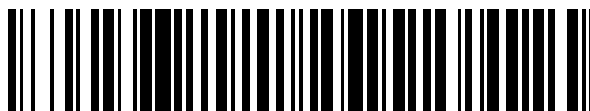


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 130**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2009** **E 09793888 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013** **EP 2310048**

54 Título: **Estabilizador y composición de vacuna que comprende uno o más flavivirus vivos atenuados**

30 Prioridad:

09.07.2008 EP 08305390

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.11.2013

73 Titular/es:

SANOFI PASTEUR (100.0%)
2, avenue Pont Pasteur
69367 Lyon Cedex 07, FR

72 Inventor/es:

FRANCON, ALAIN;
BRASS, OLIVIER;
CHOUVENC, PIERRE y
LELEU, AMANDINE

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 429 130 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

Estabilizador y composición de vacuna que comprende uno o más flavivirus vivos atenuados.

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un estabilizador para composiciones de vacuna que comprende uno o más flavivirus vivos atenuados, a una composición de vacuna a granel estabilizada con este estabilizador, particularmente una composición de vacuna seca preparada de esta composición de vacuna a granel, y a un procedimiento para estabilizar uno o más flavivirus vivos atenuados.
- 10 **[0002]** Los flavivirus son un género de virus de la familia Flaviviridae. Este grupo comprende el virus del dengue (DEN), el virus de la fiebre amarilla (FA), el virus de encefalitis de Saint Louis, el virus de la encefalitis Japonesa (EJ) y el virus del Nilo Occidental (NO). Entre estos virus, algunos son inestables.
- [0003]** En el contexto de la presente invención, el término "flavivirus" pretende referirse a cualquier virus de la familia Flaviviridae que es patógeno para los animales, incluyendo mamíferos, en particular flavivirus que son patógenos para los seres humanos. A modo de ejemplos no limitantes, puede hacerse mención a los siguientes flavivirus: serotipos del virus del dengue (DEN) 1, 2, 3 y 4, virus de la encefalitis Japonesa (EJ), virus de la fiebre amarilla (FA) y virus del Nilo Occidental (NO).
- 15 **[0004]** El término "vivo" se utiliza en su significado convencional, un virus vivo es un virus que no se ha inactivado, es decir, un virus capaz de la replicación en células permisivas.
- [0005]** Un flavivirus vivo atenuado es un flavivirus que no induce la enfermedad causada por el virus de tipo natural correspondiente en animales o seres humanos y que es capaz de inducir una respuesta inmune específica.
- 20 **[0006]** A modo de ejemplos no limitantes de los flavivirus vivos atenuados que se pueden utilizar con el estabilizador de acuerdo con la invención, puede hacerse mención a cepas víricas atenuadas, tales como la cepa JEV SA-14-14-2, la cepa YF descrita en el documento US 6589522, las cepas víricas del dengue descritas en la solicitud WO 2006/134433 A1, en particular la cepa VDV1, las cepas descritas en la solicitud WO 2006/134443 A1, en particular la cepa VDV2; las cepas descritas, por ejemplo, en las solicitudes: WO 02/66621, WO 00/57904, WO 00/57908, WO 00/57909; WO 00/57910, WO 02/095075 y WO 02/102828, y las cepas DEN-1 16007/PDK13, también llamadas "LAV1", DEN-2 16681/PDK53, también llamadas "LAV2" y LAV4, que se describen en la solicitud de patente EP1 159 968 A.
- 25 **[0007]** La cepa VDV1 es una cepa obtenida de una cepa DEN-1 de tipo natural 16007 que se ha sometido a 11 pasos en las células PDK (DEN-1 16007/PDK11) y que se amplificó posteriormente en las células Vero a 32 °C, y cuyo ARN se purificó y se transfectó en células Vero. La cepa VDV-1 tiene 14 mutaciones adicionales en comparación con la cepa vacunal DEN-1 16007/PDK13 (13 pasos en las células de Riñón de Perro Primarias-PDK). Se proporcionan la secuencia completa y también un procedimiento de preparación y la caracterización de la cepa VDV-1 en la solicitud WO 2006/134433 A1. La cepa se puede reproducir fácilmente en base a esta enseñanza.
- 30 **[0008]** La cepa VDV-2 es una cepa obtenida de una cepa DEN-2 de tipo natural 16681 que se ha sometido a 50 pasos en las células PDK (DEN-2 16681/PDK50), placa purificada y cuyo ARN se extrajo y se purificó antes de transfectarse en las células Vero. La cepa VDV-2 se obtuvo posteriormente por la purificación de placa y amplificación en las células Vero. La cepa VDV-2 tiene 10 mutaciones adicionales en comparación con la cepa vacunal DEN-2 16681/PDK53 (53 pases en las células PDK). Se dan la secuencia completa y también un procedimiento de preparación y la caracterización de la cepa VDV-2 en la solicitud WO 2006/134443 A1. Dicha cepa se puede reproducir fácilmente en base a esta enseñanza.
- 35 **[0009]** Entre los flavivirus vivos atenuados que se pueden utilizar con el estabilizador de acuerdo con la invención, también puede hacerse mención, de un modo no limitante, a virus quiméricos tales como: los virus quiméricos descritos, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 93/06214 y también el ChimeriVax™. El término "ChimeriVax™" o "CYD" representa un virus de la fiebre amarilla (FA) quimérico que comprende la cadena principal de un virus de la FA en el que las secuencias codifican la premembrana y las proteínas envueltas se han reemplazado por las secuencias correspondientes de cualquier cepa de un flavivirus diferente, por ejemplo de un virus del dengue (DEN), de un virus de la encefalitis Japonesa (EJ) o de un virus del Nilo Occidental (NO). La construcción de estos ChimeriVax™ se ha descrito en detalle en las solicitudes de patente internacional WO 98/37911 y WO 03/101397, a las que puede hacerse referencia para una descripción precisa del procedimiento para su preparación. Se proporciona una revisión en los flavivirus quiméricos vivos atenuados que se pueden usar en el
- 40 **[0009]** Entre los flavivirus vivos atenuados que se pueden utilizar con el estabilizador de acuerdo con la invención, también puede hacerse mención, de un modo no limitante, a virus quiméricos tales como: los virus quiméricos descritos, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 93/06214 y también el ChimeriVax™. El término "ChimeriVax™" o "CYD" representa un virus de la fiebre amarilla (FA) quimérico que comprende la cadena principal de un virus de la FA en el que las secuencias codifican la premembrana y las proteínas envueltas se han reemplazado por las secuencias correspondientes de cualquier cepa de un flavivirus diferente, por ejemplo de un virus del dengue (DEN), de un virus de la encefalitis Japonesa (EJ) o de un virus del Nilo Occidental (NO). La construcción de estos ChimeriVax™ se ha descrito en detalle en las solicitudes de patente internacional WO 98/37911 y WO 03/101397, a las que puede hacerse referencia para una descripción precisa del procedimiento para su preparación. Se proporciona una revisión en los flavivirus quiméricos vivos atenuados que se pueden usar en el
- 45 **[0009]** Entre los flavivirus vivos atenuados que se pueden utilizar con el estabilizador de acuerdo con la invención, también puede hacerse mención, de un modo no limitante, a virus quiméricos tales como: los virus quiméricos descritos, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 93/06214 y también el ChimeriVax™. El término "ChimeriVax™" o "CYD" representa un virus de la fiebre amarilla (FA) quimérico que comprende la cadena principal de un virus de la FA en el que las secuencias codifican la premembrana y las proteínas envueltas se han reemplazado por las secuencias correspondientes de cualquier cepa de un flavivirus diferente, por ejemplo de un virus del dengue (DEN), de un virus de la encefalitis Japonesa (EJ) o de un virus del Nilo Occidental (NO). La construcción de estos ChimeriVax™ se ha descrito en detalle en las solicitudes de patente internacional WO 98/37911 y WO 03/101397, a las que puede hacerse referencia para una descripción precisa del procedimiento para su preparación. Se proporciona una revisión en los flavivirus quiméricos vivos atenuados que se pueden usar en el
- 50 **[0009]** Entre los flavivirus vivos atenuados que se pueden utilizar con el estabilizador de acuerdo con la invención, también puede hacerse mención, de un modo no limitante, a virus quiméricos tales como: los virus quiméricos descritos, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 93/06214 y también el ChimeriVax™. El término "ChimeriVax™" o "CYD" representa un virus de la fiebre amarilla (FA) quimérico que comprende la cadena principal de un virus de la FA en el que las secuencias codifican la premembrana y las proteínas envueltas se han reemplazado por las secuencias correspondientes de cualquier cepa de un flavivirus diferente, por ejemplo de un virus del dengue (DEN), de un virus de la encefalitis Japonesa (EJ) o de un virus del Nilo Occidental (NO). La construcción de estos ChimeriVax™ se ha descrito en detalle en las solicitudes de patente internacional WO 98/37911 y WO 03/101397, a las que puede hacerse referencia para una descripción precisa del procedimiento para su preparación. Se proporciona una revisión en los flavivirus quiméricos vivos atenuados que se pueden usar en el
- 55 **[0009]** Entre los flavivirus vivos atenuados que se pueden utilizar con el estabilizador de acuerdo con la invención, también puede hacerse mención, de un modo no limitante, a virus quiméricos tales como: los virus quiméricos descritos, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 93/06214 y también el ChimeriVax™. El término "ChimeriVax™" o "CYD" representa un virus de la fiebre amarilla (FA) quimérico que comprende la cadena principal de un virus de la FA en el que las secuencias codifican la premembrana y las proteínas envueltas se han reemplazado por las secuencias correspondientes de cualquier cepa de un flavivirus diferente, por ejemplo de un virus del dengue (DEN), de un virus de la encefalitis Japonesa (EJ) o de un virus del Nilo Occidental (NO). La construcción de estos ChimeriVax™ se ha descrito en detalle en las solicitudes de patente internacional WO 98/37911 y WO 03/101397, a las que puede hacerse referencia para una descripción precisa del procedimiento para su preparación. Se proporciona una revisión en los flavivirus quiméricos vivos atenuados que se pueden usar en el

contexto de la presente invención por C-J. Lai y T. P. Monath in "Advances in Virus Research", (2003) vol. 61, páginas 469 a 509.

- 5 **[0010]** Un virus de la FA quimérico que contiene las secuencias prM y E de una cepa de serotipo 1 de dengue (DEN-1) se denomina de este modo CYD-1 o CYD DEN1. Un virus de la FA quimérico que contiene las secuencias prM y E de una cepa DEN-2 se denomina CYD-2 o CYD DEN2. Un virus de la FA quimérico que contiene las secuencias prM y E de una cepa DEN-3 se denomina CYD-3 o CYD DEN3. Un virus de la FA quimérico que contiene las secuencias prM y E de una cepa DEN-4 se denomina CYD-4 o CYD DEN4. Un virus quimérico del dengue puede ser, por ejemplo, DEN-1 de ChimeriVax™, en particular un virus YF17D/DEN-1, o también un DEN-2
10 de ChimeriVax™, en particular un virus YF17D/DEN-2, un DEN-3 de ChimeriVax™, en particular un virus YF17D/DEN-3, o un DEN-4 de ChimeriVax™, en particular un virus YF17D/DEN-4. Las quimeras descritas en los ejemplos se generaron usando las secuencias prM y E derivadas de las cepas DEN 1 PU0359 (TVP1140), DEN2 PU0218, DEN3 PaH881/88 y DEN4 1228 (TVP 980).
- 15 **[0011]** Preferiblemente, el virus de la FA quimérico comprende la cadena principal de una cepa de la fiebre amarilla atenuada YF17D (Theiler M, y Smith HH (1937) J Exp. Med 65, páginas 767-786) (virus YF17D/DEN-1, YF17D/DEN-2, YF17D/DEN-3, YF17D/DEN-4). Los ejemplos de las cepas YF17D que se pueden usar incluyen YF17D204 (YF-Vax®, Sanofi-Pasteur, Swifwater, PA, Estados Unidos; Stamaril®, Sanofi-Pasteur, Marcy l'Etoile, Francia; ARILVAX^{MR}, Chiron, Speke, Liverpool, Reino Unido; FLAVIMUN®, Berna Biotech, Bern, Suiza; YF17D-204
20 France (X15067, X15062); YF17D-204.234 Estados Unidos (Rice y col., 1985, Science, 229: 726-733), o también las cepas relacionadas YF17DD (número de acceso al Genbank U17066), YF17D-213 (número de acceso al Genbank U17067) y las cepas YF17DD descritas por Galler y col., (1998, Vaccines 16 (9/10): 1024-1028). Cualquier otra cepa del virus de la fiebre amarilla atenuada que se puede utilizar en humanos se puede usar para la construcción de las quimeras. Estas mismas cepas de la fiebre amarilla pueden usarse como tales con el estabilizador de acuerdo con la
25 invención para la preparación de una composición que se puede usar en el contexto de una inmunización contra la fiebre amarilla.
- [0012]** Las quimeras en las que el vector es un virus del dengue, como se describe, por ejemplo, en las solicitudes de patente WO 96/40933 y WO 01/60847, también se pueden usar con el estabilizador de acuerdo con la invención.
30
- [0013]** También se describen diferentes realizaciones de los virus quiméricos en las solicitudes WO 02/102828; WO 03/103571; WO 02/072835; WO 2004/045529; WO 2005/082020, cuyos virus también se pueden usar con el estabilizador de acuerdo con la presente invención.
- 35 **[0014]** Además, en el contexto de la invención, también pueden usarse los vectores quiméricos que se han descrito anteriormente en los que las secuencias heterólogas insertadas son secuencias como se describen en la solicitud WO 03/102166.
- [0015]** Los virus quiméricos tienen la particularidad de exhibir las características de los virus vivos atenuados como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, es posible usar, en el contexto de la invención, cualquier virus quimérico que expresa la proteína de envoltura o uno o más epítomos de una o más proteínas de envoltura de uno o más flavivirus y que induce una respuesta inmune específica que comprende anticuerpos que neutralizan la cepa, o al menos una de las cepas, a partir de lo cual se deriva la proteína de envoltura o el epítomo.
- 45 **[0016]** En el contexto de la presente invención, la expresión "composición de vacuna a granel" pretende referirse a una composición que sale de la etapa final de la producción de antígeno, purificada o no purificada, monovalente, o después de una mezcla multivalente.
- [0017]** En el contexto de la presente invención, la expresión "una composición de vacuna seca" pretende referirse a una composición de la que el contenido de agua residual sea menor que o igual al 3%, y que está lista para reconstituirse con una solución acuosa con el fin de usarse como una vacuna o directamente en forma particulada seca.
50
- [0018]** La expresión "secado por pulverización y liofilización" se entiende que se refiere a la pulverización con un fluido en un ambiente criogénico, seguido de la liofilización de las partículas congeladas obtenidas.
- [0019]** La expresión "secado por espuma" se entiende que se refiere al secado, en forma de una espuma vítrea por evaporación de agua, de una solución concentrada.

[0020] La expresión "liofilización y secado por espuma" se entiende que se refiere al secado, en forma de una espuma vítrea por sublimación de hielo, de una solución congelada previamente, a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea y la temperatura de colapso de matriz.

5 **[0021]** Las composiciones acuosas de los flavivirus no permiten una buena estabilidad viral a largo plazo y a una temperatura por encima de 5 °C. A modo de ejemplo, las composiciones acuosas a granel de la quimera FA-DEN (fiebre amarilla-dengue) pierden más de 4 log, estabilizadas en líquido después del almacenamiento durante 1 día a 37 °C. Actualmente, esta termolabilidad representa un serio problema en los países subtropicales endémicos de la FA donde el transporte bajo condiciones de cadena fría es difícil.

10

[0022] En los años 70-80, las vacunas de la fiebre amarilla secadas por congelación exhibieron un serio problema de termoestabilidad (almacenamiento: 6 meses a +5 °C). Estas vacunas liofilizadas sin estabilizador se degradan muy rápidamente cuando se exponen a una temperatura por encima de 20 °C. Se hicieron esfuerzos para mejorar la estabilización de las composiciones de vacuna de la fiebre amarilla liofilizadas (pérdida en 7 días a 37 °C, vacuna no estabilizada: 0,87 log, vacuna estabilizada: 0,24 log). Se ha descubierto que el estabilizador desarrollado para la fiebre amarilla (M. Barne y C. Bronnert, J. Biol. Standardization, 1984, 12, pág. 435), usado para la vacuna FA-DEN quimérica (fiebre amarilla-dengue) es ineficaz (pérdida en 7 días a 37 °C para el serotipo 1: 2,1 log; para el serotipo 2: 1,3 log; para el serotipo 3: 1,4 log; para el serotipo 4: 1,9 log). Más recientemente, A.A. Adebayo y col., (Biologicals (1998) 26, 309-316) propusieron estabilizadores para una vacuna de la fiebre amarilla 17D liofilizada y apreciaron una pérdida de vida y eficacia del virus 17D del 50% (0,3 log) después del almacenamiento a 37 °C durante 28 días. También muy recientemente se han propuesto albúmina de suero humano (HSA) como un estabilizador combinado con azúcares como agentes formadores de volumen y un tampón para composiciones liofilizadas que contienen los flavivirus vivos atenuados en el documento WO 2008/057550.

25 **[0023]** La presente invención hace posible resolver el problema de la estabilización de las composiciones de vacuna de flavivirus, particularmente vacunas de flavivirus quiméricas, en particular la quimera FA-DEN (fiebre amarilla-dengue).

[0024] Por lo tanto, la presente invención se refiere a un estabilizador para composiciones de vacuna que comprende uno o más flavivirus vivos atenuados, caracterizado porque comprende, en una solución acuosa sin proteínas de origen animal y sin sales añadidas que tengan cationes divalentes,

35 - un tampón,
 - del 2,5% al 6,5% de sorbitol,
 - del 2,5% al 13% de sacarosa,
 - del 0 al 7,5% de trehalosa y/o del 0 al 7,5% de cualquier otro disacárido o trisacárido,
 - del 0,2% al 0,5% de urea,
 - del 0,8% al 2,5% de una mezcla de aminoácidos que comprende arginina (Arg), cisteína (Cys-Cys), histidina (His), isoleucina (He), leucina (Leu), usina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptofano (Trp), tirosina (Tyr), valina (Val), alanina (Ala), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), prolina (Pro) y serina (Ser).

45 **[0025]** El estabilizador de acuerdo con la presente invención puede contener una o más tampones seleccionados entre grupo que comprende TRIS (tris(hidroximetil)aminometano), HEPES (ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)etanosulfónico) y fosfato potásico y/o fosfato sódico, el TRIS por ejemplo a una concentración de 5 a 10 mM, el HEPES por ejemplo a una concentración de 7,5 a 20 mM.

[0026] Más específicamente, el estabilizador de acuerdo con la presente invención comprende

50 3,8% (p/v) de sorbitol,
 7,5% (p/v) de sacarosa,
 5,5% (p/v) de trehalosa,
 0,25% (p/v) de urea y
 1,5% (p/v) de la mezcla de aminoácido.

55

[0027] La presente invención también se refiere a una composición de vacuna acuosa en bruto estabilizada que comprende uno o más flavivirus vivos atenuados y el estabilizador que se ha descrito anteriormente de acuerdo con la invención.

[0028] La composición de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más serotipos de los virus del dengue (DEN) vivos atenuados y/o de los virus de la fiebre amarilla (FA) vivos atenuados y/o de los virus de enfermedad del virus del Nilo Occidental (NO) vivos atenuados y/o de los virus de la encefalitis Japonesa (EJ).

5 **[0029]** Las variaciones de la presente invención comprenden uno o más flavivirus quiméricos vivos atenuados, por ejemplo, uno o más serotipos de un virus FA-DEN quimérico (fiebre amarilla-dengue), de un virus FA-NO quimérico (virus de -la fiebre amarilla-Nilo Occidental) y/o de un virus NA-EJ quimérico (fiebre amarilla-encefalitis Japonesa).

[0030] La presente invención también se refiere a un procedimiento para estabilizar uno o más flavivirus vivos atenuados. En la etapa final en la producción de los flavivirus vivos atenuados (por ejemplo, cultivo en células Vero, infección y cultivo viral seguido por la purificación en una o más etapas), la cosecha vírica purificada o no purificada y concentrada o no concentrada que comprende un flavivirus atenuado vivo se diluye añadiendo el estabilizador para obtener las concentraciones finales del estabilizador de acuerdo con la presente invención con el fin de obtener una composición de vacuna acuosa a granel estabilizada de acuerdo con la presente invención. Se obtienen 10 composiciones multivalentes mezclando cosechas víricas purificadas o no purificadas, concentradas o no concentradas y estabilizadas. 15

[0031] El procedimiento de estabilización de acuerdo con la presente invención también puede comprender secar la composición acuosa mediante un procedimiento seleccionado entre el grupo de secado por espuma, secado por pulverización o secado por espuma y liofilización, por ejemplo, secar la composición acuosa por el procedimiento de liofilización o por el procedimiento de pulverización y liofilización. Escogiendo el procedimiento de liofilización o secado por pulverización y liofilización, el procedimiento de estabilización de acuerdo con la presente invención se puede modificar congelando la solución acuosa en forma de partículas uniformes o perlas en una primera etapa y secando las partículas uniformes o perlas congeladas en una segunda etapa para obtener un producto seco 25 estabilizado en forma de partículas uniformes o de perlas. La generación de perlas puede realizarse preferiblemente en condiciones estériles. Las partículas uniformes o perlas (o más concretamente las microperlas) se generan congelando perlas de la composición acuosa de acuerdo con la presente invención ya sea cayendo en un gas muy frío (nitrógeno líquido evaporado) o por caída directa en un líquido criogénico (por ejemplo nitrógeno líquido). Las preparaciones de partículas uniformes congeladas o perlas congeladas de una solución o líquido acuoso se ilustran 30 en Price y col., (documento US 36555838), Adams y col., (documento US 4211015), A.A. Fawzy y col., (documento US 5307640), R.O. Williams III y col., (documento US 6862890 B2), P. F. Herbert y col., (documento WO 96/36317) y P.-R. Nyssen y col., (documento US 6903065 B2). La congelación de las gotas también se puede lograr por ejemplo cuando la composición de vacuna acuosa a granel estabilizada de acuerdo con la presente invención se granula para generar gotas calibradas cuyo diámetro varía de 100 µm a 1500 µm, con una distribución de tamaño 35 muy reducida. Estas gotas caen en una cámara criogénica en la que la temperatura se mantiene baja mediante un medio de congelación, ya sea por inyección/nebulización directa de nitrógeno líquido o el flujo contra corriente de un gas muy frío tal como nitrógeno, CO₂ o aire. Las gotas se congelan durante su caída para formar partículas congeladas calibradas.

40 **[0032]** La granulación, también conocida como técnica de ruptura a chorro laminar, es una técnica bien conocida para generar gotas calibradas de líquido comúnmente usada en el campo de biocatalizadores e inmovilización de células vivientes (Hulst y col., 1985. A new technique for the production of immobilized biocatalyst and large quantities. Biotechnol. Bioeng. 27, 870-876; Gotoh y col., 1993. Mass production of biocatalyst- entrapping alginate gel particles by a forced oscillation method. Chem. Eng. Commun. 120, 73-84; Seifert y Philips, 1997. Production of 45 small, monodispersed alginate beads for cell immobilization. Biotechnol. Prog. 13, 562- 568). Lord Rayleigh fue el primero en analizar la inestabilidad de los chorros capilares que salen de una boquilla y en proponer un modelo para describirlo (Rayleigh L, 1978. On the stability of jets. Proc. London Math. Soc. 10, 4- 13) para fluidos Newtonian. Weber (Weber C, 1931. Zum Zerfall eines Flüssigkeitsstrahles. Z. Angew. Math. Mech. 11, 136-154) extendió el análisis incluyendo el efecto de la viscosidad. La longitud de onda óptima para la perturbación de crecimiento más 50 rápida y ruptura de chorro se da por:

$$\lambda_{opt} = \pi \cdot \sqrt{2} \cdot d_j \cdot \sqrt{1 + \frac{3\eta}{\sqrt{\rho\sigma d_j}}}$$

[0033] Donde λ_{opt} es la longitud de onda óptima para la ruptura de chorro, d_j es el diámetro del chorro, η es la viscosidad del fluido, ρ es la densidad del fluido y σ es la tensión superficial del fluido. El diámetro d de las gotas formadas se puede calcular por:

$$d = \sqrt[3]{1.5 \cdot d_j^2 \cdot \lambda_{opt}}$$

5

[0034] La frecuencia f a aplicar al fluido para lograr los resultados deseados se refiere a la velocidad del chorro (y , por lo tanto, el caudal del fluido) u_j y la longitud de onda por:

10

$$\lambda = \frac{u_j}{f}$$

[0035] Por lo tanto, las condiciones óptimas se pueden calcular conociendo los parámetros del proceso y las características del fluido. Sin embargo, un intervalo de frecuencias y velocidades de chorro existen para formar gotas uniformes dependiendo del diámetro de la boquilla, la reología del fluido y tensión superficial (Meesters G., 1992. Mechanisms of droplet formation. Delft University Press, Delft, NL). También se pueden determinar las frecuencias de trabajo adecuadas experimentalmente mediante una evaluación visual de la estabilidad de la formación de las gotas. Los equipos de granulación convencionales están equipados con un estroboscopio de luz para observar la formación de gotas: para un producto dado y condiciones de trabajo dadas, una persona puede ajustar manualmente la frecuencia hasta que observa una cadena de gotas estables y quietas con esta luz estroboscópica. Además, los sistemas de multiboquilla se han desarrollado para solicitudes de granulación aséptica (Brandenberger H. y col., 1998. A new multinozzle encapsulation/immobilization system to produce uniform beads of alginates. J. Biotechnol. 63, 73-80). En conclusión, se pueden determinar las frecuencias de trabajo tanto teórica como experimentalmente dependiendo de las herramientas disponibles y conocimientos del producto.

[0036] El proceso de granulación se adapta a los líquidos viscosos. La viscosidad aceptable máxima de acuerdo con los proveedores actuales es aproximadamente 300 mPa.s. Las temperaturas en el entubado del proceso y en la boquilla tienen que controlarse para evitar la cristalización del disolvente antes de la formación de gotas. El experto en la técnica de la formulación ajustará diferentes concentraciones de excipiente en el producto para evitar la cristalización no controlada y viscosidades por encima del límite dado, teniendo en cuenta interacciones eventuales entre los excipientes.

[0037] La composición de vacuna acuosa a granel estabilizada de acuerdo con la presente invención se puede granular para generar gotas calibradas cuyo diámetro varía de 100 μm a 1500 μm , con una distribución de tamaño muy reducida. Estas gotas caen en una cámara criogénica en la que la temperatura se mantiene baja ya sea por inyección/nebulización directa de nitrógeno líquido o por el flujo a contra corriente de un gas muy frío tal como nitrógeno, CO_2 o aire. Las gotas se congelan durante su caída para formar partículas congeladas calibradas. La altura de caída mínima para congelar las gotas (es decir, formación de cristales fríos que solidifican los gránulos) se puede minimizar mediante el súper-enfriamiento limitante. El súper-enfriamiento se puede reducir sembrando la nucleación de hielo en las gotas ya sea por contacto con neblina de nitrógeno líquido o gotas (inyección directa de nitrógeno líquido en la cámara) o con cristales de hielo microscópicos (nebulización directa de agua o vapor sobrecalentado en la cámara fría).

[0038] Se conocen otras técnicas en la técnica para obtener gotas calibradas, tales como atomización ultrasónica (Sindayihebura D., Dobre M., Bolle L., 1997 - Experimental study of thin liquid film ultrasonic atomization. ExHFT97, Bruselas), y, posteriormente, partículas congeladas calibradas o, como se conoce de la industria alimenticia, por medio de un tambor de congelación particular como se desvela en el documento US 5.036.673.

[0039] La solución acuosa congelada en forma de partículas uniformes o perlas (microperlas) se seca posteriormente por congelación. Bajo el techo del flujo laminar, las microperlas se distribuyen en bandejas. Las

etapas que se realizaron se describen a continuación:

- Preenfriamiento de los estantes del liofilizador a -50 °C.
- Adhesión de las etiquetas con las bandejas para la identificación de las bandejas.
- 5 • Enfriamiento de herramientas de manejo y de las bandejas a -50 °C sobre los estantes del liofilizador durante aproximadamente una hora.

10 **[0040]** Las microperlas congeladas se transfieren posteriormente de sus recipientes a las bandejas. Las bandejas se agitan posteriormente de manera que las perlas se distribuyan homogéneamente. Las perlas distribuidas sobre la bandeja se secan posteriormente por liofilización. Estas partículas uniformes o perlas (microperlas) del producto seco estabilizado que emergen de este proceso tienen un diámetro de aproximadamente 100 µm a 1500 µm, más particularmente un diámetro de aproximadamente 500 µm a 1000 µm.

15 **[0041]** Los procedimientos y aparatos para realizar la congelación de las soluciones en forma de partículas uniformes o perlas congeladas, seguido de secado para obtener un producto seco en forma de partículas uniformes o perlas (microperlas), se ilustran, por ejemplo, en W.L. Porter y col., (documento US 3162019), K.M. Gover y col., (documento US 3431655), G.J. Malecki (documento US 3313032), K.D. Heck y col., (documento DE 26 59 546 A1), A.T.M. Wilderbeek (documento EP 0 799 613 A1) y D. Gehrmann y col., (documento US 2008/0060213 A1).

20 **[0042]** La presente invención también se relaciona a una composición de vacuna seca obtenida al secar la composición a granel estabilizada de acuerdo con la presente invención. Esta composición de vacuna seca puede caracterizarse por que la composición está presente en forma de partículas uniformes o perlas. Esta composición de vacuna seca en forma de partículas uniformes o perlas puede caracterizarse porque cada partícula o cada perla contiene una mezcla de diversos flavivirus vivos atenuados y/o vivos atenuados quiméricos. Esta composición de
25 vacuna seca en forma de partículas uniformes o perlas también puede caracterizarse porque cada partícula o cada perla contiene flavivirus vivos atenuados y/o vivos atenuados quiméricos de un único tipo.

30 **[0043]** La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar una vacuna, que comprende la etapa de reconstituir la composición de vacuna seca obtenida secando la composición a granel estabilizada de acuerdo con la presente invención, que puede o no puede estar en forma de partículas uniformes o perlas (microperlas), con una solución acuosa.

35 **[0044]** La presente invención también se refiere a un kit de vacuna contra flavivirus que comprende un primer recipiente que contiene la composición de vacuna seca de acuerdo con la presente invención y un segundo recipiente que contiene una solución acuosa para reconstituir la vacuna. Este kit puede caracterizarse porque el primer recipiente contiene una mezcla de las diversas composiciones de vacuna, cada partícula o cada perla que contiene flavivirus vivos atenuados y/o vivos atenuados quiméricos de un único tipo.

40 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de una composición de vacuna acuosa a granel de la fiebre amarilla-dengue quimérica estabilizada

45 **[0045]** La composición monovalente se preparó mezclando la quimera FA-DEN, serotipo 1, 2, 3 ó 4 (CYD-1, -2, -3 ó -4) con el estabilizador, para obtener las concentraciones de excipiente estabilizantes *ad hoc*. La composición multivalente se obtiene mezclando las composiciones monovalentes.

50 **[0046]** Cada composición de vacuna monovalente purificada se estabilizó con el estabilizador de la presente invención y se filtró, se homogenizó, se formó en alícuotas y después se almacenó en forma acuosa congelada a una temperatura por debajo de su temperatura de transición vítrea.

[0047] Cada composición de vacuna monovalente se descongeló con agitación, y se determinó el volumen de cada composición de vacuna a añadir a la mezcla final para preparar las composiciones de vacuna bivalentes, trivalentes y tetravalentes en concentraciones finales diana de acuerdo con el siguiente cálculo:

55

$$\text{Volumen a granel (ml)} = \frac{10^{\text{título diana/dosis}} \times \text{BFP en volumen (ml)}}{10^{\text{título a granel/ml}} \times \text{volumen de distribución/vial (ml)}}$$

[0048] BFP significa producto final a granel o composición de vacuna mono- o multivalente.

5 [0049] El volumen diana calculado de cada composición de vacuna acuosa se muestreó y el resto del volumen de la composición de vacuna monovalente se volvió a congelar. Los volúmenes de las composiciones de vacuna monovalente se mezclaron con el estabilizador de la presente invención, para obtener las concentraciones finales diana y los volúmenes diana. La mezcla se homogenizó por agitación durante 20 minutos a una temperatura de 5 °C y se filtró de forma estéril antes de la congelación o secado de la mezcla. La mezcla tuvo una temperatura de 5 °C
10 durante los períodos de reposo.

[0050] La composición de vacuna se preparó mezclando una, dos, tres o cuatro composiciones monovalentes a granel de los virus de la fiebre amarilla-dengue (CYD) quiméricos con el estabilizador de la presente invención, antes de la congelación o secado de la mezcla a granel monovalente, bivalente, trivalente y tetravalente para obtener las
15 composiciones finales en las concentraciones de la diana escogida en log/ml. Las concentraciones pueden ser equivalentes entre cada composición de vacuna monovalente, o diferentes de acuerdo con las dianas elegidas.

Ejemplo 2: Preparación de una composición de vacuna liofilizada a granel de la fiebre amarilla-dengue quimérica estabilizada

20

[0051] La composición de vacuna monovalente, bivalente, trivalente o tetravalente acuosa se obtuvo de acuerdo con la descripción del Ejemplo 1. Esta mezcla, agitada y a una temperatura de 5 °C, se dispensó de una manera hábil y reproducible a una velocidad de 0,3 ml por frasquito, durante un periodo de tiempo necesario para la carga de un liofilizador industrial. Los viales se cargaron posteriormente dentro de las bandejas identificadas por marcas en el
25 liofilizador, cuyos estantes se enfriaron previamente a 5 °C. Los viales que comprenden la composición de vacuna acuosa en la titulación diana final se liofilizaron de acuerdo con el ciclo de liofilización que se describe en lo sucesivo en el presente documento. Los viales se congelaron a una temperatura de -50 °C. Una vez que la temperatura diana se había alcanzado, la composición de vacuna congelada incluida en cada vial se sublimó durante 16,5 h, con una presión de 50 μbar para la fase de sublimación primaria y una temperatura de anaquel de -28 °C. La desecación
30 secundaria se realizó a 50 μbar y 30 °C durante 5 h. Los viales liofilizados se taparon subsecuentemente en el liofilizador mediante presión del anaquel, en vacío o bajo presión de nitrógeno parcial. Los frascos se descargaron y se prensaron, se marcaron y después se almacenaron a una temperatura de 5 °C.

Ejemplo 3: Estabilidad de la composición de vacuna tetravalente a granel de la fiebre amarilla-dengue quimérica estabilizada y liofilizada, de acuerdo con el Ejemplo 1 y 2

35

[0052] La composición de vacuna tetravalente a granel de la fiebre amarilla-dengue quimérica acuosa, estabilizada se estabilizó con el estabilizador de la presente invención a la concentración diana de 6 log/ml, antes de liofilizar cada vial en los que se habían dispensado 0,3 ml. El porcentaje de los excipientes de la composición de vacuna
40 tetravalente estabilizada se indica en la Tabla 1 que se muestra a continuación:

Tabla 1: Porcentaje de excipientes

EXCIPIENTES	%
clorhidrato de L arginina	1,021
L cisteína	0,012
L histidina	0,008
L isoleucina	0,026
L leucina	0,026
clorhidrato L lisina	0,037
L metionina	0,008
L fenilalanina	0,017
L treonina	0,024
L triptófano	0,004
L tirosina	0,018
L valina	0,024
L alanina	0,009

L asparagina	0,015
L ácido aspártico	0,013
L ácido glutámico	0,015
Glicocol	0,008
L prolina	0,012
L serina	0,011
Sacarosa	7,500
D-trehalosa dihidrato	5,500
D-sorbitol	3,750
Tris	0,073
Urea	0,250

Cada material liofilizado se hidrató de nuevo antes de la titulación con una solución de NaCl al 0,4%. Se titularon de 3 a 6 viales para obtener un título promedio.

- 5 **[0053]** Se usaron dos técnicas de titulación. La técnica CCID50 se basa en una serie de diluciones de la suspensión viral del dengue, cada producto diluido se distribuye en los pocillos de una placa de 96 pocillos que contienen células Vero. Después de 7 días de cultivo, las células Vero se fijan y se tiñen cuando el virus del dengue está presente después del uso de anticuerpos monoclonales específicos para cada serotipo. La titulación infeccioso se calcula de acuerdo con el número de pocillos positivos, relacionados con la dilución de la muestra. El CCID50 se calcula por el procedimiento de mínimos cuadrados, y el título se expresa como CCID50/ml de log 10.

[0054] La técnica μ PFU se basa en el mismo principio que la técnica CCID50. Sin embargo, el título se obtiene por conteo individual de los efectos citopatogénicos. El análisis se realiza por el análisis de imagen. La titulación es precisa a +/- 0,3 log.

15

Tabla 2: Resultados de estabilidad para el material liofilizado, expresados en forma de pérdida (log)

Material liofilizado en estado de pérdida viral	log			
	CYD1	CYD2	CYD3	CYD4
Pérdida en liofilización	0,2	0,2	0,2	0,3
7 días a 37 °C	0,6	0,5	0,4	0,5
14 días a 37 °C	0,9	0,9	0,8	0,9
1 mes a 37 °C	1,5	1,5	1,4	1,4
7 días a 45 °C	1,1	1,2	1,1	1,2
14 días a 45 °C	3,0	3,3	3,1	3,1

Tabla 3: Resultados de estabilidad para el material liofilizado rehidratado, expresados en forma de pérdida (log)

Rehidratado en estado de pérdida viral	log			
	CYD1	CYD2	CYD3	CYD4
6 h 5 °C	0	0	0,1	0
1 h 25 °C	0,1	0,1	0,1	0,3
4 h 25 °C	0,3	0,3	0,3	0,5
2 h 36 °C	0,4	0,5	0,6	0,7

- 20 **Ejemplo 4:** Estabilidad de la composición de vacuna tetravalente a granel de la fiebre amarilla-dengue química estabilizada, liofilizada - composición diferente en términos de azúcar, de acuerdo con el Ejemplo 1 y 2.

[0055] La mezcla de sacarosa al 7,5%/trehalosa al 5,5% se reemplazó por sacarosa al 13%, permaneciendo los demás componentes sin cambios.

25

Tabla 4: Resultados de estabilidad para el material liofilizado, expresados en la forma de pérdida (log)

Material liofilizado en estado de pérdida viral	log			
	CYD1	CYD2	CYD3	CYD4
Pérdida en liofilización	0	0	0,1	0,2
7 días a 37 °C	0,6	0,8	0,6	0,6

Tabla 5: Resultados de estabilidad para el material liofilizado rehidratado, expresados en la forma de pérdida (log)

Rehidratado en estado de pérdida viral	log			
	CYD1	CYD2	CYD3	CYD4
1 h 25 °C	0,8	0,1	0,4	0,3
4 h 25 °C	0,6	0,7	0,5	0,5

5 **Ejemplo 5:** Estabilidad de la composición de vacuna tetravalente a granel de la fiebre amarilla-dengue química estabilizada, liofilizada - composición tamponada con HEPES, de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2

[0056] El tampón Tris se reemplazó por el tampón HEPES, al 0,36%, permaneciendo los demás porcentajes de los componentes del estabilizador sin cambios.

10

Tabla 6: Resultados de estabilidad para el material liofilizado, expresados en forma de pérdida (log)

Material liofilizado en estado de pérdida viral	log			
	CYD1	CYD2	CYD3	CYD4
Pérdida en liofilización	0,3	0,3	0,3	0,3
7 días a 37 °C	0,6	0,5	0,7	0,7
14 días a 37 °C	0,4	0,7	0,7	1,0

Tabla 7: Resultados de estabilidad para el material liofilizado rehidratado, expresados en forma de pérdida (log)

Rehidratado en estado de pérdida viral	log			
	CYD1	CYD2	CYD3	CYD4
1 h 25 °C	0,1	0,2	0,3	0,2
4 h 25 °C	0,3	0,1	0,5	0,5
2 h 36 °C	0,2	0,1	0,3	0,2

15 **Ejemplo 6:** Estabilidad de la composición de vacuna a granel tetravalente en forma de microperlas liofilizadas

[0057] Este estudio comparó la estabilidad de la composición de vacuna a granel tetravalente, producida como se ha descrito en el Ejemplo 1, secada en forma de un material liofilizado (Ejemplo 2) o en forma de microperlas liofilizadas. Las microperlas liofilizadas se produjeron utilizando el procedimiento ilustrado en la Figura 1:

20

La composición de vacuna acuosa a granel se formó en gotas calibradas en virtud de la tecnología de "granulación", que se basa en la vibración de boquillas calibradas. Estas gotas posteriormente se congelan según caen en una cámara criogénica dentro de la cual la temperatura se mantuvo por debajo de -110 °C, ya sea por inyección directa de nitrógeno líquido o por barrido a contracorriente de este gas muy frío (temperatura < -110 °C). Las perlas calibradas congeladas obtenidas de esta manera se distribuyeron en bandejas de metal enfriadas previamente. Después, estas bandejas se colocaron en los estantes, enfriadas previamente a -50 °C, de un liofilizador de tal forma que la temperatura de las perlas congeladas nunca exceda su temperatura de transición vítrea a una crioconcentración máxima (Tg' que puede estar entre -10 °C y -40 °C). Esto hace posible evitar la fusión parcial, la agregación de las perlas o la recristalización de ciertos excipientes. Una vez que el producto se había colocado en el liofilizador, el aparato se puso a vacío para formar la sublimación de hielo, como para la liofilización convencional del producto como se ha definido mediante la técnica anterior. Para esta solicitud, se aplicaron los siguientes parámetros de desecación:

30

Desecación primaria a una temperatura de anaquel igual a -35 °C y una presión igual a 50 µbar durante 10 h.

5 **[0058]** Desecación secundaria a una temperatura de anaquel igual a 20 °C y a una presión igual a 50 µbar durante 3 h.

[0059] La Figura 2 da una indicación en cuanto al tamaño de partícula de las perlas obtenidas por medio de este procedimiento:

10

Las microperlas secas se recolectaron a granel para ser analizadas y almacenadas. Las condiciones de almacenamiento se adaptaron para el almacenamiento de polvos secos, friables e higroscópicos. Cuando las microperlas se rehidrataron con un diluyente, la reconstitución tuvo lugar instantáneamente.

15 **[0060]** El contenido de agua residual de los productos se midió por el procedimiento de Karl Fischer como se define por la Farmacopea Internacional (4ª Edición, Methods of Analysis: 2. Chemical methods: 2.8. Determination of water by the Karl Fischer method). El valor obtenido fue menor del 2%.

[0061] Las perlas obtenidas se dispensaron posteriormente para obtener el equivalente de una dosis por vial.
20 Estos viales se almacenaron a 37 °C y a 45 °C para estudiar la termoestabilidad de este producto y para compararlo con el secado por liofilización convencional. La actividad de los virus se ensayó por la técnica µPFU y los detalles de los resultados obtenidos se dan en las Tablas 8 a 10 que se muestran a continuación:

Tabla 8: Titulaciones iniciales para cada serotipo de la composición de vacuna a granel antes del secado, expresados como PFU/dosis de log10

25

	CYD1	CYD2	CYD3	CYD4
Titulación de antígeno en la composición de vacuna acuosa a granel	4,9	5,5	5,6	5,7

Tabla 9: Pérdida de actividad para cada serotipo durante el secado en forma de microperlas, PFU/dosis de log10

	CYD1	CYD2	CYD3	CYD4
Pérdida de titulación infecciosa	0,4	0,2	0,2	0,2

30 **Tabla 10:** Resultados de la termoestabilidad a 37 °C y a 45 °C para cada serotipo de las microperlas liofilizadas:

Pérdida de titulación infecciosa	PFU/dosis			
	CYD1	CYD2	CYD3	CYD4
7 días a 37 °C	0,3	0,3	0,3	0,3
14 días a 37 °C	0,6	0,5	0,6	0,6
1 mes a 37 °C	1,2	1,2	1,2	1,1
7 días a 45 °C	0,9	0,8	0,9	0,8
14 días a 45 °C	2,7	2,4	2,3	2,2

[0062] Para cada uno de los 4 serotipos, las pérdidas durante el proceso de secado fueron equivalentes entre la liofilización (descrita en los Ejemplos 2 y 3) y el procedimiento de microperlas (entre 0,2 y 0,4 PFU/dosis de log 10) . La forma seca en forma de microperla mostró una mejor termoestabilidad a 37 °C y a 45 °C que la forma seca liofilizada convencional, con una diferencia de 0,3 log después de 1 mes a 37 °C, cuya diferencia se volvió a acentuar y alcanzó 0,8 log después de 14 días de almacenamiento a 45 °C.

[0063] Dado que esta diferencia en la estabilidad se observó con las composiciones de vacuna idénticas, las condiciones de operación del procedimiento de microperlas, y más particularmente la fase de congelación rápida,

tiene un efecto benéfico en la estabilidad de los virus quiméricos vivos.

Ejemplo 7: Estabilidad de la composición de vacuna a granel de la fiebre amarilla-del Nilo Occidental quimérica estabilizada, liofilizada, de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2.

5

[0064] La composición de vacuna a granel de la fiebre amarilla-del Nilo Occidental quimérica acuosa, estabilizada se estabilizó con el estabilizador de la presente invención (de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2) antes de la liofilización (de acuerdo con el Ejemplo 3) de cada vial en lo que se habían dispensado 0,3 ml. El porcentaje de los excipientes de la composición de vacuna liofilizada estabilizada se indica en la Tabla 1 del Ejemplo 3. Al mismo tiempo, se estabilizó la composición de vacuna a granel de la fiebre amarilla-del Nilo Occidental quimérica acuosa, estabilizada, con un estabilizador de referencia que contenía Albúmina de Suero Humana (HSA) antes de la liofilización de cada vial en los que se habían dispensado 0,3 ml.

10

[0065] Los títulos se midieron utilizando la técnica PFU. La tabla que se muestra a continuación compara los perfiles de estabilidad de los dos estabilizadores del virus de la fiebre amarilla-del Nilo Occidental quimérico.

15

Tabla 11: Resultados de estabilidad del virus de la fiebre amarilla-del Nilo Occidental quimérico para el material liofilizado, expresados en la forma de pérdida (log)

Material liofilizado en estado de pérdida viral	log	
	Estabilizador de la presente invención	Estabilizador de referencia con HSA
Pérdida en liofilización	0,1	0,2
3 días a 37 °C	0,2	0,2
7 días a 37 °C	0,2	0,2
14 días a 37 °C	0,3	0,4

REIVINDICACIONES

1. Un estabilizador para composiciones de vacunas que comprende uno o más flavivirus vivos atenuados, que comprende, en una solución acuosa sin proteínas de origen animal y sin sales añadidas que tienen
 5 cationes divalentes,
 un tampón,
 del 2,5% al 6,5% de sorbitol,
 del 2,5% al 13% de sacarosa,
 del 0 al 7,5% de trehalosa y/o del 0 al 7,5% de cualquier otro disacárido o trisacárido,
 10 del 0,2% al 0,5% de urea,
 del 0,8% al 2,5% de una mezcla de aminoácidos que comprende arginina (Arg), cisteína (Cys-Cys), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), valina (Val), alanina (Ala), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), prolina (Pro) y serina (Ser).
 15
2. El estabilizador como se ha indicado en la reivindicación 1, que comprende uno o más tampones seleccionados entre el grupo que comprende TRIS (tris(hidroximetil)-aminometano), HEPES (ácido 2-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil)etano-sulfónico) y fosfato potásico y/o fosfato sódico.
- 20 3. El estabilizador como se ha indicado en la reivindicación 2, en el que TRIS está presente a una concentración de 5 a 10 mM.
4. El estabilizador como se ha indicado en la reivindicación 2, en el que el HEPES está presente a una concentración de 7,5 a 20 mM.
 25
5. El estabilizador como se ha indicado en una o más de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende
 3,8% (p/v) de sorbitol,
 7,5% (p/v) de sacarosa,
 5,5% (p/v) de trehalosa,
 30 0,25% (p/v) de urea y
 1,5% (p/v) de la mezcla de aminoácidos.
6. Una composición de vacuna acuosa a granel estabilizada que comprende uno o más flavivirus vivos atenuados y el estabilizador como se ha indicado en una o más de las reivindicaciones 1 a 5.
 35
7. La composición como se ha indicado en la reivindicación 6, que comprende uno o más serotipos vivos atenuados del virus del dengue (DEN).
8. La composición como se ha indicado en una o más de las reivindicaciones 6 ó 7, que comprende virus
 40 vivos atenuados de la fiebre amarilla (FA).
9. La composición de vacuna como se ha indicado en una o más de las reivindicaciones 6 u 8, que comprende virus vivos atenuados de la enfermedad del virus del Nilo Occidental (NO).
- 45 10. La composición de vacuna como se ha indicado en una o más de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende virus vivos atenuados de la encefalitis Japonesa (EJ).
11. La composición de vacuna como se ha indicado en una o más de las reivindicaciones 6 a 10, que comprende uno o más flavivirus vivos atenuados quiméricos.
 50
12. La composición de vacuna como se ha indicado en la reivindicación 11, que comprende uno o más serotipos de un virus FA-DEN (fiebre amarilla-dengue) quimérico.
13. La composición de vacuna como se ha indicado en una o más de las reivindicaciones 11 a 12, que
 55 comprende un virus FA-NO (fiebre amarilla-virus del Nilo Occidental) quimérico.
14. La composición de vacuna como se ha indicado en una o más de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende un virus FA-EJ (fiebre amarilla-encefalitis Japonesa).

15. La composición de vacuna como se ha indicado en la reivindicación 6 que es una composición tetravalente que comprende CYD-1, CYD-2, CYD-3 y CYD-4.
16. Un procedimiento para estabilizar uno o más flavivirus vivos atenuados, que comprende la dilución de un cultivo viral purificado y concentrado que comprende uno o más flavivirus vivos atenuados añadiendo estabilizador para obtener las concentraciones finales de los componentes de estabilizador que se han definido en las reivindicaciones 1 a 5 con el fin de obtener una composición como se ha indicado en una o más de las reivindicaciones 6 a 15.
- 10 17. El procedimiento de estabilización como se ha indicado en la reivindicación 16, que comprende secar la composición acuosa por medio de un procedimiento seleccionado entre el grupo de secado por espuma, secado por pulverización o secado por espuma y liofilización.
18. El procedimiento de estabilización como se ha indicado en la reivindicación 16, que comprende secar la composición acuosa por medio del procedimiento de liofilización.
- 15
19. El procedimiento de estabilización como se ha indicado en la reivindicación 16, que comprende secar la composición acuosa por medio del procedimiento de secado por pulverización-liofilización.
- 20 20. El procedimiento de estabilización como se ha indicado en cualquiera de las reivindicaciones 18 y 19, en el que, en una primera etapa, la solución acuosa se congela en forma de partículas uniformes o de perlas, y en el que, en una segunda etapa, las partículas uniformes o perlas congeladas se someten a secado para obtener un producto seco estabilizado en forma de partículas uniformes o de perlas.
- 25 21. El procedimiento de estabilización como se ha indicado en la reivindicación 20, en el que las partículas uniformes o perlas del producto seco estabilizado tienen un diámetro de aproximadamente 100 μm a 1500 μm .
22. El procedimiento de estabilización como se ha indicado en la reivindicación 21, en el que las partículas uniformes o perlas del producto seco estabilizado tienen un diámetro de aproximadamente 500 μm a 1000 μm .
- 30
23. Una composición de vacuna seca obtenida mediante el secado de la composición a granel estabilizada como se ha indicado en una o más de las reivindicaciones 6 a 15.
24. La composición de vacuna seca como se ha indicado en la reivindicación 23, que está presente en forma de partículas uniformes o de perlas.
- 35
25. La composición de vacuna seca como se ha indicado en la reivindicación 24, en la que cada partícula o cada perla contiene una mezcla de diversos flavivirus vivos atenuados y/o vivos atenuados quiméricos.
- 40 26. La composición de vacuna seca como se ha indicado en la reivindicación 24, en la que cada partícula o cada perla contiene flavivirus vivos atenuados y/o vivos atenuados quiméricos de un único tipo.
27. Una composición de vacuna seca preparada a partir de la composición a granel estabilizada como se ha indicado en una o más de las reivindicaciones 6 a 15.
- 45
28. Un procedimiento para preparar una vacuna, que comprende la etapa de reconstituir la composición como se ha indicado en una de las reivindicaciones 23 a 27 con una solución acuosa.
29. Un kit de vacuna contra los flavivirus que comprende un primer recipiente que contiene la composición de vacuna seca como se ha indicado en una de las reivindicaciones 23 a 27 y un segundo recipiente que contiene una solución acuosa para reconstituir la vacuna.
- 50
30. El kit como se ha indicado en la reivindicación 29, en el que el primer recipiente contiene una mezcla de las diversas composiciones de vacunas que se han indicado en la reivindicación 26.
- 55

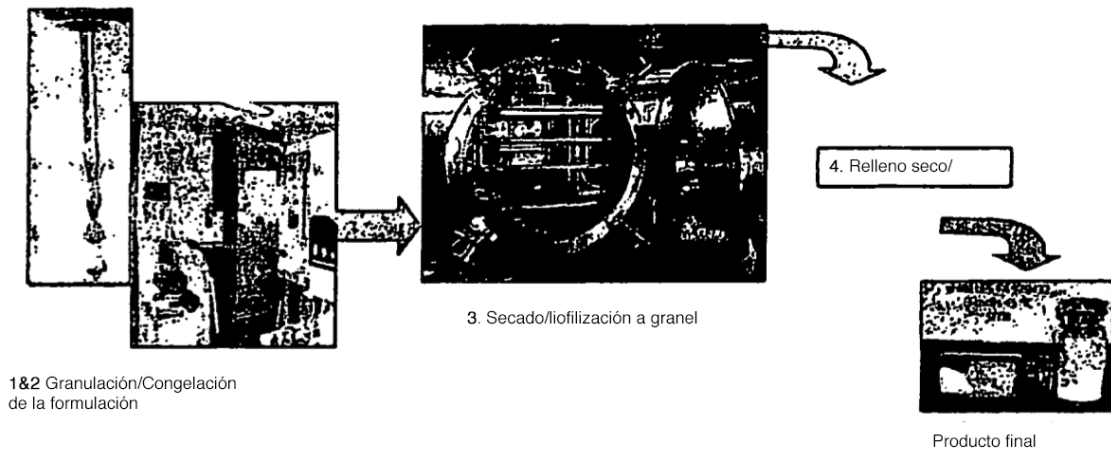


Figura 1: Producción de la composición de vacuna seca de acuerdo con la presente invención en forma de partículas uniformes o de perlas (microperlas)

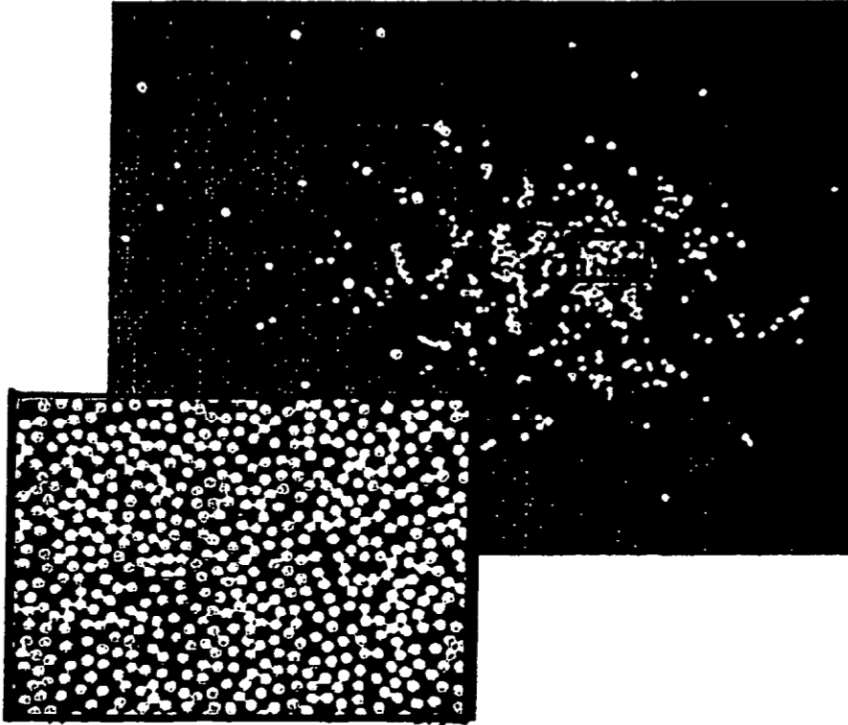


Figura 2: Composición de vacuna seca de acuerdo con la presente invención en forma de partículas uniformes o de perlas (microperlas)