

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 297**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

F26B 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2012 PCT/US2012/040230**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2013 WO13025274**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12726998 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2741740**

54 Título: **Preservación asistida por vacío de productos biológicos, en particular de vacunas**

30 Prioridad:

12.08.2011 US 201161490987 P

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

24.07.2017

73 Titular/es:

**MERIAL, INC. (100.0%)
3239 Satellite Blvd.
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

GENIN, NOEL, YVES HENRI JEAN

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 626 297 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

Preservación asistida por vacío de productos biológicos, en particular de vacunas

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional USSN 61/490.987, presentada el 27 de mayo de 2011.

10 CAMPO TÉCNICO

[0002] La presente descripción se refiere generalmente a los campos de la inmunología y la tecnología de las vacunas. Más específicamente, la presente descripción se refiere a estabilizadores para composiciones inmunogénicas y/o de vacuna atenuadas vivas liofilizadas que pueden comprender, entre otros, paramixovirus canino.

15 La descripción se refiere además a composiciones inmunogénicas y/o de vacuna atenuadas vivas liofilizadas estabilizadas de, por ejemplo, paramixovirus canino, que pueden contener estos estabilizadores. Otros aspectos de la descripción se describen en o son obvios de la siguiente divulgación, y están dentro del ámbito de la descripción.

ANTECEDENTES

20

[0003] Las composiciones inmunogénicas y composiciones de vacuna que comprenden componentes biológicos, tales como virus, bacterias, parásitos, hongos, proteínas, polipéptidos, glucoproteínas, y especialmente, microorganismos vivos atenuados, son notablemente sensibles a las condiciones por las que se preparan, formulan y almacenan.

25

[0004] Tales componentes biológicos pueden modificarse y degradarse por reacciones químicas (por ejemplo, hidrólisis, desaminación, reacción de Maillard), muchas de las cuales están mediadas por agua. El agua líquida permite movimientos moleculares y puede producir modificación de las conformaciones de proteína en composiciones que comprenden componentes biológicos. Limitando el acceso al agua o eliminando el agua, se reduce un factor importante de modificación y degradación. Métodos previos para conferir estabilidad a componentes biológicos han implicado principalmente la congelación del agua o eliminación del agua por liofilización.

30

[0005] La liofilización, o el proceso de liofilización, es una técnica comúnmente usada para eliminar agua en la preparación de productos deshidratados. Generalmente, "liofilizar" una composición acuosa implica tres etapas. Primera, la composición acuosa se congela en condiciones de baja temperatura. En segundo lugar, el agua congelada se elimina por sublimación en condiciones de presión reducida y baja temperatura. En esta etapa, la composición normalmente contiene aproximadamente el 15 % de agua. Tercera, el agua residual se elimina adicionalmente por desorción en condiciones de presión reducida y temperaturas más altas. Al final del proceso de liofilización, se produce un producto liofilizado, también llamado una "pastilla" o "torta". El producto liofilizado contiene agua residual muy baja (de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 5 % en peso/peso) y material seco en una forma amorfa. Este estado específico se clasifica como "vítreo".

40

[0006] Sin embargo, se observa pérdida sustancial de actividad inmunogénica de componentes biológicos durante las etapas de preparación, tales como antes y durante la liofilización, y también durante el almacenamiento de las composiciones inmunogénicas y composiciones de vacuna. La integridad de los componentes biológicos debe salvaguardarse para garantizar que se retiene la eficiencia de inmunización de las composiciones inmunogénicas y composiciones de vacuna. La actividad inmunogénica de componentes biológicos se mide por la capacidad para inducir y estimular una respuesta inmunológica cuando se administra a un huésped o sujeto.

45

[0007] Para limitar la manipulación de sujetos y el número de administraciones, hay una fuerte necesidad en la materia de proporcionar composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna multivalentes. Por definición, una composición inmunogénica o composición de vacuna multivalente comprende más de un componente inmunogénico activo que se origina a partir de, o se deriva de, al menos dos patógenos diferentes. Virus de diferentes géneros pueden variar en estabilidad durante la etapa de liofilización y posterior periodo de almacenamiento, produciendo una pérdida de viabilidad o infectividad. En el caso de virus tales como paramixovirus caninos, los componentes inmunogénicos comúnmente activos administrados son virus atenuados vivos. Para estimular eficientemente el sistema inmunitario, los virus atenuados vivos debe reproducirse en el sujeto inmunizado. La pérdida de viabilidad o infectividad puede producirse durante el proceso de liofilización de composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna multivalentes, durante el almacenamiento de las composiciones, o antes de la administración de las

50

55

composiciones después de la reconstitución. Así, se han añadido estabilizadores a tales composiciones liofilizadas. Sin embargo, para obtener composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna multivalentes que retengan su infectividad y/o viabilidad, sería particularmente ventajoso un estabilizador común que es capaz de preservar la viabilidad e infectividad de diferentes patógenos atenuados vivos.

5

[0008] La estabilización de componentes biológicos en forma seca ha implicado normalmente la preservación de anti toxinas, antígenos y bacterias (Flosodort et al (1935) J. Immunol. 29, 389). Sin embargo, una limitación en este proceso incluyó la desnaturalización parcial de proteínas cuando se secaron de un estado acuoso a temperatura ambiente. El secado del estado congelado ayudó a reducir la desnaturalización y condujo a una mejor preservación, aunque incompleta, de componentes biológicos que incluyen bacterias y virus (Stamp et al. (1947) J. Gen. Microbiol. 1, 251; Rightsel et al. (1967) Cryobiology 3, 423; Rowe et al. (1971) Cryobiology 8, 251).

10

[0009] Más recientemente, se han añadido azúcares tales como sacarosa, rafinosa y trehalosa en diversas combinaciones como estabilizadores antes de la liofilización de virus. Se ha probado un gran número de compuestos para su capacidad para estabilizar diferentes vacunas que contienen componentes biológicos atenuados vivos, en particular virus. Tales compuestos incluyen SPGA (sacarosa, fosfato, glutamato y albúmina; Bovarnick et al. (1950) J. Bacteriol. 59, 509-522; patente de EE.UU. N.º 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 dimetálico. Otros compuestos incluyen, por ejemplo, la amina SPG-NZ (por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 3.783.098) y mezclas de polivinilpirrolidona (PVP) (por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 3.915.794). Recientemente, se han estabilizado flavivirus atenuados vivos usando una mezcla compleja de múltiples compuestos, que incluyen sorbitol, sacarosa, opcionalmente trehalosa y/u otros disacáridos o trisacáridos, urea, y una combinación específica de aminoácidos (documento US 2010/0015180A1, a Sanofi Pasteur).

25

[0010] La vacuna y las composiciones inmunogénicas han tenido un tremendo impacto sobre la salud pública, reduciendo la morbilidad y mortalidad de una variedad de patógenos virulentos. Sin embargo, efectos secundarios involuntarios que surgen de los aditivos en las composiciones inmunogénicas y composiciones de vacuna continúan planteando un posible riesgo que puede sopesar cualquier atributo protector y terapéutico de las composiciones inmunogénicas y composiciones de vacuna.

30

[0011] En la forma frecuentemente usada en vacunas en los Estados Unidos, la gelatina puede provocar graves reacciones alérgicas en aproximadamente 1 de 2 millones de dosis. Las reacciones alérgicas que previamente se pensaba que resultaban de la albúmina (proteína del huevo) son más probablemente producidas por la gelatina en la misma vacuna. En el caso de la albúmina de suero humano, aunque nunca se ha asociado enfermedad a la albúmina de suero humano en vacunas, hay una probabilidad de transmisión de un virus mediante esta proteína, que se deriva de sangre humana.

35

[0012] Los productos derivados de bovino, tales como albúmina bovina y gelatina, conllevan el riesgo de transmisión de CJD (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, también conocida como la "enfermedad de las vacas locas") a través de la sangre de res y productos de tejido conjuntivo usados en la fabricación de vacunas. Sin embargo, no se ha informado de casos en los que la CJD se transmitiera a través de la sangre o productos de tejido conjuntivo, los priones que producen CJD no han sido encontrados en sangre o tejido conjuntivo, y está prohibido el uso de productos derivados de bovino de vacas importadas de países donde hay casos conocidos de la enfermedad de las vacas locas. Sin embargo, en vista de estos riesgos, se han hecho esfuerzos para eliminar el uso de tales productos en las composiciones inmunogénicas que se ha observado que provocan efectos inmunitarios no deseados.

45

[0013] De Rizzo (de Rizzo et al. (1989) Bull. Pan. Am. Health Organ. 23(3), 299-305) informaron de preparaciones para el virus del sarampión liofilizadas que contenían disoluciones de sorbitol-gelatina o ácido glutámico-lactosa. Estas preparaciones se almacenaron a -20 °C y sus títulos virales se determinaron durante un periodo de almacenamiento de 21 meses. Los datos resultantes indicaron que los virus liofilizados sin estabilizador son estables cuando se almacenan a -20 °C durante un periodo de 21 meses. Además, es muy sabido que los virus del sarampión liofilizados son estables cuando se almacenan a -20 °C y pueden retener potencia con prácticamente ninguna pérdida durante muchos años (Gray A., (1978) Dev. Biol. Stand. 41, 265-266). Sin embargo, estos resultados se obtuvieron a -20 °C donde los virus del sarampión liofilizados son estables y no demuestran un efecto estabilizante adicional. Estos resultados muestran solo que las disoluciones de sorbitol-gelatina y ácido glutámico-lactosa no tienen efecto negativo sobre la estabilidad de los virus del sarampión que se almacenan en forma liofilizada a -20 °C.

50

55

[0014] 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 sobre el título de infectividad del virus del moquillo canino (CDV) y virus de la bronquitis infecciosa (IBV) después de la liofilización. Se añadió una disolución de lactosa a la preparación de CDV a una concentración final de 75 mg/ml, mientras que la vacuna de IBV contuvo 40 mg de manitol por ml. Cuando se comparó el título de CDV antes de la liofilización con el título después de la liofilización y después de 12 meses de almacenamiento a 6 °C, el título de CDV disminuyó de $10^{1.6}$ a $10^{2.0}$ CCID₅₀/ml, que refleja una reducción muy significativa en el título de CDV.

10 **[0015]** Se conocen en la técnica varios métodos para eliminar la humedad con el fin de preservar la preparación biológica. El término "liofilización por pulverización" se entiende que significa la pulverización con un fluido en un entorno criogénico, seguido de liofilización de las partículas congeladas obtenidas. El "secado por espuma" se entiende que significa el secado, en forma de una espuma vítrea, mediante evaporación de agua, de una disolución concentrada. Y "secado de espuma congelada" pretende significar el secado, en forma de una espuma vítrea por sublimación de hielo, de una disolución previamente congelada, a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea y la temperatura de colapso de la matriz.

15 **[0016]** Por consiguiente, existe la necesidad de nuevos estabilizadores y métodos para preservar la viabilidad e infectividad de los componentes biológicos en forma liofilizada, que sean seguros y adecuados para inyección a sujetos y que tengan un buen aspecto.

20 **[0017]** La citación o identificación de cualquier documento en la presente solicitud no es una admisión de que tal documento esté disponible como estado de la técnica para la presente invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

25 **[0018]** La presente invención proporciona un proceso de vitrificación de material biológico que comprende las etapas de formular una preparación biológica líquida, someter la preparación a cambios controlados en la presión y temperatura para reducir el contenido de humedad de la formulación a menos de aproximadamente el 5 % en peso, vitrificando así el material biológico; en el que el proceso comprende además las etapas de: (a) añadir a la preparación líquida componentes biológicos activos, estabilizadores, que reducen o eliminan el daño inducido sometiendo los
30 componentes biológicos a medios de preservación criogénica, que incluyen granulación en perlas, vitrificación y liofilización, y opcionalmente añadir uno o más adyuvantes; (b) llenar los viales con la preparación biológica de la etapa (a); (c) cargar viales en recipiente de temperatura controlada, en el que la temperatura es entre -15 °C y 10 °C, particularmente entre -10 °C y 5 °C, e incluso más particularmente aproximadamente 5 °C; (d) reducir la presión del aire del recipiente de temperatura controlada hasta que se obtiene una presión dentro del intervalo de 15-30 mbar; (e)
35 mantener la presión obtenida durante la etapa (d) durante entre 5 y 20 minutos, particularmente entre 10 y 15 minutos, para permitir que la temperatura del producto se estabilice y para permitir que los gases volátiles, que incluyen carbonatos, sean liberados de la preparación biológica, en el que la temperatura del recipiente sigue a aproximadamente 4 °C a aproximadamente 6 °C, o aproximadamente 5 °C durante esta etapa; (f) disminuir la presión del aire del recipiente a aproximadamente 4 a aproximadamente 7 mbar, o aproximadamente 5 mbar, durante entre
40 aproximadamente 5 y aproximadamente 20 minutos; (g) mantener la presión de la etapa (f) durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos, que permite que la preparación biológica llegue a concentrarse más; (h) aumentar la temperatura del recipiente de temperatura negativa a positiva (entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 50 °C) durante el transcurso de entre 45 y 85 minutos, o aproximadamente 60 minutos, y mantener la presión constante hasta que llegue a aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, o aproximadamente 15 °C; (i) reducir
45 la presión del aire del recipiente a aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4 mbar, o aproximadamente 3 mbar, para acelerar la concentración, y hasta que la temperatura del recipiente alcance y mantenga aproximadamente 30 °C durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 90 minutos, o 60 minutos; (j) reducir adicionalmente la presión a entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 4,0 mbar, o aproximadamente 1 mbar, y mantener la presión constante hasta que se haya completado la espumación; (k) reducir adicionalmente la presión a entre
50 aproximadamente 5 µbar y aproximadamente 100 µbar, o aproximadamente 25 µbar, mientras que se mantiene la temperatura a aproximadamente 30 °C durante aproximadamente 400 a aproximadamente 2400 o más minutos, hasta que se obtiene la humedad deseada de entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 15 %, o aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 4 %; (l) tapar los viales mientras están en el recipiente del liofilizador, completándose así el método de vitrificación.

55 **[0019]** La presente descripción trata la necesidad en la materia proporcionando, entre otras cosas, nuevos métodos de producción de preparaciones vitrificadas de biológicos que incluyen proteínas, péptidos, anticuerpos, bacterias, virus, parásitos unicelulares, o cualquier tejido de animal humano o no humano. Los virus pueden comprender virus del moquillo canino (CDV) atenuado vivo, paragripe canina tipo 2 (cPI2), adenovirus canino,

enfermedad de Marek, enfermedad infecciosa de la bolsa o enfermedad de Newcastle. Las bacterias pueden incluir *Pasteurella spp.* o *Avibacterium spp.*, y los biológicos pueden incluir el polipéptido KSAC de *Leishmania*,

[0020] En una realización, el método generalizado de vitrificación comprende las etapas de:

- 5
- (1) formular una preparación biológica, que incluye las etapas de añadir componentes biológicos activos, añadir estabilizadores, que reducen o eliminan el daño inducido sometiendo los componentes biológicos a medios de preservación criogénica, que incluyen granulación en perlas, vitrificación y liofilización, y opcionalmente añadir uno o más adyuvantes, que aumentan la inmunogenicidad del biológico en el caso de preparaciones inmunológicas;
- 10
- (2) llenar viales con la preparación biológica de la etapa (1);
- (3) cargar viales en recipiente de temperatura controlada, en el que la temperatura es entre -15 °C y 10 °C, particularmente entre -10 °C y 5 °C, e incluso más particularmente aproximadamente 5 °C;
- (4) reducir la presión del aire del recipiente de temperatura controlada hasta que se obtiene una presión dentro del intervalo de 15-30 mbar;
- 15
- (5) mantener la presión obtenida durante la etapa (4) durante entre 5 y 20 minutos, particularmente entre 10 y 15 minutos, para permitir que la temperatura del producto se estabilice y para permitir que los gases volátiles, que incluyen carbonatos, sean liberados de la preparación biológica, en el que la temperatura del recipiente sigue a aproximadamente 4 °C a aproximadamente 6 °C, o aproximadamente 5 °C durante esta etapa;
- 20
- (6) disminuir la presión del aire del recipiente a aproximadamente 4 a aproximadamente 7 mbar, o aproximadamente 5 mbar, durante entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 minutos;
- (7) mantener la presión de la etapa (6) durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos, que permite que la preparación biológica llegue a concentrarse más;
- 25
- (8) aumentar la temperatura del recipiente de temperatura negativa a positiva (entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 50 °C) durante el transcurso de entre 45 y 85 minutos, o aproximadamente 60 minutos, y mantener la presión constante hasta que llegue a aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, o aproximadamente 15 °C;
- (9) reducir la presión del aire del recipiente a aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4 mbar, o aproximadamente 3 mbar, para acelerar la concentración, y hasta que la temperatura del recipiente alcance y mantenga aproximadamente 30 °C durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 90 minutos, o 60 minutos;
- 30
- (10) reducir adicionalmente la presión a entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 4,0 mbar, o aproximadamente 1 mbar, y mantener la presión constante hasta que se haya completado la espumación;
- (11) reducir adicionalmente la presión a entre aproximadamente 5 μbar y aproximadamente 100 μbar, o aproximadamente 25 μbar, mientras que se mantiene la temperatura a aproximadamente 30 °C durante aproximadamente 400 a aproximadamente 2400 o más minutos, hasta que se obtiene la humedad deseada de entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 15 %, o aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 4 %;
- 35
- (12) tapar los viales mientras están en el recipiente del liofilizador, completándose así el método de vitrificación.
- 40

[0021] Una persona con conocimientos básicos puede llevar a cabo el método descrito usando cualquier aparato de secado adecuado conocido o aún por ser fabricado. Ejemplos no limitantes de un aparato de secado adecuado incluyen: 1) una secadora pequeña (un estante, capacidad de viales 200 X 3 cc); 2) una secadora piloto (2 estantes, capacidad de viales 3000 X 3 cc), o una secadora grande BERLIN (3 estantes, 10000 X 3 cc). Pueden hacerse modificaciones rutinarias al bucle de regulación del aparato de secado de forma que el liofilizador pueda operar durante un intervalo más amplio en comparación con su intervalo usual.

45

[0022] Estas y otras realizaciones se desvelan o son obvias a partir de y están englobadas por la siguiente Descripción detallada.

50

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0023] La siguiente Descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero no prevista para limitar la invención a realizaciones específicas descritas, puede entenderse conjuntamente con las Figuras adjuntas, en las que:

55

La FIG. 1 muestra una fotografía de masas vitrificadas que tienen un aspecto de algodón de azúcar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- [0024]** En la presente divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado atribuido a ellos en la ley de patentes de EE.UU. y pueden significar "incluye", "que incluye" y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente", asimismo tiene el significado atribuido en la ley de patentes de EE.UU. y el término es de extremos abiertos, que permite la presencia de más de lo que se cita mientras que características básicas o novedosas de lo que se cita no se cambia por la presencia de más de lo que se cita, pero excluye realizaciones del estado de la técnica.
- [0025]** Un "sujeto" en el contexto de la presente descripción puede ser un vertebrado, tal como un mamífero, ave, reptil, anfibio o pez; más ventajosamente un ser humano, un animal de compañía o domesticado; un animal productor de alimento o productor de pienso; ganado, presa, animal de carreras o deportivo tal como, pero no se limita a, bovinos, caninos, felinos, caprinos, ovinos, porcinos, equinos y aviares. Preferentemente, el vertebrado es un canino.
- [0026]** Como se usa en el presente documento, "recombinante" se refiere a un ácido nucleico sintetizado o de otro modo manipulado *in vitro* (por ejemplo, "ácido nucleico recombinante"), a métodos de uso de ácidos nucleicos recombinantes para producir productos génicos en células, en sujetos, o en otros sistemas biológicos, o a un polipéptido ("proteína recombinante") codificada por un ácido nucleico recombinante. "Medios recombinantes" también engloban el corte y la unión de ácidos nucleicos que tienen diversas regiones codificantes, dominios, o secuencias promotoras de diferentes fuentes en un casete de expresión o vector para, por ejemplo, expresión inducible o constitutiva de secuencias codificantes de ácido nucleico.
- [0027]** Como se usa en el presente documento, el término "operativamente unido" significa que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista.
- [0028]** El término "heterólogo", cuando se usa con referencia a un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico está en una célula, un virus, un sujeto, o una bacteria donde normalmente no se encuentra en la naturaleza; o comprende dos o más subsecuencias de ácido nucleico que no se encuentran en la misma relación entre sí como normalmente se encuentran en la naturaleza, o se manipula recombinantemente de manera que su nivel de expresión, o relación física con otros ácidos nucleicos u otras moléculas en una célula, sujeto, o estructura, no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, puede producirse recombinantemente un ácido nucleico heterólogo que tiene dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos de un modo no encontrado en la naturaleza; por ejemplo, un gen canino operativamente unido a una secuencia promotora insertada en, por ejemplo, un vector de virus de la viruela o adenovirus. Como un ejemplo, un ácido nucleico heterólogo de interés puede codificar un producto génico inmunogénico, en el que el ácido nucleico heterólogo de interés contenido en un vector se administra terapéuticamente o profilácticamente como una composición inmunogénica o composición de vacuna. Secuencias heterólogas pueden comprender diversas combinaciones de promotores y secuencias, numerosos ejemplos de los cuales se describen en detalle en el presente documento.
- [0029]** Como se usa en el presente documento, 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 usados en técnicas de ácido nucleico recombinante permiten que entidades, tales como un segmento de ácido nucleico (tal como un segmento heterólogo de ácido nucleico, tal como un segmento de ADNc heterólogo), se transfieran en una célula diana. También se usa en el presente documento el término "vector de expresión". La presente descripción comprende vectores recombinantes que pueden incluir, sin limitación, vectores virales, vectores bacterianos, vectores fúngicos, vectores protozoicos, vectores plasmídicos, o recombinantes de los mismos.
- [0030]** Con respecto a ácidos nucleicos heterólogos para la expresión en un vector (por ejemplo, que codifica un epítipo de interés y/o un antígeno y/o inmunogén y/o un terapéutico) y documentos que proporcionan tales ácidos nucleicos heterólogos, además de con respecto a la expresión de factores de transcripción y/o traducción para potenciar la expresión de moléculas de ácidos nucleicos, y en cuanto a términos tales como "epítipo de interés", "terapéutico", "respuesta inmunitaria", "respuesta inmunológica", "respuesta inmunitaria protectora", "composición inmunológica", "composición inmunogénica" y "composición de vacuna", entre otros, se hace referencia a la patente de EE.UU. N.º 5.990.091 concedida el 23 de noviembre de 1999, y los documentos WO 98/00166 y WO 99/60164, y los documentos citados en su interior y los documentos de registro en el seguimiento de esa patente y aquellas solicitudes PCT. Así, la patente de EE.UU. N.º 5.990.091 y los documentos WO 98/00166 y WO 99/60164 y los documentos citados su interior y documentos o registro en el seguimiento de esa patente y aquellas solicitudes PCT, y otros documentos citados en el presente documento o que pueden ser consultados en la práctica de esta descripción; y todas las moléculas heterólogas de ácidos nucleicos, promotores y vectores citados en su interior, pueden usarse en

la práctica de esta descripción. A este respecto, también se hace mención de las patentes de EE.UU. N.º 6.706.693; 6.716.823; 6.348.450; solicitudes de patente de EE.UU. N.º de serie 10/424.409; 10/052.323; 10/116.963; 10/346.021; y WO99/08713, publicada el 25 de febrero de 1999, de PCT/US98/16739.

5 **[0031]** Un "antígeno" es una sustancia que es reconocida por el sistema inmunitario e induce una respuesta inmunitaria. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o porción de un organismo; un vector recombinante que contiene una inserción con propiedades inmunogénicas; un trozo de ácido nucleico o fragmento capaz de inducir una respuesta inmunitaria tras la presentación a un animal huésped; una proteína, un polipéptido, un péptido, una glucoproteína, un epítipo, un hapteno, un hidrato de carbono, un azúcar, o
10 cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el antígeno puede comprender una toxina o antitoxina. Un término similar usado indistintamente en este contexto es "inmunogén". Un "patógeno" se refiere a un agente causante específico de enfermedad, tal como una bacteria, hongo, protozoo, parásito o virus.

[0032] El término "vitrificación", como se usa en el presente documento, pretende significar secar una
15 preparación biológica líquida a una baja humedad (por ejemplo, inferior a aproximadamente el 4 %), aspecto similar a "algodón de azúcar", usando una serie de reducciones de presión controlada realizadas durante longitudes de tiempo específicas y durante intervalos de temperatura específicos. La vitrificación puede llevarse a cabo en cualquier cámara o recipiente, que incluye un liofilizador, en la que pueden ajustarse la presión del aire y la temperatura para acomodar los intervalos presentados en la presente divulgación. El término "composición vitrificada" y "preparación vitrificada"
20 pueden usarse indistintamente, y pretenden significar en el presente documento cualquier composición, preparación o formulación que ha sido sometida al método de vitrificación desvelado en el presente documento.

[0033] Como se usa en el presente documento, los términos "composición inmunogénica" y "composición inmunológica" y "composición inmunogénica o inmunológica" cubren cualquier composición que provoca una
25 respuesta inmunitaria contra el antígeno o inmunogén de interés expresado de vectores; por ejemplo, después de la administración en un sujeto, provoca una respuesta inmunitaria contra el inmunogén elegido como diana o antígeno de interés. Los términos "composición vacunal" y "vacuna" y "composición de vacuna" cubren cualquier composición que induce una respuesta inmunitaria 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 inmunitaria
30 protectora contra el antígeno elegido como diana o inmunogén o proporciona protección eficaz contra el antígeno o inmunogén expresado de vectores.

[0034] Como se usa en el presente documento, el término "multivalente" significa una composición
35 inmunogénica o composición de vacuna que contiene más de un antígeno, tanto de la misma especie, de especies diferentes, como una composición inmunogénica o composición de vacuna que contiene una combinación de antígenos de diferentes géneros.

[0035] Un "componente inmunogénico activo" en el contexto de la presente descripción incluye patógenos atenuados vivos, tales como virus atenuados vivos, bacterias atenuadas vivas, hongos, o parásitos. Cuando el
40 componente inmunogénico activo es parte de una composición inmunogénica de CDV y cPi2 atenuados vivos multivalente, suspensión, o disolución de la descripción, el componente inmunogénico activo puede derivarse ventajosamente de un patógeno distinto de un paramixovirus. También están englobados por la descripción inmunógenos heterólogos recombinantes o antígenos derivados de o que se originan de uno o más patógenos descritos en el presente documento, que pueden estar contenidos y expresarse en, entre otros, vectores virales,
45 vectores bacterianos, vectores fúngicos y vectores plasmídicos. La descripción también comprende epítipes de inmunógenos heterólogos o antígenos derivados de uno o más patógenos, inmunomoduladores tales como citocinas, agentes terapéuticos, toxinas, anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo, adyuvantes, u otras especies tales como ARN antisentido, ARN catalíticos, ARN interferentes pequeños, entre otros.

50 **[0036]** El término "composición veterinaria" significa cualquier composición que comprende un vector para uso veterinario que expresa una proteína terapéutica como, por ejemplo, eritropoyetina (EPO) o una proteína inmunomoduladora, tal como, por ejemplo, interferón (IFN). Similarmente, el término "composición farmacéutica" significa cualquier composición que comprende un vector para expresar una proteína terapéutica.

55 **[0037]** Las composiciones y métodos de la presente descripción pueden aplicarse apropiadamente en la estabilización y vitrificación de cualquier sustancia biológica/agente o sustancia biológica/agente de combinación más agente farmacéutico/veterinario. "Biológicos" incluyen, pero no se limitan a, inmunomoduladores tales como citocinas, agentes terapéuticos, toxinas, anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo, adyuvantes, u otras especies tales como ARN antisentido, ARN catalíticos, ARN interferentes pequeños, entre otros. Después de la

reconstitución de los materiales vitrificados/sustancias, estos compuestos pueden usarse para la prevención de enfermedades como inmunización profiláctica o proporcionar alivio contra síntomas de enfermedad como inmunización terapéutica.

5 **[0038]** La descripción engloba un método de vitrificación de composiciones inmunogénicas atenuadas vivas que pueden comprender al menos un estabilizador, por ejemplo azúcares no reductores o compuestos antioxidantes. En algunas realizaciones, los estabilizadores de vitrificación pueden 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 preservar o ayudar en la retención de la inmunogenicidad, infectividad y viabilidad de componentes biológicos
10 que incluyen, pero no se limitan a, virus, bacterias, hongos, parásitos, proteínas, polipéptidos, entre otros. Los estabilizadores usados en los métodos de vitrificación descritos pueden tener un buen aspecto, que incluye, por ejemplo, forma y color uniformes, y son seguros para administración en un sujeto.

[0039] Un "monosacárido reductor" es un sacárido que es capaz de donar electrones, y así, capaz de reducir
15 otro compuesto durante las reacciones de oxidación-reducción. Generalmente, un monosacárido reductor tiene grupos aldehído o cetona en su estructura. Están disponibles pruebas colorimétricas para identificar azúcares reductores, tales como la prueba del reactivo de Fehling, que da un cambio de color de azul oscuro a rojo a medida que el reactivo de ión cobre se reduce al metal cobre en presencia de un azúcar reductor. En la presente descripción, el monosacárido reductor comprende preferentemente glucosa, galactosa, fructosa, manosa, sorbosa, o combinaciones
20 de las mismas. En una realización de la descripción, se proporciona una combinación de al menos dos monosacáridos reductores. Los monosacáridos reductores son importantes para la protección de composiciones, en particular de proteínas y patógenos atenuados vivos, durante el proceso de liofilización, particularmente durante la etapa de sublimación (es decir, primera y segunda etapas de desecación), en la que los monosacáridos reductores toman el lugar del agua sublimada y mantienen la cohesión de la estructura biológica.

25 **[0040]** Opcionalmente, pueden añadirse alcoholes de azúcar y/u oligosacáridos no reductores para estabilizar preparaciones vitrificadas según la presente descripción. Las combinaciones de monosacáridos reductores y alcoholes de azúcar, combinaciones de monosacáridos reductores y oligosacáridos no reductores, y combinaciones de monosacáridos reductores, alcoholes de azúcar y oligosacáridos no reductores, se contemplan por la presente divulgación. El alcohol de azúcar puede ser, a modo de ejemplo no limitante, sorbitol, manitol, xilitol o maltitol.
30 Combinación

[0041] "Oligosacáridos no reductores" en el contexto de la descripción son azúcares que comprenden de dos a diez unidades de sacárido y son incapaces de reducir otro compuesto durante las reacciones de oxidación-reducción.
35 En la presente descripción, el oligosacárido no reductor puede ser un disacárido no reductor o trisacárido no reductor, que comprende ventajosamente trehalosa, sacarosa o rafinosa. Los estabilizadores descritos también pueden comprender una mezcla de al menos dos oligosacáridos no reductores.

[0042] Un compuesto "antioxidante ácido" se define como un compuesto químico que reacciona con y neutraliza
40 oxidantes, radicales libres (es decir, moléculas con electrones no emparejados), o productos químicos que liberan radicales libres. En el contexto de la presente descripción, el compuesto antioxidante puede estar en forma ácido. Los antioxidantes ácidos incluyen, pero no se limitan a, ácido ascórbico y/o aminoácidos ácidos, tales como ácido aspártico y ácido glutámico. Combinaciones de más de un compuesto antioxidante ácido son componentes adecuados de preparaciones vitrificadas según los métodos de la presente divulgación.

45 **[0043]** Agentes de carga también son componentes adecuados de composiciones vitrificadas según la presente divulgación. Los agentes de carga pueden ser polímeros farmacéutica o veterinariamente aceptables tales como, pero no se limitan a, dextrano, maltodextrina, polivinilpirrolidona (PVP), crospovidona e hidroxietilalmidón. Otros ejemplos no limitantes de derivados de almidón incluyen celulosa microcristalina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa,
50 hidroxipropilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Los agentes de carga aumentan el valor de T_g de las composiciones biológicas, permitiendo el uso de temperaturas más altas durante la congelación. El "valor T_g" se define como la temperatura de transición vítrea, que se corresponde con la temperatura por debajo de la cual la composición congelada se vuelve vítrea. El agente de carga puede ayudar en proporcionar el buen aspecto observado en las masas vitrificadas de la presente divulgación, masas que tienen el aspecto general de algodón de
55 azúcar esponjoso ligero.

[0044] Si se usa dextrano como agente de carga, su peso molecular puede ser de aproximadamente 5000 Da a aproximadamente 70000 Da, preferentemente de aproximadamente 10.000 Da a aproximadamente 40.000 Da. Si se usa PVP como un agente de carga, su peso molecular puede ser de aproximadamente 8.000 Da a aproximadamente

360.000 Da, particularmente de aproximadamente 10.000 Da a aproximadamente 60.000 Da.

[0045] Si se usa maltodextrina como agente de carga, su valor equivalente de dextrosa (DE, que es una medida cuantitativa del grado de hidrólisis del polímero de almidón) puede ser de aproximadamente 3 a aproximadamente 20, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 18, más preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 15. Si se usa hidroxietilalmidón como agente de carga, su peso molecular puede ser de aproximadamente 70.000 Da a aproximadamente 450.000 Da, preferentemente de aproximadamente 130.000 Da a aproximadamente 200.000 Da. El grado de sustitución del hidroxietilalmidón puede ser de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,7, particularmente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,6. El grado de sustitución se define como el número de grupo hidroxietilo por unidad de glucosa.

[0046] Algunos componentes, que incluyen estabilizadores, de las preparaciones biológicas pueden no ser fácilmente solubles. Sin embargo, está perfectamente dentro del alcance del experto sustituir adecuadamente componentes análogos (por ejemplo, seleccionando un componente más soluble) y/o adaptar las cantidades o cantidades del componente insoluble presente en el estabilizador con el fin de obtener un estabilizador soluble. La solubilidad de un componente puede comprobarse fácilmente por una prueba de solubilidad visual. Una prueba de solubilidad comprende las etapas de añadir todos los componentes del estabilizador a una temperatura de aproximadamente 55 °C, y mezclar durante aproximadamente 30 minutos. Después de aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente y sin ninguna agitación, el estabilizador puede comprobarse visualmente para el aspecto de precipitados. Si el estabilizador es transparente o claro, entonces todos los componentes del estabilizador son solubles.

[0047] Preparaciones biológicas vitrificadas según la presente divulgación pueden contener cualquier número de estabilizadores. La Tabla 1 proporciona varios ejemplos. "Dextrano" comprende dextrano-40.000 que tiene un peso molecular de 40.000 Da.

Tabla 1: Composiciones de los estabilizadores

| Estabilizadores | Monosacárido(s) reductor(es) o mezcla | Antioxidante ácido | Agente de carga | Disolvente |
|-----------------|--|--|---------------------------------|--|
| F2 | Glucosa (5 % en peso/volumen) Rafinosa (5 % en peso/volumen) | ácido aspártico (0,50 % en peso/volumen) | Dextrano (10 % en peso/volumen) | Agua para inyección (c.s.p. 100 % v/v) |
| F2B | Glucosa (3 % en peso/volumen) Rafinosa (3 % en peso/volumen) | ácido aspártico (0,20 % en peso/volumen) | Dextrano (6 % en peso/volumen) | Agua para inyección (c.s.p. 100 % v/v) |
| F6B | Galactosa (3 % en peso/volumen) Manitol (6 % en peso/volumen) | ácido aspártico (0,40 % en peso/volumen) | ----- | Agua para inyección (c.s.p. 100 % v/v) |
| F33 | Glucosa (5 % en peso/volumen) Fructosa (5 % en peso/volumen) | ácido aspártico (0,50 % en peso/volumen) | Dextrano (10 % en peso/volumen) | Agua para inyección (c.s.p. 100 % v/v) |
| F37 | Glucosa (5 % en peso/volumen) Rafinosa (5 % en peso/volumen) Sorbitol (10 % en peso/volumen) | ácido aspártico (0,50 % en peso/volumen) | ----- | Agua para inyección (c.s.p. 100 % v/v) |
| A | Glucosa (1 % en peso/volumen) Galactosa (5 % en peso/volumen) | ácido aspártico (0,50 % en peso/volumen) | Dextrano (6 % en peso/volumen) | Agua para inyección (c.s.p. 100 % v/v) |
| H | Glucosa (5 % en peso/volumen) Rafinosa (5 % en peso/volumen) | ácido aspártico (0,50 % en peso/volumen) | Dextrano (6 % en peso/volumen) | Agua para inyección (c.s.p. 100 % v/v) |

| Estabilizadores | Monosacárido(s) reductor(es) o mezcla | Antioxidante ácido | Agente de carga | Disolvente |
|-----------------|--|--|--------------------------------|--|
| | peso/volumen) | | | |
| K | Glucosa (5 % en peso/volumen) Sacarosa (1 % en peso/volumen) | ácido aspártico (0,50 % en peso/volumen) | Dextrano (6 % en peso/volumen) | Agua para inyección (c.s.p. 100 % v/v) |
| U | Glucosa (1 % en peso/volumen) Galactosa (1 % en peso/volumen) | ácido aspártico (0,50 % en peso/volumen) | Dextrano (6 % en peso/volumen) | Agua para inyección (c.s.p. 100 % v/v) |

[0048] También se proporciona por la divulgación una composición inmunogénica vitrificada, que se produce produciendo primero una suspensión inmunogénica o disolución que comprende un virus atenuado vivo, tal como, pero no se limita a, paramixovirus, seguido de vitrificación del mismo según los métodos de la presente divulgación. El paramixovirus canino puede comprender, entre otros, virus del moquillo canino (CDV) y virus paragrípalo canino tipo 2 (cPi2), ambos en forma de virus atenuados vivos.

[0049] En una realización, la presente divulgación engloba paramixovirus atenuados vivos vitrificados, en particular paramixovirus caninos. El paramixovirus canino es un virus de la familia *paramyxoviridae*, que incluye virus del moquillo canino (CDV) y virus paragrípalo canino tipo 2 (cPi2). Los paramixovirus caninos son responsables de una amplia variedad de enfermedades en muchas especies de carnívoros, en particular animales domésticos, tales como perros, o animales no domésticos, tales como hurones, leones, tigres y leopardos.

[0050] En el contexto de la presente divulgación, el término "composición de vacuna a granel" pretende significar una composición que sale en la etapa final de la producción de antígeno, purificada o no purificada, monovalente, o después de la mezcla multivalente. El término "una composición de vacuna seca" pretende significar una composición de la que el contenido de agua residual es inferior o igual a aproximadamente el 4 %, o aproximadamente el 3 %, y que está lista para ser reconstituida con una disolución acuosa con el fin de usarse como una vacuna o directamente en forma de partículas secas. La composición de vacuna seca también puede molerse y formularse con excipientes apropiados, que incluyen aglutinantes, para producir unidades de dosificación adecuadas por vía oral, por ejemplo, comprimidos y píldoras.

[0051] La presente descripción también se refiere a un método de estabilización de uno o más paramixovirus atenuados vivos. En la etapa final en la producción de los paramixovirus atenuados vivos (por ejemplo, cultivo en células, infección y cultivo viral, seguido de purificación en una o más etapas), la cosecha viral purificada o no purificada y concentrada o no concentrada que comprende un paramixovirus atenuado vivo se diluye añadiendo estabilizador, seguido de vitrificación.

[0052] Una vacuna atenuada viva o composición inmunogénica tiene las siguientes ventajas: puede administrarse en bajas dosis, particularmente si es auto-replicante; imita estrechamente la infección natural/no mutante en un sujeto, y proporciona al sujeto todos los posibles antígenos inmunológicamente importantes al mismo tiempo, es decir, en una única administración.

[0053] Generalmente, se coincide con que las composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna basadas en microorganismos atenuados vivos tienen la capacidad de inducir un tipo altamente eficaz de respuesta inmunitaria. Tales composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna tienen la ventaja de que, una vez el animal huésped se ha inmunizado, la entrada del patógeno en el huésped induce una memoria acelerada de inmunidad temprana, mediada por célula o humoral, que es capaz de controlar el crecimiento adicional del organismo antes de que la infección pueda asumir proporciones clínicamente significativas. Las composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna basadas en un patógeno muerto (vacuna muerta) son generalmente admitidas en la materia por ser incapaces o menos probables de lograr este tipo de respuesta. Sin embargo, las composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna que contienen un patógeno vivo, dependiendo del nivel de atenuación, presentan el peligro de que el huésped inmunizado, tras la inmunización, puede contraer la enfermedad contra la protección que se busca. Por tanto, serían altamente deseables composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna que poseyeran los atributos inmunizantes de un patógeno vivo, pero que fueran incapaces de causar efectos secundarios no deseables tras la administración a un sujeto.

[0054] Pueden generarse patógenos atenuados vivos incorporando una amplia variedad de mutaciones, que

incluyen cambios de un solo nucleótido, mutaciones específicas de sitio, inserciones, sustituciones, deleciones o transposiciones. Estas mutaciones pueden afectar un pequeño segmento del genoma del patógeno, por ejemplo, 15 a 30 nucleótidos, o grandes segmentos del genoma del patógeno, por ejemplo, 50 a 1000 nucleótidos, dependiendo de la naturaleza de la mutación. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones en la dirección 5' o en la dirección 3' de la región reguladora no codificante de un patógeno o elemento para abolir o alterar su actividad, produciendo así un fenotipo atenuado.

[0055] Mutaciones de regiones reguladoras no codificantes del genoma del patógeno que pueden producir regulación por disminución de la replicación de un gen de patógeno, y/o regulación por disminución de la transcripción de un gen de patógeno, pueden producir la producción de patógenos defectuosos en cada ronda de replicación; es decir, patógenos que contienen menos del complemento completo de regiones genómicas o segmentos requeridos para un patógeno completamente infeccioso. Por tanto, el patógeno alterado demostrará características atenuadas en las que el patógeno dará lugar a patógenos más defectuosos que los patógenos no mutantes en cada ronda de replicación. Sin embargo, como la cantidad de proteína, antígeno, o inmunogén sintetizado en cada ronda, es similar para tanto el patógeno no mutante como el patógeno defectuoso, es probable que tales patógenos atenuados sean capaces de inducir una buena respuesta inmunitaria en un sujeto.

[0056] Donde el gen de patógeno codifica una proteína estructural, por ejemplo, en el caso de patógenos tales como virus, una cápside, matriz, superficie o proteína de la envuelta, el número de partículas producidas durante la replicación se reducirá de forma que el patógeno mutado demuestre características atenuadas; por ejemplo, un título que produce niveles subclínicos de infección. Por ejemplo, una disminución en la expresión de la cápside viral reducirá el número de nucleocápsides encapsidadas durante la replicación, mientras que una disminución en la expresión de la proteína de la envuelta puede reducir el número y/o la infectividad de viriones de progenie. Alternativamente, una disminución en la expresión de las enzimas virales requeridas para la replicación, por ejemplo, la polimerasa, replicasa, helicasa, y similares, debe disminuir el número de genomas de progenie generados durante la replicación. Como el número de partículas infecciosas producidas durante la replicación se reduce, los virus alterados demuestran características atenuadas. Sin embargo, el número de partículas de virus antigénico producidas generalmente será suficiente para inducir una vigorosa respuesta inmunitaria en un sujeto.

[0057] Una forma alternativa de manipular patógenos atenuados implica la introducción de una mutación, que incluye, pero no se limita a, una inserción, deleción o sustitución de uno o más restos de aminoácidos y/o epítopes en una o más de las proteínas de patógeno. Esto puede realizarse fácilmente manipulando la mutación apropiada en la secuencia de genes correspondiente del patógeno. Cualquier cambio que altere la actividad de la proteína de patógeno de manera que se modifique o reduzca la replicación está englobado por la presente descripción.

[0058] Por ejemplo, en el contexto de virus atenuados, pueden manipularse mutaciones que interfieren con, pero no suprimen completamente la unión viral a receptores de célula huésped y la infección resultante, en antígenos de la superficie viral o proteasas virales implicadas en el procesamiento para producir una cepa atenuada. Pueden modificarse los antígenos de la superficie viral o factores de virulencia para contener inserciones, sustitución o deleciones de uno o más aminoácidos o epítopes que interfieren con o reducen la afinidad de unión del antígeno viral por los receptores de célula huésped. Este enfoque ofrece una ventaja añadida porque puede producirse un virus quimérico, que expresa un epítipo extraño o heterólogo, que también demuestra características atenuadas. Tales virus son candidatos ideales para su uso como vacunas recombinantes vivas.

[0059] Mutaciones manipuladas en cualquiera de las enzimas virales incluyen, pero no se limitan a, inserciones, deleciones y sustituciones en la secuencia de aminoácidos del sitio activo de la enzima. A modo de ejemplo, el sitio de unión de una enzima podría alterarse de forma que su afinidad de unión por su sustrato se redujera, y como resultado, la enzima fuera menos específica y/o eficiente. Por ejemplo, una diana de elección es el complejo de polimerasa viral, ya que existen mutaciones sensibles a la temperatura en todas las proteínas polimerasa. Por tanto, pueden manipularse cambios introducidos en las posiciones de aminoácidos asociadas a tal sensibilidad a la temperatura en el gen de polimerasa viral de manera que se produzca una cepa viral atenuada.

[0060] El CDV es un virus de ARN monocatenario envuelto de aproximadamente 100-300 nm de diámetro y que pertenece al género Morbillivirus. El núcleo del virión de CDV contiene un péptido de nucleoproteína (NP) que está estrechamente asociado a ARN viral. Un segundo péptido de núcleo es una fosfoproteína (P). La envoltura de CDV contiene tres péptidos, proteína M (proteína de la matriz) y dos glucoproteínas. Las glucoproteínas son las glucoproteínas hemaglutinina (H) y una glucoproteína de fusión (F). La glucoproteína de fusión se degrada en subunidades más pequeñas, designadas F₁ y F₂. La proteína H es principalmente responsable de la adsorción viral a células diana y la glucoproteína de fusión es responsable de la fusión célula a célula. Hasta la fecha, todas las cepas

clínicas del virus del moquillo contenían estos polipéptidos virales comunes. La vía de infección para el perro es por gotitas de aerosol infecciosas, y la transmisión del virus se facilita por la tos, estornudos y el estrecho confinamiento en un entorno cerrado húmedo caliente. Estudios sugieren que la infección viral se produce primero en el epitelio respiratorio del tracto oronasal superior con posterior diseminación al parénquima pulmonar profundo (Gorham 5 "Canine Distemper", (1960) Advance Veterinary Science, Brandley and Jungher Editors, 6: 288-315).

[0061] Los macrófagos y monocitos de tejido localizados en o a lo largo del epitelio respiratorio en las amígdalas parecen ser el primer tipo de célula en captar y replicar el CDV. El virus se disemina entonces en la circulación sanguínea a tejidos linforreticulares distantes. Esto se lleva a cabo por viremia y se produce en cualquier 10 parte de dos a cuatro días después de la infección inicial. Entre ocho y nueve días después de la infección, el virus se disemina más allá de los tejidos linforreticulares para implicar a tejidos epiteliales y mesenquimatosos (Appel, (1969) Am. J. Vet. Res. 30, 1167-1182). Es en esta etapa de infección viral que las respuestas inmunitarias de huésped específicas para antígenos virales influyen en el desenlace de la enfermedad. La forma mortal aguda de la enfermedad se caracteriza por diseminación viral no restringida a prácticamente cualquier tejido en el cuerpo. El virus 15 puede encontrarse en cada excreción y secreción en el sujeto infectado, y usando métodos de inmunofluorescencia o técnicas de trazado de antígenos, puede observarse la presencia de antígeno en prácticamente cualquier tipo de célula dentro del perro. Para la mayoría de estos animales, la causa más probable de muerte es la participación neurológica letal fulminante y/o encefalitis.

20 **[0062]** Algunos perros infectados con CDV presentan progresión clínicamente retrasada de la enfermedad y modestas respuestas inmunitarias convalecientes. Signos clínicos, si están presentes, son imperceptibles pronto en la enfermedad y son una reflexión de la persistencia viral dentro del sistema nervioso central (SNC). El posterior desarrollo con respecto a la enfermedad del SNC es variable. La mayoría de los perros infectados por CDV no presentan esencialmente signos clínicos abiertos de la enfermedad y son reconocidos como perros clínicamente 25 normales convalecientes. Se ha mostrado que perros activamente infectados que con el tiempo se recuperan de la infección por CDV demuestran anticuerpos antivirales circulantes libres en o aproximadamente el día después de la infección seis o siete (Krakowka, et al., (1975) J. Infect. Dis. 132, 384-392). Los títulos aumentan rápidamente a altos niveles en la convalecencia temprana.

30 **[0063]** Perros afectados agudamente con CDV muestran grados variables de depresión, anorexia y fiebre. La piel puede estar variablemente deshidratada, ponerse áspera por sequedad y ser inelástica. Una proporción de estos animales muestra fobia y evidencia de descarga ocular-nasal mucopurulenta. La diarrea intermitente es un signo clínico común. Durante esta fase virémica aguda de la enfermedad, el virus se libera en cada secreción y excreción. A medida que progresa la enfermedad, puede desarrollarse neumonía, frecuentemente debida a invasores bacterianos 35 secundarios. Los perros en esta de enfermedad son de moderadamente a gravemente linfopénicos, dependiendo del grado o cantidad de infección secundaria. Aunque los perros agudamente afectados pueden mostrar prácticamente cualquier combinación de signos neurológicos, en su presentación más común, un perro presenta convulsiones de pequeño mal o de gran mal. Estos episodios convulsivos se producen con el tiempo y con frecuencia creciente.

40 **[0064]** La segunda forma neurológica del moquillo canino es la que se produce con encefalitis del perro viejo (ODE), o se produce después de infección sub-clínica y aparente recuperación. Los signos del SNC pueden ser de presentación extremadamente variada y pueden ser confundidos con tumor cerebral, traumatismo craneoencefálico, meningitis bacteriana, hidrocéfalo y discopatía de la médula espinal. Una manifestación no neural importante de la infección por CDV en perros es la inmunosupresión asociada a CDV (Krakowka, et al., (1980) Am. J. Vet. Res. 41, 45 284-292). Muchos de los signos de la infección por el virus del moquillo canino son atribuibles a procesos infecciosos secundarios coincidentes que se producen en este animal debilitado.

[0065] La enfermedad en perros también puede asociarse a patógenos bacterianos, tales como especies bacterianas neumónicas que incluyen, pero no se limitan a, *Bordetella bronchiseptica*, especies de *Pasteurella*, 50 *Staphylococcus* y especies de *Streptococcus*. Estas bacterias son responsables de la conjuntivitis purulenta, rinitis y bronconeumonía indicada clínicamente en perros infectados por CDV. También son comunes infecciones virales mixtas, principalmente del tipo respiratorio. Además de la infección por adenovirus canino II, reovirus, virus paragripal canino, y supuestamente otros virus tales como el virus del herpes canino, pueden todos estar implicados en infecciones mixtas duales o múltiples.

55 **[0066]** cPi2 es un virus de ARN que induce una enfermedad respiratoria que es una de las enfermedades virales más comúnmente encontradas en el perro. Cuando la combinación de virus paragripal, adenovirus canino-2 y las bacterias *Bordetella bronchiseptica* se producen juntas, resulta la "tos de las perreras". cPi2 también produce traqueobronquitis que, en algunos animales, produce neumonía exudativa. Los signos de la tos se desarrollan 7 a 9

días después de la exposición al virus. Los signos clínicos son leves y de corta duración, a menos que se produzcan infecciones secundarias.

[0067] cPi2 es un virus envuelto esférico con un diámetro promedio de 150-200 nm, con una nucleocápside helicoidal rodeada por una bicapa de lípido cubierta con espículas de glucoproteína. Cada partícula de virus contiene un genoma de ARN monocatenario, no segmentado, de sentido negativo, con nucleoproteína (NP) y fosfoproteína (P) y las proteínas grandes (L). La infección por cPi2 se adquiere mediante la inhalación de núcleos de gotitas respiratorias infectadas. La nariz y la nasofaringe son los sitios de infección primarios. El virus inicia la infección principalmente uniéndose a las células epiteliales ciliadas de estas áreas mediante proteínas de hemaglutinina-neuraminidasa, que se combinan específicamente con receptores de ácido neuramínico en las células huésped. Posteriormente, los virus entran en la célula mediante fusión con la membrana celular mediada por receptores de F1 y F2. Los virus se multiplican e invaden otras células tanto intracelularmente como extracelularmente. La multiplicación de virus se produce mediante los tejidos traqueobronquiales, causando la potenciada producción de moco.

[0068] La laringotraqueítis es una inflamación de la laringe y la tráquea que, cuando se produce en perros, se conoce comúnmente como la "tos de las perreras". El principal síntoma es la tos manifestada por una corta "tosecilla" seca o por una serie de tales toses. En su punto más grave, la tos puede ser paroxística, y la infección implica a las vías respiratorias enteras, produciendo frecuentemente neumonía. La tos también se caracteriza por ser profunda, persistente, no productiva, y generalmente va acompañada de ojos llorosos y rinorrea. La temperatura puede ser normal, aunque es generalmente elevada. La aparición de la enfermedad puede ser repentina y puede producirse sin signos preliminares. Como la enfermedad es muy contagiosa, los perros infectados deben aislarse para prevenir la infección de poblaciones completas. La enfermedad produce pérdidas económicas importantes a los propietarios de perreras y, aunque normalmente no es mortal, puede debilitar tanto a los perros que produzca graves efectos de otras enfermedades.

[0069] Los virus cPi2 vivos y otros virus, tales como CDV, adenovirus canino tipo 2 (CAV2) y parvovirus canino (CPV) pueden propagarse en cultivos de tejido animal hasta que ambos virus se conviertan en patógenos, es decir, los virus se vuelvan inactivos o se atenúen de otro modo. El virus cPi2 es capaz de propagación en una amplia variedad de sistemas de cultivo de tejido, tales como, por ejemplo, embrión de pollito, embrión de pato, riñón porcino, testículos porcinos, riñón bovino embrionario, riñón felino, riñón canino y riñón de mono; y también en líneas celulares establecidas, tales como, por ejemplo, riñón bovino de Madin Darby (MDBK), riñón canino de Madin Darby (MDCK) y cornea de conejo del Serum Institute (SIRC).

[0070] Para la propagación de, por ejemplo, adenovirus canino tipo 2 (CAV2), se prefieren cultivos de tejido de riñón, particularmente aquellos derivados de bovinos y caninos, ya que el CAV2 no se reproduce favorablemente en otros sistemas de cultivo de tejido animal como lo hace el virus cPi2. La atenuación de cada virus puede llevarse a cabo por pases en serie estándar, que incluyen técnicas de pases de dilución terminal, en las que puede emplearse un número suficiente de pases en un cultivo de tejido susceptible hasta que el virus se vuelva no patógeno sin pérdida de inmunogenicidad. Un inmunogén, composición inmunogénica, o suspensión inmunogénica o disolución preparada a partir del mismo, puede estimular una respuesta inmunitaria en perros susceptible a enfermedad sin producir los síntomas clínicos normalmente debidos al agente virulento a cualquier grado significativo. La propagación puede realizarse en los mismos tejidos o diferentes que aquellos descritos anteriormente.

[0071] Los intervalos de tiempo de pases deben permitir suficientemente que el virus se duplique entre pases, y las temperaturas de incubación se mantienen preferentemente de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 38 °C. El intervalo de tiempo de pases óptimo depende del sistema de cultivo particular y la temperatura que se emplea. En cualquier caso, tanto si se ha producido como si no suficiente replicación del virus, puede determinarse fácilmente por técnicas convencionales tales como la técnica de hemoadsorción descrita en Shelokov, A. (1958) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97, 802; que es particularmente útil para el virus cPi2, o por observaciones citopáticas, tales como permitiendo que el virus crezca durante un pase particular antes del punto donde puede observarse un efecto citopático macroscópico mientras continúa la incubación.

[0072] Un método de propagación ventajosa utiliza células de riñón canino, particularmente líneas celulares continuas de MDCK. Por ejemplo, para fines inmunogénicos o de vacuna, pueden hacerse aproximadamente al menos 15 y preferentemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 45 pases de aislamiento a través de cultivos de tejido de riñón de perro de los virus a intervalos de aproximadamente tres días y a temperaturas de incubación de aproximadamente 30 a aproximadamente 38 °C. Se prefiere usar el material de pase más alto, ya que éste beneficiará la producción de respuestas inmunitarias favorables en sujetos en necesidad de las mismas.

[0073] En la preparación de las composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna, puede cultivarse

CDV virulento en células de mamífero cultivadas en condiciones de crecimiento de virus convencionales. Las células huésped pueden sembrarse con virus en el momento de la siembra de las células, o con un cambio de medio que contiene CDV cuando la monocapa de células es el 90-100 % confluyente. La relación de multiplicidad de infección (MOI) puede ser de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,05, preferentemente aproximadamente 0,01.

5 Puede usarse cualquier medio de crecimiento celular de mamífero apropiado, tal como, pero no se limita a, medio esencial mínimo de Eagle, medio Eagle modificado por Dulbecco, medio Dulbecco modificado con Iscove, medio Ham's F12, medio F15, medio RPMI 1640, que contiene suero de animal, tal como suero de ternero fetal, suero de ternero, suero de caballo, suero canino y similares, a de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 10 %, suplementos tales como L-glutamina y otros aminoácidos tanto esenciales como no esenciales, solución salina equilibrada con Hanks (HBSS), solución saliva de Earle, piruvato de sodio, bicarbonato sódico, insulina, transferrina y antibióticos y agentes antimicóticos, tales como, pero no se limitan a, gentamicina, penicilina, estreptomina, polimixina B, anfotericina y FUNGIZONE®, para producir el virus o los virus. También están comprendidos por la presente descripción medios de cultivo celular libres de suero.

15 **[0074]** Los cultivos celulares infectados se mantuvieron en un intervalo de temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 40 °C durante de aproximadamente 2 a aproximadamente 7 días después de la siembra, momento en el que virus puede recogerse. Los cultivos infectados pueden inocularse con medio de crecimiento celular, que puede recogerse después de un periodo de incubación adicional de 2 a 5 días. Los fluidos de virus se recogen en recipientes estériles y pueden ser clarificados por filtración. Los fluidos de virus pueden concentrarse
20 adicionalmente usando tecnología de ultrafiltración convencional (por ejemplo, sistemas de Millipore Pellicon) con filtros que tienen límites de exclusión de tamaño de partícula de 10⁵ Daltons.

[0075] Otros virus atenuados vivos que pueden mezclarse con los estabilizadores de la presente descripción incluyen, sin limitación, virus de la rabia, virus de la gripe, virus paragripales, virus de las paperas, adenovirus tales
25 como adenovirus canino tipo 2 (CAV2), virus respiratorio sincitial, virus de Epstein-barr, rinovirus, virus de la viruela tales como virus de la variolovacuna, viruela porcina, viruela del mapache, avipoxvirus tales como viruela aviar, viruela del canario, viruela de las palomas mensajeras, viruela de las palomas, virus de la poliomiéltis, virus de Coxsackie, ecovirus, coronavirus, virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de la varicela zóster, virus del herpes (humano y animal), virus del herpes simple, parvovirus tales como parvovirus canino (CPV), citomegalovirus, virus de la hepatitis
30 tales como virus de la hepatitis contagiosa canina, virus del papiloma humano, alfavirus tales como virus del bosque de Semliki, virus de Sindbis, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de O'nyong-nyong, flavivirus tales como virus de la fiebre del dengue y virus del Nilo occidental, bunyavirus, adenovirus, rotavirus, hepadnavirus tales como ortohepadnavirus y avihepadnavirus, filovirus, retrovirus tales como retrovirus endógeno porcino, HTLV-1, HTLV-2, FeLV, BLV, MLV,
35 MMSV, virus del mono Mason-Pfizer, lentivirus tales como HIV-1, HTV-2, FIV, SIV, BIV, calcivirus felino, virus de la panleucopenia felina, virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de la rinotraqueítis felina, virus de TGE (cerdo) y virus de la enfermedad de pies y boca.

[0076] Las composiciones inmunogénicas o suspensiones o disoluciones que comprenden, por ejemplo,
40 paramixovirus caninos, se mezclan con estabilizadores y se vitrifican usando métodos según la presente divulgación. Un volumen de la suspensión o disolución de paramixovirus canino puede mezclarse con un volumen del estabilizador.

[0077] Preparaciones adecuadas que pueden ser vitrificadas usando los métodos desvelados incluyen una
45 suspensión inmunogénica o disolución de paramixovirus canino y al menos un componente inmunogénico activo que se origina o deriva de un patógeno distinto de paramixovirus. El componente inmunogénico activo como se define en el presente documento puede comprender patógenos atenuados vivos, tales como virus atenuados vivos, bacterias, hongos o parásitos. Sin embargo, un componente inmunogénico activo también puede comprender virus muertos, inmunógenos heterólogos recombinantes, antígenos, subunidades inmunogénicas (por ejemplo, proteínas,
50 polipéptidos, péptidos, epítopes, haptenos) o epítopes de inmunógenos o antígenos derivados de o que se originan de uno o más patógenos descritos en el presente documento, que pueden expresarse a partir de vectores virales, vectores bacterianos, vectores plasmídicos, y similares.

[0078] El componente inmunogénico activo de la presente descripción puede comprender uno o más
55 inmunógenos seleccionados de un patógeno canino que incluye, pero no se limita a, virus de la rabia, adenovirus canino 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, que incluyen combinaciones de los mismos.

[0079] El componente inmunogénico activo puede incluir los genes HA, F, NP del CDV, el gen de la cápside de

CPV, los genes de espícula, M, N de coronavirus canino, los genes HN y F de 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 inmunogénicas o composiciones de vacuna para proteger caninos contra la enfermedad producida por estos patógenos.

5

[0080] El adenovirus canino tipo 2 (CAV2) está extendido y es altamente contagioso para los perros. Produce síntomas que se parecen al resfriado. Generalmente, los primeros signos de la enfermedad contagiosa son fiebre, que normalmente disminuye en uno a dos días. Los perros afectados pueden tener amigdalitis, dolor abdominal con la palpación, hígado agrandado, vómitos y diarrea. La enfermedad aguda normalmente es mortal. El CAV2 puede inactivarse o atenuarse y combinarse con el CDV (y/o cPi2) para producir una vacuna multivalente. Alternativamente, pueden usarse inmunógenos o antígenos de CAV2, o epítopes de inmunógenos de CAV2, tales como proteínas de la cápside, matriz, o de hexón.

10

[0081] El parvovirus canino (CPV) es un virus intestinal común que puede producir vómitos, diarrea, gastroenteritis, miocarditis y hepatitis en perros jóvenes. Se ha encontrado que está extendido en perros. El CPV puede estar presente en las composiciones inmunogénicas, suspensiones, o disoluciones de la descripción como inactivados, atenuados vivos, o inmunógenos de CPV, antígenos, o epítopes de inmunógenos de CPV, tales como los productos génicos de VP1, VP2 (cápside).

15

[0082] Dos infecciones bacterianas comunes de perros también pueden combinarse en su forma atenuada en las composiciones inmunogénicas estabilizadas, suspensiones o disoluciones de la presente descripción; estos son *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Las infecciones por leptosomas son comunes en perros y especialmente en perros infectados por CDV, cPi2, o combinaciones de virus como se observa frecuentemente en perros que padecen moquillo o tos de las perreras, y así, sus inclusiones en las composiciones inmunogénicas estabilizadas, suspensiones, o disoluciones de la presente descripción son de utilidad significativa.

20

[0083] Otro componente inmunogénico activo útil en las composiciones y métodos de la presente descripción puede comprender uno o más inmunógenos seleccionados de patógenos aviares que incluyen, pero no se limitan a, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus del síndrome de caída del huevo (EDS), virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV), virus del pavo, virus de la gripe aviar, virus de la enfermedad de Marek, virus del herpes tales como virus de la laringotraqueítis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa aviar, reovirus aviar, virus de la viruela que incluye avipox, viruela aviar, viruela del canario, viruela de la paloma, viruela de la perdiz y viruela de la paloma mensajera, virus del polioma aviar, neumovirus aviar, virus de la rinotraqueítis aviar, virus de la reticuloendoteliosis aviar, retrovirus aviares, 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 musculoesquelético aviar, virus de la mieloblastosis aviar, virus asociado a la mieloblastosis aviar, virus de la mielocitomatosis aviar, virus del sarcoma aviar, virus de la necrosis del bazo aviar y combinaciones de los mismos.

30

[0084] En cuanto a inmunógenos específicos, los componentes inmunogénicos activos también puede ser los genes HN y F del virus de la enfermedad de Newcastle, la poliproteína y genes de VP2 del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, 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 pueden usarse como las composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna para proteger aviares contra la enfermedad producida por estos patógenos.

35

[0085] Alternativamente, el componente inmunogénico activo comprende uno o más inmunógenos de un patógeno felino tal como, pero no se limita a, virus del herpes felino (FHV), calicivirus felino (FCV), virus de la leucemia 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 los mismos.

40

[0086] El componente inmunogénico activo también puede incluir los genes gB, gC y gD del virus del herpes felino, los genes env y gag/pro de FeLV, los genes env, gag/pol y tat del virus FIV, el gen de la cápside del calicivirus felino, el gen modificado S, el gen 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 gatos contra la enfermedad producida por estos patógenos.

45

[0087] El componente inmunogénico activo puede comprender uno o más inmunógenos de un patógeno equino, tal como el virus del herpes equino (tipo 1 o tipo 4), virus de la gripe equina, virus de la encefalomielitis equina (EEV),

tétanos, virus del Nilo occidental, y similares o combinaciones de los mismos.

[0088] El componente inmunogénico activo también puede incluir, los genes gB, gC, gD e inmediatos-tempranos del virus del herpes equino tipo 1, genes gB, gC, gD e inmediatos-tempranos del virus del herpes equino tipo 4, los genes HA, NA, M y NP del virus de la gripe equina, genes del virus de la encefalitis equina oriental, genes del virus de la encefalitis equina occidental, genes del virus de la encefalitis equina venezolana, los genes prM-M-E del virus del Nilo occidental, y los genes del virus de la arteritis equina, pero no se limitan a estas secuencias. Estos componentes pueden ser útiles como composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna para proteger caballos contra la enfermedad producida por estos patógenos.

[0089] El componente inmunogénico activo puede comprender uno o más inmunógenos de un patógeno bovino, tal como virus de la rabia, rotavirus bovino, virus paragripal bovino tipo 3 (bCPI2-3), coronavirus bovino, virus de la diarrea viral bovina (BVDV), virus de la enfermedad de pies y boca (FMDV), virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa (IBR), *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, y similares, y combinaciones de los mismos.

[0090] El componente inmunogénico activo también puede seleccionarse de los genes gB, gC, gD e inmediatos-tempranos del virus del herpes bovino tipo 1, los genes F y G de BRSV, la poliproteína, genes E1, E2 de BVDV, los genes HN y F del virus PI3 o genes de rotavirus. Estos componentes pueden ser útiles como composiciones inmunogénicas o de vacuna para proteger ganado vacuno contra la enfermedad producida por estos patógenos.

[0091] Además, el componente inmunogénico activo puede comprender uno o más inmunógenos de un patógeno porcino tal como, pero no se limitan a, virus de la gripe porcina (SIV), circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRSV), virus de la pseudorabia (PRV), parvovirus porcino (PPV), virus del cólera porcino (HCV), FMDV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, y similares, y combinaciones de los mismos.

[0092] El componente inmunogénico activo también puede incluir los genes gB, gC, gD e inmediatos-tempranos de PRV, los genes HA, NA, M y NP del virus de la gripe porcina, la poliproteína, E1, E2 del virus del cólera porcino, los genes ORF1 y ORF2 del virus PCV2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 u ORF7 del virus PRRSV o genes de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Estos componentes pueden ser útiles como composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna para proteger cerdos contra la enfermedad producida por estos patógenos.

[0093] El componente inmunogénico activo puede comprender secuencias que codifican una proteína expresada en patógenos tales como virus de ARN o ADN como HIV, HCV, HBV, HPV, EBV, HSV, CMV, HTLV, hantavirus, virus del Ébola, virus de Marburgo, virus de la fiebre del valle del Rift, virus de Lassa y virus de la gripe, virus de enteritidis hemorrágica (HEV), virus de la rinotraqueítis infecciosa (IBRV), entre otros. Tales inmunógenos pueden usarse ventajosamente como composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna para proteger sujetos, tales como seres humanos, contra la enfermedad producida por estos patógenos.

[0094] El componente inmunogénico activo también puede ser, por ejemplo, de una cualquiera de las siguientes bacterias patógenas y sus antígenos: especies de *Actinobacillus* tales como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella avium*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, especies de *Klebsiella* tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium pneumoniae*, *Streptococcus* del grupo A, *Streptococcus equi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Neisseria gonorrhoea*, especies de *Erysipelothrix*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, especies de *Salmonella*, *Salmonella agona*, *Salmonella blockley*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella radar*, *Salmonella Heidelberg*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella senftenberg*, *Salmonella cholerasuis*, especies de *Rickettsia*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, especies de *Shigella*, especies de *Listeria*, *Legionella pneumoniae*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Borrelia*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria meningitidis*, especies de *Clostridium*, *Clostridium difficile*, *Ureaplasma urealyticum*, especies de *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pasteurella pestis*, especies de *Campylobacter*, *Campylobacter jejuni*, especies de *Treponema*, especies de *Leptospir*, *Corynebacterium diphtheria*, *Hemophilus ducreyi*, *Hemophilus influenzae*, especies de *Erllichia*, entre otras.

[0095] El componente inmunogénico activo también puede derivarse de un hongo o moho tal como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, especies de *Penicillium*, especies de *Fusarium*, especies de *Candida* tales como *Candida trichophyton*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*, especies de *Rhizopus*,

especies de *Cryptococcus* tales como *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus grubii*, *Cryptococcus gattii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, y otros hongos y mohos.

[0096] El componente inmunogénico activo también puede seleccionarse de antígenos parasíticos derivados de especies parasíticas que incluyen, pero no se limitan a, especies de *Plasmodium*, especies de *Trypanosome*, especies de *Giardia*, especies de *Boophilus*, especies de *Babesia*, especies de *Entamoeba*, especies de *Eimeria*, especies de *Leishmania*, especies de *Schistosoma*, especies de *Brugia*, especies de *Fasciola*, especies de *Dirofilaria*, especies de *Wuchereria*, especies de *Onchocerca*, especies de *Treponema*, especies de *Toxoplasma*, especies de *Cryptococcus*, especies de *Coccidia*, especies de *Histomoniasis*, especies de *Hexamitiasis*, especies de *Giardia*, entre otros; nematodos que incluyen especies de *Ascaris*, especies de *Trichinella*, y similares, helmintos tales como trematodos, tenias, entre otros; y otros organismos patógenos similares. Métodos de preparación de inmunógenos derivados de virus, bacterias, hongos, mohos, protozoos, nematodos y helmintos se conocen en la técnica.

[0097] Otros inmunógenos útiles pueden ser, por ejemplo, factores de virulencia de antígeno secretados purificados, tales como toxinas, citotoxinas, y similares. Antígenos de toxina que se desintoxican por modificación (toxoides), que pueden administrarse en combinación con un adyuvante tal como hidróxido de aluminio, y pueden usarse para estimular la formación de anticuerpos neutralizantes de toxina. Ejemplos de toxinas que pueden usarse como inmunogén incluyen endotoxinas y exotoxinas bacterianas tales como lipopolisacárido, enterotoxinas que incluyen enterotoxinas lábiles al calor (LT), enterotoxinas estables al calor (ST), verotoxina (VT), y similares. Inmunógenos de exotoxina bacteriana son secretados en el medio circundante, e incluyen, por ejemplo, toxina diftérica (*Corynebacterium diphtheria*), toxina del tétanos (*Clostridium tetani*), enterotoxinas secretadas por *Staphylococcus aureus*, toxinas botulínicas (*Clostridium botulinum*); y toxinas producidas por algas tales como neurotoxinas; y similares. Las endotoxinas estables al calor, liberadas por autólisis de las bacterias incluyen, por ejemplo, toxinas del cólera liberadas de *Vibrio cholerae* Gram-negativas, colicinas producidas por bacterias intestinales tales como *E. coli* (bacteriocina).

[0098] Inmunógenos derivados de, o que se originan de virus, bacterias, hongos y similares, pueden producirse por métodos de cultivo *in vitro* usando medio de cultivo apropiado o líneas de células huésped y métodos convencionales muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Por ejemplo, puede cultivarse PRRSV en una línea celular apropiada, tal como la línea celular MA-104 (véanse las patentes de EE.UU. N.º 5.587.164; 5.866.401; 5.840.563; 6.251.404, entre otras). En un modo similar, puede cultivarse PCV-2 usando la línea de células PK-15 (véase la patente de EE.UU. N.º 6.391.314); SIV puede cultivarse en huevos (patente de EE.UU. N.º 6.048.537); y *Mycoplasma hyopneumoniae* puede cultivarse en un medio de cultivo apropiado (patentes de EE.UU. N.º 5.968.525; 5.338.543; Ross R. F. et al., (1984) Am. J. Vet. Res. 45: 1899-1905). Ventajosamente, puede cultivarse CDV en células de pulmón de visón, tales como aquellas descritas en la patente de EE.UU. N.º 5.178.862. Otras técnicas para la preparación de inmunógenos derivados de virus se conocen en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Ulmer et al., Science 259: 1745 (1993); Male et al., Advanced Immunology, páginas 14.1-14.15, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa. (1989).

[0099] También son útiles péptidos sintéticos inmunogénicos que imitan secuencias de péptidos antigénicas. Tales inmunógenos pueden sintetizarse usando una técnica en fase sólida como se describe, por ejemplo, en R. B. Merrifield, Science 85:2149-2154 (1963), purificarse, y opcionalmente acoplarse a una proteína transportadora tal como muramildipéptido (MDP), albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), y similares, usando un agente de acoplamiento bifuncional tal como glutaraldehído, y similares.

[0100] También están incluidos antígenos sintéticos dentro de la definición, por ejemplo, poliepítopes, epítopes flanqueantes, y otros antígenos recombinantes o sintéticamente derivados. Véanse, por ejemplo, Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23, 2777-2781; Bergmann et al. (1996) J. Immunol. 157, 3242-3249; Suhrbier, A. (1997) Immunol. Cell Biol. 75, 402-408; Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, 28 de junio-3 de julio de 1998. Fragmentos inmunogénicos, para los fines de la presente descripción, pueden normalmente incluir al menos aproximadamente 3 aminoácidos, preferentemente al menos aproximadamente 5 aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 10-15 aminoácidos, y lo más preferentemente 25 o más aminoácidos, de la molécula. No hay límite superior crítico a la longitud del fragmento, que podría comprender casi la secuencia de proteínas de longitud completa, o incluso una proteína de fusión que comprende dos o más, o al menos un epítope de la proteína.

[0101] Por consiguiente, una estructura mínima de un ácido nucleico que expresa un epítope puede comprender nucleótidos para codificar un epítope, inmunogén o antígeno de una proteína o poliproteína. Un ácido nucleico que codifica un fragmento de la proteína total o poliproteína, más ventajosamente, comprende o consiste

esencialmente en o consiste en un mínimo de aproximadamente 21 nucleótidos, ventajosamente al menos aproximadamente 42 nucleótidos, y preferentemente al menos aproximadamente 57, aproximadamente 87 o aproximadamente 150 nucleótidos consecutivos o contiguos de la secuencia que codifica la proteína total o poliproteína. Procedimientos de determinación de epítopes, tales como generación de bibliotecas de péptidos solapantes (Hemmer B. et al., (1998) *Immunology Today* 19(4), 163-168), Pepscan (Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3998-4002; Geysen et al., (1985) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82, 178-182; Van der Zee R. et al., (1989) *Eur. J. Immunol.* 19, 43-47; Geysen H.M., (1990) *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 21, 523-533; kits de síntesis de péptidos Multipin® de Chiron) y algoritmos (De Groot A. et al., (1999) *Nat. Biotechnol.* 17, 533-561), y en la solicitud PCT N.º de serie PCT/US2004/022605; todos los cuales pueden usarse en la práctica de la descripción, sin excesiva experimentación. Otros documentos citados en el presente documento también puede ser consultados para métodos de determinación de epítopes de un inmunógeno o antígeno y así moléculas de ácidos nucleicos que codifican tales epítopes.

[0102] En la presente descripción, el componente inmunogénico activo también puede comprender un agente terapéutico, una citocina, una toxina, un inmunomodulador, una proteína, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, un adyuvante, o cualquier otra molécula codificable por ADN y deseada para la administración a un animal o célula o tejido de animal.

[0103] También se contemplan por la presente descripción la inclusión de especies de ARN antisentido, catalítico, o interferente pequeño, en las composiciones inmunogénicas y composiciones de vacuna de la presente descripción, que pueden ser dirigidas contra cualquier molécula presente dentro de la célula receptora o probablemente estar presentes dentro de la célula receptora. Éstas incluyen, pero no se limitan a, especies de ARN que codifican moléculas reguladoras de células, tales como interleucina-6, agentes causantes de cáncer tales como virus del papiloma humano, enzimas, ARN viral y ARN derivado de patógeno, tal como ARN de HIV-1. Los ARN también pueden ser dirigidos a secuencias de ADN no transcritas, tales como regiones promotoras o potenciadoras, o a cualquier otra molécula presente en células receptoras, tales como, pero no se limitan a, enzimas implicadas en la síntesis de ADN o moléculas de ARNt.

[0104] Además, pueden co-expresarse citocinas e inmunomoduladores en las composiciones inmunogénicas y composiciones de vacuna de la presente descripción. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, IL-2, IL-4, TNF- α , GM-CSF, IL-10, IL-12, IGF-1, IFN- α , IFN- β e IFN- γ .

[0105] Pueden insertarse motivos de secuencia específicos, tales como el motivo RGD, en el bucle H-I de un vector viral o plasmídico para potenciar su infectividad. Se ha mostrado que esta secuencia es esencial para la interacción de ciertas proteínas de matriz extracelular y de adhesión con una superfamilia de receptores de la superficie celular llamadas integrinas. La inserción del motivo RGD puede ser ventajosamente útil en sujetos inmunodeprimidos. Puede construirse un vector recombinante clonando antígeno específico o inmunógeno o fragmentos de los mismos en cualquiera de los vectores, tales como aquellos descritos en el presente documento. El vector recombinante puede usarse para transducir células de un vertebrado para su uso como un agente inmunizante (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 10/424.409).

[0106] Preferentemente, codones que codifican los componentes inmunogénicos activos, tales como antígenos, inmunógenos y epítopes, son codones "optimizados", es decir, los codones son aquellos que aparecen frecuentemente en, es decir, expresan altamente genes caninos, en lugar de aquellos codones que se usan frecuentemente por, por ejemplo, CDV o cPi2. Tal uso de codones proporciona expresión eficiente del componente inmunogénico activo en células. En otras realizaciones, por ejemplo, cuando el componente inmunogénico activo se expresa en bacterias, levadura u otro sistema de expresión, el patrón de uso de codones se altera para representar la preferencia codónica para genes altamente expresados en el organismo en que el antígeno o inmunógeno está siendo expresado. Se conocen patrones de uso de codones en la bibliografía para genes altamente expresados de muchas especies (por ejemplo, Nakamura et al., 1996; Wang et al, 1998; McEwan et al. 1998).

[0107] En algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia codificante de manera que pueda unirse a las secuencias de control con la orientación apropiada; es decir, para mantener el marco de lectura apropiado. También puede desearse producir mutantes o análogos de los componentes inmunogénicos activos deseados. Pueden prepararse mutantes o análogos por la delección de una porción de una secuencia que codifica una proteína, por inserción de una secuencia, y/o por sustitución de uno o más nucleótidos dentro de una secuencia. Técnicas para modificar las secuencias de nucleótidos, tales como mutagénesis dirigida al sitio, se describen en, por ejemplo, Sambrook et al., arriba; clonación de ADN, arriba; hibridación de ácidos nucleicos, arriba.

[0108] Inmunógenos útiles como componentes inmunogénicos activos según la presente descripción pueden

ser vectores contenidos. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de expresión recombinantes *in vivo* tales como un vector de ácido nucleico o un plásmido (solicitud EP N.º 1001025; Chaudhuri P, (2001) Res. Vet. Sci. 70, 255-6), vectores de virus tales como, pero no se limitan a, vectores de adenovirus, vectores de virus de la viruela tales como viruela aviar (patentes de EE.UU. N.º de serie 5.174.993; 5.05.941; y 5.766.599), vectores de la viruela de canario (patente de EE.UU. N.º de serie 5.756.103), vectores retrovirales, vectores del virus del herpes, vectores basados en alfavirus, vectores fúngicos, o vectores bacterianos (*Escherichia coli* o especie de *Salmonella*). Ejemplos específicos de vectores útiles en la descripción se describen en el presente documento.

10 **[0109]** El vector puede ser un vector viral, ventajosamente un vector de avipox que contiene al menos un componente inmunogénico activo, o un epítipo del mismo, o un fragmento del mismo. En una realización particularmente ventajosa, el vector de avipox es un vector de viruela aviar, ventajosamente, un vector de viruela de canario atenuado tal como ALVAC. Los virus de viruela de canario atenuados se describen en la patente de EE.UU. N.º 5.756.103 (ALVAC) y WO01/05934. El vector avipox puede ser un vector de la viruela aviar, ventajosamente un
15 vector de la viruela aviar atenuado tal como TROVAC. También se hace referencia a la patente de EE.UU. N.º 5.766.599 que se refiere a la cepa de la viruela aviar atenuada TROVAC. A este respecto, se hace referencia a la viruela de canario disponible de la ATCC con el número de acceso VR-111. También están disponibles numerosas cepas de inmunización del virus de la viruela aviar, por ejemplo la cepa DIFTOSEC CT comercializada por Merial y la vacuna NOBILIS VARIOL comercializada por Intervet; y, también se hace referencia a la patente de EE.UU. N.º
20 5.766.599 que se refiere a la cepa de la viruela aviar atenuada TROVAC.

[0110] Un vector viral también útil para administrar componentes inmunogénicos activos incluye un virus de la viruela, por ejemplo un virus de la variolovacuna o un virus de la variolovacuna atenuado (por ejemplo, MVA, una cepa Ankara modificada obtenida después de más de 570 pases de la cepa de la vacuna Ankara en fibroblastos de embrión de pollo; véase Stickl & Hochstein-Mintzel, (1971) Munch. Med. Wschr. 113, 1149-1153; Sutter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 10847-10851; disponible como ATCC VR-1508; o NYVAC, véase la patente de EE.UU. N.º 5.494.807, por ejemplo, Ejemplos 1 a 6 de la patente de EE.UU. N.º 5.494.807 que tratan la construcción de NYVAC, además de variaciones de NYVAC con ORF adicionales deletionados del genoma del virus de la variolovacuna de la cepa de Copenhague, además de la inserción de secuencias codificantes heterólogas de ácido nucleico en sitios de
30 este recombinante, y por tanto, el uso de promotores coincidentes; véase también el documento WO96/40241), un virus de avipox o un virus de avipox atenuado (por ejemplo, viruela del canario, viruela aviar, viruela de la paloma mensajera, viruela de la vaca, viruela de la paloma, viruela de la perdiz, ALVAC o TROVAC; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.505.941, 5.494.807), viruela porcina, viruela del mapache, viruela del camello, o virus de la mixomatosis.

35 **[0111]** Para información sobre el método de generación de recombinantes de los mismos y cómo administrar recombinantes de los mismos, el experto puede referirse a los documentos citados en el presente documento y al documento WO90/12882, por ejemplo, en cuanto al virus de la variolovacuna se hace mención de las patentes de EE.UU. N.º 4.769.330, 4.722.848, 4.603.112, 5.110.587, 5.494.807 y 5.762.938, entre otros; en cuanto a la viruela aviar se hace mención de las patentes de EE.UU. N.º 5.174.993, 5.505.941 y US-5.766.599, entre otras; en cuanto a la viruela del canario se hace mención de la patente de EE.UU. N.º 5.756.103, entre otras; en cuanto a la viruela porcina se hace mención de la patente de EE.UU. N.º 5.382.425, entre otros; y, en cuanto a la viruela del mapache se hace mención del documento WO00/03030, entre otros.

45 **[0112]** Cuando el vector de expresión es un virus de la variolovacuna, el sitio de inserción o sitios para el ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican componentes inmunogénicos activos tales como inmunógenos, antígenos, epítopes y similares, que van a expresarse están ventajosamente en el gen de timidina cinasa (TK) o sitio de inserción, el gen de hemaglutinina (HA) o sitio de inserción, la región que codifica el cuerpo de inclusión del tipo A (ATI); véanse también los documentos citados en el presente documento, especialmente aquellos referentes al virus de la variolovacuna. En el caso de la viruela del canario, ventajosamente el sitio de inserción o sitios son ORF(s) C3, C5 y/o C6; véanse también los documentos citados en el presente documento, especialmente aquellos referentes al virus de la viruela del canario. En el caso de la viruela aviar, ventajosamente el sitio de inserción o sitios son ORF F7 y/o F8; véanse también los documentos citados en el presente documento, especialmente aquellos referentes al virus de la viruela aviar. El sitio de inserción o sitios para el virus de MVA son ventajosamente como en diversas
50 publicaciones, que incluyen Carroll M. W. et al. (1997) Vaccine 15(4), 387-394; Stittelaar K.J. et al. (2000) J. Virol., 2000, 74(9), 4236-4243; Sutter G. et al. (1994) Vaccine 12(11), 1032-1040; y, a este respecto también se indica que el genoma de MVA completo se describe en Antoine G., (1998) Virology 244, 365-396, que permite al experto usar otros sitios de inserción u otros promotores.

[0113] Ventajosamente, el ácido nucleico que va a expresarse puede insertarse bajo el control de un promotor

de virus de la viruela específico, por ejemplo, el promotor de la variolovacuna 7,5 kDa (Cochran et al., (1985) J. Virology 54, 30-35), el promotor de la variolovacuna I3L (Riviere et al., (1992) J. Virology 66, 3424-3434), el promotor de la variolovacuna HA (Shida, (1986) Virology 150, 451-457), el promotor de la variolovacuna 42K (Cooper J.A. et al, (1981) J. Virol. 37(1), 284-94), el promotor de la viruela de la vaca ATI (Funahashi et al (1988) J. Gen. Virol. 69, 35-47), el promotor de la variolovacuna 11K (patente de EE.UU. N.º 5.017.487); el promotor de la variolovacuna H6 (Taylor J. et al., (1988) Vaccine 6, 504-508; Guo P. et al. (1989) J. Virol. 63, 4189-4198; Perkus M. et al. (1989) J. Virol. 63, 3829-3836), o promotores sintéticos de la variolovacuna o poxvirales, entre otros.

[0114] Ventajosamente, para la inmunización de mamíferos, el vector de expresión puede ser un vector de viruela del canario o de viruela aviar. De esta forma, puede ser expresión de las proteínas heterólogas con replicación limitada o no productiva.

[0115] Otro vector viral útil para administrar y expresar componentes inmunogénicos activos es adenovirus. El adenovirus es un virus de ADN no envuelto. Los vectores derivados de adenovirus tienen varias características que los hacen particularmente útiles para transferencia génica. Un vector de adenovirus recombinante es un vector de adenovirus que lleva una o más secuencias de nucleótidos heterólogas (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más secuencias de nucleótidos heterólogas). Por ejemplo, la biología de los adenovirus se caracteriza 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 producirse en grandes cantidades con facilidad relativa, y el virus pueden convertirse en defectuoso en la replicación por deleciones en la región 1 temprana ("E1") del genoma viral.

[0116] A diferencia de, por ejemplo, los retrovirus, los adenovirus no se integran en el genoma de la célula huésped, son capaces de infectar células no divisoras y son capaces de transferir eficientemente genes recombinantes *in vivo* (Brody et al., 1994). Estas características hacen que los adenovirus sean candidatos atractivos para la transferencia génica *in vivo* de, por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo de interés en células, tejidos o sujetos en necesidad del mismo.

[0117] Se prefieren vectores de adenovirus que contienen múltiples deleciones para tanto aumentar la capacidad portadora del vector como reducir la verosimilitud de recombinación para generar adenovirus competentes en la replicación (RCA). Donde el adenovirus contiene múltiples deleciones, no es necesario que cada una de las deleciones, si están presentes solas, produzca un adenovirus defectuoso en la replicación. En tanto que una de las deleciones convierta el adenovirus en defectuoso en la replicación, las deleciones adicionales pueden incluirse para otros fines, por ejemplo, para aumentar la capacidad portadora del genoma del adenovirus para secuencias de nucleótidos heterólogas. Preferentemente, más de una de las deleciones previene la expresión de una proteína funcional y convierte el adenovirus en defectuoso en la replicación. Más preferentemente, todas las deleciones son deleciones que convertirían el adenovirus en defectuoso en la replicación.

[0118] Las realizaciones de la descripción que emplean recombinantes de adenovirus pueden incluir vectores de adenovirus defectuosos en E1 o delecionados, defectuosos en E3 o delecionados y/o defectuosos en E4 o delecionados, o el vector de adenovirus "destripado" en el que todos los genes virales están delecionados. Los vectores de adenovirus pueden comprender mutaciones en los genes E1, E3 o E4, o deleciones en estos o todos los genes adenovirales. La mutación de E1 eleva el margen de seguridad del vector debido a que se dice que mutantes de adenovirus defectuosos en E1 son defectuosos en la replicación en células no permisivas, y están, por lo menos, altamente atenuados. La mutación de E3 potencia la inmunogenicidad del antígeno alterando el mecanismo por el cual el adenovirus regula por disminución las moléculas de clase I de MHC. La mutación de E4 reduce la inmunogenicidad del vector de adenovirus suprimiendo la expresión génica tardía, puede así permitir la re-inmunización repetida utilizando el mismo vector. La presente descripción comprende vectores de adenovirus de cualquier serotipo o serogrupo que están delecionados o mutados en E1, E3, E4, E1 y E3, y E1 y E4.

[0119] Un vector de adenovirus "destripado" es el último modelo en la familia de los vectores de adenovirus y se deriva de secuencias de adenovirus humanas. Su replicación requiere un virus auxiliar y una línea celular 293 humana especial que expresa tanto E1a como Cre, a condición de que no exista en el entorno natural; el vector está privado de todos los genes virales, así el vector como vehículo de vacuna es no inmunogénico y puede inocularse múltiples veces para la reinmunización. El vector de adenovirus "destripado" también contiene espacio de 36 kb para acomodar ácido(s) nucleico(s) heterólogo(s) de interés, permitiendo así la co-administración de un gran número de antígeno o inmunógenos en células.

[0120] Así, el vector en la descripción puede ser cualquier virus recombinante adecuado o vector de virus, que

incluye, sin limitación, un virus de la viruela (por ejemplo, virus de la variolovacuna, virus de avipox, virus de la viruela del canario, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del mapache, virus de la viruela porcina, etc.), adenovirus (por ejemplo, adenovirus canino), virus del herpes, baculovirus, retrovirus; o el vector puede ser un plásmido. Los documentos citados en el presente documento, además

5 de proporcionar ejemplos de vectores útiles en la práctica de la descripción, también pueden proporcionar fuentes para otros componentes inmunogénicos activos que van a expresarse por vector o vectores en, o incluirse en, las composiciones inmunogénicas estabilizadas, suspensiones, o disoluciones de la descripción.

10 **[0121]** Elementos para la expresión de los componentes inmunogénicos activos pueden estar ventajosamente presentes en un vector plasmídico. El término plásmido cubre cualquier unidad de transcripción de ADN que comprende

un ácido nucleico según la descripción y los elementos necesarios para su expresión *in vivo* en una célula o células del huésped deseado o diana; y, a este respecto, se observa que un plásmido circular superenrollado o no superenrollado, además de una forma lineal, pretenden estar dentro del alcance de la descripción.

15 **[0122]** En una manera mínima, la expresión de un componente inmunogénico activo, tal como un antígeno, un inmunogén, y un epítoto, comprende un codón de iniciación (ATG), un codón de terminación y un promotor, y opcionalmente también una secuencia de poliadenilación para ciertos vectores tales como plásmido y ciertos vectores virales, por ejemplo, vectores virales distintos de poxvirus. Cuando el ácido nucleico codifica un fragmento de poliproteína en el vector, un ATG se pone en el extremo 5' del marco de lectura y se pone un codón de terminación en el extremo 3'. Pueden estar presentes otros elementos para controlar la expresión, tales como secuencias potenciadoras, secuencias estabilizadoras y secuencias señal que permiten la expresión, modificación y secreción de la proteína.

20

25 **[0123]** Una "secuencia codificante" de ácido nucleico o una "secuencia de nucleótidos que codifica" una proteína particular es una secuencia de ADN que se transcribe y se traduce en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se pone bajo el control de elementos reguladores apropiados. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de iniciación en el extremo 5' y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de eucariotas (por ejemplo, de mamífero) ADN, e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción normalmente se localizará 3' con respecto a la secuencia codificante.

30

[0124] "Elementos de control" de ácido nucleico se refieren conjuntamente a promotores, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de unión a ribosoma, señales de poliadenilación (por ejemplo, señales de poliadenilación derivadas de hormona de crecimiento bovina, señal de poliadenilación de SV40), secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en la dirección 5', potenciadores, orígenes de replicación (que pueden ser orígenes bacterianos, por ejemplo, derivados de vectores bacterianos tales como pBR322, u orígenes eucariotas, por ejemplo, secuencias que se replican autónomamente (ARS)), señales de encapsidación, secuencias conductoras que pueden o pueden no estar contenidas en la secuencia codificante de un componente inmunogénico activo, tal como un inmunogén, antígeno o epítoto. Si se incluye una secuencia señal, puede tanto ser la secuencia nativa, homóloga, como una secuencia heteróloga. Las secuencias conductoras pueden ser eliminadas por el huésped en procesamiento post-traducciona. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 4.431.739; 4.425.437; 4.338.397, y similares, que proporcionan conjuntamente la transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula huésped.

35

40

45 **[0125]** No todas de estas secuencias de control necesitan siempre estar presentes en un vector recombinante, mientras que el gen deseado sea capaz de ser transcrito y traducido. Un elemento de control, tal como un promotor, "dirige la transcripción" de una secuencia codificante en una célula cuando la ARN polimerasa se une al promotor y transcribe la secuencia codificante en ARN. El ARNm resultante se traduce posteriormente en el polipéptido codificado por la secuencia codificante.

50

[0126] Puede usarse una variedad de elementos promotores/potenciadores dependiendo del nivel y la expresión específica de tejido deseada. El promotor puede ser constitutivo o inducible (por ejemplo, el promotor de la metalotioneína, el promotor inducible de tetraciclina y el promotor inducible de ecdisona, entre otros), dependiendo del patrón de expresión deseado. El promotor puede ser nativo o heterólogo y puede ser una secuencia natural o una sintética. "Heterólogo", en este contexto, describe una región de iniciación de la transcripción que no se encuentra en el huésped no mutante en el que se introduce la región de iniciación de la transcripción. El promotor se elige de manera que funcione en la(s) célula(s) diana o tejido(s) de interés. Se contemplan promotores específicos de cerebro, específicos hepáticos y específicos de músculo (incluyendo específicos de esquelético, cardíaco, liso y/o de

55

diafragma) por la presente descripción. También se prefieren promotores de mamífero y aves, particularmente promotores caninos.

[0127] El promotor puede ser ventajosamente un promotor "temprano". Un promotor "temprano" se conoce en la técnica y se define como un promotor que conduce la expresión de un gen que es rápidamente y transitoriamente expresado en ausencia de síntesis de proteínas *de novo*. El promotor también puede ser un promotor "fuerte" o "débil". Los términos "promotor fuerte" y "promotor débil" se conocen en la técnica y pueden definirse por la frecuencia relativa de iniciación de la transcripción (veces por minuto) en el promotor. Un promotor "fuerte" o "débil" también puede definirse por su afinidad por ARN polimerasa.

[0128] El gen heterólogo puede ponerse bajo el control de un promotor, sitio de unión a ribosoma (para expresión bacteriana) y, opcionalmente, un potenciador u operador, de manera que la secuencia de ADN que codifica la proteína deseada se transcriba en ARN en una célula huésped o sujeto transformado por un vector que contiene el componente inmunogénico activo.

[0129] Pueden unirse elementos de control y otras secuencias reguladoras a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector, tales como los vectores de clonación descritos anteriormente. Alternativamente, la secuencia codificante puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado.

[0130] Más preferentemente, los antígenos o inmunógenos están operativamente asociados a, por ejemplo, un promotor inmediato-temprano mayor del citomegalovirus humano (CMV), un promotor del virus simio 40 (SV40), un promotor de β -actina, un promotor de albúmina, un promotor del factor de elongación 1- α (EF1- α), un promotor de PyK, un promotor de MFG, o un promotor del virus del sarcoma de Rous. Otras secuencias de control de la expresión incluyen promotores derivados de genes de inmunoglobina, adenovirus, virus del papiloma bovino, virus del herpes, etc. También puede usarse cualquier promotor viral de mamífero en la práctica de la descripción, además de cualquier promotor viral canino. Entre los promotores de origen viral canino, pueden usarse los promotores de genes inmediatos-tempranos del virus del herpes canino infeccioso, promotores tempranos (es decir, timidina cinasa, ADN helicasa, ribonucleótido reductasa) o tardíos, en los métodos y vectores de la presente descripción. Otros promotores incluyen el promotor E1 de adenovirus canino, además del promotor del complejo mayor de histocompatibilidad I canino. Además, está perfectamente dentro del alcance del experto seleccionar un promotor adecuado que exprese el antígeno o inmunógeno de interés a niveles suficientemente altos para inducir o provocar una respuesta inmunogénica al antígeno o inmunógeno, sin excesiva experimentación.

[0131] Se ha especulado que conducir la transcripción de nucleótidos heterólogos con el promotor del CMV puede producir la regulación por disminución de la expresión en animales inmunocompetentes (véase, por ejemplo, Guo et al., 1996). Por consiguiente, también se prefiere asociar operablemente las secuencias de antígeno o inmunógeno con, por ejemplo, un promotor del CMV modificado que no produce esta regulación por disminución de la expresión de antígeno o inmunógeno.

[0132] Los vectores de la descripción también pueden comprender un policonector o sitio de clonación múltiple ("MCS"), que puede localizarse ventajosamente en la dirección 3' de un promotor. El policonector proporciona un sitio para la inserción del antígeno o moléculas de inmunógeno que están "en marco" con la secuencia promotora, produciendo "unión operativa" de la secuencia promotora con el antígeno o inmunógeno de interés. Sitios de clonación múltiple y policonectores son muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

[0133] Los vectores descritos en el presente documento también pueden comprender genes de resistencia a antibióticos. Ejemplos de tales genes de resistencia a antibióticos que pueden incorporarse en los vectores de la descripción incluyen, pero no se limitan a, ampicilina, tetraciclina, neomicina, zeocina, kanamicina, bleomicina, higromicina, cloranfenicol, entre otros.

[0134] En realizaciones donde hay más de un antígeno o inmunógeno, las secuencias de antígeno o inmunógeno pueden estar operativamente asociadas a un único promotor en la dirección 5' y una o más secuencias de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) en la dirección 3' (por ejemplo, la secuencia IRES del picornavirus EMC). Una secuencia IRES permite la traducción multicistónica de dos o más secuencias codificantes a partir de una única secuencia de ARNm.

[0135] Los vectores de la descripción pueden entonces usarse para transformar una célula huésped apropiada o sujeto. Se conocen en la técnica varias líneas celulares de mamífero e incluyen líneas celulares inmortalizadas

disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), tales como, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), células de riñón canino Madin-Darby ("MDCK"), además de otras. Similarmente, huéspedes bacterianos tales como *E. coli*,
 5 *Bacillus subtilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Streptococcus* spp., encontrarán uso en la presente descripción. Huéspedes de levadura útiles en la presente descripción incluyen, entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Huéspedes de insecto útiles en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, células de *Spodoptera frugiperda*.

10

[0136] Alternativamente, los vectores pueden usarse para infectar una célula en cultivo para expresar un producto génico deseado, por ejemplo, para producir una proteína o péptido de interés. Preferentemente, la proteína o péptido es secretado en el medio y puede purificarse del mismo usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica. Secuencias de péptidos señal que dirigen la secreción extracelular de proteínas se conocen en la técnica y secuencias
 15 de nucleótidos que codifican las mismas pueden estar operativamente unidas a la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido o proteína de interés por técnicas rutinarias conocidas en la técnica. Alternativamente, las células pueden lisarse y la proteína recombinante expresada puede purificarse a partir del lisado celular. Preferentemente, la célula es una célula de vertebrado, más preferentemente una célula de mamífero.

[0137] Métodos de preparación y/o administración de un vector o recombinantes o plásmido para la expresión de productos génicos de genes de la descripción tanto *in vivo* como *in vitro* pueden ser cualquier método deseado, por ejemplo, un método que es por o análogo a los métodos desvelados en, o desvelados en los documentos citados en: las patentes de EE.UU. N.º 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;
 25 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; solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 920.197, presentada el 16 de octubre de 1986; documentos WO 90/01543; WO91/11525; WO 94/16716; WO 96/39491; WO 98/33510; EP 265785; EP 0 370 573; Andreansky et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11313-11318; Ballay et al. (1993) EMBO J. 4, 3861-65; Felgner et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 2550-2561; Frolov et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11371-11377; Graham, F.L. (1990) Trends Biotechnol. 8, 85-87; Grunhaus et al. (1992) Sem. Virol. 3, 237-52; Ju et al. (1998) Diabetologia 41, 736-739; Kitson et al. (1991) J. Virol. 65, 3068-3075; McClements et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11414-11420; Moss, B. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93,
 35 11341-11348; Paoletti, E. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11349-11353; Pennock et al. (1984) Mol. Cell. Biol. 4, 399-406; Richardson (Ed), (1995) Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols", Humana Press Inc.; Smith et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 3, 2156-2165; Robertson et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11334-11340; Robinson et al. (1997) Sem. Immunol. 9, 271; y Roizman, B. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11307-11312.

40

[0138] La expresión en el sujeto de la secuencia heteróloga puede producir una respuesta inmunitaria en el sujeto a los productos de expresión del antígeno o inmunogén. Así, los componentes inmunogénicos activos de la presente descripción pueden usarse en una composición inmunogénica o composición de vacuna para proporcionar un medio para inducir una respuesta inmunitaria, que puede, pero necesita ser, protectora. Las técnicas de biología
 45 molecular usadas en el contexto de la descripción se describen por Sambrook et al. (2001).

[0139] Incluso además alternativamente o adicionalmente, en las composiciones inmunogénicas o de vacuna englobadas por la presente descripción, la secuencia de nucleótidos que codifica los antígenos o inmunógenos puede tener delección de la misma una porción que codifica un dominio transmembranario. Aún incluso además
 50 alternativamente o adicionalmente, el vector o composición inmunogénica puede contener además y expresar en una célula huésped una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal de tPA heteróloga tal como una tPA de mamífero y/o un intrón estabilizante, tal como el intrón II del gen de β -globina de conejo.

[0140] Puede administrarse un vector a un sujeto en una cantidad para lograr las cantidades establecidas para las composiciones de producto génico (por ejemplo, epítipo, antígeno, terapéutico y/o anticuerpo). La descripción prevé dosificaciones por debajo y por encima de aquellas ejemplificadas en el presente documento, y para cualquier
 55 composición que va a administrarse a un sujeto, que incluye los componentes de la misma, y para cualquier método de administración particular, se prefiere determinar la toxicidad, tal como determinando la mediana de la dosis infectiva del cultivo celular (CCID₅₀), la dosis letal (LD) y la LD₅₀ en un sujeto adecuado; y la dosificación de la composición,

concentración de componentes en ella y el momento exacto de administrar la composición, que provocan una respuesta adecuada, tal como por valoraciones de sueros y análisis de los mismos, por ejemplo, por ELISA y/o análisis de seroneutralización. Tales determinaciones no requieren excesiva experimentación del conocimiento del experto, la presente divulgación y los documentos citados en el presente documento.

5

[0141] Composiciones inmunogénicas multivalentes y/o composiciones de vacuna y/o suspensiones o disoluciones inmunogénicas que comprenden CAV2 atenuados vivos, CDV atenuados vivos, cPi2 atenuados vivos, y CPV atenuados vivos, y que comprenden un estabilizador según la presente descripción, han sido probadas en los ejemplos en el presente documento. Estas vacunas multivalentes mostraron buena estabilidad para CDV, cPi2, CAV2 y CPV. Esto demuestra que los estabilizadores de la presente descripción son capaces de preservar la viabilidad e infectividad de CDV, cPi2, CAV2 y CPV. Esto también demuestra que los estabilizadores de la presente descripción son capaces de preservar la viabilidad e infectividad de una variedad de virus distintos de paramixovirus caninos, en particular de parvovirus caninos y adenovirus canino. Los estabilizadores según la presente descripción también pueden usarse como composición inmunogénica monovalente o composición de vacuna que comprende CAV, CPV, CDV o cPi2.

[0142] La etapa de enfriamiento (b) puede producirse a temperaturas inferiores a aproximadamente -40 °C (etapa de congelación de agua). El secado de las suspensiones inmunogénicas estabilizadas o disolución por sublimación de hielo a baja presión (c) puede producirse a, por ejemplo, presión más baja de o igual a aproximadamente 200 µbar, mientras que otra reducción en la presión puede producirse a presiones más bajas de o iguales a aproximadamente 100 µbar. Finalmente, la temperatura de la suspensión o disolución inmunogénica estabilizada durante la eliminación del exceso de agua residual (d) se produce a, por ejemplo, temperaturas entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 30 °C.

[0143] El proceso de liofilización también puede realizarse con una suspensión o disolución inmunogénica que comprende paramixovirus canino atenuado vivo y al menos un componente inmunogénico activo derivado de un patógeno distinto de un paramixovirus, que se mezcla con un estabilizador según la descripción para obtener una composición inmunogénica o de vacuna multivalente estabilizada liofilizada.

[0144] El contenido de humedad del material vitrificado puede oscilar de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 5 % en peso/peso, preferentemente de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 3 % en peso/peso, y más preferentemente de aproximadamente el 1,0 % a aproximadamente el 2,6 % en peso/peso.

[0145] Para su uso y administración en un sujeto, la composición inmunogénica estabilizada vitrificada o composición de vacuna puede reconstituirse por rehidratación con un disolvente. El disolvente normalmente es agua, tal como agua desmineralizada o destilada, agua para inyección, pero también puede comprender disoluciones o tampones fisiológicos, tales como, por ejemplo, disolución de tampón fosfato (PBS), o adyuvantes que incluyen, pero no se limitan a, emulsiones de agua en aceite, *Corynebacterium parvum*, bacilo de Calmette Guerin, hidróxido de aluminio, glucano, sulfato de dextrano, óxido de hierro, alginato de sodio, bacto-adyuvante, ciertos polímeros sintéticos tales como poliaminoácidos y copolímeros de aminoácidos, saponina, "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.), "AVRIDINE" (N, N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxiethyl)-propanodiamina), aceite de parafina, muramildipéptido y similares. Otros ejemplos específicos de adyuvantes y composiciones de adyuvante se detallan en el presente documento.

[0146] Adyuvantes adecuados incluyen fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina; patente de EE.UU. N.º 6.017.537) y/o polímero de ácido acrílico o ácido metacrílico y/o un copolímero de anhídrido maleico y de derivado de alqueno. Los polímeros de ácido acrílico o ácido metacrílico pueden estar reticulados, por ejemplo, con polialqueno éteres de azúcares o de polialcoholes. Estos compuestos son conocidos con el término "carbómero" (Pharmeuropa, Vol. 8, No. 2, junio de 1996). Un experto en la materia puede también referirse a la patente de EE.UU. N.º 2.909.462, que trata tales polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxiado que contiene al menos 3 grupos hidroxilo; un compuesto polihidroxiado no contiene 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 de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden ellos mismos contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos comercializados con el nombre Carbopol® (Noveon Inc., Ohio, EE.UU.) son particularmente adecuados para su uso como adyuvantes. Están reticulados con una alilsacarosa o con alilpentaeritritol, respecto a los que se hace mención de los productos Carbopol® 974P, 934P y 971P.

[0147] En cuanto a los copolímeros de anhídrido maleico y de derivado de alqueno, se hace mención de los

productos EMA® (Monsanto), que son copolímeros de anhídrido maleico y de etileno, que pueden ser lineales o estar reticulados, por ejemplo, reticulados con divinil éter. Por tanto, puede hacerse referencia a la patente de EE.UU. N.º 6.713.068 y Regelson, W. et al., 1960.

5 **[0148]** Lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.713.068, también pueden usarse en los métodos y composiciones de la presente descripción. Entre estos lípidos catiónicos, se da preferencia a DMRIE (N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-prapanoamónio; documento WO96/34109), ventajosamente asociado a un lípido neutro, ventajosamente DOPE (dioleoil-fosfatidiletanolamina; Behr J. P. et al, 1994), para formar DMRIE-DOPE.

10 **[0149]** El contenido total de componentes en las composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna listas para inyectar reconstituidas de la descripción puede usarse para proporcionar una inyección a una concentración isotónica, por ejemplo, dentro del intervalo de aproximadamente 100-600 mOsm, generalmente dentro de aproximadamente 250-450 mOsm, y preferentemente aproximadamente 330 mOsm.

15 **[0150]** Dosificaciones de patógenos atenuados vivos, en particular CDV y cPi2, en una composición inmunogénica o composición de vacuna estabilizada liofilizada, o en composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna listas para inyectar reconstituidas, pueden oscilar de aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^7 CCID₅₀/dosis. Para proteínas, polipéptidos o glucoproteínas en una composición inmunogénica o composición de vacuna multivalente estabilizada liofilizada, o en las composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna multivalentes listas para usar reconstituidas, puede oscilar en un título equivalente antes de la inactivación de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^9 CCID₅₀ por dosis, preferentemente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 CCID₅₀ por dosis.

25 **[0151]** Las composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna listas para uso reconstituidas pueden administrarse a un animal mediante inyección a través de la vía parenteral o mucosa, preferentemente intramuscular y subcutánea. Sin embargo, la administración de tales composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna listas para uso reconstituidas también puede comprender administración intranasal, epicutánea, tópica o por vía oral. El volumen de una dosis para inyección puede ser de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 2,0 ml, y preferentemente aproximadamente 1,0 ml.

[0152] La invención se describirá ahora además a modo de los siguientes ejemplos no limitantes, dada a modo de ilustración de diversas realizaciones de la invención, y no pretende limitar la presente invención en ningún modo.

35 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1: Proceso de vitrificación - Material biológico (general seguido de específico)

40 **[0153]** Se vitrificaron las composiciones biológicas según las siguientes etapas generales:

(1) formular una preparación biológica, que incluye las etapas de añadir componentes biológicos activos, añadir estabilizadores, que reducen o eliminan el daño inducido sometiendo los componentes biológicos a medios de preservación criogénica, que incluyen granulación en perlas, vitrificación y liofilización, y opcionalmente añadir uno o más adyuvantes, que aumentan la inmunogenicidad del biológico en el caso de preparaciones inmunológicas;

(2) llenar viales con la preparación biológica de la etapa (1);

(3) cargar viales en recipiente de temperatura controlada, en el que la temperatura es entre -15 °C y 10 °C, particularmente entre -10 °C y 5 °C, e incluso más particularmente aproximadamente 5 °C;

(4) reducir la presión del aire del recipiente de temperatura controlada hasta que se obtiene una presión dentro del intervalo de 15-30 mbar;

(5) mantener la presión obtenida durante la etapa (4) durante entre 5 y 20 minutos, particularmente entre 10 y 15 minutos, para permitir que la temperatura del producto se establezca y para permitir que los gases volátiles, que incluyen carbonatos, sean liberados de la preparación biológica, en el que la temperatura del recipiente sigue a aproximadamente 4 °C a aproximadamente 6 °C, o aproximadamente 5 °C durante esta etapa;

(6) disminuir la presión del aire del recipiente a aproximadamente 4 a aproximadamente 7 mbar, o aproximadamente 5 mbar, durante entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 minutos;

(7) mantener la presión de la etapa (6) durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos, que permite que la preparación biológica llegue a concentrarse más;

(8) aumentar la temperatura del recipiente de temperatura negativa a positiva (entre aproximadamente 30 °C

y aproximadamente 50 °C) durante el transcurso de entre 45 y 85 minutos, o aproximadamente 60 minutos, y mantener la presión constante hasta que llegue a aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, o aproximadamente 15 °C;

5 (9) reducir la presión del aire del recipiente a aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4 mbar, o aproximadamente 3 mbar, para acelerar la concentración, y hasta que la temperatura del recipiente alcance y mantenga aproximadamente 30 °C durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 90 minutos, o 60 minutos;

10 (10) reducir adicionalmente la presión a entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 4,0 mbar, o aproximadamente 1 mbar, y mantener la presión constante hasta que se haya completado la espumación;

(11) reducir adicionalmente la presión a entre aproximadamente 5 µbar y aproximadamente 100 µbar, o aproximadamente 25 µbar, mientras que se mantiene la temperatura a aproximadamente 30 °C durante aproximadamente 400 a aproximadamente 2400 o más minutos, hasta que se obtiene la humedad deseada de entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 15 %, o aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 4 %;

15 (12) tapar los viales mientras están en el recipiente del liofilizador, completándose así el método de vitrificación.

Tabla 2. Vitrificación de RECOMBITEK® (EURICAN, Meril) Virus del moquillo canino (CDV) y paragripe tipo 2 (PI2); HR 4 %

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 238 | refrig. placas | 0 | -10 | refrig. trampa | 20 | -70 |
| disminuir vacío | 10 | 30 | calentar placa | 20 | -4 | | | |
| vacío estable | 20 | 30 | estable | 35 | -4 | | | |
| disminuir vacío | 10 | 5 | calentar placa | 60 | 30 | | | |
| vacío estable | 40 | 5 | estable | 1275 | 30 | | | |
| disminuir vacío | 10 | 3 | | | | | | |
| vacío estable | 15 | 3 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 1,5 | | | | | | |
| vacío estable | 160 | 1,5-1 | | | | | | |
| alto vacío | 1050 | / | | | | | | |

Tabla 3. Vitrificación de IB88: HR 3,9 %

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 247 | refrig. placas | 0 | -7 | refrigerar trampa | 20 | -70 |
| disminuir vacío | 10 | 20 | calentar placa | 25 | -4 | | | |
| vacío estable | 15 | 20 | estable | 20 | -4 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 5 | calentar placa | 60 | 30 | | | |
| vacío estable | 50 | 5 | estable | 1375 | 30 | | | |

ES 2 626 297 T3

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 10 | 3 | | | | | | |
| vacío estable | 30 | 3 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 2 | | | | | | |
| vacío estable | 85 | 2-1,5 | | | | | | |
| alto vacío | 1270 | / | | | | | | |

Tabla 4. Cellules CEP-parquet MO23; Cellules EB66; Vitrificación de CEP 50/50 S32+S 325 g/l; Vitrificación de EB66 50/50 S32+S 325 g/l

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 780 | refrigerar placas | 0 | -11 | refrigerar trampa | 30 | -70 |
| disminuir vacío | 10 | 22 | calentar placa | 5 | -5 | | | |
| vacío estable | 10 | 22 | estable | 40 | -5 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 5 | calentar placa | 70 | 30 | | | |
| vacío estable | 50 | 5 | estable | 1335 | 30 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 3 | | | | | | |
| vacío estable | 40 | 3 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 2 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 2 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 1,5 | | | | | | |
| vacío estable | 10 | 1,5 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 1 | | | | | | |
| vacío estable | 125 | 1 | | | | | | |
| alto vacío | 1150 | / | | | | | | |

Tabla 5. Cellules CEP-parquet 09/17; Vitrificación de CEP 50/50 S32+S 325 g/l

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 660 | refrigerar placas | 0 | -5 | refrigerar trampa | 30 | -70 |
| disminuir vacío | 10 | 15 | estable | 45 | -5 | | | |

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| vacío estable | 10 | 15 | calentar placa | 60 | 30 | | | |
| disminuir vacío | 10 | 5 | estable | 1330 | 30 | | | |
| vacío estable | 50 | 5 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 3 | | | | | | |
| vacío estable | 20 | 3 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 2,5 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 2 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 1,5 | | | | | | |
| vacío estable | 20 | 1,5 | | | | | | |
| alto vacío | 1275 | / | | | | | | |

Tabla 6. Vitrificación de MAREK: HR 5,4 %

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 780 | refrigerar placas | 0 | -5 | refrigerar trampa | 20 | -70 |
| disminuir vacío | 10 | 23 | estable | 45 | -5 | | | |
| vacío estable | 10 | 20 | calentar placa | 65 | 30 | | | |
| disminuir vacío | 10 | 5 | estable | 1325 | 30 | | | |
| vacío estable | 50 | 5 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 3 | | | | | | |
| vacío estable | 10 | 3 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 2 | | | | | | |
| vacío estable | 10 | 2 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 1,5-1 | | | | | | |
| vacío estable | 50 | 1,5-1 | | | | | | |
| alto vacío | 1255 | / | | | | | | |

ES 2 626 297 T3

Tabla 7. Vitrificación de vCP97 50/50 S11+S 325 g/l: HR 8,42 %; Vitrificación de vCP2017 50/50 S11+S 325 g/l: HR 7,61 %; Vitrificación de vCP97 50/50 F2+S 325 g/l: HR 8,76 %; Vitrificación de vCP2017 50/50 F2+S 325 g/l: HR 7,06 %

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 122 | refrigerar placas | 0 | -10 | refrigerar trampa | 30 | -70 |
| disminuir vacío | 10 | 23 | calentar placa | 10 | -5 | | | |
| vacío estable | 20 | 23 | estable | 20 | -5 | | | |
| disminuir vacío | 15 | 5 | calentar placa | 100 | 30 | | | |
| vacío estable | 45 | 5 | estable | 1325 | 30 | | | |
| disminuir vacío | 10 | 3 | | | | | | |
| vacío estable | 10 | 3 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 2 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 2 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 1,5 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 1 | | | | | | |
| vacío estable | 10 | 1 | | | | | | |
| alto vacío | 1295 | / | | | | | | |

Tabla 8. Vitrificación de vCP97 50/50 S11+S 325 g/l: HR 13,1 %; Vitrificación de vCP97 50/50 F2+S 325 g/l: HR 8,2 %

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 412 | refrigerar placas | 0 | 4 | refrigerar trampa | 30 | -70 |
| disminuir vacío | 5 | 17 | estable | 20 | 4 | | | |
| vacío estable | 10 | 17 | calentar placa | 70 | 30 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 14 | estable | 1620 | 30 | | | |
| vacío estable | 10 | 14 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 12 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 10 | | | | | | |
| disminuir vacío | 10 | 8 | | | | | | |
| vacío estable | 10 | 8 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 6 | | | | | | |

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| vacío estable | 10 | 6 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 4 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 4 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 2 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 1,3 | | | | | | |
| vacío estable | 60 | 1,3 | | | | | | |
| alto vacío | 1570 | / | | | | | | |

Tabla 9. Vitricación de PA Newcastle: HR 4,6 %

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 520 | refrigerar placas | 0 | 4 | refrigerar trampa | 20 | -70 |
| disminuir vacío | 5 | 22 | calentar placa | 90 | 30 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 17 | estable | 1410 | 30 | | | |
| vacío estable | 10 | 17 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 14 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 12 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 10 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 8 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 8 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 6 | | | | | | |
| vacío estable | 25 | 6 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 4 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 4 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 2 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 2 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 1,3 | | | | | | |
| vacío estable | 95 | 1,3 | | | | | | |

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| alto vacío | 1310 | / | | | | | | |

Tabla 10. Vitrificación de PA IB88: HR 4,6 %

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 490 | refrigerar placas | 0 | 4 | refrigerar trampa | 25 | -70 |
| disminuir vacío | 5 | 22 | estable | 10 | 4 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 17 | calentar placa | 85 | 30 | | | |
| vacío estable | 10 | 17 | estable | 1030 | 30 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 12 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 12 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 10 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 8 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 6 | | | | | | |
| vacío estable | 40 | 6 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 4 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 4 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 2 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 2 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 1 | | | | | | |
| vacío estable | 150 | 1 | | | | | | |
| alto vacío | 865 | / | | | | | | |

Tabla 11. Vitrificación Pasteurella 50/50 S54+S (325 g/l): HR 5,5 %; Vitrificación Pasteurella 50/50 F2+S (325 g/l): HR 6,1 %

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 715 | refrigerar placas | 0 | 4 | refrigerar trampa | 30 | -70 |
| disminuir vacío | 5 | 30 | estable | 15 | 4 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 18 | calentar placa | 75 | 30 | | | |

ES 2 626 297 T3

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| vacío estable | 10 | 18 | estable | 1455 | 30 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 14 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 14 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 12 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 10 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 10 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 8 | | | | | | |
| vacío estable | 10 | 8 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 6 | | | | | | |
| vacío estable | 30 | 6 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 4 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 2 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 1 | | | | | | |
| vacío estable | 1015 | 1 | | | | | | |
| alto vacío | 460 | / | | | | | | |

Tabla 12. Vitrificación Avibacterium 50/50 S54+S (325 g/l): HR 4,8 %; Vitrificación Avibacterium 50/50 F2+S (325 g/l): HR 6 %

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 404 | refrigerar placas | 0 | 4 | refrigerar trampa | 15 | -70 |
| disminuir vacío | 5 | 23 | estable | 15 | 4 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 17 | calentar placa | 80 | 30 | | | |
| vacío estable | 10 | 17 | estable | 1705 | 30 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 14 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 14 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 12 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 10 | | | | | | |
| vacío estable | 5 | 10 | | | | | | |

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 5 | 8 | | | | | | |
| vacío estable | 15 | 8 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 6 | | | | | | |
| vacío estable | 20 | 6 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 4 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 2 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 1 | | | | | | |
| vacío estable | 1255 | 1 | | | | | | |
| alto vacío | 385 | / | | | | | | |

Tabla 13. Vitrificación de vCP2017 50/50 S11+S 325 g/l: HR 7,5 %; Vitrificación de vCP2017 50/50 F2+S 325 g/l: HR 7,1 %

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 372 | refrigerar placas | 0 | 4 | refrigerar trampa | 15 | -70 |
| disminuir vacío | 5 | 18 | estable | 10 | 4 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 17 | calentar placa | 75 | 30 | | | |
| vacío estable | 10 | 17 | estable | 1625 | 30 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 13 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 10 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 8 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 6 | | | | | | |
| vacío estable | 30 | 6 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 4 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 2 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 1 | | | | | | |
| vacío estable | 170 | 1 | | | | | | |
| alto vacío | 1455 | / | | | | | | |

Tabla 14. Vitrificación de ERN: HR 4,1 %

| Presión | | | Temperatura del estante de la secadora | | | Temperatura de la trampa | | |
|-----------------|---------|--------------|--|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| etapa | Tps Min | Presión mbar | etapa | Tps Min | Temp °C | etapa | Tps Min | Temp °C |
| disminuir vacío | 0 | 372 | refrigerar placas | 0 | 4 | refrigerar trampa | 10 | -70 |
| disminuir vacío | 5 | 17 | estable | 15 | 4 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 15 | calentar placa | 75 | 30 | | | |
| vacío estable | 10 | 15 | estable | 1625 | 30 | | | |
| disminuir vacío | 5 | 12 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 10 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 8 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 6 | | | | | | |
| vacío estable | 50 | 6 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 4 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 2 | | | | | | |
| disminuir vacío | 5 | 1 | | | | | | |
| vacío estable | 135 | 1 | | | | | | |
| alto vacío | 1415 | / | | | | | | |

Ejemplo 2: Estudios de estabilidad después de la liofilización

5 [0154] Se sometió EURICAN (CDV y PI2) a liofilización, vitrificación (según el método desvelado anteriormente), o granulación en perlas. Las tablas proporcionan detalles resumen para las formulaciones inmunológicas probadas.

Tabla 15. Estudio de estabilidad de nueve meses, RECOMBITEK® (EURICAN, Merial)

| Ciclo | Título en log10CCID50/ml | | | | | |
|-------------------|--------------------------|------|--------------------------|------|----------------------------------|------|
| | Liofilización de EURICAN | | Vitrificación de EURICAN | | Granulación en perlas de EURICAN | |
| Valencia | CDV | PI2 | CDV | PI2 | CDV | PI2 |
| Formulación diana | 0,48 ml | 6,73 | 0,48 ml | 6,73 | 0,48 ml | 6,73 |
| T 0 | 5,41 | 6,14 | 5,88 | 6,47 | 5,07 | 6,02 |
| T 3 meses | 5,33 | 5,95 | 5,71 | 6,47 | 4,72 | 5,9 |
| T 6 meses | 5,4 | 5,99 | 5,78 | 6,39 | 4,68 | 5,6 |
| T 9 meses | 5,39 | 5,71 | 5,76 | 6,6 | 4,69 | 5,88 |

Tabla 16. Estudio de estabilidad de seis meses, vCP97 (antígenos FeLV con vector de la viruela del canario, Merial FeLV®)

| | Título en log ₁₀ CCID ₅₀ /ml | | | |
|-------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Liofilización en estabilizador S11 | Liofilización en estabilizador F02 | Vitrificación en estabilizador S11 | Vitrificación en estabilizador F02 |
| Formulación diana | 8,1 | 8,1 | 8,1 | 8,1 |
| T 0 | 7,91 | 7,87 | 8,2 | 7,94 |
| T 6 meses | 7,56 | 7,6 | 7,48 | 7,65 |

5

Tabla 17. Estudio de estabilidad de seis meses, vCP2017 (WNV con vector de la viruela del canario, Merial RECOMBITEK® WNV)

| | Título en log ₁₀ CCID ₅₀ /ml | | | |
|-------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Liofilización en estabilizador S11 | Liofilización en estabilizador F02 | Vitrificación en estabilizador S11 | Vitrificación en estabilizador F02 |
| Formulación diana | 7,5 | 7,5 | 7,5 | 7,5 |
| T 0 | 6,87 | 6,93 | 7,07 | 7 |
| T 6 meses | 6,34 | 6,52 | 6,9 | 6,53 |

Tabla 18. Estudio de estabilidad de seis meses, *avibacterium* atenuado

| | Pasteurella | | | | Avibacterium | | | |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| | Liof. en estab. 54 | Liof. en estab. F02 | Vitrif. en estab. 54 | Vitrif. en estab. F02 | Liof. en estab. 54 | Liof. en estab. F02 | Vitrif. en estab. 54 | Vitrif. en estab. F02 |
| T 0 antes de liof. o vitrif. | 9,73 | 9,73 | 9,45 | 9,45 | 8,97 | 8,97 | 9,01 | 9,01 |
| T0 después de liof. o vitrif. | 8,8 | 8,88 | 7,83 | 7,82 | 8,15 | 8,15 | 4,76 | 4,58 |
| T 1 semana | 8,8 | 8,88 | 7,84 | 7,83 | / | / | / | / |
| T 1 meses | / | / | / | / | 7,58 | 7,87 | 5,56 | 5,63 |
| T 3 meses | 8,76 | 8,66 | 7,78 | 7,18 | / | / | / | / |

Tabla 19. Estudio de estabilidad de dieciocho meses, enfermedad de MAREK, vitrificado según la presente divulgación

| | Título en log ₁₀ PFU/ml | | |
|------------|------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| | 091023-1 S32 50 %/50 % de PA | 091023-4 S32 1/3-2/3 PA | 091126-8 S32+Sac 30 %/70 % de PA |
| T 0 | 4,75 | 4,65 | 4,88 |
| T 6 meses | 5,11 | 5,07 | 5,25 |
| T 12 meses | 4,05 | 3,96 | 4,37 |
| T 18 meses | 4,17 | 4,05 | ??? |

10

[0155] También se vitrificaron satisfactoriamente enfermedad infecciosa de la bolsa (coronavirus), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), polipéptido KSAC de Leishmania y células de fibroblasto embrionarias de pollo (CEF) según el método de la presente divulgación.

15 Ejemplo 4: Vacunas de prueba en perros

[0156] Las vacunas vitrificadas descritas en el Ejemplo 1 se administran a animales después de la rehidratación en agua inyectable estéril. Se asignan aleatoriamente cuatro perros libres de patógenos específicos (SPF) de edades 3 a 5 meses de edad y 4 perros convencionales de edad 3 a 5 meses de edad a 4 grupos de dos animales, en los que cada grupo tuvo un perro SPF y un perro convencional. Para cada grupo, se inmunizan dos perros por vía subcutánea en el día 0 con una dosis doble (2 ml) de su vacuna vitrificada/estabilizada correspondiente. En el día 14, los perros se inmunizan por vía subcutánea con una dosis única (1 ml) de la misma vacuna estabilizada. Se observan reacciones locales inmediatas y reacciones generales inmediatas, temperaturas rectales, reacciones locales, reacciones generales y síntomas clínicos. No se observa reacción local o general tras la administración. Por tanto, la seguridad de las vacunas vitrificadas/estabilizadas parece ser alta.

25

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de vitrificación de material biológico que comprende las etapas de formular una preparación biológica líquida, someter la preparación a cambios controlados en la presión y temperatura para reducir el contenido de humedad de la formulación a menos de aproximadamente el 5 % en peso, vitrificando así el material biológico; en el que el proceso comprende además las etapas de:
- (a) añadir a la preparación líquida componentes biológicos activos, estabilizadores, que reducen o eliminan el daño inducido sometiendo los componentes biológicos a medios de preservación criogénica, que incluyen granulación en perlas, vitrificación y liofilización, y opcionalmente añadir uno o más adyuvantes;
- (b) llenar viales con la preparación biológica de la etapa (a);
- (c) cargar viales en recipiente de temperatura controlada, en el que la temperatura es entre -15 °C y 10 °C, particularmente entre -10 °C y 5 °C, e incluso más particularmente aproximadamente 5 °C;
- (d) reducir la presión del aire del recipiente de temperatura controlada hasta que se obtiene una presión dentro del intervalo de 15-30 mbar;
- (e) mantener la presión obtenida durante la etapa (d) durante entre 5 y 20 minutos, particularmente entre 10 y 15 minutos, para permitir que la temperatura del producto se estabilice y para permitir que los gases volátiles, que incluyen carbonatos, sean liberados de la preparación biológica, en el que la temperatura del recipiente sigue a aproximadamente 4 °C a aproximadamente 6 °C, o aproximadamente 5 °C durante esta etapa;
- (f) disminuir la presión del aire del recipiente a aproximadamente 4 a aproximadamente 7 mbar, o aproximadamente 5 mbar, durante entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 minutos;
- (g) mantener la presión de la etapa (f) durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos, que permite que la preparación biológica llegue a concentrarse más;
- (h) aumentar la temperatura del recipiente de temperatura negativa a positiva (entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 50 °C) durante el transcurso de entre 45 y 85 minutos, o aproximadamente 60 minutos, y mantener la presión constante hasta que llegue a aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, o aproximadamente 15 °C;
- (i) reducir la presión del aire del recipiente a aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4 mbar, o aproximadamente 3 mbar, para acelerar la concentración, y hasta que la temperatura del recipiente alcance y mantenga aproximadamente 30 °C durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 90 minutos, o 60 minutos;
- (j) reducir adicionalmente la presión a entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 4,0 mbar, o aproximadamente 1 mbar, y mantener la presión constante hasta que se haya completado la espumación;
- (k) reducir adicionalmente la presión a entre aproximadamente 5 µbar y aproximadamente 100 µbar, o aproximadamente 25 µbar, mientras que se mantiene la temperatura a aproximadamente 30 °C durante aproximadamente 400 a aproximadamente 2400 o más minutos, hasta que se obtiene la humedad deseada de entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 15 %, o aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 4 %;
- (l) tapar los viales mientras están en el recipiente del liofilizador, completándose así el método de vitrificación.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que el biológico activo es un inmunogén, un polipéptido, un nucleótido, un virus vivo, bacterias vivas, un protista vivo, o una subunidad que se origina de una enfermedad o patógeno causante de trastorno.
3. El proceso de la reivindicación 2, en el que el biológico activo es un virus atenuado vivo.
4. El proceso de la reivindicación 3, en el que el virus es virus del moquillo canino (CDV), virus paragripal tipo 2 canino (PI2), o combinaciones de los mismos.
5. El proceso de la reivindicación 3 en el que el virus atenuado es viruela del canario, virus de la enfermedad de Marek, virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, virus del Nilo occidental (WNV) o virus de la leucemia felina (FeLV).
6. El proceso de la reivindicación 2, en el que la bacteria es avibacterium.
7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la preparación contiene al menos un adyuvante.
8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el material biológico vitrificado

es estable a 4 °C durante al menos un año.

9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el material biológico vitrificado es estable a -20 °C y -80 °C durante al menos un año.

