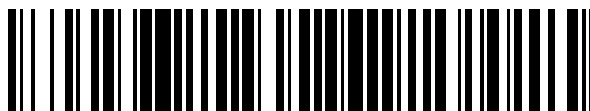


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 238**

51 Int. Cl.:
A61K 39/155 (2006.01)
A61K 39/175 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06814694 .3**
96 Fecha de presentación: **15.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1954308**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2008**

54 Título: **ESTABILIZADORES PARA VACUNAS LIOFILIZADAS.**

30 Prioridad:
16.09.2005 US 717640 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2012

73 Titular/es:
MERIAL LTD.
3239 SATELLITE BLVD.
DULUTH, GA 30096, US

72 Inventor/es:
BELIN-POPOT, Delphine, Magali y
GENIN, Noel Yves Henri, Jean

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 373 238 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Estabilizadores para vacunas liofilizadas

SECTOR DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención se refiere en general a los sectores de inmunología y tecnología de vacunas. Más específicamente, la presente invención se refiere a estabilizadores para composiciones inmunógenas y/o de vacunas vivas atenuadas liofilizadas que pueden comprender, entre otros, al paramixovirus canino. La invención se refiere también a composiciones inmunógenas y/o de vacunas vivas atenuadas liofilizadas estabilizadas, de, por ejemplo, el paramixovirus canino, que puede contener a estos estabilizadores. Otros aspectos de la invención se describen en la descripción siguiente o resultan obvias a partir de esta, y están en el ámbito de la invención.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las composiciones inmunógenas y de vacunas que comprenden ingredientes biológicos, tales como virus, bacterias, parásitos, hongos, proteínas, polipéptidos, glicoproteínas, y especialmente, microorganismos vivos atenuados, son marcadamente sensibles a las condiciones en que son preparadas, formuladas y almacenadas.

15 [0003] Estos ingredientes biológicos pueden modificarse y degradarse mediante reacciones químicas (por ejemplo hidrólisis, desaminación, Reacción de Maillard), muchas de las cuales se median por agua. El agua líquida permite movimientos moleculares y puede dar como resultado la modificación de conformaciones de proteína en composiciones que comprenden ingredientes biológicos. Limitando el acceso al agua o retirándola, se reducen en un factor mayor la modificación y la degradación. Los procedimientos anteriores para conferir estabilidad a los ingredientes biológicos implicaban principalmente congelar el agua o retirar agua para liofilizar.

20 [0004] La liofilización, o el proceso de liofilización, es una técnica de uso común para retirar agua en la preparación de productos deshidratados. En general, "liofilizar" una composición acuosa implica tres etapas. Primero, se congela la composición acuosa en condiciones de baja temperatura. En segundo lugar, se retira el agua congelada por sublimación en condiciones de presión reducida y baja temperatura. En esta etapa, la composición suele contener aproximadamente 15% de agua. En tercer lugar, el agua residual también se retira por desorción en condiciones de presión reducida y temperaturas mayores. Al final del proceso de liofilización, se obtiene un producto liofilizado, también llamado "pastilla" o "torta". El producto liofilizado contiene muy poca agua residual (que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% peso/ peso) y un material seco con forma amorfa. Este estado específico se califica como "vítreo".

30 [0005] Sin embargo, se observa una sustancial pérdida de actividad inmunogénica de ingredientes biológicos durante las etapas de preparación, tales como antes de y durante la liofilización, y también durante el almacenamiento de composiciones inmunógenas y de vacuna. La integridad de los ingredientes biológicos debe salvaguardarse para asegurar que se mantienen la eficiencia de inmunización de las composiciones inmunógenas y de las vacunas. La actividad inmunogénica de los ingredientes biológicos se mide por la capacidad para inducir y estimular una respuesta inmunológica cuando se administra a un huésped o sujeto.

35 [0006] Para limitar la manipulación de sujetos y el número de administraciones, hay una gran necesidad en el estado de la técnica de disponer de composiciones inmunógenas o de vacunas multivalentes. Por definición, una composición inmunógena multivalente o composición de vacuna comprende más de un componente inmunógeno activo procedente de, o derivado de, al menos dos diferentes patógenos. Los virus de diferentes generaciones pueden variar en estabilidad durante la etapa de liofilización y el posterior período de almacenamiento, lo que resulta en una pérdida de viabilidad o infectividad. En el caso de virus tales como el paramixovirus canino, los componentes inmunógenos activos comúnmente administrados son virus vivos atenuados. Para estimular eficientemente el sistema inmune, los virus vivos atenuados se tienen que replicar en el sujeto inmunizado. La pérdida de viabilidad o infectividad puede ocurrir durante el proceso de liofilización de las composiciones inmunógenas o de vacunas multivalentes, durante el almacenamiento de las composiciones, o antes de la administración de las composiciones después de la reconstitución. Por lo tanto, se añaden estabilizadores a estas composiciones liofilizadas. Sin embargo, para obtener composiciones inmunógenas o de vacunas multivalentes que mantienen su infectividad y/o viabilidad, sería especialmente ventajoso un estabilizador común que sea capaz de preservar la viabilidad y la infectividad de diferentes patógenos vivos atenuados.

50 [0007] La estabilización de ingredientes biológicos en forma seca implicaba típicamente la preservación de antitoxinas, antígenos y bacterias (Flosodort y otros (1935) J. immunol. 29, 389). Sin embargo, una limitación de este proceso incluía la desnaturalización parcial de proteínas cuando se secan a partir de un estado acuoso a temperatura ambiente. El secado a partir del estado congelado contribuye a reducir la desnaturalización y conduce a una mejor, aunque incompleta, preservación de los ingredientes biológicos incluyendo las bacterias y los virus (Stamp y otros. (1947) J. Gen. Microbiol. 1, 251; Rightsel y otros. (1967) cryobiology 3, 423; Rowe y otros. (1971) cryobiology 8, 251).

[0008] Más recientemente, se han añadido azúcares tales como sacarosa, rafinosa y trehalosa en varias combinaciones como estabilizadores antes de la liofilización de los virus. Se ha verificado para un gran número de

- compuestos su capacidad para estabilizar diferentes vacunas que contienen ingredientes biológicos vivos atenuados, en particular virus. Estos compuestos incluyen SPGA (sacarosa, fosfato, glutamato, y albúmina; Bovarnick y otros. (1950) J. Bacteriol. 59, 509-522; La patente americana número 4,000,256), albúmina de suero bovino o humano, sales de metales alcalinos de ácido glutámico, sales de aluminio, sacarosa, gelatina, almidón, lactosa, sorbitol, Tris-EDTA, hidrolizado de caseína, lactobionato de sodio y potasio, y fosfato de metal alcalino monometálico o bimetálico. Otros compuestos incluyen, por ejemplo, SPG-NZ-amina (ver por ejemplo la patente americana número 3,783,098) y mezclas de polivinilpirrolidona (PVP) (ver por ejemplo la patente americana número 3,915,794).
- 5
- 10 **[0009]** Las composiciones de vacuna e inmunógenas han tenido un enorme impacto en la salud pública reduciendo la morbilidad y la mortalidad causadas por una variedad de patógenos virulentos. Sin embargo, los efectos secundarios no deseados provocados por los aditivos de las composiciones inmunógenas y de vacunas siguen suponiendo un riesgo potencial que pueden superar cualquier atributo de protección y terapéutico de las composiciones inmunógenas y de vacunas.
- 15 **[0010]** En la forma frecuentemente utilizada en vacunas en los Estados Unidos, la gelatina puede provocar reacciones alérgicas graves entre aproximadamente 1 de 2 millones de dosis. Las reacciones alérgicas que previamente se creían originadas por la albúmina (proteína del huevo) están más probablemente causadas por la gelatina de la propia vacuna. En el caso de la albúmina del suero humano, aunque no se haya asociado enfermedad alguna a la albúmina del suero humano en vacunas, hay riesgo de transmisión de un virus a través de esta proteína, que se deriva de la sangre humana.
- 20 **[0011]** Los productos de origen bovino, tales como la albúmina y la gelatina bovinas, llevan consigo el riesgo de transmisión de la enfermedad Creutzfeld- Jakob (también conocida como "Enfermedad de las vacas locas") a través de la sangre y productos de tejidos conjuntivos de buey empleados en la fabricación de vacunas. Sin embargo, no se ha informado de casos donde la CJD se transmitió a través de sangre y productos de tejidos conjuntivos, no se han encontrado priones causantes de la CJD en la sangre o en tejido conjuntivo, y la utilización de productos
- 25 derivados de bovino de vacas importadas de países donde son conocidos casos de Enfermedad de las vacas locas está prohibida. Sin embargo, a la vista de estos riesgos, se han realizado esfuerzos para eliminar la utilización de estos productos en composiciones inmunógenas en las que se han observado efectos inmunes no deseados.
- 30 **[0012]** De Rizzo (de Rizzo y otros. (1989) Bull. Pan. Am. Health Organ. 23(3), 299-305) informan acerca de preparaciones liofilizadas de virus de sarampión que contienen soluciones de sorbitol, gelatina o ácido glutámico-lactosa. Estas preparaciones se almacenaron a 20°C y sus títulos virales se determinaron durante un período de almacenamiento de 21 meses. Los datos resultantes indicaban que los virus liofilizados sin estabilizador son estables cuando se almacenan a -20°C durante un período de 21 meses. Además, es bien conocido que los virus de sarampión liofilizados son estables cuando se almacenan a -20°C y pueden retener su potencia sin prácticamente pérdidas durante muchos años (Gray A., (1978) Dev. Biol. Stand. 41, 265-266). Sin embargo, estos resultados se obtuvieron a -20°C donde los virus de sarampión liofilizados son estables y no muestran un efecto estabilizador
- 35 adicional. Estos resultados solamente muestran que las soluciones de sorbitol, gelatina y ácido glutámico-lactosa no tienen efectos negativos en la estabilidad de los virus de sarampión almacenados en forma liofilizada a -20°C.
- 40 **[0013]** Precausta (Precausta et al (1980) J. Clin. Microbiol. 12(4), 483-489) examinaron los efectos de la humedad residual y el sellado de la atmósfera en el título de infectividad del virus de la enfermedad de virus Carré canino (CDV también llamado moquillo) y del virus de la bronquitis infecciosa (IBV) después de liofilizar. Se añadió una solución de lactosa a la preparación de CDV a una concentración final de 75 mg/ml, mientras que la vacuna de IBV contenía 40 mg de manitol por ml. Cuando se comparó el título de CDV antes de liofilizar con el título después de liofilizar y después de 12 meses de almacenamiento a 6°C, el título de CDV descendió de 10^{1.6} a 10^{2.0} CCID₅₀/ml, lo cual reflejaba una reducción en el título de CDV muy significativa.
- 45 **[0014]** Estos estabilizadores comprendían a menudo componentes que no son deseables para la administración en un sujeto, debido a problemas de seguridad y a efectos secundarios adversos. Consecuentemente, hay una necesidad de nuevos estabilizadores y procedimientos para preservar la viabilidad e infectividad de ingredientes biológicos en forma liofilizada, que sean seguros y adecuados para la inyección a sujetos y que tengan un buen aspecto.
- 50 **[0015]** Se incluyen en el estado de la técnica EP872249 que describe la estabilización de un virus liofilizado (MoMLV) con por ejemplo glucosa, ácido ascórbico, o glutamato de sodio y glucosa; WO2005066333 que describe la estabilización de ALVAC (un virus del canario) con composiciones que incluyen ácido aspártico; y WO0077043, que describe vacunas basadas en ADN por separado que contiene inmunógenos contra la CDV y la cPi2.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 55 **[0016]** La presente invención satisface la necesidad en el estado de la técnica proporcionando, entre otros, nuevos estabilizadores para composiciones inmunógenas o de vacunas liofilizadas vivas atenuadas, que puede comprender el virus de la enfermedad de Carré canino (CDV) y del virus de la parainfluenza de tipo 2 canino (cPi2) vivos atenuados. Estos estabilizadores pueden mantener la viabilidad e infectividad del paramixovirus canino además de

otros virus, patógenos, y componentes inmunógenos activos, notablemente durante el proceso de liofilización y durante un largo período de almacenamiento de los productos liofilizados ya sea a temperaturas refrigeradas o a temperatura ambiente, en particular entre temperaturas que van desde aproximadamente 4°C a aproximadamente 25°C. De manera importante, los estabilizadores para composiciones inmunógenas o de vacunas liofilizadas 5 estabilizados vivas atenuadas aquí reivindicados son seguros y adecuados para la inyección a sujetos después de la reconstitución. Estas composiciones inmunógenas liofilizadas estabilizadas pueden comprender pastillas o tortas con buen aspecto, es decir, que tienen forma regular y color uniforme.

[0017] Los estabilizadores de la presente invención están ventajosamente libres de ingredientes de origen animal, en particular libres de albúmina de suero de origen humano o bovino, lactoalbúmina y gelatina. De esta manera, se 10 minimiza o elimina cualquier riesgo biológico potencial de, por ejemplo, reacciones alérgicas que resultan de alergias a la gelatina o a la albúmina, tal como la urticaria y la anafilaxis, y la transmisión de enfermedades de encefalitis espongiforme, notablemente de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) o encefalitis espongiforme bovina (BSE; también conocida como Enfermedad de las vacas locas).

[0018] Por consiguiente, la presente invención proporciona lo siguiente:

- 15 1. Un estabilizador para una composición inmunógena liofilizada del virus de la enfermedad de Carré canino (CDV) y del virus de la parainfluenza de tipo 2 canino (cPi2) vivos atenuados que comprende al menos un monosacárido reductor y al menos un compuesto antioxidante ácido, en el que dicho al menos un compuesto antioxidante ácido comprende ácido aspártico; y en el que dicho al menos un monosacárido reductor comprende 20 glucosa, galactosa, fructosa, manosa, sorbosa, o combinaciones de estas; y en el que al menos un monosacárido reductor está presente con una concentración que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p y dicho al menos un ácido antioxidante está presente con una concentración que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 6% en p/p;
2. El estabilizador de 1, que comprende además
 - (a) al menos un agente de carga o
 - 25 (b) al menos un agente de carga en el que dicho al menos un agente de carga comprende dextrano, maltodextrina, polivinilpirrolidona, hidroxietil almidón, o combinaciones de estas o
 - (c) al menos un alcohol de azúcar o
 - (d) al menos un alcohol de azúcar en el que el alcohol de azúcar comprende sorbitol, manitol xilitol, maltitol o combinaciones de estos o
 - 30 (e) al menos un oligosacárido no reductor o
 - (f) al menos un oligosacárido no reductor en el que dicho al menos un oligosacárido no reductor comprende trehalosa, sacarosa, rafinosa o combinaciones de estos o
 - (g) al menos un alcohol de azúcar y al menos un oligosacárido no reductor o
 - 35 (h) al menos un alcohol de azúcar y al menos un oligosacárido no reductor en el que dicho al menos un alcohol de azúcar comprende sorbitol, manitol xilitol, maltitol o combinaciones de estas, y en el que dicho al menos un oligosacárido no reductor comprende trehalosa, sacarosa, rafinosa o combinaciones de estos;
3. Suspensión o solución inmunógena que comprende paramixovirus vivos atenuados que comprende CDV y cPi2, mezclados con el estabilizador de 1 o 2;
- 40 4. La suspensión o solución inmunógena de 3, en el que la suspensión o solución inmunógena es una suspensión o solución inmunógena multivalente que comprende además al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno diferente del paramixovirus;
5. La suspensión o solución inmunógena de 4, en el que
 - 45 (a) dicho al menos un componente inmunógeno activo es un derivado de un patógeno que comprende Adenoviridae, Parvoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Rhabdoviridae, o combinaciones de estos o
 - (b) dicho al menos un componente inmunógeno activo comprende el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) vivo atenuado y el parvovirus canino (CPV) vivo atenuado o
 - (c) dicho al menos un componente inmunógeno activo comprende un vector vírico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos o

(d) dicho al menos un componente inmunógeno activo comprende un vector plasmídico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos;

6. La suspensión o solución inmunógena de 3, de 4 o de 5, en la que el estabilizador comprende

(a) al menos un monosacárido reductor a una concentración final que va desde

- 5 aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v o
aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v o
aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v o
aproximadamente 2.5% a aproximadamente 3% en p/v o
aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v o

10 (b) al menos un compuesto antioxidante ácido a una concentración final que va desde

- aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.25% en p/v o de
aproximadamente 0.2% en p/v o

que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 7.5% en p/v o

15 (c) al menos un agente de carga a una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v o

(d) al menos un alcohol de azúcar a una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v y al menos un monosacárido reductor, con la condición de que la concentración final de dicho al menos un monosacárido reductor y dicho al menos un alcohol de azúcar sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v o

20 (e) al menos un oligosacárido no reductor cuya concentración final va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v y al menos un monosacárido reductor, con la condición de que la concentración final del monosacárido reductor y del oligosacárido no reductor sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v o

25 (f) al menos un alcohol de azúcar a una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v, al menos un oligosacárido no reductor a una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v, y al menos un monosacárido reductor, con la condición de que la concentración final de monosacárido reductor, alcohol de azúcar y oligosacárido no reductor sea inferior o igual a aproximadamente 12.5% en p/v;

7. La suspensión o solución inmunógena de 3, de 4 o de 5, en el que el estabilizador comprende:

30 (a) (i) una concentración final desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v de una mezcla de dos monosacáridos reductores, (ii) una concentración final desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v de al menos un ácido antioxidante, y (iii) una concentración final desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 7.5% p/v de al menos un agente de carga o

35 (b) (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un oligosacárido no reductor, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v de al menos un ácido antioxidante, y (iv) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 7.5% p/v de al menos un agente de carga, con la condición de que la concentración final de (i) y (ii) sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v o

40 (c) (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 2.5% en p/v de al menos un oligosacárido no reductor, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.25% en p/v de al menos un ácido antioxidante, y (iv) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un agente de carga, con la condición de que la concentración final de (i) y (ii) sea inferior o igual a aproximadamente 5% en p/v o

45 (d) (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un alcohol de azúcar, (iii) una concentración final que va desde

50

aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v de al menos un ácido antioxidante, con la condición de que la concentración final de (i) y (ii) sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v o

5 (e) (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 3% en p/v de al menos un alcohol de azúcar, y (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.25% en p/v de al menos un ácido antioxidante, con la condición de que la concentración final de (i) y (ii) sea inferior o igual a aproximadamente 5% en p/v o

10 (f) (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1 % a aproximadamente 5% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un alcohol de azúcar, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un oligosacárido no reductor, y (iv) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v de al menos un ácido antioxidante, con la condición de que la concentración final de (i), (ii) y (iii) sea inferior o igual a aproximadamente 12.5% en p/v o

15 (g) (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un alcohol de azúcar, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 2.5% en p/v de al menos un oligosacárido no reductor, y (iv) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.25% en p/v de al menos un ácido antioxidante, con la condición de que la concentración final de (i), (ii) y (iii) sea inferior o igual a aproximadamente 10% en p/v;

25 8. La composición inmunógena estabilizada liofilizada de CDV y cPi2 vivos atenuados que comprende (i) una concentración final que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos;

30 9. La composición inmunógena de 8, en el que (ii) la concentración final de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos va desde aproximadamente 2% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos, y que comprende además (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 15% a aproximadamente 70% en p/p de al menos un agente de carga;

10. La composición inmunógena de 8, que comprende además al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno diferente del paramixovirus;

35 11. La composición inmunógena de 10, en el que dicho al menos un componente inmunógeno activo

(a) es un derivado de un patógeno que comprende Adenoviridae, Parvoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Rhabdoviridae, o combinaciones de estos o

(b) comprende el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) vivo atenuado y el parvovirus canino (CPV) vivo atenuado o

40 (c) comprende un vector vírico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos o

(d) comprende un vector plasmídico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos.

45 12. Una composición inmunógena multivalente estabilizada liofilizada que comprende al CDV vivo atenuado, el cPi2 vivo atenuado y al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno diferente del paramixovirus, y que comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 2% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos, y (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 15% a aproximadamente 70% en p/p de al menos un agente de carga;

13. La composición inmunógena multivalente de 12, en el que dicho al menos un componente inmunógeno activo

50 (a) es un derivado de un patógeno que comprende Adenoviridae, Parvoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Rhabdoviridae, o combinaciones de estos o

(b) comprende el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) vivo atenuado y el parvovirus canino (CPV) vivo atenuado o

(c) comprende un vector vírico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos o

(d) comprende un vector plasmídico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos;

5 14. Procedimiento de liofilización de una suspensión o solución inmunógena de CDV y cPi2 vivos atenuados, que comprende (a) poner en contacto la suspensión o solución inmunógena de CDV y cPi2 vivos atenuados con un estabilizador tal como se define en la reivindicación 1 o 2, de modo que se forma una suspensión o solución inmunógena estabilizada; (b) enfriar, a presión atmosférica, la suspensión o solución inmunógena estabilizada a una temperatura inferior a aproximadamente el valor T_g de la suspensión inmunógena estabilizada; (c) secar la suspensión o solución inmunógena estabilizada por sublimación de hielo a baja presión; y (d) retirar el exceso de agua residual reduciendo aún más la presión y aumentando la temperatura de la suspensión o solución
10 inmunógena estabilizada; y

15. Un kit que comprende un primer frasco que contiene la composición inmunógena estabilizada liofilizada de CDV y cPi2 vivos atenuados tal como se define en 8, 9, 10 u 11 o la composición inmunógena multivalente liofilizada tal como se define en 12, y un segundo frasco que contiene un disolvente.

15 [0019] La presente invención también proporciona una composición inmunógena multivalente estabilizada liofilizada que comprende el CDV vivo atenuado, el cPi2 vivo atenuado, y al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno diferente del paramixovirus producido mediante procesos de la invención, y que puede comprender (i) una concentración final que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico,
20 ácido ascórbico, o combinaciones de estos.

[0020] Según otro aspecto, la invención proporciona un kit, que puede comprender un primer frasco que contiene una composición inmunógena liofilizada estabilizada de la invención, y un segundo frasco que contiene un disolvente.

25 [0021] El disolvente puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en agua desmineralizada, agua destilada, agua para inyección, tampón (es decir, solución tampón de fosfato), y adyuvante (es decir, agua en emulsiones de aceite, hidróxido de aluminio, carbómeros).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 [0022] La siguiente descripción detallada, ofrecida a modo de ejemplo, pero sin pretender limitar la invención a las realizaciones específicas descritas, se puede entender en combinación con las figuras adjuntas, incorporadas aquí por referencia, en las que:

La figura 1A muestra fotografías de pastillas liofilizadas que tienen una forma regular, un aspecto de merengue, o un aspecto esponjoso

La figura 1B muestra fotografías de un aspecto atascado, un aspecto de carrete, y un aspecto de-duplicado

35 La figura 2 muestra gráficos que muestran el efecto del porcentaje de (A) de oligosacáridos no reductores, y (B) de monosacáridos reductores en el título de CDV, expresado en log₁₀ CCID₅₀/ml, al final de la etapa de liofilización (a T₀). La concentración final de los oligosacáridos no reductores y los monosacáridos reductores se expresa en % peso/ volumen.

40 La figura 3 muestra gráficos que demuestran el efecto de un compuesto antioxidante en el título de cPi2, expresado en log₁₀ CCID₅₀/ml (A) al final de la etapa de liofilización (a T₀), y (B) después de un periodo de almacenamiento de 3 meses a +4°C (T + 3 meses), en el que la concentración final está expresada en % peso/ volumen.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 [0023] En esta descripción, "comprende," "que comprende," "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado adscrito a la ley de patentes americana puede significar "incluye," "que incluye," y similares; "consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente" también tienen el significado adscrito a la ley de patentes americana y el término es abierto, es decir que permite la presencia de más de lo que se expone siempre que las características básicas o nuevas no se cambien por la presencia de más de lo que se expone, pero excluye realizaciones del estado de la técnica.

50 [0024] Un "sujeto" en el contexto de la presente invención puede ser un vertebrado, tal como un mamífero, pájaro, reptil, anfibio o pez; más ventajosamente un ser humano, un animal de compañía o domesticado; un animal productor de alimentos o de piensos; animal para ganado, juegos, carreras tales como, pero no limitados a, bovinos, caninos, felinos, caprinos, ovinos, porcinos, equinos, y aves. Preferentemente, el vertebrado es un canino.

[0025] Tal como se usa aquí, "recombinante" se refiere a un ácido nucleico sintetizado o manipulado de otra manera in vitro (por ejemplo, "ácido nucleico recombinante"), a procedimientos de utilización de ácidos nucleicos

recombinantes para producir productos genéticos en las células, en sujetos, o en otros sistemas biológicos, o a un polipéptido ("proteína recombinante") codificado mediante un ácido nucleico recombinante. "Medios recombinantes" también abarca la escisión y ligado de ácidos nucleicos que tienen varias regiones de codificación, dominios, o secuencias de promotores de diferentes fuentes en una casete o vector de expresión para, por ejemplo, la expresión
5 inducible o constitutiva de secuencias de codificación de ácidos nucleicos.

[0026] Tal como se usa aquí, el término "enlazados funcionalmente" significa que los componentes descritos tienen una relación que les permite funcionar tal como se pretende que lo hagan.

[0027] El término "heterólogo" cuando se emplea con referencia a un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico está en una célula, un virus, un sujeto, o una bacteria en los cuales normalmente no se encuentra en la naturaleza; o comprende dos o más subsecuencias de ácidos nucleicos que no se encuentran con la misma relación entre sí tal como normalmente se encuentra en la naturaleza, o se diseña de forma recombinante para que su nivel de expresión, o relación física con otros ácidos nucleicos u otras moléculas en una célula, sujeto, o estructura, que normalmente no se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo puede ser producido de
10 manera recombinante con dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos de manera no encontrada en la naturaleza; por ejemplo, un gen canino operativamente ligado con una secuencia de promotores insertada en, por ejemplo, un virus de la viruela o vector adenovirus. Como ejemplo, un ácido nucleico heterólogo de interés puede codificar a un producto genético inmunogénico, en el que el ácido nucleico heterólogo de interés contenido en un vector es administrado terapéuticamente o profilácticamente como composición inmunógena o composición de vacuna. Las secuencias heterólogas pueden comprender varias combinaciones de promotores y secuencias,
15 numerosos ejemplos de los cuales se describen en detalle aquí.

[0028] Tal como se usa aquí, un "vector" es una herramienta que permite o facilita la transferencia de una entidad de un entorno a otro. A modo de ejemplo, algunos vectores empleados en técnicas de ácido nucleico recombinante permiten a entidades, tales como un segmento de ácido nucleico (tal como un segmento de ácido nucleico heterólogo, tal como un segmento heterólogo de cDNA), ser transferidos a una célula diana. También se emplea
25 aquí el término "vector de expresión". La presente invención comprende vectores recombinantes que pueden incluir, sin limitación, vectores víricos, vectores bacterianos, vectores fúngicos, vectores protozoarios, vectores plasmídicos, o recombinantes de los mismos.

[0029] Con respecto a los ácidos nucleicos heterólogos para la expresión en un vector (por ejemplo, codificación de un epítipo de interés y/o un antígeno y/o inmunógeno y/o a terapéutico) y a documentos que proporcionan estos
30 ácidos nucleicos heterólogos, así como con respecto a factores de expresión, de transcripción y/o de traducción para aumentar las moléculas de expresión de ácido nucleico, y a términos tales como "epítipo de interés", "terapéutico", "respuesta inmune", "respuesta inmunológica", "respuesta inmune protectora", "composición inmunológica", "composición inmunogénica", y "composición de vacuna", entre otros, se hace referencia a la patente americana número 5,990,091 publicada el 23 de noviembre de 1999, y WO 98/00166 y WO 99/60164, y los documentos citados en estas y los documentos registrados relativos a la obtención de la patente y aquellas solicitudes PCT; todos ellos
35 incorporados aquí como referencias. Por lo tanto, la patente americana número 5,990,091 y WO 98/00166 y WO 99/60164 y los documentos ahí citados y los documentos registrados relativos a la obtención de la patente y aquellas solicitudes PCT; y otros documentos citados aquí o de otra manera incorporados aquí por referencia, se pueden consultar para llevar a cabo esta invención; y todas las moléculas de ácido nucleico heterólogas,
40 promotores, y vectores citados ahí se pueden utilizar para llevar a cabo esta invención. A este respecto, también se mencionan las patentes americanas con números 6,706,693; 6,716,823; 6,348,450; Las solicitudes de patente americana con números 10/424,409; 10/052,323; 10/116,963; 10/346,021; y WO99/08713, publicada el 25 de febrero de 1999, a partir de la PCT/US98/16739.

[0030] Un "antígeno" es una sustancia reconocida por el sistema inmune y que induce una respuesta inmune. El
45 antígeno puede comprender un organismo entero, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o porción de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; un trozo o fragmento de ácido nucleico capaz de inducir una respuesta inmune al presentarla a un huésped animal; una proteína, un polipéptido, un péptido, una glicoproteína, un epítipo, un hapteno, un carbohidrato, un azúcar, o cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, el antígeno puede comprender una toxina o antitoxina. Un término
50 similar empleado de manera intercambiable en este contexto es "inmunógeno". Un "patógeno" se refiere a un agente específico causante de enfermedad, tal como una bacteria, un hongo, un protozoo, un parásito, o un virus.

[0031] Tal como se usa aquí, los términos "composición inmunogénica" y "composición inmunológica" y "composición inmunogénica o inmunológica" abarcan cualquier composición que provoca una respuesta inmune
55 contra el antígeno o inmunógeno de interés expresado a partir de vectores; por ejemplo, que después de la administración a un sujeto, provoca una respuesta inmune contra el inmunógeno o antígeno de interés diana. Los términos "composición de vacuna" y "vacuna" y "composición de vacuna" abarca cualquier composición que induce una respuesta inmune protectora contra el antígeno de interés, o que protege eficazmente contra el antígeno; por ejemplo, después de la administración o inyección en el sujeto, provoca una respuesta inmune protectora contra el antígeno o inmunógeno diana o proporciona una protección eficaz contra el antígeno o inmunógeno expresado a
60 partir de vectores.

[0032] Tal como se usa aquí, el término "multivalente" significa una composición inmunógena o composición de vacuna que contiene más de un antígeno, de la misma especie, de diferentes especies, o una composición inmunógena o composición de vacuna que contiene una combinación de antígenos de diferentes géneros.

- 5 **[0033]** Un "componente inmunogénico activo" en el contexto de la presente invención incluye patógenos vivos atenuados, tales como los virus vivos atenuados, las bacterias, hongos o parásitos vivos atenuados. Cuando el componente inmunógeno activo forma parte de una suspensión o solución de composición inmunógena multivalente de CDV y cPi2 vivos atenuados de la invención, el componente inmunógeno activo puede estar ventajosamente derivado de un patógeno u otros diferentes de los paramixovirus. La invención también abarca inmunógenos heterólogos o antígenos recombinantes derivados de o procedentes de uno o más patógenos descritos aquí, que
 10 pueden estar contenidos y expresados en, entre otros, vectores víricos, vectores bacterianos, vectores fúngicos, y vectores plasmídicos. La invención también comprende epítomos de inmunógenos heterólogos o antígenos derivados de uno o más patógenos, inmunomoduladores tales como citoquinas, agentes terapéuticos, toxinas, anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo, adyuvantes, u otras especies tales como ARNs antisentido, ARNs catalíticos, ARNs pequeños de interferencia, entre otros.
- 15 **[0034]** El término "composición veterinaria" significa cualquier composición que comprende un vector para uso veterinario que exprese una proteína terapéutica tal como, por ejemplo, la eritropoyetina (EPO) o una proteína inmunomoduladora, tales como, por ejemplo, el interferón (IFN). De manera similar, el término "composición farmacéutica" significa cualquier composición que comprende un vector para expresar una proteína terapéutica.

20 **[0035]** Las composiciones y procedimientos de la presente descripción pueden ser adecuadamente aplicados a la estabilización de inmunomoduladores tales como las citoquinas, agentes terapéuticos, toxinas, anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo, adyuvantes, u otras especies tales como ARNs antisentido, ARNs catalíticos, ARN pequeños de interferencia, entre otros. Después de la reconstitución, estos compuestos se pueden utilizar para la prevención de enfermedades como inmunización profiláctica o proporcionan alivio contra síntomas de enfermedad como inmunización terapéutica.

25 **[0036]** La presente descripción abarca un estabilizador para composiciones inmunógenas liofilizadas vivas atenuadas que comprende al menos un monosacárido reductor y al menos un compuesto antioxidante ácido. El estabilizador puede comprender opcionalmente al menos un oligosacárido no reductor y/o al menos un agente de carga y/o al menos un alcohol de azúcar. Estos estabilizadores pueden mantener o mantienen la inmunogenicidad, infectividad, y viabilidad de ingredientes biológicos que incluyen, pero que no se limitan a, virus, bacterias, hongos,
 30 parásitos, proteínas, polipéptidos, entre otros. Los estabilizadores descritos aquí también tienen un buen aspecto, es decir forma y color uniformes, y son seguros para su administración a un sujeto

[0037] Un "monosacárido reductor" es un sacárido que es capaz de donar electrones, y que de este modo, es capaz de reducir a otro compuesto durante reacciones de oxidación-reducción. En general, un monosacárido reductor tiene grupos aldehído o cetona en su estructura. Hay disponibles tests colorimétricos para identificar azúcares reductores,
 35 tales como el test reactivo Fehling's, que da como resultado un cambio de color de azul intenso a rojo a medida que el ión de cobre reactivo se reduce a metal cobre en presencia de un azúcar reductor. En la presente invención, el monosacárido reductor comprende preferentemente glucosa, galactosa, fructosa, manosa, sorbosa, o combinaciones de estas. En una realización de la invención, se proporciona una combinación de al menos dos monosacáridos reductores. Los monosacáridos reductores son importantes para la protección de composiciones,
 40 notablemente de proteínas y patógenos vivos atenuados, durante el proceso de liofilización, especialmente durante las etapas de sublimación (es decir, etapas de desecación primera y segunda), en las que los monosacáridos reductores ocupan el lugar del agua sublimada agua y mantienen la cohesión de la estructura biológica.

[0038] Opcionalmente, se pueden añadir alcoholes de azúcar y/o oligosacáridos no reductores al estabilizador según la presente invención. Las combinaciones de monosacáridos reductores y alcoholes de azúcar, las
 45 combinaciones de monosacáridos reductores y oligosacáridos no reductores, y las combinaciones de monosacáridos reductores, alcoholes de azúcar y oligosacáridos no reductores están al alcance de la presente descripción.

[0039] Los alcoholes de azúcar son químicamente alcoholes, más precisamente polioles, derivados de moléculas de azúcar por reducción del grupo aldehído azúcar. En el contexto de la presente descripción los alcoholes de azúcar son ventajosamente alcoholes monosacáridos o alcoholes disacáridos. El alcohol de azúcar puede comprender
 50 sorbitol, manitol, xilitol, o maltitol. Los estabilizadores de la descripción también pueden comprender una mezcla de al menos dos alcoholes de azúcar.

[0040] Los "oligosacáridos no reductores" en el contexto de la descripción son azúcares que comprenden de dos a diez unidades sacárido y que no son capaces de reducir otro a compuesto durante reacciones de oxidación-reducción. En la presente descripción el oligosacárido no reductor puede ser un disacárido no reductor o un
 55 trisacárido no reductor, que ventajosamente comprenda trehalosa, sacarosa, o rafinosa. Los estabilizadores pueden comprender una mezcla de al menos dos oligosacáridos no reductores.

[0041] El compuesto antioxidante ácido se define como un compuesto químico que reacciona con y que neutraliza a oxidantes, radicales libres (es decir, moléculas con electrones desapareados), o productos químicos que liberan

radicales libres. En el contexto de la descripción, el compuesto antioxidante está en forma ácida. Por razones de claridad, se les denomina aquí como "antioxidantes ácidos". Los ácidos antioxidantes pueden comprender ácido ascórbico y/o aminoácidos, tales como ácido aspártico y ácido glutámico. El antioxidante es ventajosamente ácido aspártico. Los estabilizadores no contienen preferentemente sales de ácidos antioxidantes, por ejemplo sales de metales alcalinos tales como sales de sodio o de potasio, notablemente sal de sodio del ácido aspártico, sal de potasio del ácido aspártico, sal de sodio del ácido glutámico, sal de potasio del ácido glutámico, sal de sodio del ácido ascórbico y sal de potasio del ácido ascórbico. Las combinaciones de más de un compuesto antioxidante ácido están al alcance de la invención.

5 [0042] El agente de carga puede ser un polímero farmacéuticamente o veterinariamente aceptable tal como, aunque no limitado a, dextrano, maltodextrina, polivinilpirrolidona (PVP), crospovidona, e hidroxietil almidón. Otros derivados del almidón incluyen, aunque no están limitados a, celulosa microcristalina, metil celulosa, carboxi metil celulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilo metil celulosa, e hidroxipropilo metil celulosa. Ventajosamente, el agente de carga puede ser dextrano o PVP, preferentemente dextrano. También se contemplan en la presente invención combinaciones de al menos dos agentes de carga. El agente de carga aumenta el valor de Tg de las composiciones inmunógenas y de vacunas, lo cual permite la utilización de temperaturas mayores durante el congelado. El " valor Tg " se define como la temperatura de transición vítrea, que corresponde a la temperatura por debajo de la cual la composición congelada se vuelve vítrea. El agente de carga es principalmente responsable del buen aspecto observado en las pastillas liofilizadas y tortas de la presente invención, notablemente por mantener la forma sólida de las pastillas sin crear enlaces hidrógeno.

10 [0043] Si se utiliza dextrano como agente de carga, su peso molecular puede ir desde aproximadamente 5000 Da a aproximadamente 70000 Da, preferentemente ir desde aproximadamente 10,000 Da a aproximadamente 40,000 Da. Si se utiliza PVP como agente de carga, su peso molecular puede ir desde aproximadamente 8,000 Da a aproximadamente 360,000 Da, preferentemente ir desde aproximadamente 10,000 Da a aproximadamente 60,000 Da.

15 [0044] Si se utiliza maltodextrina como agente de carga, su valor equivalente a dextrosa (DE, que es una medida cuantitativa del grado de hidrólisis del polímero de almidón) puede ir desde aproximadamente 3 a aproximadamente 20, preferentemente ir desde aproximadamente 5 a aproximadamente 18, más preferentemente ir desde aproximadamente 10 a aproximadamente 15. Si se utiliza hidroxietil almidón como agente de carga, su peso molecular puede ir desde aproximadamente 70,000 Da a aproximadamente 450,000 Da, preferentemente ir desde aproximadamente 130,000 Da a aproximadamente 200,000 Da. El grado de sustitución de almidón de hidroxietilo puede ir desde aproximadamente 0.4 a aproximadamente 0.7, preferentemente ir desde aproximadamente 0.4 a aproximadamente 0.6. El grado de sustitución se define como el número de grupos hidroxietilo por unidad de glucosa.

20 [0045] Algunos de los componentes en el estabilizador pueden ser no solubles. Sin embargo, es bien conocido por el experto sustituir adecuadamente componentes análogos (por ejemplo mediante la selección de un componente más soluble) y/o adaptar la cantidad o cantidades de componente insoluble presente en el estabilizador con la finalidad de obtener un estabilizador soluble. La solubilidad de un componente puede verificarse fácilmente mediante un test visual de solubilidad. Un test visual de solubilidad comprende las etapas de añadir todos los componentes del estabilizador a una temperatura de aproximadamente 55°C, y mezclarlos durante aproximadamente 30 minutos. Después de aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente y sin agitación alguna, el estabilizador puede verificarse visualmente mediante la aparición de precipitados. Si el estabilizador es transparente o límpido, entonces todos los componentes del estabilizador son solubles.

[0046] En los siguientes ejemplos se describen realizaciones específicas de los estabilizadores de la presente invención, llamadas F2, F2B, F6B, F33, F37, A, H, K y U.

25 [0047] Los estabilizadores de la presente invención pueden ser almacenados a temperaturas que van desde aproximadamente 10°C a aproximadamente 40°C, y preferentemente ir desde aproximadamente 15°C a aproximadamente 25°C.

[0048] La invención también proporciona una suspensión o solución inmunógena estabilizada, que comprende una suspensión o solución inmunógena que comprende virus vivos atenuados, tales como, aunque no limitados a paramixovirus, mezclada con un estabilizador según la invención. El paramixovirus canino comprende, entre otros, al virus de la enfermedad de Carré canino (CDV) y el virus de parainfluenza de tipo 2 canino (cPi2), ambos en la forma de virus vivos atenuados.

30 [0049] Una realización ventajosa de la presente invención abarca paramixovirus vivos atenuados, en particular, el paramixovirus canino. El paramixovirus canino es un virus de la familia Paramyxoviridae, que incluye virus de la enfermedad de Carré canino (CDV) y virus de parainfluenza de tipo 2 canino (cPi2). El paramixovirus canino es responsable de una amplia variedad de enfermedades en varias especies de carnívoros, en particular animales domésticos, tales como perros, o no domésticos, tales como hurones, leones, tigres y leopardos.

[0050] En las suspensiones o soluciones estabilizadas inmunogénicas de la presente invención, la concentración final de monosacárido reductor va desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v, ventajosamente desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v, más ventajosamente desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v, y preferentemente desde aproximadamente 2.5% a aproximadamente 3% en p/v.

5 **[0051]** "Concentración final" en el contexto de la invención significa la concentración de un compuesto en la suspensión o solución inmunógena estabilizada.

[0052] Las suspensiones o soluciones estabilizadas inmunogénicas de la invención pueden comprender una concentración final de compuesto antioxidante ácido que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v final, especialmente desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.25% en p/v, y más
10 especialmente aproximadamente 0.2% en p/v.

[0053] Cuando la suspensión o solución inmunógena estabilizada comprende al menos un agente de carga, la concentración final de agente de carga va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 7.5% en p/v, y ventajosamente desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v.

[0054] Cuando la suspensión o solución inmunógena estabilizada comprende al menos un monosacárido reductor y
15 al menos un alcohol de azúcar, la concentración final de monosacárido reductor va desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v, ventajosamente desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v, más ventajosamente desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v y preferentemente desde aproximadamente 2.5% a aproximadamente 3% en p/v, la concentración final de alcohol de azúcar va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v, y ventajosamente desde aproximadamente 1.5% a
20 aproximadamente 3% en p/v, con la condición de que la concentración final de la mezcla de monosacárido reductor y alcohol de azúcar sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v, y ventajosamente a aproximadamente 5% en p/v.

[0055] Cuando la suspensión o solución inmunógena estabilizada comprende al menos un monosacárido reductor y al menos un oligosacárido no reductor, la concentración final de monosacárido reductor va desde aproximadamente
25 1% a aproximadamente 5% en p/v, ventajosamente desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v, más ventajosamente desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v y preferentemente desde aproximadamente 2.5% a aproximadamente 3% en p/v, la concentración final de oligosacárido no reductor va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v y ventajosamente desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 2.5% en p/v, con la condición de que la concentración final de la mezcla de monosacárido reductor y oligosacárido no reductor sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v, y ventajosamente a
30 aproximadamente 5% en p/v.

[0056] Cuando la suspensión o solución inmunógena estabilizada comprende al menos un monosacárido reductor, al menos un oligosacárido no reductor y al menos un alcohol de azúcar, la concentración final de monosacárido reductor va desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v, ventajosamente desde aproximadamente
35 1.5% a aproximadamente 5% en p/v, más ventajosamente desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v y preferentemente, desde aproximadamente 2.5% a aproximadamente 3% en p/v; la concentración final de oligosacárido no reductor va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v y ventajosamente desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 2.5% en p/v, la concentración final de alcohol de azúcar va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v, y ventajosamente desde aproximadamente 1.5% a
40 aproximadamente 3% en p/v, con la condición de que la concentración final de la mezcla de monosacárido reductor, oligosacárido no reductor y alcohol de azúcar sea inferior o igual a aproximadamente 12.5% en p/v, ventajosamente aproximadamente 10% en p/v, y más ventajosamente aproximadamente 7.5% en p/v.

[0057] En algunas realizaciones, los estabilizadores F2, F2B, F6B, F33, F37, A, H, K o U se mezclan con las suspensiones o soluciones inmunogénicas o con suspensiones o soluciones inmunogénicas multivalentes que
45 comprenden virus vivos atenuados. Preferentemente, un volumen de del estabilizador F2, F2B, F6B, F33, F37, A, H, K, o U se mezcla con un volumen de la suspensión o solución inmunógena que comprende virus vivos atenuados, o con un volumen de la suspensión o solución inmunógena multivalente que comprende virus vivos atenuados. Sus concentraciones finales en la suspensión o solución estabilizada son preferentemente aproximadamente la mitad de la concentración inicial.

50 **[0058]** La vacuna o composición inmunógena viva atenuada tiene las siguientes ventajas: puede ser administrada en bajas dosis, especialmente si es auto-replicante; imita estrechamente las infecciones naturales / de tipo salvaje en un sujeto, y proporciona al sujeto todos los posibles antígenos inmunológicamente importantes al mismo tiempo, es decir, en una única administración.

[0059] Se acepta en general que las composiciones inmunógenas o de vacunas basadas en microorganismos vivos
55 atenuados tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune altamente efectiva. Estas composiciones inmunógenas o de vacunas tienen la ventaja de que, una vez que el animal ha sido inmunizado, la entrada del patógeno en el huésped induce un recordatorio acelerado de anteriores inmunizaciones mediadas por células o humorales, que es capaz de controlar el posterior crecimiento del organismo antes de que la infección pueda

- alcanzar proporciones clínicamente significantes. Se acepta generalmente en el estado de la técnica que las composiciones inmunógenas o de vacunas basadas en un patógeno muerto (vacuna muerta) son incapaces o que poco probablemente pueden lograr este tipo de respuesta. Sin embargo, las composiciones inmunógenas o de vacunas que contienen un patógeno vivo, dependiendo de los niveles de atenuación, presentan el peligro de que el huésped inmunizado, tras la inmunización, pueda contraer la enfermedad contra la cual se le intenta proteger. Por lo tanto, las composiciones inmunógenas o de vacunas que tienen atributos de inmunización de un patógeno vivo, pero que son incapaces de provocar efectos secundarios indeseables tras la administración a un sujeto serían altamente deseables.
- 5
- [0060]** Los patógenos vivos atenuados pueden ser generados mediante la incorporación de una amplia variedad de mutaciones, incluyendo cambios de nucleótidos individuales, mutaciones en lugares específicos, inserciones, sustituciones, eliminaciones, o reordenamientos. Estas mutaciones pueden afectar a un pequeño segmento del genoma del patógeno, por ejemplo, de 15 a 30 nucleótidos, o segmentos largos del genoma del patógeno, por ejemplo, de 50 a 1000 nucleótidos, dependiendo de la naturaleza de la mutación. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones aguas arriba o aguas abajo de una región o elemento regulatorio no codificantes del patógeno para eliminar o reducir su actividad, que resultan de este modo en un fenotipo atenuado.
- 10
- [0061]** Las mutaciones de regiones regulatorias no codificantes del genoma del patógeno, que pueden dar como resultado una subregulación de replicación del gen de un patógeno, y/o la subregulación de transcripción de un gen de un patógeno pueden dar como resultado la producción de patógenos en cada ciclo de replicación; es decir, los patógenos que contienen menos de todo el complemento de regiones o segmentos genómica necesarios para un patógeno completamente infeccioso. Por lo tanto, los patógenos alterados presentarán características atenuadas en tanto que el patógeno dará lugar a más patógenos defectuosos que patógenos de tipo salvaje en cada ciclo de replicación. Sin embargo, puesto que la cantidad de proteína, antígeno, o inmunógeno sintetizados en cada ciclo es similar tanto para patógenos de tipo salvaje y para patógenos deficientes, estos patógenos atenuados tienen probabilidades de ser capaces de inducir una buena respuesta inmune en un sujeto.
- 20
- [0062]** Cuando el gen de un patógeno codifica a una proteína estructural, por ejemplo, en el caso de patógenos tales como virus, una cápside, matriz, superficie o proteína de envoltura, se reducirá el número de partículas producidas durante la replicación de modo que el patógeno mutado presente características atenuadas; por ejemplo, un título que da como resultado niveles de infección subclínicos. Por ejemplo, una disminución de la expresión cápside vírica reducirá el número de nucleocápsides empaquetadas durante la replicación, mientras que una disminución de la expresión de la proteína de envoltura puede reducir el número y/o infectividad de viriones de progeñe. Como alternativa, una disminución de la expresión de las enzimas virales necesarias para la replicación, por ejemplo, la polimerasa, la replicasa, la helicasa, y similares, debería disminuir el número de genomas de progeñe generados durante la replicación. Puesto que el número de partículas infecciosas producidas durante la replicación reduce los virus alterados que presentan características atenuadas. Sin embargo, el número de partículas de virus antigénicas producidas será en general suficiente para inducir una respuesta inmune vigorosa en un sujeto.
- 30
- [0063]** Una forma alternativa de diseñar patógenos atenuados implica la introducción de una mutación, que incluye, pero que no se limita a, una inserción, eliminación o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos y/o epítopos en una o más de las proteínas del patógeno. Esto se puede realizar fácilmente diseñando la mutación apropiada en la correspondiente secuencia de genes del patógeno. Cualquier cambio que altere la actividad de la proteína del patógeno de modo que la replicación se modifique o se reduzca queda al alcance de la presente invención.
- 40
- [0064]** Por ejemplo, en el contexto de los virus atenuados, se pueden diseñar mutaciones que interfieran con pero que no supriman completamente el enlace vírico con los receptores de la célula huésped y la consiguiente infección sobre las proteasas de superficie de los antígenos o virus implicados en el procesado para la producción de linajes atenuados. Los factores virulentos de superficie de los antígenos o virus se pueden modificar para que contengan inserciones, sustituciones o eliminaciones de uno o más aminoácidos o epítopos que interfieran con o reduzcan la afinidad de unión del antígeno vírico de los receptores de la célula huésped. Este enfoque ofrece la ventaja añadida de que se puede producir un virus quimérico, que exprese un epítipo externo o heterólogo, que también presente características atenuadas. Estos virus son candidatos ideales para su uso como vacunas recombinantes vivas.
- 45
- [0065]** Las mutaciones diseñadas en cualquiera de las enzimas víricas incluyen, aunque no están limitadas a, inserciones, eliminaciones y sustituciones en la secuencia del aminoácido del sitio activo de la enzima. A modo de ejemplo, el sitio de unión de una enzima podría alterarse de modo que su afinidad de unión para su sustrato se reduzca, y como resultado, la enzima sea menos específica y/o eficiente. Por ejemplo, un objetivo de elección es el complejo de la polimerasa vírica, puesto que mutaciones sensibles a la temperatura existen en todas las proteínas de polimerasa. Por lo tanto, los cambios introducidos en las posiciones del aminoácido asociadas a dicha sensibilidad a la temperatura se pueden diseñar en el gen vírico de la polimerasa para que se produzca un linaje vírico atenuado.
- 50
- [0066]** El CDV es un virus envuelto en una RNA de hebra simple de unos 100-300 nm de diámetro y perteneciente al género Morbillivirus. El núcleo virión CDV contiene un péptido de nucleoproteína (NP) estrechamente asociado con el RNA vírico. Un segundo péptido del núcleo es una fosfoproteína (P). La envoltura del CDV contiene tres péptidos,
- 60

- la proteína M (proteína de matriz) y dos glicoproteínas. Las glicoproteínas son las glicoproteínas hemaglutinina (H) y una glicoproteína de fusión (F). La glicoproteína de fusión se degrada en subunidades más pequeñas, designadas F1 y F2. La proteína H es responsable principalmente de la absorción vírica en células diana y la glicoproteína de fusión es responsable de la fusión célula a célula. Hasta hoy, todos los virus del moquillo aislados conocidos
- 5 contienen estos polipéptidos víricos comunes. La vía de infección al perro es por gotas de aerosol infeccioso, y la transmisión del virus se ve facilitada por tosidos, estornudos y confinamiento cerrado en entornos cerrados calientes y húmedos. Estudios en entorno cerrado sugieren que la infección vírica ocurre primero en el epitelio respiratorio de del tracto oronasal superior con posterior extensión a la parénquima pulmonar profunda (Gorham "Canine Distemper", (1960) *advance veterinary Science*, Brandley y Jungheer editors, 6: 288-315).
- 10 **[0067]** Los tejidos macrófagos y monocitos ubicados en o a lo largo del epitelio respiratorio en amígdalas aparecen como las primeras células que atrapan el CDV y lo replican. Entonces el virus se extiende por el torrente sanguíneo a tejidos linforreticulares distantes. Esto se realiza por viremia y se da en cualquier lugar de dos a cuatro días tras la infección inicial. Entre ocho y nueve días después de la infección, el virus se extiende más allá de los tejidos linforreticulares e implica a tejidos epiteliales y mesenquimales (Appel, (1969) *Am. J. Vet Res.* 30, 1167-1182). Es en
- 15 esta etapa de infección vírica en la que las respuestas inmunes específicas del huésped a la influencia de los antígenos víricos tienen como resultado la enfermedad. La forma fatal aguda de la enfermedad se caracteriza por el hecho de que la expansión vírica queda irrestricta a prácticamente cada tejido del cuerpo. Se puede encontrar el virus en cada excreción y secreción del sujeto infectado, y se puede observar mediante la utilización de procedimientos de inmunofluorescencia o técnicas de rastreo de antígenos, la presencia de antígenos prácticamente
- 20 en cada célula tipo dentro del perro. Para la mayoría de estos los animales, la causa de muerte más probable es un desarrollo neurológico fatal fulminante y/o encefalitis.
- [0068]** Algunos perros infectados con CDV muestran una progresión retardada clínicamente de la enfermedad y respuestas inmunes convalecientes modestas. Los signos clínicos, si los hay, son sutiles tempranamente en la enfermedad y son un reflejo de la persistencia vírica dentro del sistema nervioso central (CNS). El desarrollo
- 25 posterior por el CNS de la enfermedad es variable. La mayoría de los perros infectados de CDV no presentan esencialmente signos clínicos de enfermedad abiertos y son reconocidos como perros convalecientes, clínicamente normales. Se ha demostrado que los perros infectados activamente que eventualmente se recuperan de la infección CDV presentan anticuerpos anti-víricos que circulan libremente tras aproximadamente seis o siete días tras la infección (Krakowka, y otros., (1975) *J. Infect. Dis.* 132, 384-392). Los títulos aumentan rápidamente a elevados
- 30 niveles en la convalecencia temprana.
- [0069]** Los perros extremadamente afectados con CDV muestran grados de depresión variables, anorexia, y fiebre. La piel puede deshidratarse de forma variable, volverse seca y rugosa, e inelástica. Una proporción de estos animales muestran fofobia y evidencia de descargas oculares-nasales mucopurulentas. La diarrea intermitente es un signo clínico común. Durante esta fase de viremia aguda de la enfermedad, aparecen virus en cada secreción y
- 35 excreción. A medida que la enfermedad progresa, se pueden desarrollar neumonía, frecuentemente debida a invasores bacterianos secundarios. En esta etapa de la enfermedad los perros son de moderadamente a severamente linfopénicos, dependiendo del grado o cantidad de infección secundaria. Aunque los perros extremadamente afectados pueden presentar prácticamente cada combinación de signos neurológicos, en su presentación más común, el perro presenta grandes o pequeñas convulsiones. Estos episodios convulsivos
- 40 aumentan su frecuencia con el tiempo.
- [0070]** La segunda forma neurológica del virus de la enfermedad de Carré canino es aquella que ocurre en la encefalitis de perros viejos (ODE), u ocurre después de la infección sub-clínica y la recuperación aparente. Los signos CNS pueden ser extremadamente variados en su presentación y pueden ser tomados por error por tumor cerebrales, traumas craneales, meningitis bacteriana, hidrocefalitis, y enfermedad del disco espinal. Una
- 45 manifestación mayor no-neural de la infección de CDV en los perros es la inmunosupresión asociada a la CDV (Krakowka, y otros., (1980) *Am. J. Vet. Res.* 41, 284-292). Varios de los signos de la infección por el virus de la enfermedad de Carré canino son atribuibles a procesos infecciosos secundarios coincidentes que ocurren en el animal debilitado.
- [0071]** La enfermedad en los perros también puede estar asociada a patógenos bacterianos, tales como especies bacterianas neumónicas que incluyen, pero que no se limitan a, *Bordetella bronchiseptica*, especies *Pasteurella*, especies estafilococo y estreptococo. Estas bacterias son responsables de la conjuntivitis purulenta, la rinitis, y la bronconeumonía presentes clínicamente en perros infectados con CDV. También son comunes las infecciones víricas combinadas, principalmente de tipo respiratorio. Además de la infección por el adenovirus II canino, reovirus, virus de la parainfluenza canina, y presumiblemente otros virus tales como el virus del herpes canino, todos pueden
- 50 estar implicados en infecciones combinadas dobles o múltiples.
- [0072]** El cPi2 es un virus RNA que induce una enfermedad respiratoria que es una de las que más se encuentran comúnmente en enfermedades víricas del perro. Cuando las infecciones por el virus de la parainfluenza, del adenovirus-2 canino y de las bacterias *Bordetella bronchiseptica* se dan juntas, se da la "tos de la perrera". El cPi2 también causa traqueobronquitis que, en algunos animales, produce neumonía exudativa. Los signos de tosido se
- 60 desarrollan de 7 a 9 días después de la exposición al virus. Los signos clínicos son suaves y de corta duración a menos que se den infecciones secundarias.

[0073] El cPi2 es un virus envuelto esférico con un diámetro medio de 150-200 nm, con una nucleocápside helicoidal rodeada por una bicapa de lípidos cubierta con espigas de glicoproteína. Cada partícula de virus contiene un genoma RNA de sentido negativo de cadena simple, no-segmentado, con nucleoproteína (NP) y fosfoproteína (P) y proteínas largas (L). La infección de cPi2 se adquiere por inhalación respiratoria de núcleos en gotas infectadas. La nariz y la nasofaringe son los principales sitios de infección. El virus inicia la infección principalmente por adhesión a las células epitelial ciliares de estas áreas a través de proteínas de hemaglutinina-neuraminidasa, que se combinan específicamente con receptores de ácidos neurámínicos en las células huésped. Después, el virus entra en la célula por fusión con la membrana celular mediada por los receptores F1 y F2. El virus se multiplica e invade también las células tanto intracelularmente como extracelularmente. La multiplicación del virus ocurre a lo largo de los tejidos traqueobronquiales, provocando un aumento en la producción de moco.

[0074] La laringotraqueítis es una inflamación de laringe y tráquea que, cuando ocurre en los perros, se conoce comúnmente por "tos de la perrera". El principal síntoma es un tosido que se manifiesta por uno o una serie de tosidos cortos, secos. En el caso más grave, el tosido puede llegar al paroxismo, y la infección implica a todo el tracto respiratorio, produciendo a menudo neumonía. El tosido también se caracteriza como profundo, persistente, no productivo, y en general acompañado de ojos y nariz llorosos. La temperatura puede ser normal, aunque en general elevada. El comienzo de la enfermedad puede ser repentino y puede ocurrir sin signos preliminares. Puesto que la enfermedad es muy contagiosa, los perros infectados deben ser aislados para evitar la infección de poblaciones enteras. La enfermedad produce pérdidas económicas mayores a los dueños, y aunque no suele ser fatal, puede llegar a debilitar tanto a los perros como para producir efectos graves de otras enfermedades.

[0075] Los virus cPi2 y otros virus vivos, tales como el CDV, el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2), y el parvovirus canino (CPV) pueden propagarse en cultivos de tejidos animales hasta que ambos virus se vuelven no patógenos, es decir, los virus se vuelven inactivos o de atenuados de algún modo. El virus de cPi2 es capaz de propagarse en una amplia variedad de sistemas de cultivo de tejidos, tales como, por ejemplo, embrión de gallina, embrión de pato, riñón porcino, testículos porcinos, riñón de bovino embrionario, riñón de felino, riñón canino y riñón de mono; y también en líneas celulares establecidas, tales como, por ejemplo, riñón de bovino Madin Darby (MDBK), riñón canino Madin Darby (MDCK) y córnea de conejo del Serum Institute (SIRC).

[0076] Para la propagación de, por ejemplo, el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2), se prefieren cultivos del tejido renal, especialmente aquellos derivados de bovinos y caninos, puesto que el CAV2 no se replica favorablemente en otros animal sistemas de cultivo de tejidos tal como lo hace el virus del cPi2. La atenuación de cada uno de estos virus puede lograrse mediante pasadas en serie estándar, incluyendo técnicas de pasadas de dilución terminal, en el que se emplea un número suficiente de pasadas en un cultivo de tejido susceptibles hasta que el virus se vuelve no patógeno sin pérdida de inmunogenicidad. Un inmunógeno, una composición inmunógena, o una suspensión o solución inmunógena preparada a partir de estos puede estimular una respuesta inmune en los perros susceptibles a la enfermedad sin producir los síntomas clínicos normalmente debidos al agente virulento en cualquier grado significativo. La propagación puede ser conducida en los mismos o diferentes tejidos como los descritos más arriba.

[0077] Los intervalos de tiempo de las pasadas deberían permitir que el virus se replique suficientemente entre pasadas, y temperaturas de incubación se mantienen preferentemente entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 38°C. El intervalo de tiempo de aplicación óptimo depende del sistema de cultivo particular y de la temperatura empleada. En cualquier caso, si ha habido o no replicación del virus suficiente se puede determinar fácilmente mediante técnicas estándar tales como la técnica de hemadsorción descrita en Shelokov, A. (1958) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97, 802; que es especialmente útil para el virus del cPi2, o mediante observaciones citopáticas, tales que permitan al virus crecer durante un ciclo particular antes del punto en el que se puede observar un efecto citopático en bruto al continuar la incubación.

[0078] Un procedimiento ventajoso de propagación utiliza las células del riñón canino, especialmente líneas celulares continuas MDCK. Por ejemplo, con finalidades inmunogénicas o de vacuna, se pueden hacer aproximadamente al menos 15 y preferentemente ir desde aproximadamente 20 a aproximadamente 45 ciclos de aislamiento a través cultivos del virus en el tejido renal del perro en intervalos de aproximadamente tres días y con temperaturas de incubación de aproximadamente 30 a aproximadamente 38°C. Se prefiere emplear el material de ciclo alto, puesto que beneficiará la producción de respuestas inmunes favorables en sujetos que las necesiten.

[0079] Para la preparación de composiciones inmunógenas o de vacunas, se pueden hacer crecer CDV virulentos en células cultivadas de mamíferos en condiciones de crecimiento convencionales del virus. Las células huésped se pueden plantar con virus al mismo tiempo que al plantar en la célula, o con un cambio de medio que contenga CDV cuando la célula monocapa es confluyente en un 90-100%. La multiplicidad del ratio de infección (MOI) puede ir desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.05, preferentemente alrededor de 0.01. Se puede utilizar cualquier medio de cultivo celular mamífero apropiado, tal como, pero no limitado a, medio esencial de Eagle mínimo, medio de Eagle modificado de Dulbecco, medio modificado de Iscove de Dulbecco, medio de Ham F12, medio F15, medio RPMI 1640, que contienen suero animal, tal como suero de ternera fetal, suero de ternera, suero de caballo, suero canino y similares, desde aproximadamente 0% a aproximadamente 10%, suplementos tales como Lglutamina y otros aminoácidos tanto esenciales como no esencial es, solución de sal de Hanks equilibrada (HBSS), solución de sal de Earle, piruvato de sodio, bicarbonato de sodio, insulina, transferrina, y antibióticos y agentes antimicótico, tales como aunque no limitados a, gentamicina, penicilina, streptomycin, polimixina B, anfotericina, y

Fungizone®, para producir el virus o virus. También se incluyen en la presente invención medios de cultivo celular libres de suero.

- [0080]** Los cultivos celulares infectados se mantienen a un rango de temperaturas que va desde aproximadamente 35°C a aproximadamente 40°C durante desde aproximadamente 2 a aproximadamente 7 días tras poner las semillas, y luego ya se pueden recolectar. Los cultivos infectados pueden ser inoculados con medios de cultivo celular, que se pueden recolectar después de un período de incubación adicional de 2 a 5 días. Los fluidos de virus son recogidos en recipientes estériles y se pueden aclarar por filtración. Los fluidos de virus pueden además ser concentrados empleando tecnología convencional de ultrafiltración (por ejemplo, Millipore Pellicon systems) con filtros que tienen tamaños de exclusión de partículas de hasta 10⁵ Daltons.
- 5 **[0081]** Otros virus vivos atenuados que pueden mezclarse con los estabilizadores de la presente invención incluyen, sin limitarse a estos, virus de la rabia, virus de la gripe, virus de la Parainfluenza, virus de las paperas, Adenovirus tales como el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2), virus respiratorio sincitial, virus de Epstein-Barr, Rhinovirus, virus aviares tales como el virus vaccinia, la viruela porcina, virus del mapache, virus aviares tales como la viruela aviar, virus del canario, virus de la paloma, Poliovirus, virus Coxsackie, virus Echo, virus de la Corona, virus de la Rubeola, virus de la Varicella-zoster, el virus del herpes (humano y animal), virus del Herpes simplex, Parvovirus tales como parvovirus canino (CPV), citomegalovirus, virus de la hepatitis tales como virus de la hepatitis canina contagioso, virus del papiloma humano, alfavirus tales como el virus del bosque de Semliki, Virus Sindbis, Virus Ross River, virus de la encefalitis equina del este, virus de la encefalitis equina del oeste, virus de la encefalitis equina del oeste de Venezuela, virus O'nyong-nyong, Flavivirus tales como virus de la fiebre del dengue y Virus del Nilo OCCIDental,
- 10 **[0081]** Bunyavirus, Arenavirus, Rotavirus, Hepadnavirus tales como el Orthohepadnavirus y Avihepadnavirus, Filovirus, Retrovirus tales como retrovirus endógeno porcino, HTLV-1, HTLV-2, FeLV, BLV, MLV, MMSV, virus del mono de Mason-Pfizer, Lentivirus tales como HIV-1, HIV-2, FIV, SIV, BIV, calicivirus felino, virus panleucopenia felino, virus de la peritonitis infecciosa felino, virus de la rinotraqueitis felino, virus TGE (cerdo), y virus de enfermedades de pies y boca.
- 15 **[0082]** Las composiciones inmunógenas o suspensiones o soluciones que comprenden, por ejemplo, el paramixovirus canino, se mezclan con los estabilizadores según la invención para formar suspensiones o soluciones inmunogénicas estabilizadas. Preferentemente, un volumen de suspensión o solución del paramixovirus canino se mezcla con un volumen del estabilizador.
- 20 **[0083]** Los estabilizadores de la invención también pueden emplearse para estabilizar suspensiones o soluciones inmunogénicas multivalentes, que pueden comprender, por ejemplo, una suspensión o solución inmunógena del paramixovirus canino y al menos un componente inmunógeno activo originario o derivado de un patógeno u otros diferentes del paramixovirus. El componente inmunógeno activo tal como se define aquí puede comprender patógenos vivos atenuados, tales como un virus vivo atenuado, bacterias, hongos, o parásitos. Sin embargo, un componente inmunógeno activo también puede comprender virus muertos, inmunógenos heterólogos recombinantes, antígenos, subunidades inmunogénicas (por ejemplo proteínas, polipéptidos, péptidos, epítomos, haptenos) o epítomos de inmunógenos o antígenos derivados de o procedentes de uno o más patógenos descritos aquí, que pueden ser expresados a partir de vectores víricos, vectores bacterianos, vectores plasmídicos, y similares.
- 30 **[0084]** El componente inmunógeno activo según la presente invención puede comprender uno o más inmunógenos que se seleccionan de entre una patógeno canino que incluyen, pero que no se limita a, virus de la rabia, el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2), virus del herpes canino (CHV), parvovirus canino (CPV), coronavirus canino, Leptospira canicola, Leptospira icterohaemorrhagiae, Leptospira grippotyphosa, Borrelia burgdorferi, Bordetella bronchiseptica y similares, incluyendo combinaciones de estos. El componente inmunógeno activo puede incluir genes de HA, F, NP del CDV, el gen de la cápside del CPV, los genes de espigas, M, N del coronavirus Canina, los genes HN y F del cPi2, genes de Leptospira, genes de Bordetella, genes de Borrelia, y los genes gB, gC y gD del virus del herpes canino, entre otros. Estos componentes pueden ser útiles como composiciones inmunógenas o de vacunas para proteger caninos contra enfermedades causadas por estos patógenos.
- 35 **[0085]** El adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) está muy extendido y es muy contagioso para los perros. Produce síntomas que se parecen al frío. En general los primeros signos de la enfermedad contagiosa son fiebre, que generalmente disminuye en uno o dos días. Los perros afectados pueden tener amigdalitis, flacidez abdominal, hígado hinchado, vómitos y diarrea. La enfermedad aguda suele ser fatal. El CAV2 puede inactivarse o ser atenuado y combinarse con el CDV (y/o cPi2) para producir vacunas multivalentes. Como alternativa, se pueden emplear inmunógenos o antígenos de CAV2, o epítomos de CAV2 inmunógenos, tales como proteínas de cápside, matriz, o hexón.
- 40 **[0086]** El parvovirus canino (CPV) es un virus intestinal común que puede causar vómitos, diarrea, gastroenteritis, miocarditis y hepatitis en perros jóvenes. Se ha descubierto que está muy extendido entre los perros. El CPV puede estar presente en las composiciones inmunógenas, suspensiones, o soluciones de la invención inactivadas, vivas atenuadas, o CPV inmunógenos, antígenos, o epítomos de CPV inmunógenos, tales como los productos genéticos VP1, VP2 (cápside).
- 45 **[0086]**
- 50 **[0086]**
- 55 **[0086]**

[0087] También se pueden combinar dos infecciones bacterianas comunes de perros en sus formas atenuadas en las composiciones, suspensiones, o soluciones inmunógenas estabilizadas de la presente invención; estas son la *Leptospira canicola* y la *Leptospira ichtherohaemorrhagiae*. Las Lepto infecciones son comunes en los perros y especialmente en los perros infectados por CDV, cPI2, o combinaciones de virus tal como se ha observado
5 frecuentemente en los perros que padecen moquillo o tos de la perrera, y así, sus inclusiones en las composiciones, suspensiones, o soluciones inmunógenas estabilizadas de la presente invención son de utilidad significativa.

[0088] Otro componente inmunógeno activo útil en las composiciones y procedimientos de la presente invención puede comprender uno o más inmunógenos que se seleccionan de entre patógenos aviares que incluyen, pero que no se limitan a, salmonela typhimurium, salmonela enteritidis, virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la
10 Enfermedad de Newcastle (NDV), virus del síndrome de la gota del huevo (EDS), virus de la Enfermedad infecciosa Bursal (IBDV), virus del pavo, virus de la gripe aviar, virus de la enfermedad de Marek's, virus del Herpes tales como el virus de la laringotraqueítis infecciosa, virus de la bronquitis aviar infecciosa, reovirus aviar, poxvirus incluyendo la viruela aviar, virus, pigeonpox, quailpox, y dovepox, poliomavirus aviar, pneumovirus aviar, virus aviar rhinohacheitis,
15 virus aviar reticuloendoteliosis, retrovirus aviar, virus endógeno aviar, virus de la eritroblastosis aviar, virus de la hepatitis aviar, virus de la anemia aviar, virus de la enteritis aviar, virus de la enfermedad de Pacheco, virus de la leucemia aviar, parvovirus aviar, rotavirus aviar, virus de la leucosis aviar, virus del fibrosarcoma musculoaoneurótico aviar, virus de la mieloblastosis aviar, virus de la mieloblastosis asociada aviar, virus de la mielocitomatosis aviar, virus del sarcoma aviar, virus de la necrosis del bazo aviar, y combinaciones de estos.

[0089] En lo que se refiere a los inmunógenos específicos, los componentes inmunógenos activos también puede ser los genes HN y F del Virus de la Enfermedad de Newcastle, los genes de la poliproteína y VP2 del Virus de la
20 Enfermedad Bursal infecciosa, los genes S y N del virus de la bronquitis infecciosa y los genes gB y gD del virus de la enfermedad de Marek. Estos componentes se pueden utilizar como composiciones inmunógenas o de vacunas para proteger aves contra enfermedades provocadas por estos patógenos.

[0090] Como alternativa, el componente inmunógeno activo comprende uno o más inmunógenos de un patógeno felino tales como, pero no limitados a, virus del herpes felino (FHV), calcivirus felino (FCV), virus de la leucemia
25 felina (FeLV), virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de la panleucopenia felina, virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la rabia, y similares, y combinaciones de estos.

[0091] El componente inmunógeno activo también puede incluir los genes gB, gC y gD del Virus del herpes felino, los genes env y gag/pro del FeLV, los genes env, gag/pol y tat del virus de la FIV, el gen de la cápsida del calcivirus
30 felino, el gen S modificado, los genes M, y N del Virus de la peritonitis infecciosa felina, y el gen VP2 del parvovirus felino. Estos componentes pueden ser útiles como composiciones inmunogénicas o de vacuna para proteger a los gatos contra enfermedad causadas por estos patógenos.

[0092] El componente inmunógeno activo puede comprender uno o más inmunógenos de un patógeno equino, tales como el virus del herpes equino (tipo 1 o tipo 4), virus de la gripe equina, virus de la encefalomiélitis equina (EEV),
35 tétanos, Virus del Nilo Occidental, y similares o combinaciones de estos.

[0093] El componente inmunógeno activo también puede incluir, los genes gB, gC, gD y genes inmediatamente tempranos del virus del herpes equino de tipo 1, los genes gB, gC, gD y genes inmediatamente tempranos del virus del herpes equino de tipo 4, los genes HA, NA, M y NP del virus de la gripe equina, los genes del Virus de la
40 Encefalitis equina del este, los genes del Virus de la Encefalitis equina del oeste, genes del virus de la Encefalitis equina de Venezuela, los genes prM--M-E del virus del Nilo occidental, y genes del virus de la arteritis equina, aunque no están limitados a estas secuencias. Estos componentes pueden ser útiles como composiciones inmunógenas o de vacunas para proteger caballos contra enfermedad causadas por estos patógenos.

[0094] El componente inmunógeno activo puede comprender uno o más inmunógenos de un patógeno bovino, tales como el virus de la rabia, el rotavirus bovino, el virus de la parainfluenza bovina de tipo 3 (bCPI2-3), el coronavirus
45 bovino, el virus de la diarrea bovina vírica (BVDV), el virus de la enfermedad de la boca y del pie (la fiebre aftosa), el virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), el *Escherichia coli*, el *Pasteurella multocida*, el *Pasteurella haemolytica*, y similares y combinaciones de estos.

[0095] El componente inmunógeno activo también puede seleccionarse de entre los genes gB, gC, gD y genes inmediatamente tempranos del virus del herpes bovino de tipo 1, los genes F y G del BRSV, la poliproteína, los
50 genes E1, E2 de BVDV, los genes HN y F del virus PI3 o genes del Rotavirus. Estos componentes pueden ser útiles como composiciones inmunogénicas o vacunas para proteger ganado contra enfermedades causadas por estos patógenos.

[0096] Además, el componente inmunógeno activo puede comprender uno o más inmunógenos de un patógeno porcino tal como, pero no limitado a, el virus de la influenza porcina (SIV), el circovirus porcino de tipo 2 (PCV-2), el
55 virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRSV), el virus de la pseudorabia (PRV), el parvovirus porcino (PPV), el virus del cólera del cerdo (HCV), la fiebre aftosa, micoplasma hyopneumoniae, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, y similares, y combinaciones de estos.

- 5 **[0097]** El componente inmunógeno activo también puede incluir los egens gB, gC, gD y genes inmediatamente tempranos de PRV, los genes HA, NA, M y NP del virus de la influenza porcina, la poliproteína, los genes E1, E2 del Virus del cólera del cerdo, los genes ORF1 y ORF2 del virus del PCV2, los genes ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, o ORF7 del virus del PRRSV o genes de micoplasma hyopneumoniae. Estos componentes pueden ser útiles como composiciones inmunógenas o de vacunas para proteger cerdos contra enfermedad causadas por estos patógenos.
- 10 **[0098]** El componente inmunógeno activo puede comprender secuencias que codifican a una proteína expresada en patógenos tales como virus del ARN o ADN tales como VIH, HCV, HBV, HPV, EBV, HSV, CMV, HTLV, virus Hanta, virus Ebola, virus Marburg, virus de la fiebre de Rift Valley, virus Lassa y virus de la gripe, virus de la enteritis hemorrágica (HEV), virus de la rinitis infecciosa (IBRV), entre otros. Estos inmunógenos se pueden utilizar ventajosamente como composiciones inmunógenas o de vacunas para proteger a sujetos, tales como humanos, contra enfermedades causadas por estos patógenos.
- 15 **[0099]** El componente inmunógeno activo también puede ser, por ejemplo, uno cualquiera de los siguientes patógenos, bacterias y sus antígenos: Actinobacillus especies tales como Actinobacillus pleuropneumoniae, Bordetella la tos ferina, Bordetella parapertussis, Bordetella bronchiseptica, Bordetella avium, clamidia trachomatis, clamidia pneumoniae, clamidia psittaci, especies de Klebsiella tales como Klebsiella pneumoniae, tuberculosis
20 Mycobacterium, pseudotuberculosis Mycobacterium, Mycobacterium pneumoniae, estreptococo grupo A, estreptococo equi, estreptococo pneumoniae, estreptococo agalactiae, estreptococo pyogenes, estreptococo viridans, Neisseria gonorrhoeae, Erysipelothrix especies, enterotoxigénica Escherichia coli, Vibrio cholerae, bacilo anthracis, Haemophilus influenzae, Haemophilus somnus, Haemophilus parasuis, salmonela especies, salmonela agona,
25 salmonela blockley, salmonela enteritidis, salmonela hadar, salmonela Heidelberg, salmonela montevideo, salmonela senftenberg, salmonela choleraesuis, especies Rickettsia, Helicobacter pylori, Helicobacter felis, especies Shigella, especies Listeria, Legionella pneumoniae, especies Pseudomonas, especies Borrelia, Borellia burgdorferi, Neisseria meningitis, especies Clostridium, Clostridium difficile, Ureaplasma urealyticum, especies estafilococo, estafilococo aureus, enterococos faecalis, Pasteurella pestis, especies Campylobacter, Campylobacter jejuni,
30 especies Treponema, especies Leptospira, Corynebacterium diphtheriae, Hemophilus ducreyi, Hemophilus influenza, especies Erlichia, entre otros.
- [0100]** El componente inmunógeno activo también puede ser un derivado de un hongo o molde tal como el Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, especies Penicillium, especies Fusarium, especies Candida tal como Candida trichophyton, Candida parapsilosis, Candida glabrata, Candida dubliniensis, y Candida albicans, Rhizopus especies, especies de criptococo tales como criptococo neoformans, criptococo grubii, criptococo gattii, Paracoccidioides brasiliensis, Histoplasma capsulatum, y otros hongos y moldes.
- 35 **[0101]** El componente inmunógeno activo también puede seleccionarse de entre antígenos parasitarios derivados de especies parasitarias que incluyen, aunque no se limitan a, especies Plasmodium, especies tripanosoma, especies Giardia, especies Boophilus, especies Babesia, especies Entamoeba, especies Eimeria, especies Leishmania, especies Schistosoma, especies Brugia, especies Fasciola, especies Dirofilaria, especies Wuchereria, especies Onchocerca, especies Treponema, especies Toxoplasma, especies criptococo, especies CoCCIDia, especies Histomoniasis, especies Hexamitiasis, especies Giardia, entre otros; nematodos que incluyen a especies Ascaris, especies Trichinella, y similares, helmintos tales como trematodos, tenias, entre otros; y otros organismos patógenos. Los procedimientos para preparar inmunógenos derivados de virus, bacterias, hongos, moldes,
40 protozoos, nematodos, y helmintos son conocidos en el estado de la técnica.
- [0102]** Otros inmunógenos útiles pueden ser, por ejemplo, factores de virulencia antigénica purificados secretados, tales como toxinas, citotoxinas, y similares. Los antígenos de toxina que están destoxificados por modificación (toxoides), que pueden ser administrados en combinación con un adyuvante tal como el hidróxido de aluminio, y se pueden utilizar para estimular la formación de anticuerpos neutralizadores de la. Algunos ejemplos de toxinas que se
45 pueden utilizar como inmunógeno incluyen endotoxinas y exotoxinas bacterianas tales como la lipopolysaccharida, enterotoxinas que incluyen enterotoxinas lábiles al calor (LT), enterotoxinas estables frente al calor (ST), verotoxina (VT), y similares. Los inmunógenos de exotoxina bacteriana son secretados en el medio circundante, e incluyen, por ejemplo, la toxina de la difteria (Corynebacterium diphtheriae), la toxina del tétanos (Clostridium tetani), las enterotoxinas secretadas por el estafilococo aureus, las toxinas de botulinum (Clostridium botulinum); y las toxinas
50 producidas por algas tales como neurotoxinas; y similares. Algunas endotoxinas estables frente al calor, liberadas por autólisis de las bacterias, incluyen, por ejemplo, toxinas del cólera liberadas por el gramo negativo Vibrio cholerae, las colicinas producidas por bacterias intestinales tales como E. coli (bacteriocina).
- 55 **[0103]** Los inmunógenos derivados de, o procedentes de virus, las bacterias, hongos y similares pueden ser producidos por procedimientos de cultivo in vitro empleando medios de cultivo o líneas de células huésped apropiados y procedimientos convencionales bien conocidos para el experto en la materia. Por ejemplo, se puede cultivar PRRSV en una línea celular apropiada, tal como la línea celular MA-104 (ver las patentes americanas de números. 5,587,164; 5,866,401; 5,840,563; 6,251,404 entre otros). De manera similar, el PCV-2 se puede cultivar en líneas celulares PK-15 (ver las patentes americanas de números. 6,391,314); el SIV se puede cultivar en huevos (Patente americana número. 6,048,537); y el micoplasma hyopneumoniae se puede cultivar en un medio de cultivo
60 apropiado (Patentes americanas número. 5,968,525; 5,338,543; Ross R F. y otros., (1984) Am. J. Vet. Res. 45: 1899-1905). Ventajosamente, el CDV se puede cultivar en células de pulmón de visón, tal como se describe en la

patente americana número 5,178,862. Son conocidas otras técnicas para la preparación de derivados de virus inmunógenos en el estado de la técnica, y descritas, por ejemplo, en Ulmer y otros, Science 259: 1745 (1993); Male y otros., advanced Immunology, páginas 14.1-14. 15, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa. (1989).

5 **[0104]** También son útiles los péptidos sintéticos inmunogénicos que mimetizan secuencias de péptido antigénico. Estos inmunógenos pueden ser sintetizados empleando técnicas en fase sólida como las descritas, por ejemplo, en R B. Merrifield, Science 85:2149- 2154 (1963), purificados, y opcionalmente acoplados a una proteína portadora tal como el dipéptido muramilo (MDP), la albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de la lapa californiana (KLH), y similares, empleando un agente de acoplamiento bifuncional tal como el glutaraldehído, y similares.

10 **[0105]** Los antígenos sintéticos también se incluyen en la definición, por ejemplo, poliepitopos, epitopos de flanco, y otros antígenos derivados sintéticamente o recombinantes. Ver, por ejemplo, Bergmann y otros. (1993) Eur. J. immunol. 23,2777-2781; Bergmann y otros. (1996) J. immunol. 157, 3242-3249; Suhrbier, A. (1997) immunol. cell Biol. 75, 402-408; Gardner y otros. (1998) 12th World AIDS conference, Geneva, Switzerland, Jun. 28-Jul. 3, 1998. Los fragmentos inmunogénicos pueden contener en general al menos aproximadamente 3 aminoácidos, preferentemente al menos aproximadamente 5 aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 10-
15 aminoácidos, y Más preferentemente 25 o más aminoácidos, de la molécula. No hay un límite superior crítico de la longitud del fragmento, que podría comprender casi toda la longitud de la secuencia de la proteína, o incluso una proteína de fusión que comprenda dos o más, o al menos un epitopo de la proteína.

20 **[0106]** Por consiguiente, una estructura mínima de un ácido nucleico que expresa un epitopo puede comprender nucleótidos que codifiquen a un epitopo, inmunógeno, o antígeno de una proteína o poliproteína. Un ácido nucleico que codifica a un fragmento de la proteína o poliproteína total, más ventajosamente, comprende o consiste en esencialmente en un mínimo de aproximadamente 21 nucleótidos, ventajosamente al menos aproximadamente 42 nucleótidos, y preferentemente al menos aproximadamente 57, aproximadamente 87 o aproximadamente 150 consecutivos o nucleótidos contiguos de la secuencia que codifica a la proteína o poliproteína total. Procesos de determinación de epitopo, tales como, generación o superposición de bibliotecas de péptidos (Hemmer B. y otros.,
25 (1998) Immunology Today 19(4), 163-168), Pepscan (Geysen y otros. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3998-4002; Geysen y otros., (1985) Proc. Nat Acad. Sci. USA 82, 178-182; Van der Zee R. y otros., (1989) Eur. J. inmunol. 19, 43-47; Geysen H.M., (1990) Southeast Asian J. Trop. Med. salud pública 21, 523-533; Multipin® síntesis de péptidos Kits de Chiron) y algoritmos (De Groot A. y otros., (1999) Nat. Biotechnol. 17, 533-561), y en la solicitud PCT No. PCT/US2004/022605. También se pueden consultar otros documentos citados e incorporados aquí para procedimientos para la determinación de epitopos de un inmunógeno o antígeno y moléculas de ácido nucleico que codifiquen a estos epitopos.

30 **[0107]** En la presente descripción, el componente inmunógeno activo también puede comprender un agente terapéutico, una citoquina, una toxina, un inmunomodulador, una proteína, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de antígeno de unión de un anticuerpo, un adyuvante, o cualquier otra molécula codificable por DNA y deseada para el suministro a un animal o célula o tejido animal.
35

[0108] También quedan contemplados por la presente invención la inclusión de especies antisentido, catalíticas, o RNA de interferencia pequeños en las composiciones inmunógenas y de vacunas de la presente invención, que puede ser dirigidas contra cualquier molécula presente en la célula recipiente o que probablemente esté presente en la célula recipiente. Estos incluyen, aunque no están limitados a especies RNA que codifican moléculas reguladoras de la célula, tales como la interleuquina-6, agentes causantes de cáncer tal como el virus del papiloma humano, enzimas, RNA vírica y RNA derivados de patógenos, tales como el RNA HIV-1. Los ARNs también pueden ser dirigidos a secuencias de ADN no transcritas, tales como regiones promotoras o potenciadoras, o to cualquier otra molécula presente en las células recipiente, tales como, aunque no limitados a, enzimas implicadas en la síntesis de moléculas DNA o tRNA.
40

45 **[0109]** Además, las citoquinas y los inmunomoduladores pueden co-expresarse en las composiciones inmunógenas y de vacunas de la presente invención. Algunos ejemplos incluyen, aunque no están limitados a, IL-2, IL-4, TNF- α , GM-CSF, IL- 10, IL-12, IGF-1, IFN- α , IFN- β , y IFN- γ .

[0110] Se pueden insertar motivos de secuencia específicos, tales como el motivo RGD, en el bucle H-I de un plasmídico vírico o vector para aumentar su infectividad. Esta secuencia ha mostrado ser esencial para la interacción de determinadas matrices y proteínas extracelulares de adhesión con una superfamilia de receptores de superficie celulares llamadas integrinas. La inserción de del motivo RGD puede ser ventajosamente útil en sujetos inmunocomprometidos. Un vector recombinante se puede construir clonando antígenos o inmunógenos específicos o fragmentos de los mismos en cualquiera de los vectores tales como aquellos aquí descritos. El vector recombinante se puede utilizar para transducir las células de un vertebrado para su uso como agente de
50 inmunización(Ver, por ejemplo, la solicitud de patente americana número. 10/424,409, incorporada por referencia).
55

[0111] Preferentemente, los codones que codifican componentes inmunógenos activos, tales como antígenos, inmunógenos y epitopos, son codones "optimizados", es decir, los codones son aquellos que aparecen frecuentemente en, es decir, genes caninos altamente expresados, en lugar aquellos codones que se usan frecuentemente, por ejemplo, en CDV o cPi2. Este uso de codones proporciona una expresión eficiente del

- componente inmunógeno activo en las células. En otras realizaciones, por ejemplo, cuando el componente inmunógeno activo está expresado en las bacterias, levadura u otros sistemas de expresión, el uso de patrones de codones se altera para que represente el sesgo de codón para genes altamente expresados en el organismo en el que el antígeno o inmunógeno está expresado. El uso de patrones de codones es conocida en la literatura para genes altamente expresados de varias especies (por ejemplo, Nakamura y otros., 1996; Wang et al, 1998; McEwan y otros. 1998).
- [0112]** En algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de codificación para que se adhiera a las secuencias de control con la orientación apropiada; es decir, para mantener el marco de lectura apropiado. También puede ser deseable para producir mutantes o análogos de los componentes inmunógenos activos deseados. Los mutantes o análogos se pueden preparar por eliminación de una porción de una secuencia que codifica a una proteína, por inserción de una secuencia, y/o por sustitución de uno o más nucleótidos en una secuencia. Algunas técnicas para la modificación de secuencias de nucleótidos, tales como mutagénesis dirigida a sitios, se describen en, por ejemplo, Sambrook y otros., supra; DNA Cloning, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.
- [0113]** Algunos inmunógenos útiles en componentes inmunógenos activos de la presente invención pueden estar contenidos en vectores. Estos vectores incluyen, aunque no están limitados a, vectores de expresión recombinante en vivo tal como un vector ácido nucleico o un plásmido (Solicitud EP No. 1001025; Chaudhuri P, (2001) Res. Vet Sci. 70, 255-6), vectores víricos tales como, pero no limitados a, vectores adenovirus, vectores aviarios tales como la viruela aviar (US patente Serial Nos. 5,174,993; 5,505,941; y 5,766,599) vectores virus (US patente Serial No. 5,756,103), vectores retrovirales, vectores del virus del herpes, vectores basados en alfavirus, vectores fúngicos, o vectores bacterianos (especies *Escherichia coli* o salmonela). Aquí se describen ejemplos de vectores específicos útiles para la invención.
- [0114]** El vector puede ser un vector vírico, ventajosamente un vector de la viruela aviar que contenga al menos un componente inmunógeno activo, o un epítipo de los mismos, o un fragmento de los mismos. En una realización especialmente ventajosa, el vector de la viruela aviar es un vector virus, ventajosamente, un vector virus atenuado tal como el ALVAC. Algunos virus del canario atenuados se describen en la patente americana número 5,756,103 (ALVAC) y WO01/05934. El vector de la viruela aviar puede ser un vector de la viruela aviar, ventajosamente un vector atenuado de la viruela aviar tal como el TROVAC. También se hace referencia a la patente americana número 5,766,599 que pertenece al linaje atenuado de la viruela aviar TROVAC. A este respecto, se hace referencia a los virus disponibles a partir de la ATCC con número de acceso VR-111. También están disponibles numerosas cepas de virus de inmunización contra la viruela aviar, por ejemplo el linaje DIFTOSEC CT comercializado por Merial y la vacuna NOBILIS VARIOLE comercializada por Intervet; y, también se hace referencia a la patente americana número. 5,766,599 que pertenece al linaje atenuado de la viruela aviar TROVAC.
- [0115]** Un vector vírico que también es útil para suministrar componentes inmunógenos activos incluyen un virus de la viruela, por ejemplo un virus vaccinia o un virus vaccinia atenuado, (por ejemplo, MVA, un linaje modificado de Ankara obtenida después de más de 570 ciclos del linaje de la vacuna Ankara en fibroblastos de embrión de pollo; ver Stickl & Hochstein-Mintzel, (1971) Munch. Med Wschr. 113, 1149-1153; Sutter y otros. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 10847-10851; disponible como ATCC VR-1508; o NYVAC, ver la patente americana número 5,494,807, por ejemplo, los ejemplos 1 a 6 de la patente americana número 5,494,807 que tratan de la construcción de NYVAC, así como variaciones de NYVAC con más ORFs eliminados del genoma del virus de la vaccinia del linaje de Copenhage, así como la inserción de secuencias de codificación de ácidos nucleicos heterólogos en sitios de este recombinante, y también, la utilización de promotores coincidentes; ver también WO96/40241) en el virus de la viruela aviar o virus atenuado de la viruela aviar (por ejemplo, virus, viruela aviar, de la paloma, viruela de la vaca, de la codorniz, ALVAC o TROVAC; ver, por ejemplo, La patente americana número 5,505,941, 5,494,807), la viruela porcina, del mapache, viruela del camello, o virus de la mixomatosis.
- [0116]** Para información sobre el procedimiento para generar recombinantes de los mismos y sobre cómo administrar recombinantes de los mismos, el experto puede referirse a documentos citados aquí y a WO90/12882, por ejemplo, y en lo que se refiere al virus de la vaccinia se mencionan las patentes americanas 4,769,330, 4,722,848, 4,603,112, 5,110,587, 5,494,807, y 5,762,938 entre otras; En lo que respecta a la viruela aviar, se mencionan las patentes americanas de números. 5,174,993, 5,505,941 y US-5,766,599 entre otras; En lo que respecta a virus se menciona la patente americana número 5,756,103 entre otras; En lo que respecta a la viruela porcina se menciona la patente americana número 5,382,425 entre otras; y, En lo que respecta al mapache, se menciona WO00/03030, entre otros.
- [0117]** Cuando el vector de expresión es un virus de la vaccinia, un sitio o unos sitios inserción para el ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican a componentes inmunógenos activos tales como inmunógenos, antígenos, epítopos y similares, para que se expresen ventajosamente en el gen o sitio de inserción de la quinasa timidina (TK), gen o sitio de inserción de la hemaglutinina (HA), la región que codifica el cuerpo de inclusión del tipo A (ATI); ver también los documentos citados aquí, especialmente aquellos pertenecientes al virus de la vaccinia. En el caso de virus, ventajosamente el sitio o sitios de inserción son ORF(s) C3, C5 y/o C6; ver también los documentos citados aquí, especialmente aquellos relativos al virus del canario. En el caso de la viruela aviar, ventajosamente el sitio o sitios de inserción son ORFs F7 y/o F8; ver también los documentos citados aquí, especialmente aquellos relativos al virus de la viruela aviar. El sitio o sitios de inserción para el virus MVA se describen ventajosamente en varias

publicaciones, incluyendo Carroll M. W. y otros. (1997) *vaccine* 15(4), 387-394; Stittelaar K.J. y otros. (2000) *J. Virol.*, 2000, 74(9), 4236-4243; Sutter G. y otros. (1994) *vaccine* 12(11), 1032-1040; y, a este respecto también se destaca que el genoma MVA completo se describe en Antoine G., (1998) *virology* 244, 365-396, que permite al experto emplear otros sitios de inserción u otros promotores.

- 5 [0118] Ventajosamente, el ácido nucleico a expresar puede ser insertado bajo el control de un promotor poxvirus específico, por ejemplo, el promotor de vaccinia 7.5 kDa (Cochran y otros., (1985) *J. virology* 54, 30-35), el promotor de vaccinia I3L (Riviere y otros., (1992) *J. virology* 66, 3424-3434), el promotor de vaccinia HA (Shida, (1986) *virology* 150,451-457), el promotor de vaccinia 42K (Cooper J.A. et al, (1981) *J. Virol.* 37(1), 284-94), el promotor de la viruela de la vaca ATI (Funahashi y otros (1988) *J. Gen. Virol.* 69, 35-47), el promotor de la vacuna 11K (La patente americana número 5,017,487); el promotor de vaccinia H6 (Taylor J. y otros., (1988) *vaccine* 6, 504-508; Guo P. y otros. (1989) *J. Virol.* 63, 4189-4198; Perkus M. y otros. (1989) *J. Virol.* 63, 3829-3836), o promotores de la vaccinia o viruela sintéticos, entre otros.

- 10 [0119] Ventajosamente, para la inmunización de mamíferos, el vector de expresión puede ser un virus o un vector de la viruela aviar. De esta manera, puede haber expresión de las proteínas heterólogas con replicación limitada o
15 no productiva.

- [0120] Otro vector vírico útil para suministrar y expresar componentes inmunógenos activos es un adenovirus. El adenovirus es un virus no-envuelto en ADN. Los vectores derivados de los adenovirus tienen un número de características que los hace especialmente útiles para la transferencia de genes. Un vector adenovirus recombinante es un vector adenovirus que transporta una o más secuencias de nucleótidos heterólogos (por ejemplo, dos, tres,
20 cuatro, cinco o más secuencias de nucleótidos heterólogos). Por ejemplo, la biología del adenovirus está caracterizada en detalle, el virus es extremadamente eficiente en introducir su ADN en la célula huésped, el virus puede infectar una amplia variedad de células y tiene un amplio intervalo de huéspedes, el virus puede ser producido en grandes cantidades con relativa facilidad, y el virus puede volverse defectuoso para replicación por eliminaciones en la región temprana 1 ("E1") del genoma vírico.

- 25 [0121] En contraste con, por ejemplo, los retrovirus, los adenovirus no se integran en genoma de la célula huésped, son capaces de infectar a células que no se dividen, y son capaces de transferir genes recombinantes in vivo eficientemente (Brody y otros., 1994). Estas características hacen atractivos a los adenovirus como candidatos para la transferencia in vivo de genes de, por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo de interés en las células, tejidos o sujetos que necesiten a los mismos.

- 30 [0122] Los vectores adenovirus que contienen múltiples eliminaciones se prefieren tanto por el aumento de la capacidad de transporte del vector y por la reducción de probabilidad de recombinación para generar adenovirus competente para la replicación (RCA). Cuando el adenovirus contiene múltiples eliminaciones, no es necesario que cada una de las eliminaciones, si están presentes individualmente, porque darían como resultado adenovirus deficientes para la replicación. En la medida en que las eliminaciones hacen al adenovirus deficiente en la
35 replicación, las eliminaciones adicionales se pueden incluir para otros fines, por ejemplo, para aumentar la capacidad de transporte del genoma del adenovirus para secuencias de nucleótidos heterólogos. Preferentemente, más de una eliminación evita la expresión de una proteína funcional y hace que la replicación del adenovirus sea deficiente. Más preferentemente, todas las eliminaciones son eliminaciones que harían la replicación del adenovirus deficiente.

- 40 [0123] Los adenovirus recombinantes pueden incluir vectores adenovirus E1-deficientes o eliminados, E3-deficientes o eliminados, y/o E4- deficientes o eliminados, o vector adenovirus "sin entrañas" por el hecho de que todos los genes víricos se han eliminado. Los vectores adenovirus pueden comprender mutaciones en los genes E1, E3, o E4, o eliminaciones en estos o de todos los genes adenovíricos. La mutación E1 aumenta el margen de seguridad del vector porque se sabe que los mutantes adenovirus deficientes en E1 son deficientes para su
45 replicación en células no-permisivas, y son, como muy mínimo, muy atenuados. La mutación E3 aumenta la inmunogenicidad del antígeno mediante la disrupción del mecanismo mediante el cual el adenovirus regula por disminución de moléculas MHC de clase I. La mutación E4 reduce la inmunogenicidad del vector de adenovirus mediante la supresión de la última expresión del gen, y así permite la re-inmunización repetida utilizando el mismo vector. Se contemplan los vectores adenovirus de cualquier serotipo o serogrupo eliminados o mutados en E1, E3,
50 E4, E1 y E3, y E1 y E4.

- [0124] Un vector adenovirus "sin entrañas" es el último modelo en la familia de vectores de adenovirus y se deriva de secuencias adenovirus humanas. Su replicación requiere un virus ayudante y una línea celular especial humana 293 que exprese tanto a E1a y a Cre, una condición que no existe en medio ambiente natural; el vector está desprovisto de cualquier gen vírico, así el vector como portador de vacuna no es inmunogénico y puede ser
55 inoculado varias veces para la re-inmunización. El vector adenovirus "sin entrañas" también contiene 36 kb de espacio para acomodar ácido nucleico(s) heterólogos de interés, permitiendo así la co liberación de un gran número de antígenos o inmunógenos en las células.

[0125] El vector puede ser cualquier vector virus recombinante o virus adecuado, que incluya, sin limitarse a, un virus de la viruela (por ejemplo, virus vaccinia, el virus de la viruela aviar, el virus del canario, el virus de la viruela

aviar, el virus de la ciruela del mapache, el virus de la viruela porcina, etc.), adenovirus (por ejemplo, adenovirus canino), el virus del herpes, baculovirus, retrovirus, o el vector puede ser un plásmido. Los documentos aquí citados, además de proporcionar ejemplos de vectores útiles en la práctica de la invención, también pueden proporcionar fuentes para otros componentes inmunógenos activos para ser expresados por un vector o vectores en, o incluidos en, las composiciones inmunógenas estabilizadas, suspensiones, o soluciones de la invención.

[0126] Elementos para la expresión de los componentes inmunógenos activos puede estar ventajosamente presente en un vector plasmídico. El término plásmido incluye cualquier unidad de transcripción de DNA que comprenda un ácido nucleico según la invención y los elementos necesarios para su expresión en vivo en una célula o las células de huésped u objetivo deseados; y, a este respecto, hay que destacar que un plásmido superenrollado o no-superenrollado, circular, así como una forma lineal, también se suponen como al alcance de la invención.

[0127] De manera mínima, la expresión de un componente inmunógeno activo, tal como un antígeno, un inmunógeno, y un epítipo, comprenden un codón de inicio (ATG), un codón de parada y un promotor, y opcionalmente también un secuencia de poliadenilación para determinados vectores tales como el plásmido y determinados vectores víricos, como por ejemplo, vectores víricos diferentes del virus de la viruela. Cuando el ácido nucleico codifica a un fragmento de poliproteína en el vector, un ATG se coloca en el terminal 5' del marco de lectura y un codón de parada se coloca en el terminal 3'. Pueden estar presentes otros elementos para controlar la expresión, tales como secuencias potenciadoras, secuencias estabilizadoras y secuencias de señales que permiten the expresión, modificación, y secreción de la proteína.

[0128] Una "secuencia de codificación" de ácido nucleico o una " secuencia de codificación de nucleótidos" e una proteína particular es una secuencia de ADN que es transcrita y traducida en un polipéptido in vitro o en vivo cuando se coloca bajo el control de elementos de regulación apropiados. Los límites de la secuencia de codificación están determinados por un codón de inicio en el terminal 5' y un codón de parada de traducción en el terminal 3'. Una secuencia de codificación puede incluir, aunque no está limitada a, secuencias procariotas, cADN de ARNm eucariotas, secuencias genómicas de ADN de ADN eucariotas (por ejemplo, mamíferos), e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una secuencia de terminación de transcripción estará generalmente ubicada en 3' de la secuencia de codificación.

[0129] Los "elementos de control" del ácido nucleico se refieren colectivamente e promotores, sitios de empalme RNA, sitios de unión de ribosomas, señales de poliadenilación (por ejemplo, señales de poliadenilación derivadas de la hormona de crecimiento bovino, señal de poliadenilación SV40), secuencias de terminación de transcripción, dominios de regulación dispuesto aguas arriba, potenciadores, orígenes de replicación (que pueden ser de orígenes bacterianos, por ejemplo, derivados de vectores bacterianos tales como pBR322, u orígenes eucariotas, por ejemplo, de secuencias de replicación de forma autónoma (ARS)), señales de empaquetamiento, secuencias líder que pueden estar o no contenidas en la secuencia de codificación de un componente inmunógeno activo, tal como un inmunógeno, un antígeno o un epítipo. Si se incluye una secuencia de señales, puede ser o bien native, una secuencia homóloga, o una secuencia heteróloga. Las secuencias líder pueden ser eliminadas por el huésped en procesados post-translacionales. Ver, por ejemplo, las patentes americanas de números. 4,431,739; 4,425,437; 4,338,397, y similares, que colectivamente proporcionan la transcripción y traducción de una secuencia de codificación en una célula huésped.

[0130] No siempre se necesitan todas estas secuencias de control en un vector recombinante en la medida en que el gen deseado es capaz de ser transcrito y traducido. Un elemento de control, tal como un promotor "dirige la transcripción" de una secuencia de codificación en una célula cuando la polimerasa ARN se une al promotor y transcribe la secuencia de codificación en ARNm. El ARNm resultante es traducido después al polipéptido codificado por la secuencia de codificación.

[0131] Se puede utilizar una variedad de elementos promotores / potenciadores dependiendo de del nivel y el tejido específico deseados. El promotor puede ser constitutivo o inducible (por ejemplo, el promotor metalotionein, el promotor tetraciclina inducible, y el promotor ecdisona inducible, entre otros), dependiendo de patrón de expresión deseado. El promotor puede ser nativo o heterólogo y puede ser una secuencia natural o a sintético. "Heterólogo" en este contexto describe una región de inicio de transcripción que no se encuentra en huéspedes de tipo salvaje en el que la región de inicio de transcripción se introduce. El promotor se escoge para que funcione en la o las células objetivo o en el o los tejidos de interés. Se contemplan en la presente invención promotores específicos del cerebro, específicos hepáticos, y específicos del músculo (incluyendo específicos del esqueleto, cardíaco, y/o del diafragma). También se prefieren los promotores mamíferos y aviares, especialmente promotores caninos.

[0132] El promotor puede ser ventajosamente un promotor "temprano". Un promotor "temprano" es conocido en el estado de la técnica y se define como un promotor que lleva una expresión de un gen que es rápidamente y transitoriamente expresado en ausencia de síntesis de proteína *de novo*. El promotor también puede ser un promotor "fuerte" o "débil". Los términos "promotor fuerte" y " promotor débil" son conocidos en el estado de la técnica y pueden definirse por la frecuencia relativa de transcripción en el inicio (veces por minuto) en el promotor. Un promotor "fuerte" o "débil" también puede definirse por su afinidad con la polimerasa ARN.

[0133] El gen heterólogo puede disponerse bajo el control de un promotor, sitio de unión de ribosoma (para expresión bacteriana) y, opcionalmente, un potenciador o operador, de modo que la secuencia de ADN que codifica a la proteína deseada es transcrita en el ARN en una célula huésped o sujeto transformados por un vector que contiene al componente inmunógeno activo.

5 **[0134]** Se pueden ligar elementos de control y otras secuencias reguladoras a la secuencia de codificación antes de la inserción en un vector, tales como los vectores de clonación descritos más arriba. Como alternativa, la secuencia de codificación puede ser clonada directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado.

10 **[0135]** Más preferentemente, los antígenos o inmunógenos están operativamente asociados con, por ejemplo, un promotor mayor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano (CMV), un promotor del virus del simio 40 (SV40), un promotor de β -actina, un promotor de albúmina, un promotor de Factor de Elongación 1- α (EF1-a), un promotor PyK, un promotor MFG, o un promotor del virus del sarcoma de Rous. Otras secuencias de control de expresión incluyen promotores derivados de genes de la inmunoglobulina, adenovirus, virus del papiloma bovino, virus del herpes, y de este tipo. También se puede utilizar cualquier promotor vírico de mamífero para llevar a cabo
15 la invención, además de cualquier promotor vírico canino. Entre promotores de origen vírico caninos, los promotores de genes inmediatamente tempranos de el virus del herpes infeccioso canino, promotores tempranos o tardíos (es decir, quinasa timidina, helicasa ADN, ribonucleótido reductasa), se pueden utilizar en los procedimientos y vectores de la presente invención. Otros promotores incluyen el promotor de adenovirus canino E1, así como el promotor I complejo de histocompatibilidad mayor canina. Además, queda claramente al alcance del experto seleccionar un
20 promotor adecuado que exprese el antígeno o inmunógeno de interés a niveles suficientemente altos para inducir o provocar una respuesta inmunogénica en el antígeno o inmunógeno, sin experimentación indebida.

[0136] Se ha especulado que llevar a cabo la transcripción de nucleótidos heterólogos con el promotor de CMV puede dar como resultado la subregulación de expresión en animales inmunocompetentes (ver, por ejemplo, Guo y otros., 1996). Por consiguiente, también se prefiere asociar operativamente las secuencias de antígeno o
25 inmunógeno con, por ejemplo, un promotor de CMV modificado que no dé como resultado esta subregulación de la expresión del antígeno o inmunógeno.

[0137] Los vectores también pueden comprender un polienlazador o sitio de clonación múltiple ("MCS"), que puede estar ventajosamente ubicado aguas abajo de un promotor. El polienlazador proporciona un sitio para la inserción de
30 las moléculas de antígeno o inmunógeno que están "en el marco" con la secuencia del promotor, lo que da como resultado un "enlace operacional" en la secuencia del promotor al antígeno o inmunógeno de interés sitios de clonación múltiple y polienlazadores son bien conocidos para el experto en la materia.

[0138] Los vectores descritos aquí también pueden comprender genes de resistencia a los antibióticos. Ejemplos de estos genes de resistencia a los antibióticos que pueden incorporarse en los vectores de la invención incluyen, aunque no están limitados a, ampicilina, tetraciclina, neomicina, zeocina, kanamicina, bleomicina, hygromicina, y
35 cloramfenicol, entre otros.

[0139] En realizaciones donde hay más de un antígeno o inmunógeno, las secuencias de antígeno o inmunógeno pueden estar operativamente asociadas con un único promotor dispuesto aguas arriba y uno o más secuencias de sitios de entrada de ribosomas internos aguas abajo (IRES) (por ejemplo, la secuencia picornavirus EMC IRES). Una secuencia IRES permite la traducción multicistronica de dos o más secuencias de codificación a partir de una única
40 secuencia de ARNm.

[0140] Los vectores que se pueden utilizar para transformar una célula huésped apropiada o sujeto. Algunas líneas de células de mamífero son conocidas en el estado de la técnica e incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles a partir de la American Type Culture Collection (ATCC), tales como, pero no limitados a, células de ovario del hámster chino (CHO), células HeLa, células riñón de bebé hámster (BHK), células de riñón de mono
45 (COS), células carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón de bovino de Madin-Darby ("MDBK"), células de riñón canino de Madin-Darby ("MDCK"), así como otros. De manera similar, huéspedes bacterianos tales como *E. coli*, bacilo subtilis, salmonela spp., *Shigella* spp., y *estreptococo* spp., encontrarán su utilidad en el contexto de la presente invención. Huéspedes de levadura útiles para la presente invención incluyen entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Yarrowia lipolytica*. Huéspedes de insecto útiles en la presente invención incluyen, aunque no están limitados a, células de
50 *Spodoptera frugiperda*.

[0141] Como alternativa, se pueden utilizar vectores para infectar una célula en cultivo para expresar un producto de gen deseado, por ejemplo, para producir una proteína o péptido de interés. Preferentemente, la proteína o péptido es secretada en el medio y puede ser purificada a partir de este empleando técnicas rutinarias conocidas en el estado de la técnica. Son conocidas en el estado de la técnica secuencias de péptidos de señales que dirigen la secreción extracelular de proteínas y secuencias de nucleótidos que codifican a estas pueden enlazarse operativamente con la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido o proteína de interés mediante técnicas rutinarias conocidas en el estado de la técnica. Como alternativa, se puede hacer la lisis de las células y la proteína
55

recombinante expresada puede ser purificada a partir de la célula lisada. Preferentemente, la célula es una célula de vertebrado, más preferentemente una célula de mamífero.

[0142] El procedimientos para hacer y/o administrar un vector o recombinante o plásmido para la expresión de productos genéticos de genes ya sea en vivo o in vitro puede ser cualquier procedimiento deseado, por ejemplo, un procedimiento que es un procedimiento citado o análogo a los citados en: Las patentes americanas de números. 4,603,112; 4,769,330; 4,394,448; 4,722,848; 4,745,051; 4,769,331; 4,945,050; 5,494,807; 5,514,375; 5,744,140; 5,744,141; 5,756,103; 5,762,938; 5,766,599; 5,990,091; 5,174,993; 5,505,941; 5,338,683; 5,494,807; 5,591,639; 5,589,466; 5,677,178; 5,591,439; 5,552,143; 5,580,859; 6,130,066; 6,004,777; 6,130,066; 6,497,883; 6,464,984; 6,451,770; 6,391,314; 6,387,376; 6,376,473; 6,368,603; 6,348,196; 6,306,400; 6,228,846; 6,221,362; 6,217,883; 6,207,166; 6,207,165; 6,159,477; 6,153,199; 6,090,393; 6,074,649; 6,045,803; 6,033,670; 6,485,729; 6,103,526; 6,224,882; 6,312,682; 6,348,450 y 6; 312,683; La solicitud de patente americana número 920,197, presentada el 16 de octubre de 1986; WO90/01543; W091/11525; WO 94/16716; WO 96/39491; WO 98/33510; EP 265785; EP 0 370 573; Andreansky y otros. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11313-11318; Ballay y otros. (1993) EMBO J. 4, 3861-65; Felgner y otros. (1994) J. Biol. Chem. 269, 2550-2561; Frolov y otros. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11371-11377; Graham, F.L. (1990) Trends Biotechnol. 8, 85-87; Grunhaus y otros. (1992) Sem. Virol. 3, 237-52; Ju y otros. (1998) Diabetology 41, 736-739; Kitson y otros. (1991) J. Virol. 65, 3068-3075; McClements y otros. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93,11414-11420; musgo, B. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11341-11348; Paoletti, E. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93,11349-11353; Pennock y otros. (1984) Mol. ell. Biol. 4,399-406; Richardson (Ed), (1995) Procedimientos en biología molecular 39, "Baculovirus Expression protocols," Human Press Inc.; Smith y otros. (1983) Mol. célula. Biol. 3, 2156-2165; Robertson y otros. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11334-11340; Robinson y otros. (1997) Sem. inmunol. 9, 271; y Roizman, B. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11307-11312.

[0143] La expresión en el sujeto de la secuencia heteróloga puede dar como resultado una respuesta inmune en el sujeto a los productos de expresión del antígeno o inmunógeno. Por lo tanto, se pueden utilizar componentes inmunógenos activos en una composición inmunógena o composición de vacuna para proporcionar medios para inducir una respuesta inmune, que puede, pero no tiene por que ser, protectora. Las técnicas de biología molecular utilizadas en el contexto de la invención se describen en Sambrook y otros. (2001).

[0144] También como alternativa, o adicionalmente, en composiciones inmunogénicas o de vacuna, la secuencia de nucleótidos que codifica a los antígenos o inmunógenos puede tener eliminada de esta una porción que codifica un dominio transmembrana. Incluso además como alternativa, o adicionalmente, el vector o composición inmunógena puede contener además y expresar en una célula huésped una secuencia de nucleótidos que codifican a una secuencia heteróloga tPA de señales tal como un tPA mamífero y/o un intrón estabilizador, tal como el intrón II del gen de la β -globina del conejo.

[0145] Se puede administrar un vector a un sujeto en una cantidad para lograr las cantidades establecidas para composiciones de productos genéticos (por ejemplo, epitopo, antígeno, terapéutico, y/o anticuerpo). Aquí se contemplan dosis por debajo y por encima de las aquí ejemplificadas, y para cualquier composición a administrar a un sujeto, incluyendo los componentes de los mismos, y para cualquier procedimiento particular de administración, se prefiere para determinar la toxicidad, como por ejemplo para determinar la dosis infecciosa de cultivo celular media (CCID₅₀), la dosis letal (LD) y LD50 en un sujeto adecuado; y la dosis de la composición, concentración de componentes en esta y los tiempos de administración de la composición, que provoquen una respuesta adecuada, tales como titulaciones de sueros y análisis de los mismos, por ejemplo, por ELISA y/o análisis de seroneutralización. Estas determinaciones no requieren experimentación indebida aparte del conocimiento del experto, esta descripción y los documentos citados aquí.

[0146] Las composiciones inmunógenas y/o composiciones de vacuna y/o suspensiones o soluciones inmunogénicas multivalentes que comprenden CAV2 vivos atenuados, CDV vivos atenuados, cPi2vivos atenuados, y CPV vivos atenuados, y que comprenden un estabilizador según la presente invención se han probado en los presentes ejemplos. Estas vacunas multivalentes mostraron una buena estabilidad para CDV, cPi2, CAV2 y CPV. Este demuestra que los estabilizadores de la presente invención son capaces de preservar la viabilidad e infectividad de CDV, cPi2, CAV2 y CPV. Esto también demuestra que los estabilizadores de la presente invención son capaces de preservar la viabilidad y infectividad de una variedad de virus distinta del paramixovirus canino, notablemente del parvovirus canino y del adenovirus canino. Los estabilizadores según la presente invención también se pueden emplear en composición inmunógena o composición de vacuna monovalente que comprenda CAV, CPV, CDV o cPi2.

[0147] Preferentemente un volumen de la suspensión o solución multivalente (es decir el paramixovirus canino y al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno distinto del paramixovirus) se mezcla con un volumen del estabilizador.

[0148] La invención también suministrada un proceso de para producir una composición inmunógena o composición de vacuna viva atenuada liofilizada estabilizada que comprende, por ejemplo, al paramixovirus canino, que comprende la etapa de liofilizar una suspensión o solución estabilizada formadas por una suspensión o solución de paramixovirus canino vivos atenuados, mezclada con un estabilizador según la invención.

- 5 [0149] Otro aspecto de la presente invención es un proceso para producir una liofilizada composición inmunógena estabilizada multivalente o composición de vacuna, que comprende la etapa de liofilizar una suspensión o solución estabilizada multivalente que comprende, por ejemplo, una suspensión o solución de paramixovirus caninos vivos atenuados y al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno diferente del paramixovirus, mezclada con un estabilizador según la invención.
- 10 [0150] "Liofilizar" implica la liofilización y se refiere al proceso mediante el que se congela una suspensión is frozen, después de que el agua se retire por sublimación a baja presión. Tal como se usa aquí, el término "sublimación" se refiere a un cambio en las propiedades físicas de una composición, en el que la composición cambia directamente desde un estado sólido a un estado gaseoso sin transformarse en un líquido. Tal como se usa aquí, el "valor Tg" se define como la temperatura de transición vítrea, que corresponde a la temperatura por debajo de la cual que la composición congelada se vuelve vítrea.
- 15 [0151] Un procedimiento de liofilización de suspensión o solución inmunógena según la invención puede comprender las etapas de (a) poner en contacto la suspensión o solución inmunógena con un estabilizador de la invención, de modo que se forma una suspensión o solución inmunógena estabilizada; (b) enfriar, a presión atmosférica, la suspensión o solución inmunógena estabilizada a una temperatura menos de aproximadamente el valor Tg de la suspensión o solución inmunógena estabilizada; (c) secar la suspensión o solución inmunógena estabilizada (es decir, la desecación primaria o etapa de sublimación) por sublimación de hielo a baja presión; y (d) retirar el exceso de agua residual (es decir, etapa secundaria de secado o desorción) reduciendo aún más la presión y aumentando la temperatura de la suspensión o solución inmunógena estabilizada.
- 20 [0152] La etapa de enfriar (b) puede ocurrir a temperaturas inferiores a aproximadamente -40°C (etapa de congelación de agua). Secar las suspensiones o soluciones estabilizadas inmunogénicas por sublimación de hielo a baja presión (c) puede ocurrir a, por ejemplo, presión inferior a o igual a aproximadamente 200 µbar, mientras que más reducción de presión puede ocurrir a presiones inferiores a o iguales a aproximadamente 100 µbar. Finalmente, la temperatura de la suspensión o solución inmunógena estabilizada durante la eliminación del exceso de agua residual (d) ocurre a, por ejemplo, temperaturas de entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 30°C.
- 25 [0153] El proceso de liofilización también puede realizarse con suspensiones o soluciones inmunógenas que comprenden paramixovirus canino vivos atenuados y al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno distinto del paramixovirus, que se mezcla con un estabilizador según la invención para obtener una composición inmunogénica o composición de vacuna liofilizada estabilizada multivalente.
- 30 [0154] El contenido de humedad del material liofilizado puede estar en el intervalo que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/p, preferentemente ir desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 3% en p/p, y más preferentemente ir desde aproximadamente 1.0% a aproximadamente 2.6% en p/p.
- 35 [0155] Ventajosamente, la suspensión o solución inmunógena estabilizada que comprende al menos un agente de carga tiene un valor de Tg elevado de entre aproximadamente -36°C a aproximadamente -30°C. Un elevado valor de Tg permite temperaturas mayores durante la etapa de congelación del agua del proceso de congelación y/o el proceso de liofilización, reduciendo de este modo la exposición de los virus vivos atenuados y el componente inmunógeno activo a estrés, evitando la pérdida sustancial de actividad.
- 40 [0156] Cada etapa, incluyendo la congelación del agua, y su eliminación durante las desecaciones primaria y secundaria, someter los ingredientes biológicos, tales como patógenos, en las suspensiones o soluciones inmunogénicas de la invención a choques mecánicos, físicos y bioquímicos, que tienen efectos potencialmente adversos en la estructura, apariencia, estabilidad, inmunogenicidad, infectividad y viabilidad de los patógenos o ingredientes biológicos.
- 45 [0157] Los estabilizadores de la invención permiten una buena estabilidad de patógenos vivos atenuados como el paramixovirus canino, y mantiene la infectividad de, en particular, el CDV y cPi2 durante el proceso de liofilización y durante el almacenamiento. La estabilidad se puede calcular por la diferencia entre el título de infectividad antes de la etapa de liofilización, y el título de la infectividad después de 12 meses de almacenamiento a 4°C de la composición inmunógena o composición de vacuna liofilizada estabilizado. La buena estabilidad puede comprender ventajosamente una diferencia de sólo 1.2 log₁₀ y preferentemente de sólo 1.0 log₁₀. Los procedimientos para determinar título de infectividad son bien conocidos por el experto en el estado de la técnica. Algunos procedimientos para determinar el título de infectividad se describen en los siguientes ejemplos. También, la estabilidad se puede estimar ajustando el log₁₀ título y los puntos de tiempo de la titulación durante el período de almacenamiento empleando cálculos y/o algoritmos de regresión lineal.
- 50 [0158] Además, los estabilizadores de la invención dan como resultado pastillas liofilizadas que tienen un buen aspecto, en otras palabras, que tienen forma regular y color uniforme. Una forma irregular puede caracterizarse por el hecho de que la presencia de todos o una parte de la pastilla adherida al fondo del recipiente y que permanece inmóvil después de darle la vuelta y cizallarlo (aspecto enganchado). También, una pastilla que tiene una forma de carrete (aspecto de carrete), o separación de la pastilla en dos partes, según un plano horizontal (aspecto duplicado), o una pastilla que tiene un aspecto de espuma con agujeros irregulares (aspecto esponjoso), o una

pastilla que tiene el aspecto de espuma en el recipiente (aspecto de merengue) tienen una forma irregular y no se aceptan (Figuras 1A y 1B).

5 **[0159]** Las composiciones liofilizadas inmunógenas o de vacunas estabilizadas empleando un estabilizador según la presente invención y obtenidas por el proceso de liofilización descrito más arriba se engloban en la presente invención.

10 **[0160]** En la presente descripción, la composición inmunogénica o composición de vacuna o la composición inmunógena liofilizada estabilizada multivalente o composición de vacuna liofilizada estabilizada viva atenuada comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p de al menos un monosacárido reductor, y (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante.

15 **[0161]** La composición inmunogénica o composición de vacuna o la composición inmunogénica o composición liofilizada estabilizada multivalente de vacuna liofilizada estabilizada viva atenuada puede comprender: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante, y (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 15% a aproximadamente 70% en p/p de al menos un agente de carga.

20 **[0162]** Las composiciones liofilizadas inmunógenas o de vacunas estabilizadas según la presente invención pueden ser almacenadas en atmósfera seca a temperaturas de refrigerador y a temperatura ambiente, en particular a temperaturas que van desde aproximadamente 2°C a aproximadamente 35°C, y más especialmente que van desde aproximadamente 4°C a aproximadamente 25°C.

[0163] Otro aspecto de la presente invención proporciona un kit que comprende un primer frasco que contiene la composición inmunógena o composición de vacuna liofilizada estabilizada viva atenuada o la composición inmunógena multivalente o composición de vacuna liofilizada estabilizado de la invención, y un segundo frasco que contiene un disolvente.

25 **[0164]** Para su uso y administración a un sujeto, la composición inmunógena o composición de vacuna liofilizada estabilizada puede ser reconstituida por rehidratación con un disolvente. El disolvente es típicamente agua, tal como agua desmineralizada o agua destilada, agua para inyección, pero también puede comprender soluciones fisiológicas o tampones, tales como por ejemplo solución tampón de fosfato (PBS), o adyuvantes que incluyen, pero que no se limitan a, emulsiones de aceite en agua, *Corynebacterium parvum*, bacilo Calmette Guerin, hidróxido de aluminio, glucano, sulfato de dextrano, óxido de hierro, alginato de sodio, Bacto-adyuvante, determinados polímeros sintéticos tales como poliaminoácidos y co-polímeros de aminoácidos, saponina, "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.), "AVRIDINE" (N, N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietilo)-propanediamina), aceite de parafina, dipéptido muramilo y similares. Otros ejemplos específicos de adyuvantes y composiciones de adyuvantes se describen en detalle aquí.

30 **[0165]** Algunos adyuvantes adecuados incluyen fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina; La patente americana número 6,017,537) y/o polímero y/o un copolímero de ácido acrílico o metacrílico ácido de maleico anhídrido y de alqueno derivado. Los polímeros ácidos acrílicos o ácido metacrílicos pueden ser reticulados, por ejemplo, con éteres de polialqueno de azúcares o de polialcoholes. Estos compuestos son conocidos bajo el término "carbomero" (Pharmeuropa, Vol. 8, No. 2, June 1996). Un experto en la materia también puede referirse a la patente americana número 2,909,462 (incorporada por referencia), que discute estos polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que contiene al menos 3 grupos hidroxilo; un compuesto polihidroxilado que contiene no más de 8 grupos hidroxilo; como otro ejemplo, los átomos de hidrógeno de al menos 3 hidroxilos se sustituyen con radicales alifáticos insaturados que contienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales pueden contener desde aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos insaturados etilénicamente. Los radicales insaturados pueden ellos mismo contener otros sustituyentes, tales como metil. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol® (Noveon Inc., Ohio, USA) son especialmente adecuados para su uso como adyuvantes. Están reticulados con un alilo sacarosa o con alilpentaeritrol, tales como los productos Carbopol® 974P, 934P, y 971P.

40 **[0166]** En lo que se refiere a los copolímeros de anhídrido maleico y de alqueno derivado, se mencionan los productos EMA® (Monsanto), que son copolímeros de anhídrido maleico y de etileno, que pueden ser lineales o reticulados, por ejemplo, reticulados con éter divinilo. También se puede hacer referencia a la patente americana número 6,713,068 y Regelson, W. y otros., 1960; (incorporada por referencia).

45 **[0167]** También se pueden utilizar los lípidos catiónicos que contienen una sal amonio cuaternario que se describen en la patente americana número 6,713,068, cuyos contenidos se incorporan aquí por referencia, en los procedimientos y composiciones de la presente invención. Entre estos lípidos catiónicos, se da preferencia a DMRIE (N-(2-hidroxietilo)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1- propano amonio; WO96/34109), ventajosamente asociados con lípidos neutrales, ventajosamente DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina; Behr J. P. et al, 1994), para formar DMRIE-DOPE.

[0168] El contenido total de componentes en las composiciones inmunógenas o de vacunas reconstituidas listas para inyección de la invención se pueden utilizar para proporcionar una inyección a concentración isotónica, por ejemplo, dentro del intervalo de aproximadamente 100-600 mOsm, en general dentro de aproximadamente 250-450 mOsm, y preferentemente aproximadamente 330 mOsm.

- 5 **[0169]** Las dosis de patógenos vivos atenuados, notablemente CDV y cPi2, en composiciones inmunógenas o composición de vacuna liofilizadas estabilizadas, o en composiciones inmunógenas o de vacunas reconstituidas listas para su uso, pueden estar en el intervalo que va desde aproximadamente 102 a aproximadamente 107 CCID₅₀/dosis. Para proteínas, polipéptidos o glicoproteínas en una composición inmunógena multivalente o composición de vacuna liofilizada estabilizado, o en las composiciones inmunógenas o de vacunas multivalentes reconstituidas listas para inyección, pueden estar en el intervalo con un título equivalente antes de inactivación que va desde aproximadamente 105 a aproximadamente 109 CCID₅₀ por dosis, preferentemente ir desde aproximadamente 106 a aproximadamente 108 CCID₅₀ por dosis.

- 10 **[0170]** Las composiciones inmunógenas o de vacunas reconstituidas listas para su uso pueden ser administradas a un animal por inyección a través de la vía parenteral o mucosal, preferentemente intramuscular y subcutánea. Sin embargo, la administración de estas composiciones inmunógenas o de vacunas reconstituidas listas para su uso también pueden comprender administración intranasal, epicutánea, tópica, u oral. El volumen de una dosis para inyección puede ir desde aproximadamente 0.1 ml a aproximadamente 2.0 ml, y preferentemente aproximadamente 1.0 ml.

- 15 **[0171]** La invención se describirá a continuación además mediante los ejemplos siguientes no limitativos, ofrecidos a modo de ilustración de varias realizaciones de la invención y sin pretender limitar la presente invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de Estabilizadores

- 20 **[0172]** Las composiciones y las cantidades de componentes en los estabilizadores se muestran en la tabla 1. "Dextrano" comprende dextrano-40,000 que tiene un peso molecular de 40,000 Da.

Tabla 1: Composiciones de los estabilizadores

Estabilizadores	Monosacárido(s) reductores o mezcla	Acido antioxidante	Agente de carga	Disolvente
F2	Glucosa (5% en p/v) Rafinosa (5% en p/v)	ácido aspártico (0.50% en p/v)	Dextrano (10% en p/v)	agua para inyección (q.s. 100% v/v)
F2B	Glucosa (3% en p/v) Rafinosa (3% en p/v)	ácido aspártico (0.20% en p/v)	Dextrano (6% en p/v)	agua para inyección (q.s. 100% v/v)
F6B	Galactosa (3% en p/v) manitol (6% en p/v)	ácido aspártico (0.40% en p/v)	---	agua para inyección (q.s. 100% v/v)
F33	Glucosa (5% en p/v) Fructosa (5% en p/v)	ácido aspártico (0.50% en p/v)	Dextrano (10% en p/v)	agua para inyección (q.s. 100% v/v)
F37	Glucosa (5% en p/v) Rafinosa (5% en p/v)	ácido aspártico (0.50% en p/v)	---	agua para inyección (q.s. 100% v/v)
	Sorbitol (10% en p/v)			
A	Glucosa (1% en p/v) Galactosa (5% en p/v)	ácido aspártico (0.50% en p/v)	Dextrano (6% en p/v)	agua para inyección (q.s. 100% v/v)
H	Glucosa (5% en p/v) Rafinosa (5% en p/v)	ácido aspártico (0.50% en p/v)	Dextrano (6% en p/v)	agua para inyección (q.s. 100% v/v)
K	Glucosa (5% en p/v) Sacarosa (1% en p/v)	ácido aspártico (0.50% en p/v)	Dextrano (6% en p/v)	agua para inyección (q.s. 100% v/v)
U	Glucosa (1% en p/v) Galactosa (1% en p/v)	ácido aspártico (0.50% en p/v)	Dextrano (6% en p/v)	agua para inyección (q.s. 100% v/v)

- 30 **[0173]** Para cada estabilizador, se calentó un litro de agua destilada a una temperatura de aproximadamente 55°C bajo agitación. Entonces se añadieron los compuestos despacio al agua cliente aún en condiciones de agitación mediante una barra magnética, para facilitar su disolución. La agitación se mantuvo durante aproximadamente 30 minutos después de la última adición, de modo que se obtuvo una solución homogénea.

- 35 **[0174]** Entonces se enfrió la solución a temperatura ambiente. Después de enfriar la solución, el estabilizador se esterilizó por filtración estéril a través de un filtro con un tamaño umbral de poro de 0.22 Pm (Optiscale Durapore). Entonces se almacenaron las soluciones de estabilizadores estériles F2, F2B, F6B, F33, F37, A, H, K y U a temperatura ambiente.

Ejemplo 2: Proceso de liofilización

[0175] Cada uno de los estabilizadores obtenidos en el ejemplo 1 se emplearon para estabilizar una suspensión vírica. Se añadieron cuatro volúmenes de estabilizador a temperatura ambiente y bajo agitación a 6 volúmenes de una mezcla de cuatro virus vivos atenuados caninos. Los virus vivos atenuados caninos eran virus de la parainfluenza canina de tipo 2 (cPi2), virus de la enfermedad de Carré canino (CDV), el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2), y parvovirus canino (CPV).

[0176] Los valores Tg de estas suspensiones estabilizadas se midieron con un calorímetro de exploración diferencial (Mettler Toledo; Viroflay, France) y se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: valor Tg de suspensiones estabilizadas

Estabilizador	Valor de Tg (°C)	Estabilizador	Valor de Tg (°C)
F2	-30.8	A	-36.2
F2B	-33.0	H	-34.9
F6B	-46.8	K	-36.2
F33	-34.2	U	-33.0
F37	42.9	-----	-----

10

[0177] Luego se liofilizaron las suspensiones estabilizadas formuladas con el estabilizador. El ciclo de liofilización comprendía 3 etapas:

(1) Etapa de congelación: las suspensiones estabilizadas, agrupadas en pequeñas botellas, se colocaron en un liofilizador y se enfriaron por contacto con las estanterías a presión atmosférica hasta congelarse completamente. La temperatura de las estanterías era inferior a o igual a aproximadamente - 50°C.

15

(2) Sublimación etapa (o desecación primaria): La presión en el liofilizador se ajustó a una presión suficientemente baja para obtener la sublimación del hielo (presión inferior o igual a 120 µbar). la temperatura se ajustó para que no hubiera descongelación durante la sublimación, a una temperatura de producto que era inferior o igual a -22°C). El vapor que resulta de la sublimación se congeló en un condensador de hielo ubicado de las bombas de vacío.

(3) Etapa de desorción (o desecación secundaria): Al final de sublimación, cuando todo el hielo desapareció del producto a liofilizar, se eliminó el exceso de agua residual libre y/o adherida reduciendo aún más la presión otra vez a una presión inferior a o igual a 30 µbar en el liofilizador y aumentando la temperatura a aproximadamente 30°C.

20

[0178] Después de liofilizar, se rompió el vacío empleando nitrógeno estéril. Entonces se cerraron las botellas, y se descargó el liofilizador. Se midió el contenido de humedad de cada vacuna liofilizada estabilizada que se muestra en la tabla 3.

25

Tabla 3: Contenido de humedad de vacunas liofilizadas estabilizadas

Estabilizador	Contenido de humedad (%)	estabilizador	contenido de humedad (%)
F2.	1.32	A	2.01
F2B	2.16	H	2.60
F6B	3.63	K	2.58
F33	2.03	U	1.08
F37	3.27	-----	-----

Ejemplo 3: Estudios de estabilidad después de liofilizar

[0179] Se observó que las pastillas liofilizadas obtenidas después de liofilizar las suspensiones estabilizadas tal como se describió en el ejemplo 2 se distinguían entre pastillas anormales y las de forma regular. Las pastillas liofilizadas que contienen un estabilizador de la presente invención y que comprenden además un agente de carga (es decir F2, F2B, F33, A, H, K y U) tienen un buen aspecto; con sólo 5 pastillas con estabilizador F2 que tiene un aspecto enganchado por encima de 110 (4.5%). Entonces las vacunas estabilizadas liofilizadas se almacenaron a +4°C.

30

[0180] La determinación del título vírico de las vacunas liofilizadas se realizó por cálculo del título medio de tres titulaciones repetidas en la misma vacuna. Las vacunas liofilizadas obtenidas después de liofilizar tal como se describe en el ejemplo 2 se rehidrataron en 1 ml de agua para inyección. Después cada vacuna se diluyó para obtener diluciones desde -3.8 log₁₀ a -6.8 log₁₀.

35

[0181] Para la titulación del cPi2, cada dilución se depositó 6 veces en una placa de titulación con una cantidad de 50 µl por pozo, con 50 µl de una solución contra anticuerpos de la hepatitis y 150 µl de una suspensión celular de

40

células de riñón caninos de Madin-Darby (células MDCK) a 100,000 células / ml. Las células MDCK se cultivaron en medio de cultivo F15suplementado con 2% de suero fetal de ternera. Como control, 100 µl de la dilución y 150 µl de MDCK las células se depositaron en el mismo pozo. Todas las placas de titulación se mantuvieron a 37°C durante 7 días. Después de incubación, los sobrenadantes se retiraron de cada pozo de las placas de titulación y se dispusieron en nuevas placas de titulación con pozos cónicos. Se añadieron eritrocitos de conejillo de indias (Alsever sp.) a cada pozo que contenía al sobrenadante. La dilución de la solución de eritrocitos era la misma en todos los pozos. Después de 3-4 horas a +4°C, los resultados se obtuvieron disponiendo las placas sobre papel blanco. Entonces se detectaron los ataques víricos por la presencia de un pellet fácilmente identificable.

[0182] Para titulación de CDV, cada dilución se depositó 6 veces sobre una placa de titulación, con una cantidad de 50 µl por pozo, con 50 µl de a solución de anticuerpos anti-cPi2 y 150 µl de una suspensión celular de células VERO (células de riñón de mono) a 120,000 células / ml. Las células Vero se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (medio de cultivo MEM) suplementado con 2% de suero fetal de ternera. Como control, cien µl de la dilución y 150 µl de células VERO se depositaron en el mismo pozo. Todas las placas de titulación se mantuvieron a 37°C durante 7 días. Después de la incubación, las placas de titulación se colocaron bajo un microscopio. Los ataques víricos se detectaron por la degradación de las células VERO. Las titulaciones víricas se expresaron en log₁₀ de 50% de dosis infecciosa de cultivo celular por mililitro (CCID₅₀/ml).

[0183] La tabla 4 muestra la disminución de los títulos de cPi2 y CDV, expresados en log₁₀ CCID₅₀/ml, después de la etapa de liofilización y un período de almacenamiento de 12 meses a 4°C.

Tabla 4: Reducción de títulos de cPi2 y CDV después de liofilizar y 12 meses de almacenamiento a 4°C.

Estabilizador	Descenso en el título de cPi2	Descenso en el Título de CDV
F2	-0.36	-0.60
F2B	-0.43	-1.06
F6B	-0.93	-0.56
F33	-0.81	-0.15
F37	-1.06	-0.91
A	-0.69	-0.69
H	-0.51	-0.64
K	-0.73	-1.00
U	-0.50	+0.15

20

[0184] Los resultados muestran muy buena estabilidad de ambos virus CDV y cPi2 durante un largo período de almacenamiento a 4°C. Para algunas de estas vacunas liofilizadas estabilizadas, las titulaciones de CAV2 y CPV se realizaron por triplicado. Los resultados de estas titulaciones se dan en la tabla 5 como descenso de los valores medios obtenidos a partir de las tres titulaciones, expresadas en log₁₀ CCID₅₀/ml, justo después de la etapa de liofilización y después de un período de almacenamiento de 3 meses (T0+3) a 4°C.

25

Tabla 5: Disminución de títulos de CAV2 y CPV después de liofilizar y 3 meses de almacenamiento a 4°C.

Estabilizador	Disminución en el título de CAV2	Disminución en el título de CPV
A	-0.20	-0.10
H	-0.47	-0.20
K	-0.36	+0.10

[0185] Se estudiaron los efectos de varios compuestos del estabilizador en la estabilidad de CDV y cPi2 durante y después de la etapa de liofilización. En particular, se verificó el efecto del oligosacárido no reductor sobre la estabilidad de CDV. Los resultados se dieron por análisis estadístico en la figura 2A y en la tabla 6.

30

Tabla 6: Promedio y desviación estándar del título al final de la etapa de liofilización (a T0) de CDV estabilizado con un estabilizador que comprende oligosacárido no reductor (n=72).

Oligosacárido no reductor (%p/v concentración final)	Cuenta	Título promedio de CDV (log ₁₀ CCID ₅₀ /ml)	Desviación estándar
0	18	4.78	0.20
0.5	27	4.69	0.25
2.5	27	4.76	0.34

[0186] La presencia de oligosacáridos no reductores en el estabilizador no tiene efecto en el título de CDV (ANOVA p-valor = 0.5142).

35

[0187] Se verificó el efecto del monosacárido reductor sobre la estabilidad de CDV. Los resultados se sometieron a un análisis estadístico y se muestran en figura 2B y en la tabla 7.

Tabla 7: Promedio y desviación estándar del título al final de la etapa de liofilización (a T0) de CDV estabilizado con un estabilizador que comprende un monosacárido reductor (n=72).

Monosacárido (%p/v concentración final)	Cuenta	Título promedio de CDV (log ₁₀ CCID ₅₀ /ml)	Desviación estándar
0.5	30	4.58	0.27
1	6	4.61	0.13
2.5	24	4.90	0.22
3	6	4.92	0.20
5	6	4.82	0.12

5

[0188] Tal como se muestra en la tabla 7 y en la figura 2B, la presencia de monosacárido reductor en el estabilizador tiene un efecto positivo en el título de CDV (ANOVA p = 0.0000).

[0189] También se estudió el efecto del compuesto antioxidante en la estabilidad de cPi2. Los resultados se sometieron a un análisis estadístico en las figuras 3A y 3B, y en las tablas 8 y 9.

10 Tabla 8: Promedio y desviación estándar del título de cPi2 estabilizado con un estabilizador con o sin ácido aspártico (n=15), Al final de la etapa de liofilización (a T0)

Ácido aspártico (%p/v concentración final)	Cuenta	Título promedio de cPi2 (log ₁₀ CCID ₅₀ /ml)	Desviación estándar
0	5	4.39	1.04
0.1	5	5.41	0.96
0.2	5	6.09	0.13

Table 9: Promedio y desviación estándar del título de cPi2 estabilizado con un estabilizador con o sin ácido aspártico (n=15), después de la etapa de liofilización y período de almacenamiento de 3 meses 4°C (a T0+3 meses).

Ácido aspártico (%p/v concentración final)	Cuenta	Título promedio de cPi2 (log ₁₀ CCID ₅₀ /ml)	Desviación estándar
0	5	4.27	0.81
0.1	5	4.92	1.00
0.2	5	5.82	0.35

15

[0190] La presencia de compuesto antioxidante en el estabilizador resultó tener un efecto positivo en el título de cPi2 (ANOVA p= 0.0000) durante la etapa de liofilización y durante el período de almacenamiento.

Ejemplo 4: Estudios comparativos de los componentes del estabilizador

20 **[0191]** El estabilizador F2 (Ejemplo 1) se empleó como referencia para medir el descenso en el título de las vacunas liofilizadas en comparación con otras formulaciones liofilizadas estabilizadas. Estas formulaciones se obtuvieron por modificación de cada componente tal como se muestra en la tabla 10.

[0192] El estabilizador F63 es idéntico al F2, pero le falta el compuesto antioxidante.

[0193] El estabilizador F62 es idéntico al F2, pero incluye fenilalanina en lugar de ácido aspártico.

25 **[0194]** El estabilizador F42 es idéntico al F2, pero incluye sal monosodio de ácido aspártico en lugar de ácido aspártico.

[0195] El estabilizador F32 es idéntico al F2, pero incluye betaína en lugar de un monosacárido reductor.

Table 10: Composiciones de las formulaciones

estabilizador	mezcla que contiene monosacárido reductor o variante	ácido antioxidante o variante	Agente de carga	disolvente
F63	Glucosa (5% en p/v) Rafinosa (5% en p/v)	----	Dextrano (10% en p/v)	agua para inyección (q.s. 100% v/v)
F62	Glucosa (5% en p/v) Rafinosa (5% en p/v)	Fenilalanina (0.50% en p/v)	Dextrano (10% en p/v)	agua para inyección(q.s. 100% v/v)
F42	Glucosa (5% en p/v) Rafinosa (5% en p/v)	monosodio del Ácido aspártico sal(0.50% en p/v)	Dextrano (10% en p/v)	agua para inyección(q.s. 100% v/v)
F32	betaína (5% en p/v) Rafinosa (5% en p/v)	Ácido aspártico (0.50% en p/v)	Dextrano (10% en p/v)	agua para inyección(q.s. 100% v/v)

Estas formulaciones se emplearon para estabilizar las vacunas de ejemplo 2 y se liofilizaron según el proceso descrito aquí. Las vacunas liofilizadas se rehidrataron en 1 ml de agua para inyección. La determinación del título de cPi2 y el título de CDV de vacunas se realizaron por cálculo del título medio de tres titulaciones repetidas sobre la misma vacuna tal como se hizo en el ejemplo 3. Las titulaciones se midieron después del proceso de liofilización para cada formulación. Estas titulaciones, expresadas en log₁₀ CCID₅₀/ml, se presentan en la tabla 11.

Tabla 11: Disminución de títulos durante la etapa de liofilización de vacunas estabilizadas liofilizadas/ rehidratadas con varias formulaciones.

Estabilizador	Título de cPi2	Título de CDV
F63	-2.22	-0.46
F62	-2.42	-0.74
F32	-3.29	-1.86
F42	-1.12	-0.83
F42 después de 12 mes almacenamiento a 4°C	-1.60	-1.98

10

[0196] Estos resultados muestran que la ausencia de compuestos antioxidante da como resultado una pérdida significativa en el título de cPi2. La inclusión del amino ácido fenilalanina, que carece de efecto antioxidante, también da como resultado una pérdida en el título tanto para cPi2 como para CDV. De manera similar, la inclusión del antioxidante sal de monosodio del ácido aspártico da como resultado una pérdida en el título tanto para cPi2 como para CDV. Estos resultados también demuestran que una ausencia de monosacárido reductor da como resultado una elevada pérdida en el título tanto para cPi2 como para CDV.

15

Ejemplo 5: Evaluación de seguridad de vacunas estabilizadas en perros

[0197] Algunas de las vacunas liofilizadas descritas en el ejemplo 2 se administraron a perros después de rehidratación en agua estéril inyectable. Las vacunas contenían los estabilizadores A, H, K y F2B descritos en el ejemplo 1.

20

[0198] Cuatro perros libres de patógenos específicos (SPF) con 3 a 5 meses de edad y 4 perros convencionales con 3 a 5 meses de edad, se asignaron al azar a 4 grupos de dos animales, donde cada grupo tenía un perro SPF y uno convencional. Para cada grupo, se inmunizaron dos perros por vía subcutánea el día 0 con una dosis doble (2 ml) de su vacuna estabilizada correspondiente. El día 14, los perros fueron inmunizados por vía subcutánea con una única dosis (1 ml) de la misma vacuna estabilizada.

25

[0199] Se observaron reacciones inmediatas locales y generales, temperaturas rectales, reacciones locales, reacciones generales y síntomas clínicos. No se observaron reacciones locales o generales tras la administración. Por lo tanto, la seguridad de las vacunas estabilizado resulta ser alta.

[0200] La presente descripción se describirá además mediante los siguientes párrafos numerados:

30 1. Estabilizador para una liofilizada vivos atenuados del virus de la enfermedad de Carré canino (CDV) y el paramixovirus canino tipo 2 (cPi2) composición inmunógena que comprende al menos un monosacárido reductor y al menos un compuesto antioxidante ácido, en el que dicho al menos un compuesto antioxidante ácido comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos.

2. El estabilizador del párrafo 1, en el que dicho al menos un monosacárido reductor comprende glucosa, galactosa, fructosa, manosa, sorbosa, o combinaciones de estas.
3. El estabilizador del párrafo 1 o 2, que comprende además al menos un agente de carga.
4. El estabilizador del párrafo 3, en el que dicho al menos un agente de carga comprende dextrano, maltodextrina,
5 polivinilpirrolidona, hidroxietil almidón, o combinaciones de estas.
5. El estabilizador de cualquiera de los párrafos 1 a 4, que comprende además al menos un alcohol de azúcar.
6. El estabilizador del párrafo 5, en el que dicho al menos un alcohol de azúcar comprende sorbitol, manitol xilitol, maltitol o combinaciones de estas.
7. El estabilizador de cualquier de los de párrafos 1 a 6, que comprende además al menos un oligosacárido no
10 reductor.
8. El estabilizador del párrafo 7, en el que dicho al menos un oligosacárido no reductor comprende trehalosa, sacarosa, rafinosa o combinaciones de estos.
9. El estabilizador de cualquiera de los párrafos 1 a 8, que comprende además al menos un alcohol de azúcar y al menos un oligosacárido no reductor.
- 15 10. El estabilizador del párrafo 9, en el que dicho al menos un alcohol de azúcar comprende sorbitol, manitol xilitol, maltitol o combinaciones de estos, y en el que dicho al menos un oligosacárido no reductor comprende trehalosa, sacarosa, rafinosa o combinaciones de estos.
11. Suspensión o solución inmunógena que comprende paramixovirus vivos atenuados que comprende al CDV y al cPi2, mezclados con el estabilizador de cualquiera de los párrafos 1 a 10.
- 20 12. La suspensión o solución inmunógena del párrafo 11, en el que la suspensión o solución inmunógena es una suspensión o solución inmunógena multivalente que comprende además al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno diferente del paramixovirus.
13. La suspensión o solución inmunógena del párrafo 12, en el que dicho al menos un componente inmunógeno activo es un derivado de un patógeno que comprende Adenoviridae, Parvoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae,
25 Poxviridae, Rhabdoviridae, o combinaciones de estos.
14. La suspensión o solución inmunógena de párrafos 12 o 13, en el que dicho al menos un componente inmunógeno activo comprende el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) vivo atenuado y el parvovirus canino (CPV) vivo atenuado.
15. La suspensión o solución inmunógena de cualquiera de los párrafos 12 a 14, en el que dicho al menos un
30 componente inmunógeno activo comprende un vector vírico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos.
16. La suspensión o solución inmunógena de cualquiera de los párrafos 12 a 15, en el que dicho al menos un componente inmunógeno activo comprende un vector plasmídico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos.
17. La suspensión o solución inmunógena de cualquiera de los párrafos 11 a 16, en el que el estabilizador
35 comprende al menos un monosacárido reductor a una concentración final que va desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v.
18. La suspensión o solución inmunógena de cualquiera de los párrafos 11 a 16, en el que el estabilizador comprende al menos un monosacárido reductor a una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v.
- 40 19. La suspensión o solución inmunógena de cualquiera de los párrafos 11 a 16, en el que el estabilizador comprende al menos un monosacárido reductor a una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v.
20. La suspensión o solución inmunógena de cualquiera de los párrafos 11 a 16, en el que el estabilizador
45 comprende al menos un monosacárido reductor a una concentración final que va desde aproximadamente 2.5% a aproximadamente 3% en p/v.
21. La suspensión o solución inmunógena de cualquiera de los párrafos 11 a 20, en el que el estabilizador comprende al menos un compuesto antioxidante ácido a una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v.

22. La suspensión o solución inmunógena de cualquiera de los párrafos 11 a 20, en el que el estabilizador comprende al menos un compuesto antioxidante ácido a una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.25% en p/v.
- 5 23. La suspensión o solución inmunógena de cualquiera de los párrafos 11 a 20, en el que el estabilizador comprende al menos un compuesto antioxidante ácido a una concentración final desde aproximadamente 0.2% en p/v.
24. La suspensión o solución inmunógena de cualquiera de los párrafos 11 a 23, en el que el estabilizador comprende al menos un agente de carga a una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 7.5% en p/v.
- 10 25. La suspensión o solución inmunógena de cualquiera de los párrafos 11 a 24, el estabilizador comprende al menos un agente de carga a una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v.
- 15 26. La suspensión o solución inmunógena del párrafo 11, en el que el estabilizador comprende al menos un alcohol de azúcar a una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v y al menos un monosacárido reductor, con la condición de que la concentración final de dicho al menos un monosacárido reductor y dicho al menos un alcohol de azúcar sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v.
- 20 27. La suspensión o solución inmunógena del párrafo 11, en el que el estabilizador comprende al menos un oligosacárido no reductor cuya concentración final va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v y al menos un monosacárido reductor, con la condición de que la concentración final del monosacárido reductor y del oligosacárido no reductor sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v.
- 25 28. La suspensión o solución inmunógena del párrafo 11, en el que el estabilizador comprende al menos un alcohol de azúcar a una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v, al menos un oligosacárido no reductor a una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v, y al menos un monosacárido reductor, con la condición de que la concentración final de monosacárido reductor, alcohol de azúcar y oligosacárido no reductor sea inferior o igual a aproximadamente 12.5% en p/v.
- 30 29. La suspensión o solución inmunógena del párrafo 11, en el que el estabilizador comprende: (i) una concentración final desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v de una mezcla de dos monosacáridos reductores, (ii) una concentración final desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v de al menos un ácido antioxidante, y (iii) una concentración final desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 7.5% p/v de al menos un agente de carga.
- 35 30. La suspensión o solución inmunógena del párrafo 11, en el que el estabilizador comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un oligosacárido no reductor, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v de al menos un ácido antioxidante, y (iv) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 7.5% p/v de al menos un agente de carga, con la condición de que la concentración final de (i) y (ii) sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v.
- 40 31. La suspensión o solución inmunógena del párrafo 11, en el que el estabilizador comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 2.5% en p/v de al menos un oligosacárido no reductor, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 0.25% en p/v de al menos un ácido antioxidante, y (iv) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un agente de carga, con la condición de que la concentración final de (i) y (ii) sea inferior o igual a o menos de aproximadamente 5% en p/v.
- 45 32. La suspensión o solución inmunógena del párrafo 11, en el que el estabilizador comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un alcohol de azúcar, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 0.3% en p/v de al menos un ácido antioxidante, con la condición de que la concentración final de (i) y (ii) sea inferior o igual a 50 aproximadamente 7.5% en p/v.
- 55 33. La suspensión o solución inmunógena del párrafo 11, en el que el estabilizador comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 3% en p/v de al menos un alcohol de azúcar, y (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.25% en p/v de al menos un ácido antioxidante, con la condición de que la concentración final de (i) y (ii) sea inferior o igual a aproximadamente 5% en p/v.

34. La suspensión o solución inmunógena del párrafo 11, en el que el estabilizador comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un alcohol de azúcar, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un oligosacárido no reductor, y (iv) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v de al menos un ácido antioxidante, con la condición de que la concentración final de (i), (ii) y (iii) sea inferior o igual a aproximadamente 12.5% en p/v.
35. La suspensión o solución inmunógena del párrafo 11, en el que el estabilizador comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un alcohol de azúcar, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 2.5% en p/v de al menos un oligosacárido no reductor, y (iv) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.25% en p/v de al menos un ácido antioxidante, con la condición de que la concentración final de (i), (ii) y (iii) sea inferior o igual a aproximadamente 10% en p/v.
36. A procedimiento de liofilización de una suspensión o solución inmunógena de CDV y cPi2 vivos atenuados de cualquiera de los párrafos 11 a 35, que comprende (a) poner en contacto la suspensión o solución con el estabilizador, de modo que se forma una suspensión o solución inmunógena estabilizada; (b) enfriar, a presión atmosférica, la suspensión o solución inmunógena estabilizada a una temperatura inferior a aproximadamente el valor de T_g de la suspensión o solución inmunógena estabilizada; (c) secar la suspensión o solución inmunógena estabilizada por sublimación de hielo a baja presión; y (d) retirar el exceso de agua residual reduciendo aún más la presión y aumentando la temperatura de la suspensión o solución inmunógena estabilizada.
37. El proceso del párrafo 36, en el que la temperatura en la etapa (b) es menos de aproximadamente -40°C.
38. El proceso del párrafo 36 o 37, en el que la presión en la etapa (c) es menos de o igual a aproximadamente 200 Pbar.
39. El proceso del párrafo 36 o 37, en el que la presión en la etapa (d) es menos de o igual a aproximadamente 100 Pbar.
40. El proceso de cualquiera de los párrafos 36 a 39, en el que la temperatura en la etapa (d) es de entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 30°C.
41. El proceso de cualquiera de los párrafos 36 a 40, que comprende además al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno diferente del paramixovirus.
42. El proceso del párrafo 41, en el que dicho al menos un componente inmunógeno activo es un derivado de un patógeno que comprende Adenoviridae, Parvoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Rhabdoviridae, o combinaciones de estos.
43. El proceso del párrafo 41 o 42, en el que dicho al menos un componente inmunógeno comprende el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) vivo atenuado y el parvovirus canino (CPV) vivo atenuado.
44. El proceso de cualquiera de los párrafos 41 a 43, en el que dicho al menos un componente inmunógeno comprende un vector vírico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos.
45. El proceso de cualquiera de los párrafos 41 a 44, en el que dicho al menos un componente inmunógeno comprende un vector plasmídico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos.
46. La composición inmunógena estabilizada liofilizada de CDV y cPi2 vivos atenuados producido por el proceso de cualquiera de los párrafos 36 a 45.
47. La composición inmunógena estabilizada liofilizada de CDV y cPi2 vivos atenuados, que comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos.
48. La composición inmunógena estabilizada liofilizada de CDV y cPi2 vivos atenuados, que comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 2% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos, y (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 15% a aproximadamente 70% en p/p de al menos un agente de carga.
49. Una composición inmunógena liofilizada estabilizada multivalente que comprende vivos atenuados CDV, cPi2 vivos atenuados, y al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno diferente del

paramixovirus, y que comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos.

- 5 50. La composición inmunógena multivalente del párrafo 49 o 50, en la que dicho al menos un componente inmunógeno activo es un derivado de un patógeno que comprende Adenoviridae, Parvoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Rhabdoviridae, o combinaciones de estos.
51. La composición inmunógena multivalente del párrafo 49, en la que dicho al menos un componente inmunógeno comprende el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) vivo atenuado y el parvovirus canino (CPV) vivo atenuado.
- 10 52. La composición inmunógena multivalente de cualquiera de los párrafos 49 a 51, en la que dicho al menos un componente inmunógeno comprende un vector vírico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos.
53. La composición inmunógena multivalente de cualquiera de los párrafos 41 a 52, en la que dicho al menos un componente inmunógeno comprende un vector plasmídico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos.
- 15 54. Una composición inmunógena multivalente estabilizada liofilizada que comprende al CDV vivo atenuado, el cPi2 vivo atenuado y al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno diferente del paramixovirus, y que comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 2% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos, y (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 15% a
- 20 aproximadamente 70% en p/p de al menos un agente de carga.
55. La composición inmunógena multivalente del párrafo 54, en la que dicho al menos un componente inmunógeno activo es un derivado de un patógeno que comprende Adenoviridae, Parvoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Rhabdoviridae, o combinaciones de estos.
- 25 56. La composición inmunógena multivalente del párrafo 54 o 55, en la que dicho al menos un componente inmunógeno comprende el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) vivo atenuado y el parvovirus canino (CPV) vivo atenuado.
57. La composición inmunógena multivalente de cualquiera de los párrafos 54 a 56, en la que dicho al menos un componente inmunógeno comprende un vector vírico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos.
- 30 58. La composición inmunógena multivalente de cualquiera de los párrafos 54 a 57, en la que dicho al menos un componente inmunógeno comprende un vector plasmídico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos.
59. Un kit que comprende un primer frasco que contiene una composición liofilizada estabilizada inmunógena de cualquiera de los párrafos 46 a 58, y un segundo frasco que contiene un disolvente.
60. El kit del párrafo 49, en el que el disolvente se selecciona de entre el grupo que consiste en agua desmineralizada, agua destilada, agua para inyección, tampón, y adyuvante.

REIVINDICACIONES

1. Estabilizador para una liofilizada vivos atenuados del virus de la enfermedad de Carré canino (CDV) y del virus de parainfluenza de tipo 2 canino (cPi2) composición inmunógena que comprende al menos un monosacárido reductor y al menos un compuesto antioxidante ácido, en el que dicho al menos un compuesto antioxidante ácido comprende
- 5 ácido aspártico; y en el que dicho al menos un monosacárido reductor comprende glucosa, galactosa, fructosa, manosa, sorbosa, o combinaciones de estas; y en el que dicho al menos un monosacárido reductor está presente con una concentración que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p y dicho al menos un ácido antioxidante está presente con una concentración que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 6% en p/p.
- 10 2. El estabilizador de la reivindicación 1, que comprende además
- (a) al menos un agente de carga o
- (b) al menos un agente de carga en el que dicho al menos un agente de carga comprende dextrano, maltodextrina, polivinilpirrolidona, hidroxietil almidón, o combinaciones de estas o
- (c) al menos un alcohol de azúcar o
- 15 (d) al menos un alcohol de azúcar en el que el alcohol de azúcar comprende sorbitol, manitol xilitol, maltitol o combinaciones de estas o
- (e) al menos un oligosacárido no reductor o
- (f) al menos un oligosacárido no reductor en el que dicho al menos un oligosacárido no reductor comprende trehalosa, sacarosa, rafinosa o combinaciones de estas o
- 20 (g) al menos un alcohol de azúcar y al menos un oligosacárido no reductor o
- (h) al menos un alcohol de azúcar y al menos un oligosacárido no reductor en el que dicho al menos un alcohol de azúcar comprende sorbitol, manitol xilitol, maltitol o combinaciones de estas, y en el que dicho al menos un oligosacárido no reductor comprende trehalosa, sacarosa, rafinosa o combinaciones de estas.
3. Suspensión o solución inmunógena que comprende paramixovirus vivos atenuados que comprende al CDV y al
- 25 cPi2, mezclados con el estabilizador de la reivindicación 1 ó 2.
4. La suspensión o solución inmunógena de la reivindicación 3, en la que la suspensión o solución inmunógena es una suspensión o solución inmunógena multivalente que comprende además al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno diferente del paramixovirus.
5. La suspensión o solución inmunógena de la reivindicación 4, en la que
- 30 (a) dicho al menos un componente inmunógeno activo es un derivado de un patógeno que comprende Adenoviridae, Parvoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Poxvirididae, Rhabdoviridae, o combinaciones de estos o
- (b) dicho al menos un componente inmunógeno activo comprende el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) vivo atenuado y el parvovirus canino (CPV) vivo atenuado o
- (c) dicho al menos un componente inmunógeno activo comprende un vector vírico que comprende uno o más
- 35 inmunógenos heterólogos o
- (d) dicho al menos un componente inmunógeno activo comprende un vector plasmídico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos.
6. La suspensión o solución inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en la que el estabilizador comprende
- 40 (a) al menos un monosacárido reductor a una concentración final que va desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v o aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v o aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v o aproximadamente 2.5% a aproximadamente 3% en p/v o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v o
- (b) al menos un compuesto antioxidante ácido a una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a
- 45 aproximadamente 0.25% en p/v o de aproximadamente 0.2% en p/v o que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 7.5% en p/v o
- (c) al menos un agente de carga a una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v o

(d) al menos un alcohol de azúcar a una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v y al menos un monosacárido reductor, con la condición de que la concentración final de dicho al menos un monosacárido reductor y dicho al menos un alcohol de azúcar sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v o

5 (e) al menos un oligosacárido no reductor cuya concentración final va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v y al menos un monosacárido reductor, con la condición de que la concentración final del monosacárido reductor y del oligosacárido no reductor sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v o

(f) al menos un alcohol de azúcar a una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v, al menos un oligosacárido no reductor a una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v, y al menos un monosacárido reductor, con la condición de que la concentración final de monosacárido reductor, alcohol de azúcar y oligosacárido no reductor sea inferior o igual a aproximadamente 12.5% en p/v.

7. La suspensión o solución inmunógena según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el estabilizador comprende:

15 (a) (i) una concentración final desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v de una mezcla de dos monosacáridos reductores, (ii) una concentración final desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v de al menos un ácido antioxidante, y (iii) una concentración final desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 7.5%p/v de al menos un agente de carga o

20 (b) (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un oligosacárido no reductor, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v de al menos un ácido antioxidante, y (iv) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 7.5%p/v de al menos un agente de carga, con la condición de que la concentración final de (i) y (ii) sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v o

25 (c) (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 2.5% en p/v de al menos un oligosacárido no reductor, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.25% en p/v de al menos un ácido antioxidante, y (iv) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un agente de carga, con la condición de que la concentración final de (i) y (ii) sea inferior o igual a aproximadamente 5% en p/v o

30 (d) (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un alcohol de azúcar, (iii) una concentración final desde aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 0.3% en p/v de al menos un ácido antioxidante, con la condición de que la concentración final de (i) y (ii) sea inferior o igual a aproximadamente 7.5% en p/v o

35 (e) (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 3% en p/v de al menos un alcohol de azúcar, y (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.25% en p/v de al menos un ácido antioxidante, con la condición de que la concentración final de (i) y (ii) sea inferior o igual a aproximadamente 5% en p/v o

40 (f) (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1 % a aproximadamente 5% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un alcohol de azúcar, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un oligosacárido no reductor, y (iv) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3% en p/v de al menos un ácido antioxidante, con la condición de que la concentración final de (i), (ii) y (iii) sea inferior o igual a aproximadamente 12.5% en p/v o

45 (g) (i) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 4% en p/v de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% en p/v de al menos un alcohol de azúcar, (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 0.5% a aproximadamente 2.5% en p/v de al menos un oligosacárido no reductor, y (iv) una concentración final que va desde aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.25% en p/v de al menos un ácido antioxidante, con la condición de que la concentración final de (i), (ii) y (iii) sea inferior o igual a aproximadamente 10% en p/v.

50 8. La composición inmunógena estabilizada liofilizada de CDV y cPi2 vivos atenuados que comprende (i) una concentración final que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 1.5% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos.

9. La composición inmunógena de la reivindicación 8, en la que (ii) la concentración final de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos va desde aproximadamente 2% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos, y que comprende además (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 15% a aproximadamente 70% en p/p de al menos un agente de carga.
10. La composición inmunógena de la reivindicación 8, que comprende además al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno diferente del paramixovirus.
- 10 11. La composición inmunógena de la reivindicación 10, en la que dicho al menos un componente inmunógeno activo
- (a) es un derivado de un patógeno que comprende Adenoviridae, Parvoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Rhabdoviridae, o combinaciones de estos o
- (b) comprende el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) vivo atenuado y el parvovirus canino (CPV) vivo atenuado o
- (c) comprende un vector vírico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos o
- 15 (d) comprende un vector plasmídico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos.
12. La composición inmunógena multivalente estabilizada liofilizada que comprende al CDV vivo atenuado, el cPi2 vivo atenuado y al menos un componente inmunógeno activo derivado de un patógeno diferente del paramixovirus, y que comprende: (i) una concentración final que va desde aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en p/p de al menos un monosacárido reductor, (ii) una concentración final que va desde aproximadamente 2% a aproximadamente 6% en p/p de al menos un ácido antioxidante que comprende ácido aspártico, ácido glutámico, ácido ascórbico, o combinaciones de estos, y (iii) una concentración final que va desde aproximadamente 15% a aproximadamente 70% en p/p de al menos un agente de carga.
- 20 13. La composición inmunógena multivalente de la reivindicación 12, en el que dicho al menos un componente inmunógeno activo
- 25 (a) es un derivado de un patógeno que comprende Adenoviridae, Parvoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Rhabdoviridae, o combinaciones de estos o
- (b) comprende el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) vivo atenuado y el parvovirus canino (CPV) vivo atenuado o
- (c) comprende un vector vírico que comprende uno o más inmunógeno heterólogo o
- (d) comprende un vector plasmídico que comprende uno o más inmunógenos heterólogos.
- 30 14. Procedimiento de liofilización de una suspensión o solución inmunógena de CDV y cPi2 vivos atenuados, que comprende (a) poner en contacto la suspensión o solución inmunógena de CDV y cPi2 vivos atenuados con un estabilizador tal como se define en la reivindicación 1 o 2, de modo que se forma una suspensión o solución inmunógena estabilizada; (b) enfriar, a presión atmosférica, la suspensión o solución inmunógena estabilizada a una temperatura inferior a aproximadamente el valor T_g de la suspensión inmunógena estabilizada; (c) secar la suspensión o solución inmunógena estabilizada por sublimación de hielo a baja presión; y (d) retirar el exceso de agua residual reduciendo aún más la presión y aumentando la temperatura de la suspensión o solución inmunógena estabilizada.
- 35 15. Kit que comprende un primer frasco que contiene la composición inmunógena estabilizada liofilizada de CDV y cPi2 vivos atenuados tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 o la composición inmunógena multivalente liofilizada tal como se define en la reivindicación 12, y un segundo frasco que contiene un disolvente.
- 40

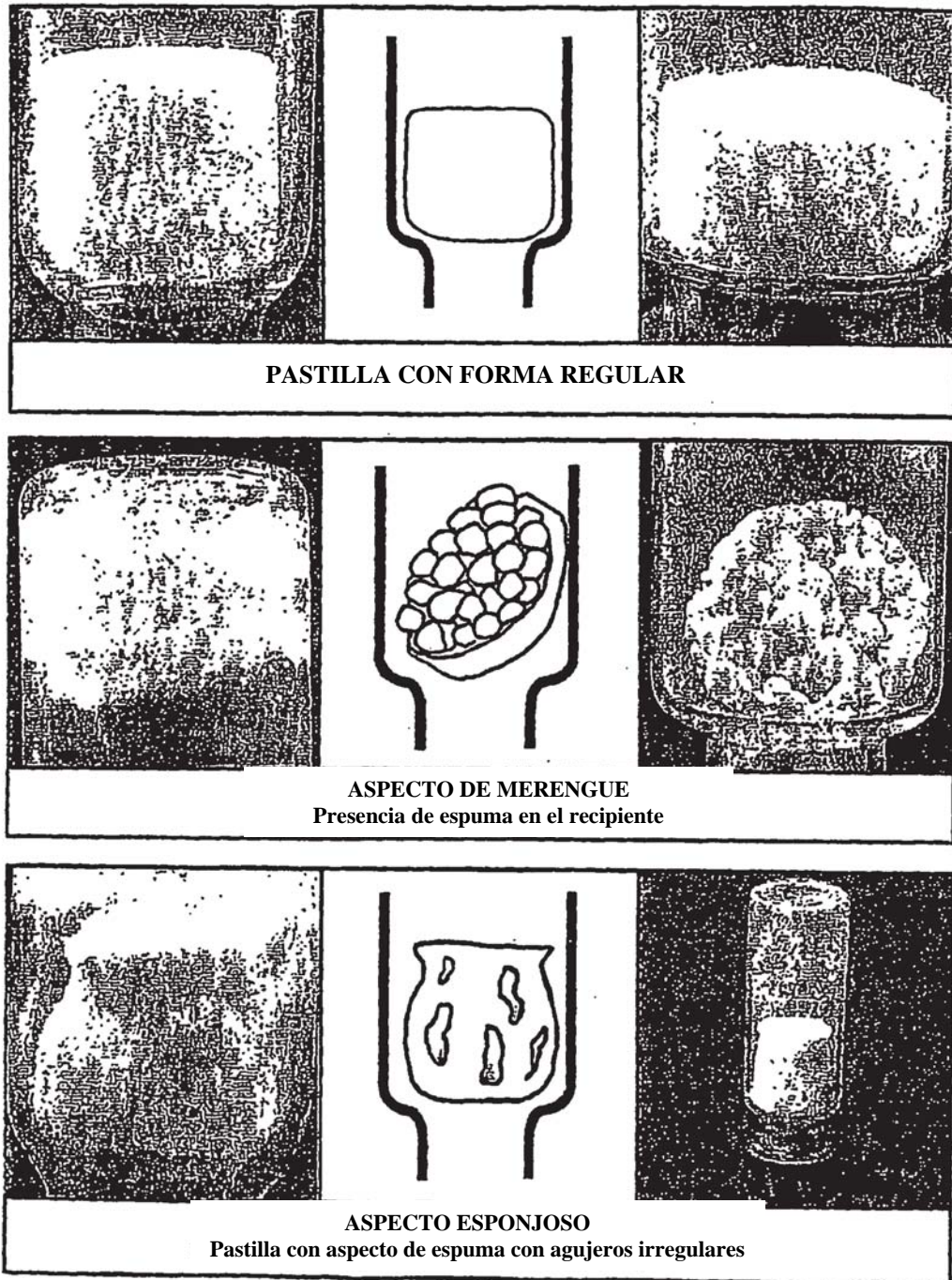


Fig. 1A

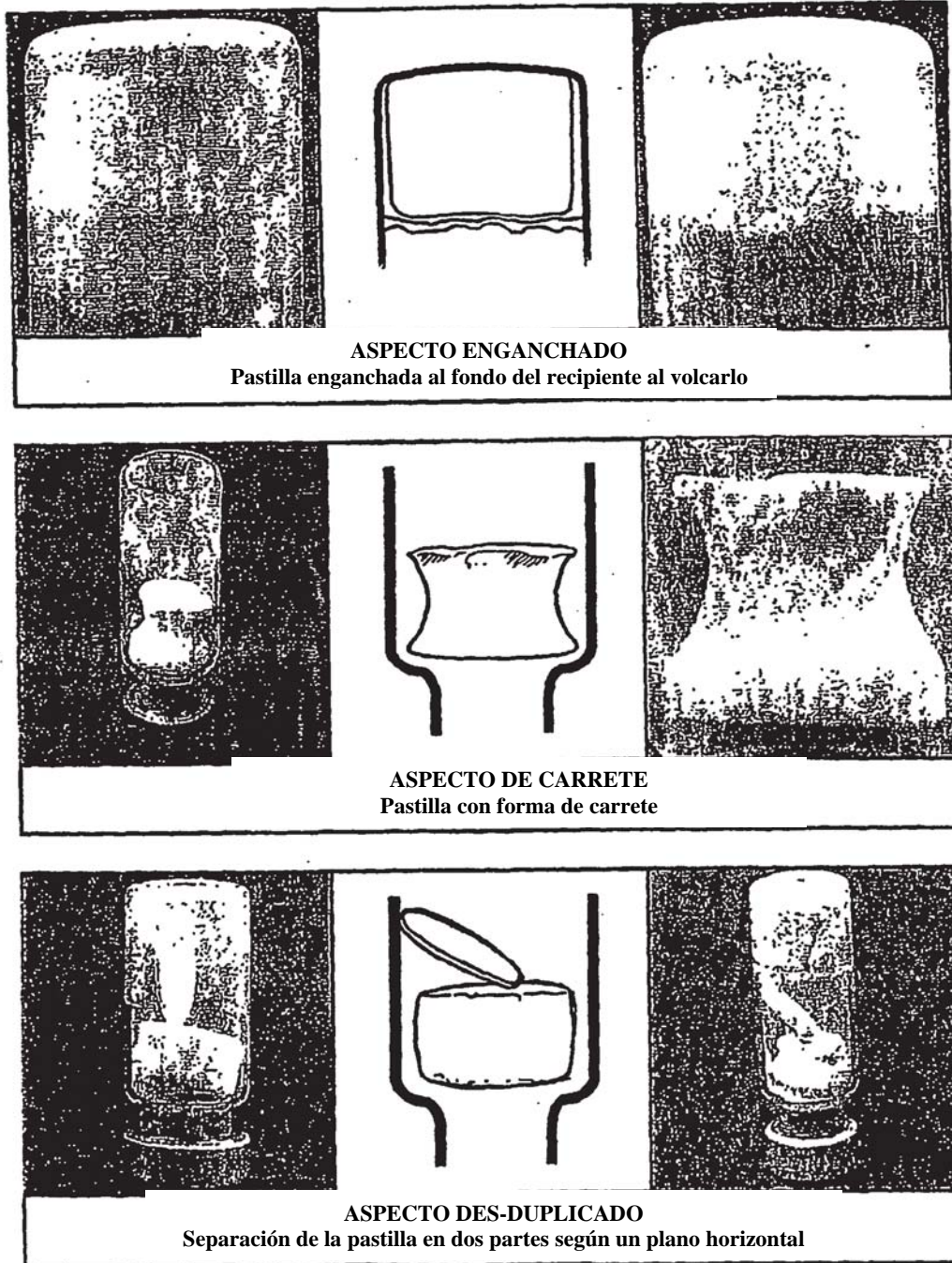


Fig. 1B

Efecto del porcentaje de oligosacárido no reductor a T0

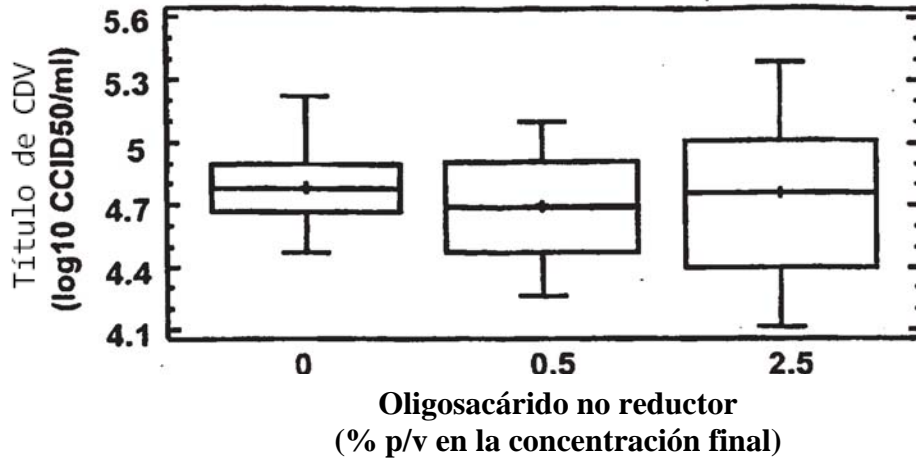


Fig. 2A

Efecto del porcentaje de monosacárido reductor a T0

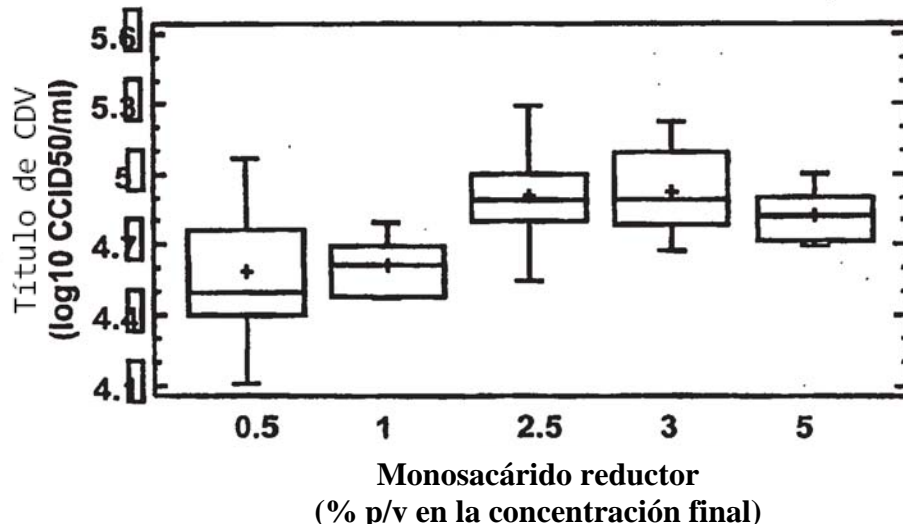


Fig. 2B

