



(22) Data de Depósito: 15/11/2006
(43) Data da Publicação: 13/09/2011
(RPI 2123)



C12N 7/00
A61K 39/00
A61K 48/00
A61P 31/00
A61P 35/00
C12N 1/04
C12N 15/86
C12N 7/01

(87) Publicação Internacional: WO 2007/056847de
24/05/2007

(57) Resumo: FORMULAÇÕES DE ESTABILIZAÇÃO PARA VÍRUS RECOMBINANTES. A presente invenção refere-se a preparações de vírus, por exemplo, para vacina ou outro agente farmacêutico ou uso em pesquisa, à sua estabilização e a processos de produção de tais preparações, bem como ao seu uso, por exemplo, como vacinas ou como vetores de vírus. As formulações compreendem um açúcar, um conservante, um agente dispersante, um agente de estabilidade térmica, um tampão e até três tipos distintos de aminoácidos sem impactar a aparência estrutural do produto liofilizado.

Gráfico 1: Evolução da contagem de colônias de *E. coli* em função do tempo de armazenamento em diferentes temperaturas. O gráfico mostra a contagem de colônias (CCID50/ml) no eixo Y (0 a 8) versus o tempo em semanas no eixo X (0 a 6). Seis condições são comparadas: FD (-20°C), Líquido 2-8°C, Líquido 2-6°C, Líquido 25°C, FD 25°C e Líquido 37°C. A contagem geralmente diminui com o tempo, especialmente em temperaturas mais baixas.

Tempo (semanas)	FD (-20°C)	Líquido 2-8°C	Líquido 2-6°C	Líquido 25°C	FD 25°C	Líquido 37°C
0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
1	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	4.5
2	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	1.8
3	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	0.0
4	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	4.2
5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	4.0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**FORMULAÇÕES DE ESTABILIZAÇÃO PARA VÍRUS RECOMBINANTES**".

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à preparação de vírus, por exemplo, vacina ou outro agente farmacêutico ou uso em pesquisa, à sua estabilização e a processos de produção de tais preparações, bem como ao seu uso, por exemplo, como vacinas ou como vetores de vacina.

Antecedentes da Invenção

Vários métodos são conhecidos para produção de preparações de vírus vivo para vacina e outros propósitos. Formulações e métodos úteis em congelamento, liofilização ou se não armazenamento de preparações de vírus viáveis para uso em laboratório ou vacina a fim de preservar sua atividade são também conhecidos.

Tipicamente, vírus recombinantes têm sido armazenados como péletes secos com congelamento contendo sacarose, hidrolisatos de caseína e/ou colágeno em solução salina fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Esses péletes são então reidratados em uma solução farmacêuticamente aceitável tal como NaCl a 0,4-0,9%. No entanto, existem desvantagens significativas associadas com tais formulações e são conhecidas na técnica. Dentre essas estão o uso de substâncias derivadas de animais, componentes incompletamente definidos, procedimentos de preparação complexos, alto custo e incapacidade em manter certas características desejadas do vírus.

Persiste uma necessidade na técnica de formulações adequadas para preparação de preparações de vírus estabilizadas para uso em formulações imunológicas e vacinas. É desejável prover formulações de estabilização que preservem características desejadas de um vírus, formulação imunológica ou vacina, incluindo viabilidade e infectividade do vírus. Ainda, há uma necessidade na técnica de formulações de estabilização que não sejam derivadas de produtos à base de animal devido a preocupações com relação a doenças de origem animal. É ainda desejável prover formulações de pouco volume de alto título condescendentes a tratamentos de secagem

com congelamento rápidos. Tais formulações, formulações e métodos de uso das mesmas são descritos aqui.

Breve Descrição do Desenho

Figura 1. Comparação da formulação líquida e uma modalidade da invenção, uma nova formulação (FD) F12 seca com congelamento, da estabilidade de uma preparação viral recombinante em várias temperaturas. Títulos infecciosos (CCID₅₀) de cada formulação viral foram medidos nos momentos indicados.

Sumário da Invenção

10 A presente invenção provê formulações de estabilização ("estabilizadores") para preservação de vírus, tal como vetores virais, para vários usos incluindo dentro de formulações imunológicas e vacinas. Em uma modalidade, a formulação compreende um açúcar, um conservante, um agente dispersante, um agente de estabilidade térmica, um tampão e até três tipos
15 distintos de aminoácidos (isto é, um, dois ou três tipos distintos de aminoácido(s)). Em uma modalidade, a formulação compreende três tipos distintos de aminoácidos. Em outra modalidade, a formulação compreende dois tipos distintos de aminoácidos. Em outra modalidade, a formulação compreende apenas um tipo de aminoácido. É preferido que o(s) aminoácido(s) é/sejam
20 arginina, alanina, serina ou glicina. É ainda preferido que o(s) aminoácido(s) é/sejam arginina, serina ou glicina. O vírus é adicionado à formulação de estabilização e retém características mensuráveis, particulares (isto é, viabilidade, infectividade), por uma quantidade de tempo desejada. As formulações preferidas retêm certas características desejáveis e mensuráveis tal
25 como aparência e tempos de dissolução favoráveis sob condições específicas na presença de um vírus, que são descritas abaixo. Outras modalidades da presente invenção serão evidentes a partir da descrição, exemplos e reivindicações mostrados abaixo.

Descrição Detalhada da Invenção

30 Tipicamente, vírus recombinantes tal como o vírus avipox AL-VAC têm sido armazenados como péletes secos com congelamento contendo sacarose, hidrolisatos de caseína e/ou colágeno em solução salina fisio-

lógica tamponada com fosfato (PBS). Esses péletes são então reidratados em uma solução farmacêuticamente aceitável tal como 0,4-0,9% de NaCl. No entanto, existem desvantagens significantes associadas com tais formulações e são conhecidas na técnica como sendo difíceis de trabalhar. Então, são providas aqui novas formulações de estabilização, conforme descrito abaixo.

A presente invenção provê formulações para armazenar e preservar estavelmente um vírus, incluindo um vírus recombinante, para uso como vetores de expressão, formulações imunológicas e/ou vacinas. As formulações são úteis em métodos de preparação, armazenamento e uso de tais vírus com maior facilidade, em um custo menor e sem uma diminuição significativa em atividade viral conforme comparado com as formulações atualmente disponíveis. Tais formulações podem ser referidas como "formulações de estabilização" e incluem tipicamente um açúcar (isto é, sacarose ou sorbitol, trealose, sacarose, manitol, lactose), um conservante (que pode ser um açúcar, aminoácido, outro componente), um agente de dispersão (isto é, polivinil pirrolidona 40, dextrano, PEG), um agente de estabilidade térmica (isto é, uréia), um tampão (isto é, Tris, solução salina tamponada com fosfato (PBS), fosfato de sódio, acetato, Borato, Hepes, MOPS, PEG) e um ou mais aminoácidos.

É preferido que não mais do que um, dois, três ou quatro aminoácidos estejam incluídos na formulação. Deve ser compreendido por aqueles versados na técnica que os aminoácidos referidos na descrição da invenção não incluem aminoácidos encontrados dentro ou liberados na formulação de um vírus, adjuvante ou outro componente adicionado à formulação subsequente à sua preparação. Então, os aminoácidos descritos como sendo parte da formulação estão presentes antes da adição de um vírus ou adjuvante à formulação.

Em uma modalidade mais preferida, um único aminoácido é incluído na formulação. Em uma modalidade preferida, a formulação inclui pelo menos um de arginina, serina ou glicina. Em uma modalidade mais preferida, a formulação compreende um único aminoácido que é arginina, serina

ou glicina. O(s) aminoácido(s) é/estão de preferência presentes na formulação em ou abaixo de cerca de 100 mg/ml. Com mais preferência, o(s) aminoácido(s) é/estão presentes na formulação em cerca de 90-95 mg/ml, cerca de 85-90 mg/ml, cerca de 80-85 mg/ml ou cerca de 80 mg/ml. Aminoácidos individuais estão amplamente disponíveis àqueles versados na técnica.

Uma formulação de estabilização é de preferência usada para armazenar um vírus como uma preparação líquida, preparação seca com congelamento, preparação liofilizada ou outra forma. Com relação ao líquido, é preferido que a formulação líquida seja uma formulação farmacêutica. A preparação seca com congelamento ou liofilizada é tipicamente convertida em uma forma líquida através de sua reconstituição usando um líquido, tal como um veículo farmacêuticamente aceitável. O veículo farmacêuticamente aceitável pode ser um veículo líquido que contém um tampão e um sal, por exemplo, (isto é, PBS). Exemplos de tampões e sais adequados, bem como outros tipos de veículos farmacêuticamente aceitáveis, são bem conhecidos na técnica.

Na avaliação da adequabilidade de uma formulação particular para armazenamento de uma preparação de vírus, a aparência visual da formulação foi determinada ser um indicador importante de adequabilidade. Por exemplo, as formulações mais adequadas apresentam uma camada branca, lisa, ou "torta" que não é retraída dos lados do frasco após liofilização e armazenamento em cerca de -20°C por cerca de 52 semanas. Formulações menos adequadas parecem "derretidas", "estufadas" ou de outra forma mal formadas, e retraídas dos lados do frasco após armazenamento. Conforme mostrado nos resultados experimentais apresentados abaixo, a camada branca, lisa, está associada com tempos de dissolução mais rápidos, que é uma outra característica desejável das formulações descritas aqui. A torta de camada lisa e branca é fortemente associada com uma formulação útil para preservar estavelmente um vírus.

Conforme acima discutido, tempo de dissolução é uma característica muito importante de uma formulação adequada. É preferido que, seguindo liofilização da preparação de vírus, a formulação tenha um tempo de

dissolução em um veículo farmacêuticamente aceitável tal como PBS de cerca de 20-25 segundos, cerca de 15-20 segundos ou, de preferência, cerca de 15 segundos ou menos após armazenamento por cerca de 52 semanas a cerca de 5°C. Isto provê o versado na técnica com uma formulação que é rapidamente útil no campo.

A temperatura na qual o vírus é mantido na formulação de estabilização é qualquer uma adequada para manutenção do vírus/formulação em um estado desejado (isto é, determinado através da observação da aparência, tempo de dissolução, título ou outra característica da preparação) durante o período de tempo de armazenamento (isto é, até cerca de 52 semanas). A formulação é tipicamente e mais convenientemente mantida em uma temperatura abaixo de cerca de 10°C (isto é, cerca de 5°C). Em certas situações, a formulação será mantida a -20°C.

Um pH adequado para a formulação seguindo reconstituição é qualquer pH no qual o vírus seja mantido em um estado desejado (isto é, viabilidade, título infeccioso, tempo de dissolução) durante o período de tempo de armazenamento (isto é, até cerca de 52 semanas). Por exemplo, o pH da formulação líquida é desejavelmente cerca de 6-9, 6-8,5, 6,5-8,5, 7-8,5, 7,5-8,5, 6-8, 6,5-8, 7-8, 7,5-8 ou 7-7,5. É preferido que a formulação tenha um pH de cerca de 7,5. A formulação líquida pode ser posta (por exemplo, mantida ou armazenada) em qualquer recipiente adequado. Tipicamente, o recipiente vai compreender, consistir essencialmente em ou consistir em vidro ou plástico na forma de um frasco ou outro recipiente de armazenamento.

Muitos vírus diferentes podem ser utilizados na prática da presente invenção. Vírus adequados incluem, por exemplo, Adenovírus, Arbovírus, Astrovírus, Bacteriófagos, Enterovírus, Vírus da Gastroenterite, Hantavírus, Vírus Coxsackie, Vírus da Hepatite A, Vírus da Hepatite B, Vírus da Hepatite C, Herpesvírus (por exemplo, Vírus Epstein Barr (EBV), Citomegalovírus (CMV) e Vírus Herpes Simplex (HSV)), Vírus Influenza, Vírus Norwalk, Vírus da Pólio, *Chordopoxviridae* (isto é, 5-Ortopoxvírus, vaccínia, MVA, NYAC, Avipoxvírus, *canarypox*, ALVAC, ALVAC(2), *fowlpox*, Rhabdovirus,

Reovírus, Rhinovirus, Rotavírus, Retrovírus, *Baculoviridae*, *Caliciviridae*, *Caulimoviridae*, *Coronaviridae*, *Filoviridae*, *Flaviviridae*, *Hepadnaviridae*, *Nodaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Papovaviridae*, *Parvoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Picomaviridae* e *Togaviridae*, e vírus modificados se originando de, com base em, ou substancialmente similares a qualquer um dos acima ou outro vírus adequado. Vírus preferidos para uso na prática da presente invenção são poxvírus, em particular ALVAC. Outros vírus adequados são conhecidos na técnica conforme descrito em, por exemplo, Fields e outros, *Virology* (34^a Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2001)).

Em certas modalidades, o vírus recombinante contém em seu genoma seqüência de ácido nucléico codificando um antígeno ou imunógeno, de modo que o vírus pode ser usado em uma formulação imunológica ou vacina. O termo "vírus recombinante" refere-se a qualquer vírus tendo inserido no genoma viral um gene heterólogo que não é naturalmente parte do genoma viral. Uma formulação imunológica é uma que, quando da administração a um hospedeiro, resulta em uma resposta imune direcionada ou reativa ao antígeno ou imunógeno codificado pelo vírus. Esta resposta imune pode ou não ser protetora ou prover imunidade ao hospedeiro. Uma vacina é uma formulação que faz com que o hospedeiro desenvolva uma resposta imunoprotetora direcionada ou reativa ao antígeno ou imunógeno codificado pelo hospedeiro. Respostas imunes podem ser medidas através de qualquer uma de muitas técnicas disponíveis a um versado na técnica, incluindo, mas não limitado a, ELISA, BIACORE, DOT-BLOT, técnicas de imunodifusão.

Em certos casos, o vírus recombinante pode codificar um ou mais antígenos de tumor ("TA"). TA inclui ambos antígenos associados a tumor (TAAs) e antígenos específicos de tumor (TSAs), onde uma célula cancerosa é a fonte do antígeno. Um TAA é um antígeno que é expresso na superfície de uma célula de tumor em quantidades mais altas do que é observado em células normais ou um antígeno que é expresso em células normais durante desenvolvimento fetal. Um TSA é um antígeno que é único para células de tumor e não é expresso em células normais. TA ainda inclui TAAs ou TSAs, seus fragmentos antigênicos e versões modificadas que re-

têm sua antigenicidade. TAS são tipicamente classificados em cinco categorias de acordo com seu padrão de expressão, função ou origem genética: antígenos de câncer de testículo (CT) (isto é, MAGE, NY-ESO-1); antígenos de diferenciação de melanócito (isto é, Melan A/MART-1, tirosinase, gp100);

5 antígenos mutacionais (isto é, MUM-1, p53, CDK-4); "auto- antígenos" superexpressos (isto é, HER-2/neu, p53); e antígenos virais (isto é, HPV, EBV). Para os propósitos de prática da presente invenção, um TA adequado é qualquer TA que induza ou aumente uma resposta imune antitumor em um hospedeiro ao qual TA foi administrado. TAS adequados incluem, por exem-

10 plo, gp100 (Cox e outros, *Science*, 264:716-719 (1994)), MART-1 /Melan A (Kawakami e outros, *J. Exp. Med.*, 180:347- 352 (1994)), gp75 (TRP-1) (Wang e outros, *J. Exp. Med.*, 186:1131-1140 (1996)), tirosinase (Wolfel e outros, *Eur. J. Immunol.*, 24:759-764 (1994); WO 200175117; WO 200175016; WO 2001 75007), NY-ESO-1 (WO 98/ 14464; WO 99/18206),

15 proteoglicano de melanoma (Hellstrom e outros, *J. Immunol.*, 130:1467-1472 (1983)), antígenos da família MAGE (isto é, MAGE-1,2,3,4,6 e 1 2; Van der Bruggen e outros, *Science*, 254: 1643-1647 (1991); Pat. U.S. Nos. 6.235.525), antígenos da família BAGE (Boel e outros, *Immunity*, 2: 167-175 (1995)), antígenos da família GAGE (isto é, GAGE-1 , 2; Van den Eynde e

20 outros, *J. Exp. Med.*, 182:689-698 (1995); Pat. U.S. No. 6.013.765), antígenos da família RAGE (isto é, RAGE-1 ; Gaugler e outros, *Immunogenetics*, 44:323- 330 (1996); Pat. U.S. No. 5.939.526), N-acetilglicosaminiltransferase-V (Cuilloux e outros, *J. Exp. Med.*, 183:1173-1183 (1996)), p15 (Robbins e outros, *J. Immunol.* 154:5944-5950 (1995)), β -catenina

25 (Robbins e outros, *J. Exp. Med.*, 183:1185-1192 (1996)), MUM-1 (Coulie e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7976-7980 (1995)), cinase-4 dependente de ciclina (CDK4) (Wolfel e outros, *Science*, 269:1281-1284 (1995)), p21-ras (Fossum e outros, *Int. J. Cancer*, 56:40-45 (1994)), BCR-*abl* (Bocchia e outros, *Blood*, 85:2680-2684 (1995)), p53 (Theobald e outros, *Proc.*

30 *Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11993-11997 (1995)), p185 HER2/neu (erb-B1 ; Fisk e outros, *J. Exp. Med.*, 181:2109-2117 (1995)), receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) (Harris e outros, *Breast Cancer Res. Treat.*,

29:1-2 (1994)), antígenos carcinoembrionários (CEA) (Kwong e outros, *J. Natl. Cancer Inst.*, 85:982-990 (1995) Pat. U.S. Nos. 5.756.103; 5.274.087; 5.571.710; 6.071.716; 5.698.530; 6.045.802; EP 263933; EP 346710; e, EP 784483); mucinas mutadas associadas a carcinoma (isto é, produtos de gene MUC-1; Jerome e outros, *J. Immunol.*, 151:1654-1662 (1993)); produtos de gene EBNA de EBV (isto é, EBNA-1; Rickinson e outros, *Cancer Surveys*, 13:53-80 (1992)); proteínas E7, E6 de papilomavírus humano (Ressing e outros, *J. Immunol.*, 154:5934-5943 (1995)); antígeno específico de próstata (PSA; Xue e outros, *The Prostate*, 30:73-78 (1997)); antígeno de membrana específico de próstata (PSMA; Israeli, e outros, *Cancer Res.*, 54:1807-1811 (1994)); epítomos ou antígenos idiotípicos, por exemplo, idiotipos de imunoglobulina ou idiotipos de receptor de célula T (Chen e outros, *J. Immunol.*, 153:4775-4787 (1994)); KSA (Patent eU.S. No. 5.348.887), cinesina 2 (Dietz, e outros, *Biochem Biophys Res Commun* 7 de setembro de 2000 ;275(3):731-8), HIP-55, fator antiapoptótico TGF β -1 (Toomey, e outros, *Br J Biomed Sci* 2001 ;58(3):1 77-83), proteína de tumor D52 (Bryne J.A., e outros, *Genomics*, 35:523-532 (1996)), H1FT, NY-BR-1 (WO 01 /47959), NY-BR-62, NY-BR-75, NY-BR-85, NY-BR-87, NY-BR-96 (Scanlan, M. *Serologic and Bioinformatic Approaches to the Identification of Human Tumor Antigens*, em *Cancer Vaccines 2000*, *Cancer Research Institute*, New York, NY), BCY1, BFA4, BCA4 e BFY3, incluindo versões "tipo selvagem" (isto é, normalmente codificado pelo genoma, de ocorrência natural), modificadas, mutadas bem como outros fragmentos e seus derivados. Qualquer um desses TAs pode ser utilizado sozinho ou em combinação com um ou mais outros TAs em um protocolo de co-imunização.

Em outros casos, o vírus recombinante pode codificar um antígeno ou imunógeno derivado de um organismo patogênico. Agentes de doença infecciosos exemplares incluem bactérias, vírus, fungos, parasitas e similar. Agentes infecciosos exemplares particulares incluem *Bacillus spp.* (isto é, *B. anthracis*), *Bordetella spp.* (isto é, *B. brochiseptica*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*), *Borellia* (isto é, *B. burgdorferi*), *Brucella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Chlamydia spp.* (isto é, *C. trachomatis*), *Clostridium spp.* (isto é,

- Clostridium botulinum*), *Corynebacterium* (isto é, *C. diphtheria*), *Enterobacter spp.*, *Escherichia spp.* (isto é, *E. coli*), *Haemophilus spp.* (isto é, *H. influenzae*), *Helicobacter spp.* (isto é, *H. pylori*), *Klebsiella spp.*, *Legionella spp.*, *Listeria spp.*, *Mycobacterium spp.* (isto é, *M. tuberculosis*), *Mycoplasma spp.*,
 5 *Neisseria spp.* (isto é, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*), *Nocardia spp.*, *Pasteurella spp.*, *Proteus spp.*, *Rickettsia spp.*, *Salmonella spp.* (isto é, *S. enteritidis*, *S. typhi*), *Shigella spp.* (isto é, *Shigella flexneri*), *Staphylococcus spp.* (isto é, *S. aureus*), *Streptococcus spp.* (isto é, *S. pneumoniae*), *Vibrio spp.* (isto é, *V. cholerae*), Coronavírus, CMV, vírus do Dengue, Vírus Ebola, EBV,
 10 Vírus da hepatite (isto é, Hepatites A, B, C, D, e E), Vírus do Herpes, HIV, Vírus Influenza, Vírus do sarampo, Vírus da caxumba, *Papillomavirus* (humano), *poxvirus* (isto é, vaccínia, *smallpox*), Vírus da pólio, Vírus da raiva, RSV, Vírus do Nilo Ocidental, Vírus da Febre Amarela, *Aspergillus spp.*, *Blastomyces spp.*, *Candida spp.*, *Coccidioides spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Histoplasma spp.*,
 15 *Coccidia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba spp.* (isto é, *E. histolytica*), *Giardia spp.* (isto é, *Giardia lamblia*), *Leshmania spp.*, *Plasmodium spp.*, *Schistosoma spp.*, *Toxoplasma spp.* (isto é, *Toxoplasma gondii*), *Trichinella spp.* e *Trypanosoma spp.*, dentre outros.

- Em certas modalidades, uma formulação ou vacina imunogênica
 20 da presente invenção pode ser administrada em combinação com um ou mais adjuvantes para reforçar a resposta imune. Adjuvantes exemplares são mostrados na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1- Tipos de Adjuvantes Imunológicos

Tipo de Adjuvante	Exemplos Gerais	Exemplos Específicos/Referências
1 Tipo gel	Hidróxido /fosfato de alumínio ("adjuvantes a-lum")	(Aggerbeck e Heron, 1995)
	fosfato de cálcio	(Relyveld, 1986)
2 Microbiano	Dipeptídeo Muramila (MDP)	(Chedid e outros, 1986)
	Exotoxinas bacterianas	Toxina do cólera (CT), toxina lábil de <i>E. coli</i> (LT) (Freytag e Clements, 1999)

Tipo de Adjuvante	Exemplos Gerais	Exemplos Específicos/Referências
2 Microbiano	Adjuvantes à base de endotoxina	Lipídeo monofosforila (M-PL) (Ulrich e Myers, 1995)
	Outras bactérias	Oligonucleotídeos CpG (Corral e Petray, 2000), seqüências BCG (Krieg e outros, Nature, 374:576), toxóide do tétano (Rice e outros, J. Immunol., 2001, 167:1558-1565)
3 Partículas	Microesferas de polímero biodegradável	(Gupta e outros, 1998)
	Complexos imunoestimuladores (ISCOMs)	(Morein e Bengtsson, 1999)
	Lipossomas	(Wassef e outros, 1994)
4 Adjuvantes à base de emulsão oleosa e tensoativo	Adjuvante incompleto de Freund	(Jensen e outros, 1998)
	Emulsões microfluidizadas	MF59 (Ott e outros, 1995)
		SAF (Allison e Byars, 1992) (Allison, 1999)
	Saponinas	QS-21 (Kensil, 1996)
5 Sintético	Derivados do peptídeo muramila	Murabutide (Lederer, 1986) Threony-MDP (Allison, 1997)
	Copolímeros em bloco nao-iônicos	L121 (Allison, 1999)
	Folifosfazeno (PCPP)	(Payne e outros, 1995)
	Polinucleotídeos sintéticos	Poly A: U, Poly I: C (Johnson, 1994)

A presente invenção é descrita ainda nos exemplos que seguem. Os exemplos servem apenas para ilustrar a invenção e não pretendem limitar o escopo da invenção de modo algum.

Exemplos

Formulações de Estabilização de Vírus - Materiais

Os agentes químicos, filtros e frascos que seguem foram utilizados para os experimentos descritos abaixo: Uréia (Número do Lote 101K0040 Sigma); L.Ala em pó (Número do Lote 042K0900 Sigma); MSG (Número do Lote 91K0096 Sigma). L. Arg em pó (Número do Lote 42K0183 Sigma); EAA (Número do Lote 3065605 Gibco); Glicina em pó (Número do Lote 32K2502 Sigma); Tris (Número do Lote 73378B BioRad); L. Ser em pó (Número do Lote 111K0883 Sigma); D Mannitol (Número do Lote 22K0111 Sigma); NEAA (Número do Lote 3065603 Gibco); NaCl (BDH Número do Lote 12833/MO89160); HCl concêntrico (Número do Lote 299102 BDH); Sacarose (Número do Lote 51K0026); Sacarose (Número do Lote 022K0065 Sigma, Número do Lote K27819853/0076535B Merck kGAA); PVP₄₀ (Número do Lote 120K0117, Número do Lote 71K0064 Sigma); Sorbitol (Número do Lote 51K0005 Sigma, Número do Lote 042K01351 Sigma); Ácido Glutâmico (Número do Lote 91LK0096 Sigma); Frascos (BV0030, Frasco de vidro Tubular Branco de 3 ml); Rolha (3101820, 13 mm V-32 4432/50 livre de *Gray Butyl Serum Stopper Latex*); Lacre (CS0001, Lacre de Alumínio de Uma Peça de 13 mm); Filtro 0,2 µm (Número do Lote 476291 Nalgene® AC, Número do Lote M2MN00586 ZapCap®). Vírus ALVAC vCP307 codificando o antígeno de HIV gp120, Número do Lote PX-0246 e Número do Lote PX-0230) foi utilizado como o vírus exemplar para os experimentos descritos abaixo.

Métodos - pH

Como manipulações tal como secagem com congelamento e armazenamento podem alterar o pH, determinação do pH das formulações secas com congelamento ALVAC é uma medida importante de estabilidade. O medidor de pH (VWR Scientific Products SB301, symphony) é calibrado com tampão de pH-padrão (Orion Application Solutions, Tampões de pH 7,0, 10,01 e 4,01), que ultrapassa a faixa de pH esperado da amostra. Uma porção fresca da amostra é posta em um tubo de teste e o eletrodo é imerso nela. Quando o mostrador digital mostra uma leitura constante, a leitura é

registrada para duas casas decimais.

Osmolalidade

Osmolalidade é a concentração de soluto total de uma solução aquosa. Osmômetros medem o número de partículas de soluto sem importar o peso molecular ou a carga iônica. Este estudo usou o Advanced Micro-Osmometer Modelo 3300, que se apóia na depressão de ponto de congelamento para medir a osmolalidade. Os osmômetro foi calibrado usando Padrões de Calibragem 50 mOsm/kg e 850 mOsm/kg conforme as instruções de fabricação. A calibragem foi verificada administrando Solução de referência Cilintrol 290. Amostras de 20 µL foram carregadas no êmbolo e inseridas na porta de amostra do osmômetro para medição. Quando o mostrador digital mostra uma leitura constante, a leitura é registrada.

Umidade Residual

Umidade residual (RM) é a quantidade de água ligada que permanece em um produto seco com congelamento seguindo secagem primária. A técnica Karl Fisher para teste de umidade residual, usada neste estudo, determina o teor de água através de titulação volumétrica. Isto é medido como a porcentagem em peso de água restante comparado com o peso total do produto seco. RM é um indicador de estabilidade uma vez que exposição à umidade durante armazenamento pode desestabilizar o produto. A Farmacopéia Européia (V Edição) recomenda uma RM abaixo de 3%. Esta RM ajuda a evitar desenvolvimento de microorganismo bem como prevenção de degradação química e física. O Método Coloumétrico Karl Fisher é usado com um método de teste feito para uso com o sistema de Titulação Automático Mitsubishi, Modelo CA-06, que determina o ponto final amperometricamente. Ele é operado em uma caixa estanque que é mantida em menos de 15% de umidade relativa com pentóxido fosforoso e um fluxo constante de ar seco a ~5 mL/min com uma faixa de temperatura de 20 a 25°C. Pesagens são feitas em uma balança Sartorius localizada na caixa estanque.

Título Infeccioso (CCID₅₀)

CCID₅₀ é uma técnica usada para determinar o título (infectividade) de um vírus, neste caso, título da formulação ALVAC seca com conge-

lamente seguindo dissolução. O título é refletido pela diluição de um vírus requerida para infectar 50% de uma dada batelada de culturas de célula inoculadas. O ensaio se apóia na presença e detecção de partículas de vírus citocidal (aqueles capazes de causar um efeito citopático (CPE)). Células hospedeiro são cultivadas em monocamadas saudáveis confluentes, tipicamente em placas de 96 cavidades, a quais alíquotas de diluições de vírus são adicionadas. Na incubação, o vírus replica e virions da progênie são liberados, que por sua vez infectam células saudáveis. O CPE é deixado se desenvolver durante um período de tempo, e as cavidades são classificadas quanto à presença ou ausência de CPE. O método se torna mais preciso com números altos de cavidades por diluição. Este teste é crucial para determinação da perda de atividade do vírus ALVAC atenuado durante armazenamento.

Amostras de produto seco com congelamento viral ALVAC foram serialmente tituladas em placas de 96 cavidades de acordo com o Número SOP 22 PD-039 v1.0. Uma suspensão de células QT35 (codorna) foi adicionada a cada placa de 96 cavidades. Seguindo um período de incubação de seis dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, as cavidades mostrando efeito citopático (CPE) foram contadas. A concentração do vírus no produto foi calculada usando o método de quadrados mínimos e expressa como o número de 50% de doses infectivas por ml de produto.

Ciclo de Secagem com Congelamento

Liofilização é uma técnica de desidratação onde um estado seco é atingido através de congelamento de uma substância úmida e evaporação do gelo resultante sob vácuo através de um processo de sublimação (sem fusão). Este processo é convencionalmente diluído em três estágios: pré-congelamento, secagem primária ou sublimação e secagem secundária ou dessorção. O ciclo de secagem com congelamento de 24 horas de vetores de expressão baseados em ALVAC foi executado conforme sumarizado na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2 - Ciclo de Secagem com Congelamento

Etapas	Parâmetros	Valores Programáveis
Congelamento (3 Horas)	Temperatura de Carregamento Temperatura no final do Congelamento	5°C -40°C
Sublimação (Secagem Primária) (16 Horas, 30 Minutos)	Pressão Tempo para Aumentar para a Temperatura de Prateleira Temperatura de Prateleira Duração Tempo para Aumentar para a Temperatura de Prateleira	70 µBar 1 Hora -17°C 13 Horas 2 Horas, 30 Minutos
Dessorção (Secagem Secundária) (4 Horas)	Temperatura de Prateleira Temperatura do Produto para Restabelecer um Vácuo Eficaz	45°C 25°C
Fechamento	Sob nitrogênio	Sob nitrogênio

As contribuições qualitativa e quantitativa de vários componentes em uma formulação de estabilização, tal como: aminoácidos, açúcares (sacarose, sorbitol, manitol) e polímeros (poli-vinil-pirrolidona (PVP)) foram avaliadas em formulação de estabilização diferente. Os componentes e concentrações são mostrados na Tabela 3. A estabilidade da formulação foi então avaliada usando os ensaios que seguem: aparência, tempo de dissolução, aparência pós-dissolução, expoente de hidrogênio (pH), umidade residual e infectividade (CCID₅₀).

Cada formulação de estabilização foi preparada sob condições de fluxo laminar. O pH de cada formulação foi ajustado para estar entre cerca de 7,2 e cerca de 7,4 para cada formulação. Cada formulação foi filtrada em um filtro descartável de bifluoreto de polivinila (PVDF) a 0,2 µm, marcada, recebeu um número de lote e então armazenada a 5°C até a liofilização.

Um dia antes da secagem com congelamento, coleta bruta de ALVAC (em tampão de Tris (pH 9,0) a 10 mM) foi descongelada em um banho de água a 30°C ± 2°C. Duas diluições (1/2 e 1/6) foram feitas a partir da

coleta bruta para preparar 120 ml de *Final Bulk Product* (FBP). A primeira diluição foi preparada usando o estabilizador concentrado enquanto a segunda diluição foi preparada usando uma diluição 1:2 de estabilizador com água para injeção (WFI).

5 Preparação para o processo de secagem com congelamento envolveu várias etapas. Primeiro, 400 frascos por formulação foram cheios com 0,3 mL de FPB em um isolador usando frascos de vidro de 3 ml US. Segundo, todos os frascos foram carregados em uma bandeja em quatro prateleiras diferentes e estabilizadores de secagem com congelamento cor-
10 rentes, PO6 e PO7, foram administrados como os Controles. Para prevenir colapso, cada bandeja foi localizada no meio de cada prateleira e deixada dentro a fim de evitar contato direto com prateleiras. A colocação dos frascos que continham termopares na frente da câmara permitiu monitoramento da temperatura do produto. Finalmente, o ciclo de liofilização ALVAC de 24 ho-
15 ras adaptado foi realizado (vide Materiais e Métodos).

 Seguindo a execução, os frascos foram descarregados e tampa-
dos com rolhas de Carbono de Poli vinila (PVC) também, hermeticamente
tampados com tampas Alu-Alu. Durante descarregamento, o aspecto de tor-
ta dos frascos da borda, do meio e da frente e costas da bandeja foi obser-
20 vado quanto à homogeneidade. O gráfico do secador com congelamento foi
analisado para assegurar que o ciclo realizou cada etapa sem sofrer compli-
cações. Os frascos foram então armazenados a -20°C para mais amostra-
gem e teste.

 O efeito da formulação sobre estabilidade de proteína seca com
25 congelamento foi investigado usando ambos estudos de tempo real e estabi-
lidade acelerada. Cada ensaio foi realizado em cada conjunto de cinco a-
mostras em vários pontos de tempo e várias temperaturas (-20°C, 2-8°C, 35-
39°C, em cada uma das semanas 1-6, 8, 12, 26 e 52). As características que
seguem de cada amostra foram então registradas: Aparência de Liofilizado,
30 Tempo de Dissolução, Aparência Seguindo Dissolução, pH e Título Infeccio-
so (CCID₅₀).

 Estudos de estabilidade adicionais foram então conduzidos u-

sando aquelas formulações tendo as características mais desejáveis. Cada ensaio foi realizado em cada conjunto de quatro a seis amostras em vários pontos de tempo e várias temperaturas (-20°C, 2-8°C, 37°C e 45°C, em cada um dos dias 0, 3, 7, 11, 14, 21, 25, 28, 35, 56, 84, 182 e 364). As características que seguem de cada amostra foram então registradas: Aparência do Liofilizado, Tempo de Dissolução, Aparência seguindo Dissolução, pH, Umidade Residual e Título Infeccioso (CCID₅₀). Um ponto de observação adicional foi adicionado a 45W para Controle, F12 (n=6).

Um estudo de estabilidade final das Formulações ALVAC secas com congelamento F12 (amostras de ponto de tempo extra dos estudos anteriores) foi realizado a 23-27°C no conjunto de frascos nas semanas 1, 3, 5, 8 e 12 (n=6). As formulações foram então avaliadas quanto a Título Infeccioso (CCID₅₀), pH, Tempo de Reconstituição, Aparência e Osmolalidade.

Formulações de Estabilização

Várias novas formulações de estabilização foram desenvolvidas e testadas. Os componentes incluídos em cada uma de tais formulações são mostrados na Tabela 3. Deve ser notado que cuidado particular deve ser tomado quando adicionando PVP40 à formulação. A velocidade de agitação deve ser aumentada para uma certa quantidade de tempo e então diminuída quando a PVP40 dissolver. Se a velocidade não for aumentada, agregados indesejados vão tipicamente aparecer. Tempo e velocidade para mistura dependem do volume preparado, como será compreendido por um versado na técnica.

Resultados Experimentais

Aparência do Liofilizado

Seguindo 52 semanas de armazenamento a -20°C e 5°C, a aparência do liofilizado para as formulações diferentes foi avaliada. A aparência da torta para formulações F9, F10, F11 e F12 no primeiro conjunto de experimentos condiz com as especificações requeridas (camada branca, lisa, que não é retraída das bordas do frasco). Essas especificações de aparência de "torta" requeridas indicam que a formulação é capaz de manter a integridade físico-química do vírus protegendo-o e o ambiente circundante de um even-

tual colapso ou derretimento. O colapso da torta poderia ser devido a um processo de secagem com congelamento ou condições de armazenamento agressivos tal como armazenamento a longo prazo ou alta temperatura. Foi determinado que uma formulação tendo uma aparência de torta apropriada
5 provê um ambiente adequado para estabilização de vírus. Foi determinado que a mistura dos 20 aminoácidos não-essenciais usada previamente poderia ser substituída por L-Arginina, L-Alanina, Serina e/ou Glicina em concentrações altas sem impactar a aparência estrutural do liofilizado.

Várias outras formulações pareciam estufadas/derretidas, retraídas da borda dos frascos e apresentaram uma aparência não-homogênea
10 (isto é, uma camada que não é branca, lisa); desta maneira, essas foram rejeitadas por não satisfazerem os critérios de aparência. Conforme discutido abaixo, esta aparência era associada com um tempo de dissolução alto indesejável. Cada uma dessas formulações rejeitadas não tinha um agente(s) de dispersão (isto é, polivinil pirrolidona (PVP40), sorbitol), então demonstrando o impacto significativo de tais componentes sobre a estrutura da
15 torta. A torta, para essas formulações, parecia solta ou retraída da borda dos frascos e conseqüentemente, foi também rejeitada com base nos critérios de aparência.

20 Tempo de Dissolução, Aparência após Dissolução, pH e Osmolalidade

O tempo de dissolução para as formulações F9 foi ligeiramente aumentado seguindo 52 semanas de armazenamento a -20°C e 5°C comparado com os outros estabilizadores (F10-12), que dissolveram em menos de 15 segundos. Cada frasco foi reconstituído com 1 ml de NaCl a 0,4% e misturado manualmente até dissolução da torta toda. Foi concluído que a inclusão de PVP40 afeta positivamente o tempo de dissolução do produto final.
25 Para aquelas amostras armazenadas sob condições de estresse (35-27°C), o tempo de dissolução foi consideravelmente aumentado para todas as formulações, de 15 segundos a mais de um minuto. Ainda, onde a aparência da torta era derretida, o produto grudou nos frascos tornando difícil reconstituir o liofilizado.
30

Para todas as formulações sob todas as condições testadas, o

pH permanece estável entre $7,5 \pm 0,5$ unidade.

Para formulações F12, a osmolalidade variou entre 350 ± 100 mOsm/kg.

Umidade Residual (RM)

- 5 Para as formulações F12 os resultados de Umidade Residual foram $<3\%$ e obedientes às recomendações da Farmacopéia Européia (V Edição). As outras formulações não foram testadas.

Tabela 4 - Umidade Residual - Formulações F12

Formulação	Amostra	Água		
		Primeira rodada CA-03-031	Segunda rodada CA-03-044	Terceira rodada CA-03-059
F12	2	1,47	1,19	0,99
	2	1,34	1,20	1,08
	3	1,48	1,25	1,02

Título Infeccioso

- 10 Uma diminuição significativa na atividade viral é considerada uma queda em atividade de mais do que cerca de 10-20%. Todas as formulações pareciam manter o título infeccioso, seguindo 52 semanas de armazenamento a -20° e $2-8^{\circ}\text{C}$, sem nenhuma perda significativa observada. Todas as formulações testadas eram similares ao Controle confirmando a precisão do método ($\pm 0,3 \log 10 \text{ CCID}_{50}/\text{ml}$).
- 15 Em condições de estresse, o título infeccioso do Controle e das formulações testadas foi mantido pelas 8 semanas completas de armazenamento a $35-37^{\circ}\text{C}$.

Estabilidade de formulações líquidas vs. secas com congelamento

- 20 Dado os resultados descritos acima, F12 (seca com congelamento) foi selecionada para comparação com a formulação líquida (ALVAC em Tris-HCl a 10 mM, NaCl a 0,9%, pH 9,0). Essas formulações foram comparadas quanto à estabilidade de título em ambos "tempo real" ($2-8^{\circ}\text{C}$) e sob condições de estresse ou aceleradas ($23-25^{\circ}\text{C}$ e $35-39^{\circ}\text{C}$) e comparadas com condições de controle (-70°C e -20°C). Ambas formulações foram preparadas com volume igual e quantidades iguais de coleta purificada de AL-
- 25 VAC. Título foi medido usando o ensaio CCID_{50} . Conforme mostrado na figu-

ra 1, F12 seca com congelamento mostrou títulos similares à formulação líquida em 2-8°C (bem como temperaturas de controle -20°C e -70°C) e títulos superiores à formulação líquida a 25°C e 37°C. Dado o fato que F12 é uma formulação seca com congelamento, que é o formato de formulação
5 favorecido por aqueles versados na técnica, pode ser concluído que F12 é superior à formulação líquida previamente disponível.

Os estudos descreveram aqui que um agente de dispersão tal como PVP40 e/ou sorbitol é essencial para manter a aparência da formulação seca com congelamento (isto é, a "torta"), que é funcionalmente previsi-
10 va de propriedades de dissolução desejadas. Ainda, é aparente que a mistura previamente utilizada dos 20 aminoácidos essenciais e não-essenciais pode ser substituída por L-Arginina, L-Alanina, Serina e/ou Glicina em altas concentrações sem impactar a aparência estrutural do liofilizado enquanto mantendo título infeccioso. Isto é especialmente significativo pelo fato de que
15 simplifica o processo de preparação de formulação e reduz custos associados com ele. Resultados baseados nos dados de título infeccioso não indicaram nenhuma diferença significativa entre as várias formulações. Todas as formulações eram capazes de manter um título infeccioso por 52 semanas a 2-8°C.

20 Embora a presente invenção tenha sido descrita em termos das modalidades preferidas, é compreendido que variações e modificações vão ocorrer àqueles versados na técnica. Deste modo, é pretendido que as reivindicações apenas cubram todas tais variações equivalentes que estejam dentro do escopo da invenção conforme reivindicado.

25 Tabela 3 (1ª parte)

Formulações Qualitativas e Quantitativas

Formulação	EAA	NE-AA	Sacaro-se	Sorbi-tol	MSG	PVP40	Tris	U-réia	Ma-nitol
Controle	40	40	10	10	1	2	1,452	1	0
F9	0	0	10	10	1	2	1,452	1	0
F10	0	0	10	10	1	2	1,452	1	0
F11	0	0	10	10	1	2	1,452	1	0
F12	0	0	10	10	1	2	1,452	1	0

Tabela 3 (2ª parte)

Formula- ção	L.Arg	L.Ala	L.Ser	Gly	Tempo de dissolução de 52 sema- nas @ 5°C	Aparência	
						-20°C	5°C
Controle	0	0	0	0	5-12	camada branca, torta lisa	camada retrátil ou branca, torta lisa
F9	0	80	0	0	29	camada branca, torta lisa	camada branca, torta lisa
F10	80	0	0	0	15	camada branca, torta lisa	camada branca, torta lisa
F11	0	0	80	0	15	camada branca, torta lisa	Retrátil
F12	0	0	0	80	15	camada branca, torta lisa	camada branca, torta lisa

REIVINDICAÇÕES

- 5 1. Formulação para manutenção de um vírus em uma forma estável, a formulação compreendendo um açúcar, um conservante, um agente dispersante, um agente de estabilidade térmica, um tampão e até três tipos distintos de aminoácido.
2. Formulação para manutenção de um vírus em uma forma estável, a formulação compreendendo um açúcar, um conservante, um agente dispersante, um agente de estabilidade térmica, um tampão e até dois tipos distintos de aminoácidos.
- 10 3. Formulação para manutenção de um vírus em uma forma estável, a formulação compreendendo um açúcar, um conservante, um agente dispersante, um agente de estabilidade térmica, um tampão e um tipo único de aminoácido.
4. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o açúcar é sacarose ou sorbitol.
- 15 5. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, onde o tampão é Tris.
6. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, onde o agente dispersante é polivinil pirrolidona.
- 20 7. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, onde o agente dispersante é polivinil pirrolidona 40.
8. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, onde o aminoácido é selecionado de arginina, serina e glicina.
9. Formulação de acordo com a reivindicação 8, onde o aminoácido é arginina.
- 25 10. Formulação de acordo com a reivindicação 8, onde o aminoácido é serina.
11. Formulação de acordo com a reivindicação 8, onde o aminoácido é glicina.
- 30 12. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, onde o aminoácido está presente na formulação em uma concentração de menos do que cerca de 100 mg/ml.

13. Formulação de acordo com a reivindicação 12, onde o aminoácido está presente na formulação em uma concentração de cerca de 80 mg/ml.

14. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13 tendo um tempo de dissolução de 15 segundos ou menos a 5°C.

15. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, aparecendo quando da liofilização como uma camada branca de material, lisa, após armazenamento em cerca de -20°C por cerca de 52 semanas.

16. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, tendo um tempo de dissolução de 15 segundos ou menos a 5°C e aparecendo quando da liofilização como uma camada branca de material, lisa, após armazenamento em cerca de -20°C por cerca de 52 semanas.

17. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16 compreendendo ainda um vírus recombinante.

18. Formulação de acordo com a reivindicação 17, onde o vírus é selecionado do grupo consistindo em adenovírus, vírus influenza, poxvírus e retrovírus.

19. Formulação de acordo com a reivindicação 18, onde o vírus é um poxvírus.

20. Formulação de acordo com a reivindicação 19, onde o poxvírus é um vírus ortopox ou um vírus avipox.

21. Formulação de acordo com a reivindicação 20, onde o vírus ortopox é selecionado do grupo consistindo em vaccínia, MVA ou NYVAC.

22. Formulação de acordo com a reivindicação 20, onde o vírus avipox é selecionado do grupo consistindo em *canarypox*, *fowlpox*, TROVAC, ALVAC e ALVAC(2).

23. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 22, onde o vírus recombinante inclui dentro de seu genoma pelo menos uma sequência de ácido nucléico codificando um antígeno relacionado com um organismo patogênico ou câncer.

24. Formulação de acordo com a reivindicação 23, onde o orga-

nismo patogênico é selecionado do grupo consistindo em *Bacillus spp.*, *Bordetella spp.*, *Borellia spp.*, *Brucella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Chlamydia spp.*, *Clostridium spp.*, *Corynebacterium*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia spp.*, *Haemophilus spp.*, *Helicobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Legionella spp.*,
 5 *Listeria spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Neisseria spp.*, *Nocardia spp.*, *Pasteurella spp.*, *Proteus spp.*, *Rickettsia spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Vibrio spp.*, Coronavírus, CMV, vírus da Dengue, vírus Ebola, EBV, vírus da Hepatite, vírus do Herpes, HIV, vírus Influenza, vírus do sarampo, vírus da Caxumba, Papilomavírus, poxvírus, vírus da pólio, vírus da raiva, RSV, vírus do Nilo Ocidental, Vírus da Febre Amarela, *Aspergillus spp.*, *Blastomyces spp.*, *Candida spp.*, *Coccidioides spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Histoplasma spp.*, *Coccidia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba spp.*, *Giardia spp.*, *Leshmania spp.*, *Plasmodium spp.*, *Schistosoma spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Trichinella spp.* e *Trypanosoma spp.*
 15

25. Formulação de acordo com a reivindicação 24, onde o agente infeccioso é selecionado do grupo consistindo em *B. anthracis*, *B. brochi-septica*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*, *B. burgdorferi*, *C. trachomatis*, *Clostridium botulinum*, *C. diphtheria*, *E. coli*, *H. influenzae*, *H. pylori*, *M. tuberculosis*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *S. enteritidis*, *S. typhi*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *V. cholerae*, Hepatite A, Hepatite B, Hepatite C, Hepatite D, Hepatite E, vírus vaccínia, vírus *smallpox*, *E. histolytica*, *Ciardia lamblia* e *Toxoplasma gondii*.
 20

26. Formulação de acordo com a reivindicação 23, onde o câncer é selecionado do grupo consistindo em câncer de colo, reto, mama, pele, pulmão, cérebro e sangue.
 25

27. Formulação de acordo com a reivindicação 23, onde a sequência de ácido nucléico codifica um antígeno de tumor.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, onde o antígeno
 30 de tumor é selecionado do grupo consistindo em gp100, MART-1/Melan A, gp75 (TRP-1), tirosinase, proteoglicano de melanoma, antígeno da família MAGE, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-12, um an-

tígeno da família BAGE, um antígeno da família GAGE, GAGE-1, GAGE-2, um antígeno da família RAGE, RAGE-1, N-acetilglicosaminiltransferase-V, p15, β -catenina, MUM-1, cinase-4 dependente de ciclina, p21-*ras*, BCR-*abl*, p53, p185 HER2/neu, receptor de fator de crescimento epidermal, antígeno carcinoembrionário (CEA), uma mucina mutada associada com carcinoma, um produto de gene MUC-1, um produto do gene EBNA do Vírus Epstein-Barr, papilomavírus E7, papilomavírus E6, antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) um antígeno idiótípico, KSA, cinesina-2, HIP-55, fator antiapoptótico TGF β -1, proteína de tumor D52,

H1FT, NY-BR-1, NY-BR-62, NY-BR-75, NY-BR-85, NY-BR-87, NY-BR-96, BCY1, BFA4, BCY3, BCZ4, seus fragmentos e seus derivados.

29. Formulação imunológica compreendendo uma formulação como definida uma das reivindicações 17 a 28.

30. Formulação imunológica de acordo com a reivindicação 29, compreendendo ainda um adjuvante.

31. Vacina para uso humano ou animal compreendendo uma formulação como definida em qualquer uma das reivindicações 17 a 28.

32. Vacina de acordo com a reivindicação 31, compreendendo ainda um adjuvante.

33. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 32, onde a formulação é seca com congelamento ou liofilizada.

34. Método para tratamento ou prevenção de uma condição de doença compreendendo reconstituição em um tampão fisiologicamente aceitável de uma formulação liofilizada como definida em qualquer uma das reivindicações 17 a 33 e administração da formulação a um hospedeiro.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, onde a condição de doença é câncer ou é causada por um organismo patogênico.

36. Método de acordo com a reivindicação 35, onde a espécie de organismo patogênico é selecionada do grupo consistindo em *Bacillus spp.*, *Bordetella spp.*, *Borellia spp.*, *Brucella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Chlamydia spp.*, *Clostridium spp.*, *Corynebacterium*, *Enterobacter spp.*, *Esche-*

- richia spp.*, *Haemophilus spp.*, *Helicobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Legionella spp.*, *Listeria spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Neisseria spp.*, *Nocardia spp.*, *Pasteurella spp.*, *Proteus spp.*, *Rickettsia spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Vibrio spp.*,
- 5 Coronavírus, CMV, vírus da Dengue, vírus Ebola, EBV, vírus da Hepatite, vírus do Herpes, HIV, vírus Influenza, vírus do Sarampo, vírus da Caxumba, Papilomavírus, poxvírus, vírus da pólio, vírus da raiva, RSV, vírus do Nilo Ocidental, Vírus da Febre Amarela, *Aspergillus spp.*, *Blastomyces spp.*, *Candida spp.*, *Coccidioides spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Histoplasma spp.*, *Coccidia spp.*,
- 10 *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba spp.*, *Giardia spp.*, *Leshmania spp.*, *Plasmodium spp.*, *Schistosoma spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Trichinella spp.* e *Trypanosoma spp.*

37. Método de acordo com a reivindicação 37, onde o agente infeccioso é selecionado do grupo consistindo em *B. anthracis*, *B. brochiseptica*, *B. paraptussis*, *B. pertussis*, *B. burgdorferi*, *C. trachomatis*, *Clostridium botulinum*, *C. diphtheria*, *E. coli*, *H. influenzae*, *H. pylori*, *M. tuberculosis*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *S. enteritidis*, *S. typhi*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *V. cholerae*, Hepatite A, Hepatite B, Hepatite C, Hepatite D, Hepatite E, vírus vaccinia, vírus smallpox, *E. histolytica*, *Ciardia lamblia* e *Toxoplasma gondii*.
- 15 20

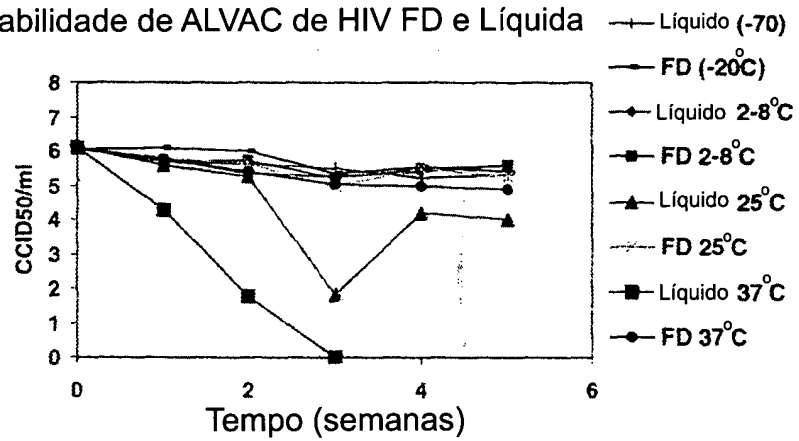
38. Método de acordo com a reivindicação 35, onde o câncer é selecionado do grupo consistindo em câncer do colo, reto, mama, pele, pulmão, cérebro e sangue.

39. Método de acordo com a reivindicação 35, onde o vírus recombinante compreende dentro de seu genoma um ácido nucléico codificando um antígeno de tumor.
- 25

40. Método de acordo com a reivindicação 39, onde o antígeno de tumor é selecionado do grupo consistindo em gp100, MART-1/Melan A, gp75 (TRP-1), tirosinase, proteoglicano de melanoma, antígeno da família MAGE, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-12, um antígeno da família BAGE, um antígeno da família GAGE, GAGE-1, GAGE-2, um antígeno da família RAGE, RAGE-1, N-acetilglicosaminiltransferase-V,
- 30

- p15, β -catenina, MUM-1, cinase-4 dependente de ciclina, p21-*ras*, BCR-*abl*, p53, p185 HER2/neu, receptor de fator de crescimento epidermal, antígeno carcinoembrionário (CEA), uma mucina mutada associada com carcinoma, um produto de gene MUC-1, um produto do gene EBNA do Vírus Epstein-
- 5 Barr, papilomavírus E7, papilomavírus E6, antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) um antígeno idiótípico, KSA, cinesina-2, HIP-55, fator antiapoptótico TGF β -1, proteína de tumor D52,
- H1FT, NY-BR-1, NY-BR-62, NY-BR-75, NY-BR-85, NY-BR-87,
- 10 NY-BR-96, BCY1, BFA4, BCY3, BCZ4, seus fragmentos e seus derivados.

Estabilidade de ALVAC de HIV FD e Líquida



P.06/8850-8

RESUMO

Patente de Invenção: "FORMULAÇÕES DE ESTABILIZAÇÃO PARA VÍRUS RECOMBINANTES".

5 A presente invenção refere-se a preparações de vírus, por exemplo, para vacina ou outro agente farmacêutico ou uso em pesquisa, à sua estabilização e a processos de produção de tais preparações, bem como ao seu uso, por exemplo, como vacinas ou como vetores de vírus. As formulações compreendem um açúcar, um conservante, um agente dispersante, um agente de estabilidade térmica, um tampão e até três tipos distintos de aminoácidos sem impactar a aparência estrutural do produto liofilizado.

10