(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 749 197**

(51) Int. CI.:

A61K 39/29 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2014 PCT/EP2014/070608**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15044337**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2014 E 14776856 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3049108**

(54) Título: **Formulaciones secas de vacunas que son estables a la temperatura ambiente**

(30) Prioridad:

27.09.2013 US 201361883611 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2020

(73) Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL

(72) Inventor/es:

QIAO, ZHISONG y
O'CONNELL, KEVIN

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Formulaciones secas de vacunas que son estables a la temperatura ambiente

Campo de la invención

La presente invención concierne a formulaciones secas de vacunas estables a la temperatura ambiente que comprenden uno o más virus vivos atenuados. La invención también concierne a la elaboración de dichas formulaciones secas de vacunas.

Antecedentes

Los virus vivos atenuados son inestables cuando se almacenan a la temperatura ambiente durante periodos prolongados de tiempo. Por lo tanto, la mayoría de las vacunas de virus vivos atenuados están liofilizadas y refrigeradas antes de su uso. Sin embargo, el transporte y el almacenamiento de dichas vacunas da lugar a significativos costes adicionales que deben ser trasladados a los dispensarios de vacunas, veterinarios, manipuladores de ganado/granjeros, y finalmente al propietario de la mascota o al consumidor. Dichos costes pueden resultar ser prohibitivos en las comunidades pobres y en los países del tercer mundo. Consecuentemente, la OMS requiere una supervivencia mínima de > 20 % después de 28 días a 37 ºC para la vacuna BCG humana [véase, por ejemplo, Jin *et al, Vaccine* 29: 4848- 4852 (2011)].

Existe una cantidad significativa de virus que puede infectar tanto a los animales de compañía (tales como perros, gatos y caballos) como al ganado (tales como aves, ganado vacuno y porcino). Por ejemplo, mientras que los síntomas debidos a las correspondientes infecciones víricas pueden incluir unos leves síntomas similares a los de un resfriado, otros pueden ser rápidamente mortales, como el caso de infecciones por el virus del moquillo canino (CDV) [véase, por ejemplo, el documento US2010/0196420]. De hecho, el CDV desencadena una infección multisistémica que puede implicar los sistemas ocular, respiratorio, gastrointestinal, tegumentario y nervioso. El índice de mortalidad por el parvovirus canino (CPV) también es relativamente alto [véase, por ejemplo, el documento US2009/0010955]. El CPV es un patógeno fundamentalmente entérico que infecta a perros, especialmente a perros jóvenes, y se caracteriza por una diarrea aguda, fiebre y leucopenia en perros y cachorros de más de entre 4 y 5 semanas de edad. Incluso los cachorros más jóvenes pueden sufrir una enfermedad miocárdica. El virus canino del moquillo y el parvovirus canino son los dos virus caninos más importantes contra los que hay que proteger a los cachorros/perros.

Algunos virus caninos adicionales incluyen: el virus paragripal canino (CPI), que es un virus muy contagioso que causa enfermedades respiratorias que contribuyen a contraer enfermedades del tracto respiratorio superior y traqueobronquitis infecciosas; el adenovirus canino tipo-1 (CAV1) que da lugar a una hepatitis infecciosa; y el virus de la gripe canina (CIV) que es muy contagioso y puede causar una grave enfermedad de tipo respiratorio. Se ha notificado que el CIV es capaz de causar una infección del 100 % con una morbilidad del 80 % y una mortalidad de hasta el 5-8 % en las infecciones graves [Crawford *et al, Science* 310 (5747): 482-485 (2005); documento U.S. 7.959.929 B2], De forma análoga, existen diversos virus felinos que afectan a los gatos, incluyendo el calicivirus felino (FCV), el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus de la panleucopenia felina (FPLV), el coronavirus felino (FCoV) y el virus de la rinotraqueítis felina (FVR).

También existe una cantidad significativa de virus que pueden infectar al ganado vacuno. Dichos virus incluyen los virus de la diarrea bovina de los tipos 1 y 2 (BVDV1 y BVDV2), el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), el paragripal de tipo 3 (PI3), el virus respiratorio sincitial bovino (BRSV) y el coronavirus respiratorio bovino (BRCV). Además, existen numerosas bacterias que pueden infectar también al ganado vacuno, que incluyen *Pasteurella* multocida, *Mannheimia* haemolytica, *Histophilus* somni y *Mycoplasma* bovis.

De forma análoga, existe una cantidad significativa de virus que pueden infectar a las aves. Dichos virus incluyen el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), el virus de la enfermedad infecciosa de las bolsas sinoviales (IBDV), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV), el virus de la enfermedad de Marek (MDV), el herpes virus de los pavos (HVT) que también se conoce como MDV3, y los metaneumovirus de las aves (aMPV). Además, existen numerosas bacterias que pueden infectar también a las aves, que incluyen *Pasteurella multocida, Salmonella ssp., Escherichia coli, Mycoplasma ssp., Avibacterium paragallinararum, Erysipelas ssp., Campylobacter ssp., Vibrio ssp., Clostridium perfringens,* y parásitos tales como *Eimeria.*

Además, existen numerosos virus que pueden infectar al ganado porcino. Dichos virus incluyen el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS), el circovirus porcino (PCV), el virus transmisible de la gastroenteritis (TGE), el virus de la seudorrabia porcina (PPRV), el parvovirus porcino (PPV), el virus de la gripe porcina (SIV), el rotavirus porcino (PRV) y el virus de la diarrea epidémica porcina (PED). Además, existen numerosas bacterias que pueden infectar también al ganado porcino, que incluyen *Pasteurella multocida* de múltiples serotipos, *Salmonella ssp., Escherichia coli* de múltiples tipos de pillus, *Haemophilus parasuis, Lawsonia intracellularis, Mycoplasma ssp., Bordetella bronchiseptica, Erysipelas ssp., Campylobacter ssp., Actinobacillus pleuropneumonia, Clostridium perfringens* y C*lostridium difficile.*

Ahora está ampliamente aceptado que la mejor forma de prevenir una enfermedad debida a infecciones por virus en un animal es la vacunación de ese animal frente a esos virus. Únicamente como un ejemplo, en los perros, las vacunas contra el virus del moquillo canino han reducido significativamente la prevalencia de la correspondiente enfermedad. De forma análoga, la hepatitis infecciosa canina ha sido extremadamente limitada por las vacunas contra el adenovirus canino-2 (CAV2). El uso de un CAV2 vivo atenuado en vacunas en lugar del estrechamente relacionado CAV1 elimina las preocupaciones relativas a la nefritis intersticial y la opacidad corneal observada en los perros que han sido inoculados con el CAV1 vivo atenuado [Taguchi *et al, Can Vet J.* 52 (9): 983-986 (2011)]. Además, las vacunas multivalentes de virus vivos atenuados pueden ser administradas de una forma segura que limita el número de inyecciones necesarias de la vacuna. Consecuentemente, existen numerosas vacunas multivalentes de virus vivos atenuados caninos disponibles comercialmente que protegen frente al moquillo canino, la hepatitis infecciosa canina, el parvovirus canino y el virus paragripal canino. Además, las nuevas vacunas multivalentes protegen adicionalmente también contra el virus de la gripe canina. Sin embargo, sigue habiendo una gran necesidad de vacunas de virus atenuados vivos, tales como vacunas de virus caninos, que puedan ser transportadas y almacenadas a la temperatura ambiente.

El documento WO03/087327 proporciona métodos y composiciones para la preservación de materiales bioactivos en una matriz de espuma seca.

Sumario de la invención

Con objeto de superar las deficiencias de las vacunas actuales, la presente invención proporciona nuevas formulaciones secas estables de vacunas atenuadas con microbios vivos, por ejemplo, vacunas contra virus, que pueden ser transportadas y/o almacenadas a la temperatura ambiente, así como sus correspondientes composiciones inmunógenas. Estas formulaciones secas siguen siendo eficaces a 27 ºC durante periodos prolongados, tales como de 12 meses, de 18 meses, o incluso más largos (por ejemplo, de entre 1,5 y 3 años).

En ciertas realizaciones, la vacuna atenuada con microbios vivos es una vacuna aviar. En algunas realizaciones en particular de este tipo, la vacuna atenuada con microbios vivos aviar es una vacuna aviar que comprende un virus aviar vivo atenuado. En algunas realizaciones más en particular de este tipo, la vacuna atenuada con microbios vivos aviar es una vacuna para pollos que comprende un virus vivo atenuado de pollo. En una realización alternativa de este tipo, la vacuna atenuada con microbios vivos aviar es una vacuna para pavos que comprende un virus vivo atenuado de pavo.

En ciertas realizaciones, la vacuna atenuada con microbios vivos es una vacuna de mamífero. En algunas realizaciones en particular de este tipo, la vacuna atenuada con microbios vivos de mamífero es una vacuna humana que comprende un virus vivo atenuado humano. En otras de dichas realizaciones, la vacuna atenuada con microbios vivos de mamífero es una vacuna bovina que comprende un virus vivo atenuado bovino. En otras realizaciones más, la vacuna atenuada con microbios vivos de mamífero es una vacuna porcina que comprende un virus vivo atenuado porcino.

En otras realizaciones más, la vacuna atenuada con microbios vivos de mamífero es una vacuna para un animal de compañía. En algunas realizaciones en particular de este tipo, la vacuna atenuada con microbios vivos para un animal de compañía es una vacuna canina. En otras realizaciones de este tipo, la vacuna atenuada con microbios vivos para un animal de compañía es una vacuna felina. En otras realizaciones más, la vacuna atenuada con microbios vivos para un animal de compañía es una vacuna equina. Consecuentemente, en algunas realizaciones en particular, la vacuna atenuada con microbios vivos canina comprende un virus vivo atenuado canino. En otras realizaciones, la vacuna atenuada con microbios vivos felina comprende un virus vivo atenuado felino. En otras realizaciones más, la vacuna atenuada con microbios vivos equina comprende un virus vivo atenuado equino.

En otras realizaciones, la vacuna atenuada con microbios vivos comprende un virus recombinante. En algunas realizaciones en particular de este tipo, el virus recombinante se emplea como un vector recombinante que codifica una proteína heteróloga. En algunas realizaciones más en particular de este tipo, la proteína heteróloga es un antígeno vírico o bacteriano. La presente invención también proporciona métodos para la elaboración de las formulaciones secas estables de la presente invención. La presente invención también proporciona métodos para el almacenamiento de las vacunas de la presente invención antes de su uso a 27 ºC durante periodos prolongados, tales como de 12 meses o más largos (por ejemplo, de entre 1,5 y 3 años) en forma de formulaciones secas estables.

Las formulaciones secas estables de la presente invención pueden usarse en métodos de administración de dicha formulación a un animal. La formulación seca estable puede ser reconstituida en una vacuna líquida antes de su administración. Algunos métodos adicionales para la prevención de una enfermedad en un animal (es decir, un ser humano, un animal de compañía o un animal de ganado) pueden llevarse a cabo a través de la administración de la formulación seca (por ejemplo, en forma de un polvo) y/o de la vacuna reconstituida líquida de la presente invención. Adecuadamente, el animal de compañía es un canino. El animal de compañía puede ser un felino. El animal de compañía puede ser un caballo. El animal de ganado puede ser un bovino. El animal de ganado puede ser un cerdo. El animal de ganado puede ser un pollo. El animal de ganado puede ser un pavo.

Consecuentemente, la presente invención proporciona formulaciones secas de vacunas que son estables a la temperatura ambiente que comprenden un virus vivo atenuado. Las formulaciones secas de la vacuna comprenden un estabilizante de azúcar. Las formulaciones secas de la vacuna comprenden entre un 30 % y un 80 % (p/p) del estabilizante de azúcar. En algunas otras realizaciones en particular, la vacuna comprende entre un 40 % y un 80 % (p/p) del estabilizante de azúcar. En ciertas realizaciones, la vacuna comprende entre un 25 % y un 50 % (p/p) del estabilizante de azúcar. En algunas realizaciones relacionadas la vacuna comprende entre un 30 % y un 70 % (p/p) del estabilizante de azúcar. En algunas realizaciones aún más en particular, la vacuna comprende entre un 40 % y un 60 % (p/p) del estabilizante de azúcar.

El estabilizante de azúcar es un oligosacárido no reductor. En algunas realizaciones en particular de este tipo, el oligosacárido no reductor es sacarosa. En otras realizaciones más, el oligosacárido no reductor es trehalosa. En otras realizaciones más, el oligosacárido no reductor es rafinosa. En otras realizaciones, el estabilizante de azúcar es un alcohol de azúcar. En una realización en particular de este tipo, el alcohol de azúcar es sorbitol. En otras realizaciones, el alcohol de azúcar es xilitol. En otras realizaciones más, el alcohol de azúcar es maltitol.

En algunas realizaciones alternativas, el estabilizante de azúcar es realmente una combinación de dos o más oligosacáridos no reductores. En algunas realizaciones en particular de este tipo, el estabilizante de azúcar es una combinación de sacarosa y sorbitol. En ciertas realizaciones, el estabilizante de azúcar es una combinación de sacarosa y trehalosa. En otras realizaciones más, el estabilizante de azúcar es una combinación de trehalosa y sorbitol. En otras realizaciones más, el estabilizante de azúcar es una combinación de sacarosa, trehalosa y sorbitol.

Las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención comprenden adicionalmente uno o más estabilizantes de volumen en una cantidad de entre un 1 % y un 6 % (p/v) en la forma líquida de la vacuna y entre un 2 % y un 25 % (p/p) en la formulación seca. En ciertas realizaciones, el estabilizante de volumen es manitol. En algunas realizaciones relacionadas, el estabilizante de volumen es glicina. En algunas realizaciones en particular, el estabilizante de volumen es dextrano. En ciertas realizaciones, el estabilizante de volumen es maltodextrina. En algunas realizaciones en particular, el estabilizante de volumen es dextrosa. En otras realizaciones, el estabilizante de volumen es polivinilpirrolidona. En otras realizaciones más, el estabilizante de volumen es hidroxietil almidón. En otras realizaciones más, las vacunas comprenden una combinación de estabilizantes de volumen. En ciertas realizaciones, el estabilizante de volumen comprende dos o más de los siguientes: dextrano, manitol, glicina, maltodextrina, polivinilpirrolidona e hidroxietil almidón. En algunas realizaciones en particular de este tipo, el estabilizante de volumen comprende manitol y glicina. En algunas realizaciones relacionadas, el estabilizante de volumen comprende dextrano y glicina. En otras realizaciones más de este tipo, el estabilizante de volumen comprende manitol, dextrano y glicina.

En algunas realizaciones en particular, el estabilizante proteico es gelatina. En otras realizaciones, el estabilizante proteico es un hidrolizado de caseína completa. En algunas realizaciones en particular, el hidrolizado de caseína completa es un hidrolizado proteolítico de caseína completa. En otras realizaciones más, el estabilizante proteico es una combinación tanto de gelatina como de un hidrolizado proteolítico de caseína completa.

Las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención varían en el pH entre un pH de 6,0 y un pH de 8,0. En ciertas realizaciones, el intervalo de pH es entre un pH de 6,5 y un pH de 7,8. En algunas realizaciones en particular, el intervalo de pH es entre un pH de 6,8 y un pH de 7,5. En otras realizaciones el intervalo de pH es entre un pH de 6,0 y un pH de 7,6. En otras realizaciones más, el intervalo de pH es entre un pH de 6,0 y un pH de 6,8. En otras algunas realizaciones más en particular, el intervalo de pH es entre un pH de 7,0 y un pH de 7,4. En algunas realizaciones más en particular, el pH es pH 7,2. En algunas otras realizaciones más en particular, el pH es un pH de 6,5.

Las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención comprenden un tampón. En una realización en particular de este tipo, el tampón comprende entre un 0,1 % y un 2 % (p/p) de histidina (entre 2,5 y 50 mM antes de su secado). En una realización relacionada, el tampón comprende entre un 0,2 % y un 1 % (p/p) de histidina. En algunas realizaciones en particular, el tampón comprende entre un 0,25 % y un 0,75 % (p/p) de histidina. En algunas realizaciones más en particular, el tampón comprende un 0,5 % (p/p) de histidina.

En otras realizaciones, el tampón comprende entre un 0,1 % y un 2 % (p/p) de fosfato (de fosfato de sodio, de fosfato de potasio, o de una mezcla de los dos; entre 2,5 y 50 mM antes de su secado). En algunas realizaciones relacionadas, el tampón comprende entre un 0,2 % y un 1 % (p/p) de fosfato. En algunas realizaciones en particular, el tampón comprende entre un 0,25 % y un 0,75 % (p/p) de fosfato. En algunas realizaciones más específicas el tampón comprende un 0,5 % (p/p) de fosfato.

En otras realizaciones más, el tampón puede comprender entre 2,5 y 50 mM de Tris. En algunas realizaciones en particular, el tampón comprende entre 2,5 y 50 mM de Tris y entre 2,5 y 50 mM de histidina. En algunas realizaciones más en particular, el tampón comprende entre 5 y 20 mM de Tris y entre 5 y 20 mM de histidina. En algunas realizaciones aún más en particular, el tampón comprende entre 7,5 y 15 mM de Tris y entre 7,5 y 15 mM de histidina.

Las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención también

comprenden un estabilizante aminoácido. En algunas realizaciones en particular, el estabilizante aminoácido es arginina. En otras realizaciones más, el estabilizante aminoácido es ácido glutámico. En otras realizaciones más, el estabilizante aminoácido es ácido aspártico. En otras realizaciones más, el estabilizante aminoácido es lisina. En algunas realizaciones relacionadas, las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención comprenden dos o más estabilizantes aminoácidos. En una realización en particular de este tipo, el estabilizante aminoácido es arginina y glutamato.

En ciertas realizaciones, la concentración del estabilizante aminoácido en la vacuna es de 0,1-0,4 M en la formulación líquida [del 10 % - 40 % (p/p) en la formulación seca]. En algunas realizaciones en particular, la concentración del estabilizante aminoácido en la vacuna es de 0,25-0,35 M en la formulación líquida. En algunas realizaciones más en particular, la concentración del estabilizante aminoácido en la vacuna es de 0,25-0,35 M en la formulación líquida. En algunas realizaciones aún más en particular, el estabilizante aminoácido es 0,3 M de arginina en la formulación líquida.

Las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención también comprenden un estabilizante proteico. El estabilizante proteico puede ser una proteína intacta y/o un hidrolizado de proteína. En algunas realizaciones en particular, el estabilizante proteico es gelatina. En algunas realizaciones alternativas, el estabilizante proteico es un hidrolizado de caseína completa. En ciertas realizaciones, el hidrolizado de caseína completa es un hidrolizado proteolítico de caseína completa. La formulación seca comprende entre un 2 % y un 20 % (p/p) del estabilizante proteico. En algunas otras realizaciones en particular, el estabilizante proteico comprende entre un 1 % y un 10 % (p/p) de gelatina. En algunas otras realizaciones más en particular, el estabilizante proteico comprende entre un 1 % y un 10 % (p/p) de un hidrolizado de caseína completa.

Las formulaciones secas de vacunas de la presente invención también pueden comprender un estabilizante proteico que incluya tanto gelatina como un hidrolizado de caseína completa. En algunas realizaciones en particular de este tipo, el estabilizante proteico comprende entre un 1 % y un 10 % (p/p) de gelatina y entre un 1 % y un 10 % (p/p) de un hidrolizado de caseína completa. En algunas realizaciones más en particular, el estabilizante proteico comprende entre un 2 % y un 5 % (p/p) de gelatina y entre un 2 % y un 6 % (p/p) de un hidrolizado de caseína completa. En algunas otras realizaciones en particular, el estabilizante proteico comprende entre un 0,4 % y un 3,0 % de gelatina (p/p) y entre un 0,5 % y un 3,0 % (p/p) de un hidrolizado de caseína completa. En algunas realizaciones específicas, el estabilizante proteico comprende un 2,3 % (p/p) de gelatina y un 2,8 % (p/p) de un hidrolizado de caseína completa. En otras realizaciones específicas, el estabilizante proteico comprende un 3,3 % (p/p/) de gelatina y un 4,2 % (p/p) de un hidrolizado de caseína completa.

Cualquiera de las formulaciones secas de la presente invención puede comprender adicionalmente entre un 0,02 % y un 1 % (p/p) de una sal de un catión divalente. En algunas realizaciones en particular, el catión divalente es entre 1 mM - 5 mM en la forma líquida y entre 0,1 % - 0,5 % (p/p) en la formulación seca. En ciertas realizaciones, el catión divalente es magnesio (Mg^{++}). En otras realizaciones el catión divalente es calcio (Ca^{++}). En otras realizaciones más, el catión divalente es cinc (Zn^{++}). En otras realizaciones más, el catión divalente es una mezcla de Mg^{++} y/o Ca^{++} y/o Zn^{++}.

Cualquiera de las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención puede comprender adicionalmente uno o más osmolitos. En algunas realizaciones en particular, el osmolito es ectoína. En algunas otras realizaciones en particular, el osmolito es hidroxiectoína. En otras realizaciones más, el osmolito es una combinación de ectoína y hidroxiectoína. En algunas realizaciones en particular, el porcentaje del osmolito en la formulación es de entre un 0,2 % y un 7,5 % (p/p). En algunas realizaciones más en particular, el porcentaje del osmolito en la formulación es de entre un 0,5 % y un 5 % (p/p). En algunas realizaciones aún más en particular, el porcentaje del osmolito en la formulación es de entre un 1 % y un 3 % (p/p).

Las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención comprenden un virus vivo atenuado. En un aspecto de la presente invención, el virus vivo atenuado es un virus canino. En una realización relacionada, el virus vivo atenuado es un virus felino. En otra realización, el virus vivo atenuado es un virus equino.

En otro aspecto más de la presente invención, el virus vivo atenuado es un virus de un animal de ganado, por ejemplo, un virus de un animal para el consumo. En una de dichas realizaciones, el virus vivo atenuado es un virus aviar. En algunas realizaciones en particular de este tipo, el virus aviar es un virus de pollo. En otras realizaciones de este tipo, el virus aviar es un virus de pavo. En otra de dichas realizaciones, el virus vivo atenuado es un virus bovino. En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado es un virus porcino.

En ciertas realizaciones, el virus vivo atenuado es el virus del moquillo (CDV). En otras realizaciones, el virus vivo atenuado es un adenovirus. En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado es un parvovirus. En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado es un virus paragripal (CPI). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado es un virus de la gripe.

En otro aspecto más de la presente invención, el virus vivo atenuado es un virus canino. En ciertas realizaciones, el virus vivo atenuado canino es el virus del moquillo canino (CDV). En otras realizaciones, el virus vivo atenuado canino

es el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado canino es el parvovirus canino (CPV). En una particular realización de este tipo, el parvovirus canino es un parvovirus canino 2 (CPV-2). En otra realización en particular de este tipo, el parvovirus canino es un parvovirus canino 2a (CPV-2a). En otra realización más en particular de este tipo, el parvovirus canino es un parvovirus canino 2b (CPV-2b). En otra realización aún más en particular de este tipo, el parvovirus canino es un parvovirus canino 2c (CPV-2c). En una realización específica de este tipo, el CPV-2c es el nº de registro de la ATCC PTA-13492. En otra realización más, el parvovirus canino es un parvovirus canino recombinante que se ha construido para que comprenda un genoma heterogéneo CPV-2c/CPV-2, es decir, la región que codifica las proteínas de la cápside es de una cepa del CPV-2c, y la región que codifica las proteínas no estructurales es de una cepa del CPV-2 [véase el documento U.S. 2012/0328652 A1, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside en el genoma del CPV-2 ha sido sustituida por la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside de un CPV-2c, dando así como resultado el genoma heterogéneo CPV-2c/CPV-2]. En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado canino es virus paragripal canino (CPI).

La presente invención también incluye vectores víricos recombinantes. En algunas realizaciones en particular, el vector vírico recombinante es un vector vírico paragripal recombinante. En ciertas realizaciones, el vector vírico paragripal recombinante es un vector vírico paragripal recombinante canino. En algunas realizaciones en particular, el virus paragripal recombinante (por ejemplo, un vector vírico paragripal recombinante canino) codifica y expresa una proteína heteróloga. En ciertas realizaciones de este tipo, la proteína heteróloga es un antígeno no canino. En algunas realizaciones más en particular, el antígeno no canino es un antígeno vírico aviar o bacteriano aviar. En otras realizaciones, el antígeno no canino es un antígeno vírico porcino o bacteriano porcino. En otras realizaciones más, el antígeno no canino es un antígeno vírico bovino o bacteriano bovino. En otras realizaciones más, el antígeno no canino es un antígeno vírico felino o bacteriano felino. En ciertas realizaciones, el virus paragripal recombinante es un Virus paragripal recombinante 5.

En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado canino es un coronavirus canino. En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado canino es un pneumovirus canino. En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado canino es un virus de la hepatitis infecciosa canina. En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado canino es un herpesvirus canino. En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado canino es el virus de la rabia. En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado canino es un virus diminuto canino. En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado canino es un virus de la gripe canina. En algunas realizaciones alternativas, el virus vivo atenuado es un virus de la seudorrabia.

Las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención pueden comprender un virus vivo atenuado felino. En ciertas realizaciones, el virus vivo atenuado felino es un herpesvirus felino (FHV). En otras realizaciones, el virus vivo atenuado felino es un calicivirus felino (FCV). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado felino es un pneumovirus felino (FPN). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado felino es un parvovirus felino (FPV). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado felino es un virus de la leucemia felina (FeLV). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado felino es un virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado felino es un virus de la inmunodeficiencia felina (FIV). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado felino es un virus de encefalomielitis (BDV). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado felino es el virus de la gripe felina. En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado felino es el virus de la panleucopenia felina (FPLV). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado felino es un coronavirus felino (FCoV). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado felino es el virus de la rinotraqueítis felina (FVR).

Además, la presente invención proporciona formulaciones secas de vacunas estables a la temperatura ambiente que son vacunas multivalentes. En algunas realizaciones en particular, las vacunas multivalentes de la presente invención comprenden únicamente vacunas de un virus vivo atenuado. Dichas vacunas multivalentes pueden contener cualquier combinación de virus vivos atenuados. En algunas realizaciones en particular de este tipo, la vacuna multivalente comprende el virus del moquillo vivo atenuado canino y el parvovirus vivo atenuado canino. En algunas realizaciones relacionadas, la vacuna multivalente comprende el virus del moquillo vivo atenuado canino y el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2. En otras realizaciones, la vacuna multivalente comprende el virus del moquillo vivo atenuado canino y el virus paragripal vivo atenuado canino. En otras realizaciones más, la vacuna multivalente comprende el virus del moquillo vivo atenuado canino, el parvovirus vivo atenuado canino y el virus paragripal vivo atenuado canino. En otras realizaciones más, la vacuna multivalente comprende el virus del moquillo vivo atenuado canino, el parvovirus vivo atenuado canino y el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2. En otras realizaciones más, la vacuna multivalente comprende el virus del moquillo vivo atenuado canino, el virus paragripal vivo atenuado canino y el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2. En otras realizaciones más, la vacuna multivalente comprende el virus del moquillo vivo atenuado canino, el parvovirus vivo atenuado canino, el virus paragripal vivo atenuado canino y el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2. En algunas realizaciones en particular, la vacuna multivalente comprende el virus del moquillo vivo atenuado canino, el parvovirus vivo atenuado canino, el virus paragripal vivo atenuado canino, el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2 y el coronavirus vivo atenuado canino. En algunas realizaciones relacionadas, la vacuna multivalente comprende el virus del moquillo vivo atenuado canino, el parvovirus vivo atenuado canino, el virus paragripal vivo atenuado canino, el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2 y el coronavirus vivo atenuado felino. En algunas realizaciones en particular de este tipo, la vacuna multivalente comprende el virus del

moquillo vivo atenuado canino, el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2, el parvovirus vivo atenuado canino, el virus paragripal vivo atenuado canino y el virus de la gripe vivo atenuado canino.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona formulaciones secas de vacunas multivalentes estables a la temperatura ambiente que comprenden el adenovirus vivo atenuado de tipo 2 y el virus paragripal vivo atenuado canino. En otras realizaciones más, la vacuna multivalente comprende el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2 y el parvovirus vivo atenuado canino. En otras realizaciones más, la vacuna multivalente comprende el parvovirus vivo atenuado canino y el virus paragripal vivo atenuado canino. En otras realizaciones más la vacuna multivalente comprende el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2, el parvovirus vivo atenuado canino y el virus paragripal vivo atenuado canino. En algunas realizaciones en particular de este tipo, la vacuna multivalente comprende el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2, el parvovirus vivo atenuado canino, el virus paragripal vivo atenuado canino y el virus de la gripe vivo atenuado canino.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona formulaciones secas de vacunas multivalentes estables a la temperatura ambiente que comprenden el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2 y el virus paragripal vivo atenuado canino. En otras realizaciones más, la vacuna multivalente comprende el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2 y el parvovirus vivo atenuado canino. En otras realizaciones más, la vacuna multivalente comprende el parvovirus vivo atenuado canino y el virus paragripal vivo atenuado canino. En otras realizaciones más, la vacuna multivalente comprende el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2, el parvovirus vivo atenuado canino y el virus paragripal vivo atenuado canino. En algunas realizaciones en particular de este tipo, la vacuna multivalente comprende el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2, el parvovirus vivo atenuado canino, el virus paragripal vivo atenuado canino y el virus de la gripe vivo atenuado canino.

En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, el virus vivo atenuado canino puede ser un vector vírico recombinante. En algunas realizaciones en particular, el vector vírico recombinante es un vector vírico paragripal recombinante canino. En algunas realizaciones en particular de este tipo, el vector vírico paragripal recombinante canino codifica y expresa un antígeno heterólogo. En otras realizaciones específicas, las formulaciones secas de una vacuna multivalente que comprenden un parvovirus canino (CPV) pueden comprender adicionalmente entre un 0,5 % y un 5 % (p/p) de sorbitol.

En algunas realizaciones en particular, el título de un virus vivo atenuado en las formulaciones secas de una vacuna (o de cada uno de los virus en una vacuna multivalente) de la presente invención es de entre 1×10^3 y 1×10^{10}. En algunas realizaciones más en particular, el título es de entre 1×10^4 y 1×10^9. En algunas realizaciones aún más en particular, el título es de entre 5×10^4 y 1×10^8.

Consecuentemente, la presente invención proporciona formulaciones secas de una vacuna que comprenden un virus vivo atenuado (por ejemplo, un virus canino, o un virus felino, o un virus equino, o un virus porcino, o un virus bovino, o un virus aviar), entre un 30 % y un 80 % (p/p) de un oligosacárido no reductor, entre un 5 % y un 40 % (p/p) de un estabilizante aminoácido, entre un 2 % y un 20 % (p/p) de un estabilizante proteico y un tampón que tiene un pH de entre 6,0 y 8,0. En algunas realizaciones en particular, las formulaciones secas siguen siendo eficaces durante al menos 18 meses a 27 ºC. Las formulaciones secas comprenden adicionalmente entre un 2 % y un 25 % (p/p) de un estabilizante de volumen. En unas realizaciones en particular, la proporción entre el estabilizante de volumen y el oligosacárido no reductor y/o el alcohol de azúcar es de entre 0,05 y 0,40. En algunas realizaciones aún más en particular, la proporción entre el estabilizante de volumen y el oligosacárido no reductor y/o el alcohol de azúcar es de entre 0,075 y 0,30. En algunas realizaciones aún más en particular, la proporción entre el estabilizante de volumen y el oligosacárido no reductor y/o el alcohol de azúcar es de entre 0,1 y 0,25.

En algunas realizaciones en particular, un oligosacárido no reductor de una formulación seca de una vacuna de la presente invención comprende sacarosa y/o trehalosa y/o rafinosa. En ciertas realizaciones de este tipo, el pH de la formulación seca es un pH de entre 6,0 y 7,6. En algunas realizaciones en particular de la presente invención, el estabilizante de volumen es manitol. En algunas realizaciones relacionadas, el estabilizante aminoácido es arginina. En ciertas realizaciones de este tipo, el estabilizante aminoácido comprende adicionalmente glutamato.

En algunas realizaciones específicas, la formulación seca de una vacuna de la presente invención comprende una combinación de entre un 20 % y un 80 % (p/p) de sacarosa y entre un 18 % y un 66 % (p/p) de trehalosa como el oligosacárido no reductor, entre un 5 % y un 20 % (p/p) de manitol como el estabilizante de volumen, entre un 9 % y un 34 % (p/p) del estabilizante aminoácido, una combinación de entre un 2 % y un 5 % (p/p) de gelatina y entre un 2 % y un 6 % (p/p) de un hidrolizado proteolítico de caseína completa como el estabilizante proteico, y un tampón a un pH de entre 6,2 y 7,5. En algunas realizaciones en particular de este tipo, la proporción entre el estabilizante de volumen y el oligosacárido no reductor es de entre 0,08 y 0,37.
En algunas realizaciones más específicas, el oligosacárido no reductor es una combinación de entre un 45 % y un 60 % (p/p) de sacarosa y entre un 15 % y un 25 % (p/p) de trehalosa, el estabilizante de volumen es entre un 5 % y un 17 % (p/p) de manitol, el estabilizante aminoácido es entre un 10 % y un 25 % (p/p) de arginina; el estabilizante proteico comprende entre un 1,5 % y un 3,5 % (p/p) de gelatina y entre un 2 % y un 4 % (p/p) de un hidrolizado proteolítico de caseína completa, y un tampón a un pH de entre 6,2 y 7,5. En algunas realizaciones en particular de este tipo, la proporción entre el estabilizante de volumen y el oligosacárido no reductor es de entre 0,1 y 0,3.

En ciertas realizaciones, la formulación seca de una vacuna canina de la presente invención comprende el virus del moquillo vivo atenuado canino (CDV), el adenovirus canino de tipo 2 (CAV2) y el virus paragripal canino (CPI); una combinación de entre un 15 % y un 80 % (p/p) de sacarosa y entre un 15 % y un 80 % (p/p) de trehalosa como el oligosacárido no reductor, siendo la cantidad combinada de sacarosa y trehalosa de entre un 30 % y un 80 % (p/p); entre un 2 % y un 25 % (p/p) de manitol como el estabilizante de volumen, siendo la proporción total entre el estabilizante de volumen total y el oligosacárido no reductor de entre 0,05 y 0,4; siendo el estabilizante proteico una combinación de entre un 1 % y un 10 % (p/p) de gelatina con entre un 1 % y un 10 % (p/p) de un hidrolizado proteolítico de caseína completa; entre un 6 % y un 40 % (p/p) de arginina como el estabilizante aminoácido; y un tampón a un pH de entre 6,2 y 7,5. En algunas realizaciones específicas de este tipo, la formulación seca comprende adicionalmente uno o más, o todos los siguientes: (i) entre un 0,5 % y un 5,0 % de ecotoína, (ii) entre un 5 % y un 15 % de glutamato, (iii) entre un 0,02 % y un 1 % de $MgSO_4$ y (iv) el parvovirus vivo atenuado canino (CPV) con entre un 2 % y un 5 % de sorbitol. En algunas realizaciones más específicas, el tampón es entre un 0,1 % y un 2 % de fosfato de potasio o de sodio, a un pH de entre 6,2 y 7,5.

En algunas realizaciones más en particular, la formulación seca de una vacuna canina de la presente invención comprende el CDV, el CAV2 y el CPI vivos atenuados; una combinación de entre un 20 % y un 80 % (p/p) de sacarosa y entre un 18 % y un 66 % (p/p) de trehalosa como el oligosacárido no reductor, siendo la cantidad combinada de sacarosa y trehalosa de entre un 45 % y un 79 % (p/p); entre un 5 % y un 17 % (p/p) de manitol como el estabilizante de volumen, siendo la proporción entre el estabilizante de volumen total y el oligosacárido no reductor total de entre 0,08 y 0,37; siendo el estabilizante proteico una combinación de entre un 2 % y un 5 % (p/p) de gelatina con entre un 2 % y un 6 % (p/p) de un hidrolizado proteolítico de caseína completa; siendo el estabilizante aminoácido entre un 9 % y un 34 % (p/p) de arginina; y un tampón a un pH de entre 6,5 y 7,2.

En algunas realizaciones específicas de este tipo, la formulación seca comprende adicionalmente uno o más, o todos los siguientes: (i) entre un 1 % y un 3 % de ecotoína, (ii) entre un 7 % y un 12 % de glutamato, (iii) entre un 0,05 % y un 0,5 % de $MgSO_4$ y (iv) el CPV vivo atenuado con entre un 3 % y un 4 % de sorbitol. En algunas realizaciones específicas, el tampón es entre un 0,2 % y un 1 % de fosfato de potasio o de sodio, a un pH de entre 6,5 y 7,2. En ciertas realizaciones de estos tipos, la formulación seca de la vacuna sigue siendo eficaz durante al menos 18 meses a 27 ºC.

En un aspecto alternativo, la presente invención proporciona formulaciones secas de vacunas que comprenden un parvovirus vivo atenuado, por ejemplo, el parvovirus canino (CPV), entre un 10 % y un 80 % (p/p) de un alcohol de azúcar, entre un 10 % y un 70 % (p/p) de un estabilizante de volumen, entre un 4 % y un 50 % (p/p) de un estabilizante proteico y un tampón que tiene un pH de entre 6,8 y 8,0. En algunas realizaciones en particular de este tipo, la formulación seca comprende adicionalmente entre un 10 % y un 50 % (p/p) de un estabilizante aminoácido. En ciertas realizaciones, la formulación seca de la vacuna sigue siendo eficaz durante al menos 18 meses a 27 ºC.

En algunas realizaciones más en particular, la presente invención proporciona formulaciones secas de vacunas que comprenden un parvovirus vivo atenuado, por ejemplo, el CPV, entre un 23 % y un 49 % (p/p) de un alcohol de azúcar, entre un 16 % y un 50 % (p/p) de un estabilizante de volumen, entre un 7 % y un 36 % (p/p) de un estabilizante proteico y un tampón que tiene un pH de entre 7,0 y 7,4. En algunas realizaciones aún más en particular de este tipo, la formulación seca comprende adicionalmente entre un 25 % y un 36 % (p/p) de un estabilizante aminoácido. En ciertas realizaciones, la formulación seca de la vacuna sigue siendo eficaz durante al menos 18 meses a 27 ºC.

El alcohol de azúcar de las formulaciones secas de estas vacunas monovalentes de parvovirus, por ejemplo, vacunas monovalentes del CPV, puede ser sorbitol, manitol, xilitol, maltitol y combinaciones de los mismos, el estabilizante de volumen puede ser dextrano, maltodextrina, polivinilpirrolidona, hidroxietil almidón, glicina, o cualquier combinación de los mismos. El estabilizante proteico puede ser gelatina, un hidrolizado de caseína completa, o una combinación de los dos. En ciertas realizaciones de este tipo, el hidrolizado de caseína completa es un hidrolizado proteolítico de caseína completa. En algunas realizaciones en particular, el alcohol de azúcar es sorbitol, el estabilizante de volumen es una combinación de dextrano y glicina, y el estabilizante proteico es una combinación de gelatina y un hidrolizado proteolítico de caseína completa.

En algunas realizaciones más en particular, la presente invención proporciona formulaciones secas de vacunas que comprenden un parvovirus vivo atenuado, por ejemplo, el CPV, entre un 10 % y un 80 % (p/p) de sorbitol como el alcohol de azúcar, una combinación de entre un 5 % y un 30 % (p/p) de glicina y entre un 5 % y un 40 % (p/p) de dextrano como el estabilizante de volumen, una combinación de entre un 2 % y un 25 % (p/p) de gelatina con entre un 2 % y un 25 % (p/p) de un hidrolizado proteolítico de caseína completa como el estabilizante proteico; y un tampón que tiene un pH de entre 6,5 y 7,8. En ciertas realizaciones de este tipo, se incluye entre un 10 % y un 50 % (p/p) de arginina como un estabilizante aminoácido. En algunas realizaciones específicas, el tampón es entre un 0,2 % y un 5 % (p/p) de fosfato de potasio o de sodio, a un pH de entre 6,5 y 7,8. En ciertas realizaciones, la formulación seca de la vacuna sigue siendo eficaz durante al menos 18 meses a 27 ºC.

En algunas realizaciones aún más en particular, la presente invención proporciona formulaciones secas de vacunas que comprenden un parvovirus vivo atenuado, por ejemplo, el CPV, entre un 23 % y un 49 % (p/p) de sorbitol como el

alcohol de azúcar, una combinación de entre un 8 % y un 17 % (p/p) de glicina y entre un 8 % y un 33 % (p/p) de dextrano como el estabilizante de volumen, una combinación de entre un 3 % y un 18 % (p/p) de gelatina con entre un 4 % y un 18 % (p/p) de un hidrolizado proteolítico de caseína completa como el estabilizante proteico; y un tampón que tiene un pH de entre 7,0 y 7,4. En ciertas realizaciones de este tipo, se incluye entre un 25 % y un 36 % (p/p) de arginina como un estabilizante aminoácido. En algunas realizaciones específicas, el tampón es entre un 0,5 % y un 2 % (p/p) de fosfato de potasio o de sodio, a un pH de entre 7,0 y 7,4. En ciertas realizaciones, la formulación seca de la vacuna sigue siendo eficaz durante al menos 18 meses a 27 ºC.

En algunas realizaciones en particular, el parvovirus canino (CPV) es un parvovirus canino 2 (CPV-2). En otra realización en particular de este tipo, el parvovirus canino es un parvovirus canino 2a (CPV-2a). En otra realización más en particular de este tipo, el parvovirus canino es un parvovirus canino 2b (CPV-2b). En otra realización aún más en particular de este tipo, el parvovirus canino es un parvovirus canino 2c (CPV-2c). En una realización específica de este tipo, el CPV-2c es el nº de registro de la ATCC PTA-13492. En otra realización más, el parvovirus canino es un parvovirus canino recombinante que ha sido construido para que comprenda un genoma heterogéneo CPV-2c/CPV-2, es decir, la región que codifica las proteínas de la cápside es de una cepa del CPV-2c, y la región que codifica las proteínas no estructurales es de una cepa del CPV-2 [véase el documento U.S. 2012/0328652 A1, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside en el genoma del CPV-2 ha sido sustituida por la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside de un CPV-2c, dando así como resultado el genoma heterogéneo CPV-2c/CPV-2].
Como parte del proceso para la elaboración de las formulaciones secas estables de vacunas con microbios vivos atenuados de la presente invención, antes de ser secadas, las correspondientes formulaciones de vacuna líquida pueden ser aplicadas a una membrana y/o congeladas en microesferas y/o congeladas en recipientes tales como viales y/o secadas por pulverización y/o liofilizadas por pulverización.

Las formulaciones secas estables de la presente invención pueden ser usadas en métodos para ayudar en la protección de un animal, (por ejemplo, un felino o un canino) frente a una enfermedad clínica que aparece por una infección (por ejemplo, por un virus felino o canino) que comprende la administración de una vacuna reconstituida de la presente invención al animal. La administración puede llevarse a cabo mucosalmente. La administración puede llevarse a cabo parenteralmente. La administración puede llevarse a cabo intradérmicamente. La administración puede llevarse a cabo transdérmicamente. Una vacuna de la presente invención puede ser administrada al animal subcutáneamente. Una vacuna de la presente invención puede ser administrada al animal intramuscularmente. Las formulaciones secas estables de la presente invención pueden ser usadas como vacunas primarias y/o de refuerzo.

En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de un virus vivo atenuado es una cantidad terapéuticamente eficaz de un virus vivo atenuado canino. En algunas realizaciones específicas de este tipo, la cantidad terapéuticamente eficaz de un virus vivo atenuado canino incluye las cantidades terapéuticamente eficaces de un virus vivo atenuado del moquillo canino, y/o de un adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2, y/o de un parvovirus vivo atenuado canino, y/o de un virus paragripal vivo atenuado canino.

Adecuadamente, el sujeto animal es un camino y el método comprende la administración al canino de una vacuna reconstituida estable a la temperatura ambiente de la presente invención que comprende un virus vivo atenuado. La vacuna estable a la temperatura ambiente puede comprender el virus vivo atenuado del moquillo canino, el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2 y el virus paragripal vivo atenuado canino. En ciertas realizaciones de este tipo, la vacuna estable a la temperatura ambiente comprende el virus vivo atenuado del moquillo canino, el adenovirus vivo atenuado canino de tipo 2, el virus paragripal vivo atenuado canino y bien el virus vivo atenuado de la gripe canino o bien el parvovirus vivo atenuado canino, o como alternativa, tanto el virus vivo atenuado de la gripe canino como el parvovirus vivo atenuado canino.

Consecuentemente, la presente invención también proporciona una vacuna reconstituida formada por una cualquiera o más de las formulaciones secas según se proporcionan en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones en particular, la presente invención proporciona una vacuna multivalente elaborada a partir de la combinación de una formulación seca de una vacuna trivalente del CDV, el CAV2 y el CPI con una formulación seca aparte de una vacuna monovalente del CPV, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se proporcionan los métodos para la elaboración y/o el almacenamiento a la temperatura ambiente (por ejemplo, a 22-27 ºC) de cualquiera y todas las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención. El método comprende la preparación de una formulación de vacuna mediante la combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de un virus vivo atenuado felino o canino con entre un 8 % y un 30 % (p/v) de un oligosacárido no reductor, entre un 1 % y un 6 % (p/v) de un estabilizante de volumen, entre 0,1 M y 0,5 M de un estabilizante aminoácido, entre un 0,9 % y un 10 % (p/v) de un estabilizante proteico y un tampón que tiene un pH de entre 6,0 y 8,0, en la que la proporción entre el estabilizante de volumen y el oligosacárido no reductor es de entre 0,05 y 0,40. Después, la formulación de vacuna se seca a vacío para elaborar una formulación seca estable a la temperatura ambiente. La temperatura en el interior del liofilizador puede aumentarse durante este proceso para acelerar la eliminación de la humedad. Preferiblemente, la formulación seca de la vacuna sigue siendo eficaz durante al menos 18 meses cuando se almacena a 27 ºC.

En ciertas realizaciones, también se incluye entre un 0,5 % y un 5 % (p/v) de sorbitol. En algunas realizaciones en particular, el estabilizante de volumen es manitol. En ciertas realizaciones, el estabilizante aminoácido es arginina. En otras, el estabilizante aminoácido es glutamato. En otras realizaciones más, el estabilizante aminoácido es una combinación de arginina y glutamato.

Los métodos de elaboración de cualquiera y todas las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención pueden incluir, antes de su secado, la aplicación de la formulación de vacuna líquida a una membrana, y/o su congelación en microesferas, y/o su congelación en viales, y/o su secado por pulverización, y/o su liofilización por pulverización.

En algunas realizaciones en particular de los métodos de elaboración de una vacuna estable a la temperatura ambiente, el método comprende la combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de un virus vivo atenuado con el oligosacárido no reductor, que es una combinación de entre un 5 % y un 18 % (p/v) de sacarosa y 5 % y un 18 % (p/v) de trehalosa, entre un 2 % y un 4 % (p/v) del estabilizante de volumen, entre 0,1 M y 0,3 M del estabilizante aminoácido y entre un 1,5 % y un 6 % (p/v) del estabilizante proteico. En algunas realizaciones más en particular, la proporción entre el estabilizante de volumen y el oligosacárido no reductor es de entre 0,08 y 0,37. En ciertas realizaciones, el virus vivo atenuado es un virus vivo atenuado canino. En algunas realizaciones relacionadas, el virus vivo atenuado es un virus vivo atenuado felino.

Estos y otros aspectos de la presente invención se apreciarán mejor mediante referencia a la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona vacunas de virus vivos atenuados y/o composiciones inmunógenas seguras y eficaces que pueden ser almacenadas en forma de formulaciones secas a la temperatura ambiente y seguir siendo seguras y eficaces durante 12, o 18, o incluso 24 meses o más tiempo. Consecuentemente, una ventaja importante de las vacunas de las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de la presente invención es que pueden eliminar la necesidad de su almacenamiento tanto en una nevera como en un congelador. Esto reduce significativamente el gasto de almacenamiento, particularmente en ubicaciones remotas, y adicionalmente elimina la necesidad de estimar si la vacuna ha permanecido segura y eficaz después del almacenamiento en una nevera o en un congelador que se ha estropeado.

Además, sorprendentemente, las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de virus vivos de la presente invención pueden incluir virus vivos atenuados de cualquier tipo. Por lo tanto, las formulaciones estables a la temperatura ambiente de las vacunas de microbios vivos de la presente invención pueden incluir virus tanto con cubierta como sin cubierta. Además, las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de microbios vivos de la presente invención pueden incluir virus vivos atenuados que tienen genomas de ARN monocatenario, genomas de ADN monocatenario o genomas de ADN bicatenario. En un aspecto de la presente invención, las vacunas de virus vivos de la presente invención incluyen virus vivos atenuados caninos y/o felinos. La presente invención también proporciona vacunas estables a la temperatura ambiente que son vacunas multivalentes. Además, las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención pueden comprender adicionalmente un virus muerto y/o una bacteria muerta (por ejemplo, una vacuna bacteriana) y/o una sub-fracción de una vacuna bacteriana, y/o una subunidad del virus o de la bacteria (por ejemplo, un antígeno proteico).

Además, las formulaciones de virus vivos estables a la temperatura ambiente de la presente invención pueden comprender vectores recombinantes, tales como vectores víricos recombinantes (incluyendo baculovirus recombinantes) que están solos, y/o con otros de dichos vectores víricos recombinantes, y/o con virus vivos atenuados y/o junto con bacterias muertas y/o virus muertos, por ejemplo, virus caninos muertos. Dichos vectores víricos recombinantes pueden codificar adicionalmente uno o más antígenos heterólogos víricos o bacterianos. Un ejemplo en particular de dicho vector recombinante es un virus paragripal recombinante, por ejemplo, un virus paragripal canino. Un vector vírico paragripal recombinante es un Virus paragripal recombinante 5, que recientemente ha sido descrito por Li *et al.,* [*J. of Virology* 87 (10) 5985-5993 (2013); incorporado al presente documento como referencia en su totalidad]. Dichos vectores víricos recombinantes, por ejemplo, un Virus paragripal recombinante 5 o un vector vírico paragripal recombinante canino, pueden codificar un antígeno heterólogo de un virus canino, y/o de un virus felino, y/o de un virus equino, y/o de un virus humano, y/o de un virus símico, y/o de un virus bovino, y/o de un virus ovino, y/o de un virus porcino, y/o de un virus aviar (por ejemplo, un virus de pollo). En algunas realizaciones en particular, las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención comprenden un virus paragripal recombinante (por ejemplo, el Virus paragripal recombinante 5 o un virus paragripal recombinante canino) que codifica uno o más antígenos de uno o más virus de pollo y/o de bacterias que infectan a los pollos.

En algunas realizaciones alternativas de la presente invención, las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención pueden comprender virus vivos atenuados bovinos y/o bacterias que infectan al ganado vacuno. En algunas realizaciones específicas, la vacuna estable a la temperatura ambiente comprende el virus BVDV1 vivo atenuado, el BVDV2 vivo atenuado y el IBR vivo atenuado. En otras realizaciones, la vacuna estable a la temperatura ambiente comprende el virus BVDV1 vivo atenuado, el BVDV2 vivo atenuado, el PI3

vivo atenuado y el BRSV vivo atenuado. En otras realizaciones más, la vacuna estable a la temperatura ambiente comprende el BVDV1 vivo atenuado, el BVDV2 vivo atenuado, el virus PI3 vivo atenuado, el virus IBR vivo atenuado y el BRSV vivo atenuado. En otras realizaciones más, la vacuna estable a la temperatura ambiente comprende el BVDV1 vivo atenuado, el BVDV2 vivo atenuado, el virus PI3 vivo atenuado, el virus IBR vivo atenuado, el BRSV vivo atenuado y un BRCV vivo atenuado. Cualquiera de las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención también puede combinarse con uno o más antígenos bacterianos atenuados o muertos, tales como *Pasteurella* multocida, *Mannheimia* haemolytica, *Histophilus* somni y *Mycoplasma* bovis, antes de su administración. Una de dichas realizaciones es la vacuna estable a la temperatura ambiente comprende el BVDV1 vivo atenuado, el BVDV2 vivo atenuado, el virus PI3 vivo atenuado, el virus IBR vivo atenuado y el BRSV vivo atenuado (el BRCV más o menos vivo atenuado) con *Pasteurella* multocida viva atenuada, *Mannheimia* haemolytica viva atenuada y *Histophilus* somni viva atenuada. En algunas realizaciones en particular, la presente invención proporciona métodos que comprenden la administración a un bovino de una vacuna estable a la temperatura ambiente de la presente invención que comprende un virus vivo atenuado bovino.

Las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención pueden comprender, como alternativa, virus y/o bacterias aviares vivos atenuados que infectan a las aves. En ciertas realizaciones, el virus aviar vivo atenuado es el virus de la bronquitis infecciosa (IBV). En otras realizaciones, el virus aviar vivo atenuado es el virus de la enfermedad infecciosa de las bolsas sinoviales (IBDV). En más realizaciones, el virus aviar vivo atenuado es el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). En otras realizaciones más, el virus aviar vivo atenuado es la laringotraqueítis infecciosa (ILTV). En otras realizaciones más, el virus aviar vivo atenuado es el metaneumovirus aviar (aMPV). En otras realizaciones más, el virus aviar vivo atenuado es el virus de la enfermedad de Marek (MDV). En otras realizaciones más, el virus aviar vivo es el Herpes Virus de los pavos (HVT). [El HVT no es patógeno en pollos].

Los virus aviares vivos también pueden ser vectores recombinantes. Esto es especialmente cierto para el HVT y los otros dos MDV, es decir, el MDV1 y el MDV2. Los vectores de HVT recombinantes que codifican los antígenos del virus de la enfermedad de Newcastle o de la laringotraqueítis infecciosa están fácilmente disponibles comercialmente. Más recientemente se han descrito dos vectores únicos de HVT recombinantes que codifican los antígenos tanto del NDV como del ILTV o tanto del NDV como del IBDV [véase el documento U.S. 2013/0101619 A1 y el documento WO2013057235 A1, respectivamente]. Las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención pueden comprender cualquiera de estos vectores víricos recombinantes aviares tanto individualmente como en cualquier combinación, según se describe en el presente documento. Además, cualquiera de las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención que comprenden una o más vacunas de vivos virus aviares pueden comprender adicionalmente un virus muerto y/o una bacteria muerta y/o una sub-fracción de una vacuna bacteriana, o incluso un parásito, tal como una *Eimeria* viva, que puede estar atenuado o no atenuado. En algunas realizaciones en particular, la presente invención proporciona métodos que comprenden la administración a aves, por ejemplo, a un pollo, de una vacuna estable a la temperatura ambiente de la presente invención que comprende un virus aviar vivo atenuado.

En otro aspecto más, una formulación seca de una vacuna estable a la temperatura ambiente de la presente invención puede comprender un virus vivo atenuado porcino. En ciertas realizaciones, el virus vivo atenuado porcino es el virus de la gastroenteritis transmisible (TGE). En otras realizaciones, el virus vivo atenuado porcino es el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS). En más realizaciones, el virus vivo atenuado porcino es el virus de la diarrea epidémica porcina (PED). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado porcino es el virus de la gripe porcina (SIV). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado porcino es el rotavirus porcino (PRV). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado porcino es el parvovirus porcino (PPV). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado porcino es el virus de la seudorrabia porcina (PPRV). En otras realizaciones más, el virus vivo atenuado porcino es el circovirus porcino (PCV).

Las vacunas multivalentes de la presente invención pueden contener cualquier combinación de virus porcinos. En ciertas realizaciones, las vacunas multivalentes de la presente invención comprenden tanto virus porcinos muertos como virus porcinos vivos atenuados. En una realización en particular de este tipo, la vacuna multivalente comprende un virus de la gripe porcina muerto SIV, un circovirus muerto porcino o una subunidad (PCV) [que incluye antígenos del PCV expresados en baculovirus, véase el documento US 8.008.001], junto con el virus de la gastroenteritis transmisible vivo atenuado (TGE) y el parvovirus vivo atenuado porcino (PPV). En una realización relacionada, la vacuna multivalente comprende el antígeno del circovirus porcino muerto (PCV), el virus de la gripe porcina muerto (SIV) de múltiples serotipos y muertos, junto con el virus de la gastroenteritis transmisible vivo atenuado (TGE) y el rotavirus vivo atenuado porcino (PRV). En algunas realizaciones en particular, la presente invención proporciona métodos que comprenden la administración a un porcino de una vacuna estable a la temperatura ambiente de la presente invención que comprende un virus vivo atenuado porino. En algunas realizaciones relacionadas, la vacuna multivalente comprende un antígeno del circovirus porcino vivo atenuado y/o inactivado y/o de subunidad (PCV), un antígeno del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino vivo atenuado y/o inactivado y/o de subunidad (PRRS), y/o un antígeno del virus de la diarrea epidémica porcina vivo atenuado y/o inactivado o de subunidad (PED).

Las vacunas de virus vivo atenuado porcino estables a la temperatura ambiente de la presente invención pueden comprender adicionalmente un virus muerto y/o una bacteria muerta (por ejemplo, una vacuna bacteriana) y/o una

sub-fracción de una vacuna bacteriana. En algunas realizaciones en particular de este tipo, la vacuna multivalente comprende un antígeno de pilus de toxoide inactivado de *Clostridium perfringens*, extraído de bacterias *E. coli* de cualquiera de los siguientes serotipos: K99, K88, 987P o F41, junto con el virus de la gastroenteritis transmisible vivo atenuado (TGE) y el parvovirus vivo atenuado porcino (PPV). En una realización relacionada, la vacuna porcina multivalente comprende un antígeno o una subunidad de circovirus porcino muerto (PCV), de *Mycoplasma hyopneumonia* (M. hyo) muerta, una vacuna bacteriana inactivada o de microbios vivos atenuados de *Lawsonia intracellularis*, junto con el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino vivo atenuado y/o inactivado (PRRS) y/o el virus de la diarrea epidémica porcina vivo atenuado o inactivado (PED).

Las formulaciones secas estables a la temperatura ambiente de las vacunas de la presente invención incluyen al menos un estabilizante de azúcar, al menos un estabilizante proteico y al menos un tampón para mantener la forma líquida de la vacuna a un pH de entre pH 6,0 y 8,0. También se añade al menos un estabilizante de volumen. Las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención se almacenan, por lo tanto, en forma de formulaciones secas. Dichas formulaciones secas pueden ser preparadas mediante métodos que incluyen la liofilización en microesferas, por ejemplo, tales como esferas conocidas como liosferas y/o esfereones, producidas mediante un método descrito previamente [véase, por ejemplo, el documento WO 2010/125084; el documento US 2012/0049412 A1; y el documento US 2014/0017318] o en forma de una torta, por ejemplo, en viales, o secas sobre una matriz sólida, por ejemplo, sobre una membrana o un filtro, o como alternativa, secas en forma de un polvo, o secadas por pulverización o liofilizadas.

Las fracciones inmunógenas activas de las vacunas monovalentes o multivalentes pueden comprender uno o más virus y/o bacterias. Consecuentemente, las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención pueden ser liofilizadas (o de otro modo reducidas en volumen de líquido) para su almacenamiento, y después reconstituidas en un vehículo líquido, por ejemplo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como agua para vacunas u otro diluyente, antes o en el momento de la administración. En algunas realizaciones en particular, el diluyente comprende uno o más de otros antígenos víricos y/o bacterianos. Alternativamente, las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención pueden ser inyectadas en forma de un sólido, por ejemplo, cuando el sólido es un polvo y el inyector es un inyector de polvo sin aguja, tal como PowderJect®.

El uso de los términos en singular por conveniencia en la descripción no pretende en modo alguno estar limitado a los mismos. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un “estabilizante de azúcar” incluye la referencia a uno o más de dichos estabilizantes de azúcar, salvo que se especifique de otro modo. El uso de los términos en plural tampoco pretende ser limitante, salvo que se especifique de otro modo.
De forma análoga, un compuesto químico que pueda estar indicado como un ácido o su correspondiente base cuando se representa en el presente documento como cualquiera de los dos, pretende indicar cualquiera de las formas del compuesto, salvo que se especifique de otro modo. Por lo tanto, el uso del término ácido glutámico pretende incluir el glutamato, y viceversa.

Según se usa en el presente documento, una “vacuna” es una composición que es adecuada para su aplicación a un animal (incluyendo, en ciertas realizaciones, los seres humanos) que, tras la administración al animal, induce una respuesta inmunitaria lo suficientemente fuerte como para ayudar mínimamente en la protección frente a una enfermedad clínica que aparece debido a una infección por un microorganismo natural, es decir, lo suficientemente fuerte para ayudar en la prevención de la enfermedad clínica, y/o en la prevención, la mejora o la curación de la enfermedad clínica. Salvo que expresamente se indique de otro modo, el uso del término vacuna incluye vacunas multivalentes.

Según se usa en el presente documento, una vacuna “eficaz” conserva un título suficiente de un antígeno dado para cumplir con los requisitos normativos para ese antígeno para la jurisdicción en la que se administra la vacuna, por ejemplo, la administración de una vacuna animal en los Estados Unidos está gobernada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).

Según se usa en el presente documento, una “vacuna multivalente” es una vacuna que comprende dos o más antígenos diferentes. En una realización en particular de este tipo, la vacuna multivalente estimula el sistema inmunitario del receptor frente a dos o más patógenos diferentes.

Según se usa en el presente documento, una formulación seca “estable a la temperatura ambiente” de una vacuna es una formulación seca de una vacuna (incluyendo una vacuna multivalente) que sigue siendo eficaz durante al menos un año cuando se almacena a 27 ºC. En algunas realizaciones en particular, una formulación seca de una vacuna estable a la temperatura ambiente sigue siendo eficaz cuando se almacena a 27 ºC durante al menos 1,5 años. En algunas realizaciones más en particular, una formulación seca de una vacuna estable a la temperatura ambiente sigue siendo eficaz cuando se almacena a 27 ºC durante al menos 2 años. En algunas realizaciones aún más en particular, una formulación seca de una vacuna estable a la temperatura ambiente sigue siendo eficaz cuando se almacena a 27 ºC durante al menos entre 2,5 y 3 años.

Según se usa en el presente documento, una “formulación seca” de una vacuna se prepara mediante la eliminación del líquido de una vacuna que ha sido formulada en una solución. La eliminación del líquido puede llevarse a cabo,

por ejemplo, mediante una evaporación, tal como mediante la aplicación de la vacuna líquida sobre un sustrato sólido y la evaporación del líquido, y/o mediante una sublimación tal como mediante una liofilización. Las vacunas de la presente invención se almacenan en forma de formulaciones secas generalmente con entre un 0,5 % y un 10,0 % (p/p) de contenido en humedad residual (RMC). Las formulaciones secas pueden ser reconstituidas en un vehículo farmacéuticamente aceptable antes de su administración. En algunas realizaciones en particular, las vacunas de la presente invención se almacenan en forma de formulaciones secas que comprenden entre un 0,5 % y un 5 % (p/p) de contenido en humedad residual. En algunas realizaciones más en particular, las vacunas de la presente invención se almacenan en forma de formulaciones secas que comprenden entre un 0,5 % y un 3 % (p/p) de contenido en humedad residual.

Debido a que las vacunas de la presente invención se almacenan en forma de formulaciones secas, una “vacuna” de la presente invención también se refiere a las formulaciones que comprenden uno o más antígenos que son almacenados en forma de formulaciones secas. Según se ha establecido más arriba, poco tiempo antes de su administración, estas formulaciones secas pueden combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los antígenos de una vacuna multivalente pueden ser almacenados en la misma formulación seca o en formulaciones secas individuales. Consecuentemente, para ciertas vacunas multivalentes, los antígenos de vacuna individuales se almacenan por separado en forma de formulaciones secas individuales, y después, después antes de su administración, se combinan junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar la vacuna multivalente. Alternativamente, pueden combinarse y almacenarse múltiples antígenos de vacuna en forma de una formulación seca individual y después, antes de su administración, pueden mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más de otros antígenos de vacuna que hayan sido almacenados en una o más formulación(es) seca(s) individual(es).

Según se usa en el presente documento, el término “vehículo” se refiere a un diluyente, un adyuvante, un excipiente o un soporte con el que se administra el compuesto.

Según se usa en el presente documento, el término “farmacéuticamente aceptable” se usa en forma adjetiva para significar que el pronombre modificado es apropiado para su uso en un producto farmacéutico. Cuando se usa, por ejemplo, para describir un excipiente en una vacuna farmacéutica, caracteriza el excipiente por ser compatible con los demás ingredientes de la composición y por no ser desventajosamente perjudicial para el receptor previsto, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y/o aceites, incluyendo los que tienen como origen el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Puede emplearse agua o soluciones salinas de una solución acuosa y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos, particularmente para soluciones inyectables. En algunas realizaciones en particular, el vehículo farmacéuticamente aceptable es, y/o contiene, un adyuvante. En ciertas realizaciones, un vehículo farmacéuticamente aceptable puede comprender adicionalmente uno o más antígenos de vacuna que, antes de su administración, pueden ser combinados con una formulación seca de una vacuna de la presente invención.

Según se usa en el presente documento, un “adyuvante” es una sustancia que es capaz de favorecer o de amplificar la cascada de acontecimientos inmunológicos, dando lugar finalmente a una mejor respuesta inmunológica, es decir, la respuesta integrada del cuerpo frente a un antígeno. Un adyuvante, en general, no es necesario para que se produzca la respuesta inmunológica, pero favorece o amplifica esta respuesta.

Según se usa en el presente documento, los términos “proteger”, “protegiendo”, “proporcionar protección a”, “proporcionando protección a” y “ayuda a la protección” no requieren una protección completa frente a cualquier señal de infección. Por ejemplo, “ayuda a la protección” puede significar que la protección es suficiente de forma que, después de la exposición, los síntomas de la infección subyacente son al menos reducidos, y/o que una o más de las causas celulares, fisiológicas o bioquímicas subyacentes o los mecanismos que causan los síntomas se reducen y/o se eliminan. Se entiende que “reducido”, según se usa en este contexto, significa relativo al estado de la infección, incluyendo el estado molecular de la infección, no solo el estado fisiológico de la infección.

Según se usa en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad de un antígeno dado, por ejemplo, de un virus vivo atenuado, que es suficiente para proporcionar protección a, y/o ayudar en, la protección frente al patógeno cuyo antígeno se está administrando frente al cual hay que proteger, cuando se proporciona en una única administración y/o cuando esté previsto, proporcionado en forma de una administración inicial con una o más administraciones de refuerzo posteriores.

Según se usa en el presente documento, “administración sistémica” es la administración en el sistema circulatorio del cuerpo (que comprende el sistema cardiovascular y el linfático), afectando por lo tanto al cuerpo como un todo en lugar de a un lugar específico, tal como el tracto gastrointestinal (a través, por ejemplo, de una administración oral o rectal) y al sistema respiratorio (a través, por ejemplo, de una administración intranasal). La administración sistémica puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la administración en un tejido muscular (intramuscular), en la dermis (intradérmica, transdérmica o supradérmica), por debajo de la piel (subcutánea), por debajo de la mucosa (submucosa), en las venas (intravenosa) etc.
La “administración parenteral” incluye inyecciones subcutáneas, inyecciones submucosas, inyecciones intravenosas,

inyecciones intramusculares, inyecciones intradérmicas e infusión.

Según se usa en el presente documento, los términos 'ganado" y "animal de ganado" incluyen ganado vacuno, cerdos y aves. Según se usa en el presente documento, los términos "bovino" y "ganado vacuno" se usan de forma intercambiable, salvo que se indique de otro modo. De forma análoga, los términos "porcino" y "cerdo" se usan de forma intercambiable, salvo que se indique de otro modo. Según se usa en el presente documento los términos, "aviar" y "ave" se usan de forma intercambiable, pretendiendo incluir ambos términos las aves. Según se usa en el presente documento, el término "aves" puede incluir pollos, patos, patos, gansos, perdiz y faisanes.

Según se usa en el presente documento el término "animal de compañía" incluye caninos, felinos y equinos.

Según se usa en el presente documento, el término "felino" se refiere a cualquier miembro de la familia *Felidae*. Algunos miembros de esta familia incluyen miembros salvajes, de zoo y domésticos, tales como cualquier miembro de las subfamilias *Felinae,* por ejemplo*,* gatos, leones, tigres, pumas, jaguares, leopardos, leopardos de nieve, panteras, leones de la montaña de Norteamérica, guepardos, linces, gatos monteses, caracales o cualquier cruce de los mismos. Los gatos también incluyen los gatos domésticos, los gatos de compañía de pura raza y/o mestizos, los gatos de exhibiciones, los gatos de laboratorio, los gatos clonados y los gatos salvajes o silvestres.

Según se usa en el presente documento, el término "canino" incluye todos los perros domésticos, *Canis lupus familiaris* o C*anis familiaris,* salvo que se indique de otro modo.

El parvovirus canino "CPV" se aisló por primera vez en 1978 y se denominó CPV-2 para distinguirlo del virus diminuto del parvovirus canino (CMV o CPV-1). Aproximadamente un año después del aislamiento inicial del CPV-2, se identificó una variante genética, el CPV-2a. A mediados de los años 80 se identificó una segunda variante genética, el CPV-2b. El CPV-2a y el CPV-2b pronto desplazaron completamente al CPV-2. Hoy en día, el CPV-2a ya no se detecta en los Estados Unidos [Parrish y Kawaoka, *Annu Rev. Microbiol,* 59: 553-586 (2005)]. Una cuarta variante del CPV en esta familia, el CPV-2c, fue descrita por primera vez en 2000 [véase el documento U.S. 8.227.593; el documento U.S. 8.258.274; Hong *et al., J. Vet. Diagn. Invest.* (5): 535-9 (2007)]. Las solicitudes provisionales de Estados Unidos 61/739.067, presentada el 19 de diciembre de 2012, y 61/778.751, presentada el 16 de marzo de 2013, describen una cepa específica atenuada del CPV-2c (nº de registro de la ATCC PTA-13492) que fue depositada el 24 de enero de 2013 en la American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, Estados Unidos, en unas condiciones que cumplen los requisitos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimiento de Patente. Además, se ha construido un parvovirus canino recombinante que comprende un genoma heterogéneo CPV-2c/CPV-2, es decir, la región que codifica las proteínas de la cápside de una cepa del CPV-2c y la región que codifica las proteínas no estructurales de una cepa del CPV-2 [documento WO2011107534 (A1); documento US 20120328652; documento WO2012007589 (A1), en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside en el genoma del CPV-2 ha sido sustituida por la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside de un CPV-2c, dando así como resultado el genoma heterogéneo CPV-2c/CPV-2]. Según se usa en el presente documento, una vacuna de la presente invención que comprende un "parvovirus canino" puede comprender uno o más de estos tipos/variantes/cepas del CPV, incluyendo el recientemente construido parvovirus canino recombinante que comprende el genoma heterogéneo CPV-2c/CPV-2.

Según se usa en el presente documento, un "oligosacárido no reductor" es un carbohidrato que consiste en entre dos y diez residuos de monosacárido unidos a través de enlaces glicosídicos y que, en un medio acuoso básico, no generan ningún compuesto que contenga un grupo aldehído. Algunos ejemplos de oligosacáridos no reductores de la presente invención incluyen sacarosa, trehalosa y rafinosa.

Según se usa en el presente documento, un "estabilizante de azúcar" es un oligosacárido no reductor (por ejemplo*,* véase más arriba) o un "alcohol de azúcar"/poliol (por ejemplo*,* sorbitol, manitol, arabitol, inositol, maltitol).

Según se usa en el presente documento, un "estabilizante de volumen" es un compuesto que ayuda en la estabilización de una vacuna a unas temperaturas elevadas, es decir, a 25 º- 30 ºC o más. Algunos ejemplos de dichos estabilizantes de volumen son manitol, glicina, dextrano, maltodextrina, polivinilpirrolidona, hidroxietil almidón, polietilenglicol (PEG, con un intervalo de peso molecular de entre 400 daltons y 20 kilodaltons), o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones en particular, el "estabilizante de volumen" es manitol.
Según se usa en el presente documento, salvo que específicamente se establezca lo contrario, el porcentaje (%) de un aditivo sólido, por ejemplo*,* de un oligosacárido no reductor o de un estabilizante proteico, en una vacuna, puede ser proporcionado en peso/peso (p/p) y/o basado en una solución al 1 % que es 1 g de sólido/100 ml de volumen de vacuna, peso/volumen (p/v).
Según se usa en el presente documento, salvo que específicamente se establezca lo contrario, el porcentaje (%) de un aditivo líquido, por ejemplo, etanol, en una vacuna se basa en una solución al 1 % que es 1 ml de aditivo líquido /100 ml de volumen de vacuna (v/v).

Según se proporciona en el presente documento, una proporción de los dos reactivos en una formulación dada, por ejemplo, la proporción entre el estabilizante de volumen y el oligosacárido no reductor y/o el alcohol de azúcar, está

basada en reactivos que tienen unas unidades idénticas, por ejemplo, (p/p).

Según se usa en el presente documento, un “estabilizante aminoácido” es un aminoácido con carga, es decir, arginina, lisina, ácido glutámico y ácido aspártico.

Según se usa en el presente documento, un “estabilizante proteico” puede ser una proteína intacta y/o un hidrolizado de proteína. En algunas realizaciones en particular, el “estabilizante proteico” de la presente invención es bien caseína hidrolizada o bien colágeno/un derivado de colágeno, tal como gelatina. El hidrolizado de caseína completa que puede usarse en las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención puede obtenerse mediante diversos procedimientos que incluyen, por ejemplo, en forma de un hidrolizado ácido o de un hidrolizado enzimático. Dichos hidrolizados contienen, en forma de mezclas de aminoácidos y péptidos, todos los aminoácidos presentes originalmente en la caseína. Un hidrolizado pancreático de caseína completa que puede usarse en las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención se vende como CASEIN HYDROLYSATE ENZYMATIC® en MP Biomedicals. Algunos productos comparables se venden con el nombre de NZ-AMINE®, NZ-AMINE® A, NZ-AMINE® AS, NZ-AMINE® B y Tryptone en Sigma-Aldrich.

Debido a que las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención idealmente varían en su pH entre un pH de 5,5 y un pH de 8,5, las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención comprenden un agente tamponante, es decir, un tampón. Los tampones para su uso en las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: fosposfato de histidina, de potasio y/o de sodio, pirofosfato de sodio o de potasio, imidazol, Tris, Tris-Histidina, BIS-Tris y los buenos tampones: BIS-Tris-Propano (BTP), PIPES, ACES, MOPS, MOPSO, BES, TES, tricina, glicilglicina y HEPES. Los tampones pueden ser llevados al pH deseado mediante el uso de cualquier contraión adecuado.

Según se usa en el presente documento, cuando se proporciona un pH de un tampón en una formulación seca de una vacuna de la presente invención, ese pH es el pH de la formulación de vacuna que comprende el tampón antes de la eliminación de esencialmente todo el líquido de la vacuna (es decir, el secado) para hacerla una formulación seca. Según se usa en el presente documento, salvo que específicamente se establezca lo contrario, el valor del pH proporcionado es el valor del pH determinado/medido a 25 ºC.

Vacunas multivalentes: la presente invención proporciona vacunas multivalentes estables a la temperatura ambiente que comprenden virus humanos, de ganado o de animales de compañía, según se detalla en el presente documento. Algunos ejemplos de vacunas multivalentes caninas estables a la temperatura ambiente de la presente invención, incluyen, pero en modo alguno se limitan a: dos o más de los siguientes virus vivos atenuados o vectores recombinantes: el virus del moquillo canino, el adenovirus canino de tipo 2, el parvovirus canino, el virus paragripal canino, el virus de la gripe canino, el neumovirus canino, el coronavirus canino, el herpes virus canino, el virus de la hepatitis infecciosa canina, el virus diminuto canino, el virus de la rabia, el virus de la seudorrabia, un vector vírico recombinante, por ejemplo, un vector vírico recombinante canino o felino, que codifica y expresa un antígeno heterólogo de un patógeno canino y/o de un patógeno felino.

Además, las vacunas caninas estables a la temperatura ambiente de la presente invención pueden contener adicionalmente, y/o pueden ser posteriormente combinadas con, uno o más antígenos atenuados o muertos tales como *Bordetella bronchiseptica,* una especie de *Mycoplasma*, *Ehrlichia canis,* una especie de *Anaplasma*, *Leptospira canicola, Leptospira grippotyfosa, Leptospira hardjo, Leptospira icterohaemorrhagiae, Leptospira pomona, Leptospira interrogans, Leptospira autmnalis o Leptospira Bratislava;* o un virus de la gripe canina muerto, o un coronavirus canino muerto, antes de su administración.

La presente invención también proporciona vacunas multivalentes estables a la temperatura ambiente que comprenden vectores víricos recombinantes, tales como un vector vírico paragripal canino recombinante, que codifica un antígeno heterólogo obtenido a partir de un patógeno humano, y/o de un patógeno símico, y/o de un patógeno bovino, y/o de un patógeno ovino, y/o de un patógeno porcino, y/o de un patógeno de aves (por ejemplo, un virus de pollo).
De forma análoga, una vacuna multivalente felina estable a la temperatura ambiente de la presente invención puede comprender dos o más de los siguientes virus vivos atenuados felinos: un herpesvirus felino, un calicivirus felino, un neumovirus felino, un parvovirus felino, un virus de la leucemia felina, un virus de la peritonitis infecciosa felina, un virus de la inmunodeficiencia felina, un virus de la encefalomielitis, un virus de la gripe felina y de la gripe aviar. Dichas vacunas estables a la temperatura ambiente pueden contener adicionalmente, y/o combinarse de posteriormente con, *Chlamydophila felis* y/o *Bartonella spp.* atenuadas o muertas (por ejemplo, *B. henselae)* antes de su administración.

Las vacunas estables a la temperatura ambiente y las vacunas multivalentes de la presente invención se almacenan en forma de formulaciones secas, y por lo tanto, los antígenos individuales puede ser envasados y almacenados tanto por separado como en cualquier combinación antes de su mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable y su administración al receptor animal. En uno de dichos ejemplos, una vacuna multivalente que comprende un antígeno del virus del moquillo canino antígeno, del virus paragripal canino y del adenovirus canino de tipo 2, se almacena en una formulación seca individual, y el antígeno de un parvovirus canino se almacena en una segunda formulación seca. Antes de la administración al receptor canino, se combinan las dos formulaciones secas con un vehículo para elaborar

una vacuna multivalente del virus del moquillo canino, el virus paragripal canino, el adenovirus canino de tipo 2 y el parvovirus canino.

Administración de la vacuna: después de ser mezcladas con un vehículo, las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención pueden ser administradas a través de cualquier medio convencional, por ejemplo, mediante una administración sistémica, o mediante una administración parenteral tal como, sin limitación, una administración subcutánea o intramuscular. Después de ser mezcladas con un vehículo, las vacunas estables a la temperatura ambiente de la presente invención también pueden ser administradas mediante una administración mucosa, tal como mediante una administración intranasal, oral, intratraqueal, rectal y/u ocular. Alternativamente, las vacunas pueden ser administradas a través de un parche cutáneo, una escarificación o una administración tópica. Se contempla que una vacuna estable a la temperatura ambiente de la presente invención también pueda ser administrada a través del agua de bebida y/o de alimentos al receptor. Adicionalmente se contempla que dichas vacunas puedan ser administradas en forma de un premio o un juguete.

Las vacunas (incluyendo las vacunas multivalentes) de la presente invención también pueden ser administradas como parte de una terapia de combinación, es decir, una terapia que incluye, además de la propia vacuna, la administración de uno o más agentes activos adicionales, terapias, etc. En ese caso, debería reconocerse que la cantidad de vacuna que constituye una cantidad “terapéuticamente eficaz” puede ser mayor o menor que la cantidad de vacuna que constituiría una cantidad “terapéuticamente eficaz” si la vacuna se fuera a administrar sola. Otras terapias pueden incluir aquellas conocidas en la materia, tales como, por ejemplo, analgésicos, antipiréticos, expectorantes, medicamentos antiinflamatorios, antihistamínicos y/o administración de fluidos.

El nivel de inmunogenicidad puede ser determinado experimentalmente mediante técnicas de estudio de ajustes de la dosis de exposición conocidas generalmente en la materia. Dichas técnicas normalmente incluyen la vacunación de varios sujetos animales con la vacuna a diferentes dosis, y después la exposición de los sujetos animales al virus virulento para determinar la dosis protectora mínima.

Algunos factores que afectan al régimen de dosificación preferido pueden incluir, por ejemplo, la especie o la raza (por ejemplo, de un canino o un felino), la edad, el peso, el sexo, la dieta, la actividad, el tamaño de los pulmones y el estado del sujeto; la vía de administración; y la eficacia, la seguridad y los perfiles de duración de la inmunidad de la vacuna en particular usada; si se usa un sistema de administración; y si la vacuna es administrada como parte de una combinación de fármacos y/o de vacunas. Por lo tanto, la dosis realmente empleada puede variar para algunos animales específicos, y por lo tanto, puede desviarse de las dosis típicas establecidas más arriba. La determinación de dichos ajustes de la dosis está generalmente en la pericia de los expertos en la materia del desarrollo de vacunas mediante el uso de los medios convencionales.

De forma análoga, el volumen con el que puede ser administrada dicha dosis normalmente está entre 0,1 ml (típico para una aplicación intradérmica o transdérmica) y 5,0 ml. Un intervalo típico del volumen de administración es de entre 0,2 y 2,0 ml, y de entre 1,0 y 2,0 ml para una administración intramuscular o subcutánea.

Se contempla que la vacuna pueda ser administrada al receptor de la vacuna en una única vez, o como alternativa, dos o más veces durante días, semanas, meses o años. La vacuna puede ser administrada al menos dos veces. Por ejemplo, la vacuna se administra dos veces, administrándose la segunda dosis (por ejemplo, un refuerzo) al menos 2 semanas después de la primera dosis. La vacuna puede ser administrada dos veces, administrándose la segunda dosis no más de 8 semanas después de la primera dosis. La segunda dosis puede ser administrada entre 1 semana y 2 años después de la primera dosis, entre 1,5 semanas y 8 semanas después de la primera dosis o entre 2 y 4 semanas después de la primera dosis. La segunda dosis también puede ser administrada 3 semanas después de la primera dosis.

Como se ha descrito más arriba, la primera dosis y las posteriores pueden variar, tal como en la cantidad y/o en la forma. A menudo, sin embargo, las dosis son iguales en cantidad y en forma. Cuando se administra sólo una dosis, la cantidad de vacuna de esa dosis única comprende generalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna. Sin embargo, cuando se administra más de una dosis, las cantidades de la vacuna en esas dosis pueden constituir conjuntamente una cantidad terapéuticamente eficaz. Además, una vacuna puede ser administrada inicialmente, y después puede administrarse un refuerzo. Las posteriores administraciones de la vacuna también pueden realizarse sobre una base anual (1 año) o bianual (2 años), independientemente de si se administró o no un refuerzo.

La presente invención puede comprenderse mejor mediante referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes, que se proporcionan como a modo de ejemplo de la invención. Los siguientes Ejemplos se presentan con objeto de ilustrar más completamente las realizaciones de la invención. Sin embargo, no deberían ser interpretados en modo alguno como limitantes del ámbito de la invención.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Materiales: la sacarosa y el sorbitol de calidad mínima para ACS se adquieren en Fisher Scientific. El clorhidrato de L-arginina, la L-metionina, la L-histidina, el manitol, el sulfato de magnesio, la ectoína, la hidroxiectoína, la glicina y el cloruro de sodio de calidad molecular con una pureza mayor del 98 % se adquieren en Sigma. El dextrano con un peso molecular medio de 70.000 y una pureza > 95 % se adquiere en Sigma. Las soluciones de Tris 1,0 M (pH de 8,0) y EDTA (pH de 8,0) de calidad para biología molecular se adquieren en Sigma. La solución de gelatina bloom 250 al 20 % y la solución de NZ Amine AS se prepararon a partir de los mejores proveedores comerciales disponibles.

Preparación de la solución madre: se han preparado las siguientes soluciones y se han esterilizado mediante una filtración a 0,2 µm: sacarosa al 80 %, sorbitol al 70 %, L-arginina 1,0 M (pH de 7,2), L-metionina al 5 % y sulfato de dextrano 5 mM. Los antígenos a granel del CDV, del CAV2, del CPV y del CPI, que tienen unos títulos de entre 6,5 y 9,5, se congelaron a -80 ºC para ser descongelados inmediatamente antes de la mezcla.

Mezcla, envasado y secado de la vacuna: los antígenos víricos y los estabilizantes se mezclan hasta la concentración final de cada componente según se recoge en la tabla de formulación. Se usa agua desionizada para llevar la solución hasta el volumen objetivo. Todos los componentes de las mezclas de vacunas se mezclan concienzudamente mediante agitación durante al menos 10 minutos en una placa de agitación. Para las vacunas secas en viales, la mezcla se dispensa en viales de vidrio de 2,2 cc a 0,5 ml por vial, después se liofiliza en un liofilizador usando un ciclo de secado desarrollado según se muestra en la Tabla 4. Para las vacunas secas en microesferas (por ejemplo, liosferas/esfereones), la mezcla se dispensó en moldes de acero inoxidable ultra fríos a 100 ul por gota para obtener microesferas esféricas congeladas. Las microesferas congeladas se transfirieron a una bandeja y se liofilizaron en el liofilizador mediante el uso del ciclo de secado optimizado según se muestra en la Tabla 5. Para las vacunas secas sobre membranas, la mezcla de vacuna se dispensa sobre una membrana y después la membrana se seca en una cámara con un vacío controlado a entre 100 y 1.000 mTorr durante aproximadamente 16 horas a 25 ºC.

Pruebas de estabilidad a temperatura acelerada y en tiempo real:

Las pruebas de estabilidad acelerada a 45 ºC y a 37 ºC se usan para cribar las diferentes formulaciones. Las formulaciones destacadas son monitorizadas en pruebas de estabilidad a largo plazo en tiempo real a 27 ºC, cuando se desee. En el punto temporal indicado, se recuperan 3 muestras de cada formulación y se miden los títulos de cada antígeno mediante un ensayo de titulación basado en un cultivo celular, y se notifican como la dosis infecciosa mediana en cultivo tisular ($TCID_{50}$) y/o como la dosis infecciosa de anticuerpo fluorescente al 50 % ($FAID_{50}$).

Métodos analíticos:

Potencia del CPI: las diluciones de las muestras de virus se inocularon en células de riñón de perro (DK). Después de 4- 6 días, las monocapas se fijan y se tiñen con un antisuero de CPI conjugado con fluoresceína y el título de virus se calcula mediante el método de Spearman-Karber [Cunningham, C. H., *A Laboratory Guide in Virology,* 7ª edición, Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN. (1973); Kaplan, M. M. y Koprowski, H., *Laboratory Techniques in Rabies, World Health Organization, Suiza,* (1973)].

Potencia del CDV: las diluciones de las muestras de virus se inocularon en células Vero. Después de 5-7 días, las monocapas se observan para evaluar el efecto citopático y el título del virus se calcula mediante el método Spearman-Karber, como se ha citado más arriba.

Potencia del CAV2: las diluciones de las muestras de virus se inocularon en células DK. Después de 7 días, las monocapas se observan para evaluar el efecto citopático y el título del virus se calcula mediante el método Spearman-Karber, como se ha citado más arriba.

Potencia del CPV: las diluciones de las muestras de virus se inocularon en células DK. Después de 3 días, las monocapas se tiñen con un antisuero de CPV conjugado con fluoresceína y el título del virus se calcula mediante el método Spearman-Karber, como se ha citado más arriba.

Análisis térmico y de la humedad de la vacuna seca: la humedad de la vacuna liofilizada en viales o en microesferas se determinó usando el tradicional método gravimétrico en un horno de vacío o el método de Karl-Fischer. [Se averiguó que el contenido en humedad residual (RMC) de las muestras liofilizadas variaba entre un 0,5 % y un 3 % (p/p)]. La temperatura de transición vítrea de las microesferas o de las tortas liofilizadas en viales se determinaron con un instrumento de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Salvo que se indique de otro modo, el RMC se proporciona en forma de un porcentaje (p/p) en las formulaciones liofilizadas.

EJEMPLO 1

PREPARACIÓN DE LOS ESTABILIZANTES

La concentración objetivo final (p/p) de cada componente en la vacuna seca final de cada formulación se muestra en las Tablas 1a y 2a. La concentración final de cada componente en la mezcla de vacuna de cada formulación se muestra en las Tablas 1b y 2b. Para la vacuna seca en forma de microesferas (por ejemplo, liosferas/esfereones) en una bandeja de plástico, el volumen de cada dosis de vacuna es de 100 µl o de 250 µl. Para las vacunas secas en forma de una torta en un vial de vidrio, el volumen de la dosis es de 250 µl o de 100 µl o de 1.000 µl. Para los estabilizantes en las vacunas secas mostradas en la Tabla 1a y 2a, todas las unidades de concentración son en peso en peso (p/p) excepto la vacuna con la dosis total, que está en mg. Para los estabilizantes en las mezclas de vacunas mostradas en las Tablas 1b y 2b: la concentración para el azúcar y la proteína son el porcentaje de peso por volumen (p/v), la concentración para los aminoácidos, los cationes y los tampones son molar (M) o milimolar (mM), la concentración para la ectoína y la hidroxiectoína son en peso por volumen (p/v). Todas las concentraciones mostradas en las Tablas 1b y 2b son la concentración final en la mezcla de vacuna con los antígenos víricos. La L-arginina en las formulaciones SP33 y SP34 es la sal de fosfato o de acetato, respectivamente. Todas las demás formulaciones de L-arginina son la sal de cloruro. El pH es el pH final de la mezcla de vacuna con los antígenos víricos. Todos los tampones en la formulación tienen una concentración final de 10 mM. El KPO4 es el tampón de fosfato de potasio que comprende fosfato de potasio monobásico y dibásico con el pH objetivo de 7,2. Los estabilizantes recogidos en las Tablas 1b y 2b se mezclan concienzudamente con la cantidad apropiada de agua, después se añaden los antígenos víricos y se mezclan concienzudamente antes de que la mezcla de vacuna resultante sea dispensada, congelada y liofilizada bien en microesferas o bien en viales.

EJEMPLO 2

CORRELACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE ESTABILIDAD A 27 ºC CON LOS ESTUDIOS A 37 ºC Y A 45 ºC

Las pruebas de estabilidad acelerada a temperaturas elevadas se usan para cribar diferentes estabilizantes. En estos estudios se usan unas temperaturas elevadas de 45 ºC y de 37 ºC para las pruebas de estabilidad acelerada. Las pruebas de estabilidad a largo plazo en tiempo real se llevan a cabo a 27 ºC. Para investigar si pueden usarse las pruebas de estabilidad acelerada a 45 ºC y a 37 ºC para el cribado de diferentes estabilizantes o formulaciones, se comparó el perfil de estabilidad de al menos tres formulaciones para cada virus a 45 ºC, a 37 ºC y a 27 ºC (Tabla 3). La estabilidad relativa del virus en las diferentes formulaciones se clasifica sobre la base del título de virus en cada punto temporal, y también de la tendencia global de pérdida de título. Se usa una clasificación similar para las mismas formulaciones a diferentes temperaturas. Según se observa en la Tabla 3, existe una estrecha correlación entre las pruebas de estabilidad acelerada y en tiempo real a las 3 temperaturas. El comportamiento de estabilidad relativa a 45 ºC, a 37 ºC y a 27 ºC siempre es coherente para la totalidad de los cuatro virus de las diferentes formulaciones. Para la mayoría de las formulaciones, la clasificación es coherente para las tres temperaturas. Por lo tanto, los datos indican que a 45 ºC y a 37 ºC puede ser un método de cribado acelerado fiable para la formulación, particularmente para distinguir las mejores y las peores formulaciones en el grupo. Para algunas formulaciones con unos perfiles de estabilidad muy similares a unas temperaturas elevadas de 45 ºC y de 37 ºC, no es tan fácil predecir cuál proporcionará la mejor estabilidad a 27 ºC (en tiempo real). En el cribado de la formulación para el DHPPi (el CDV, el CAV2, el CPV y el CPI), las pruebas de estabilidad acelerada a 45 ºC y a 37 ºC se usan para cribar los diferentes estabilizantes y excipientes, para identificar las formulaciones destacadas. Después, las formulaciones destacadas pueden ser confirmadas con pruebas de estabilidad a largo plazo en tiempo real a 27 ºC, cuando se desee.

EJEMPLO 3

Proceso de secado para virus en diferentes formulaciones

Después de mezclar concienzudamente los estabilizantes y los antígenos víricos, se midió la principal temperatura de transición vítrea (Tg) de la mezcla de vacuna con un calorímetro diferencial de barrido (Perkin Elmer). Todas las formulaciones de las Tablas 1 y 2 tienen una Tg principal mayor de -40 ºC. Tomando como base estos resultados, se usa el ciclo de secado de las Tablas 4 y 5 para secar las microesferas de la vacuna congelada y el líquido de los viales, respectivamente.

Para la preparación de las vacunas en microesferas secas, se preparan en primer lugar las microesferas de la vacuna congelada con 100 µl por microesfera colocando gotas de la mezcla de vacuna en los pocillos de placas de acero inoxidable previamente enfriadas (a entre -110 ºC y 130 ºC). Las microesferas congeladas se recogieron en una bandeja y se almacenaron a -80 ºC hasta su secado en el liofilizador. Inmediatamente antes de la liofilización de las microesferas de la vacuna, la estantería del liofilizador se enfría previamente a -20 ºC y las microesferas de la vacuna de las bandejas se cargan rápidamente en la estantería. Después de la liofilización con un ciclo de secado mostrado en la Tabla 4, el vacío se libera usando argón seco o nitrógeno gaseoso seco. Las bandejas secas de las microesferas se envasan al vacío en bolsas de aluminio con argón o nitrógeno seco.

Para la preparación de las vacunas en forma de tortas en viales, la mezcla de vacuna se dispensó en viales de vidrio

de 2,2 cc a 250 µl por vial. Después, el vial rellenado se tapó y se transfirió a la estantería previamente enfriada a 4 ºC del liofilizador. Se usó el ciclo de secado de la Tabla 5 para la liofilización de las vacunas en los viales. Después de la liofilización, se liberó el vacío y los viales se rellenaron con argón o nitrógeno gaseoso. Después, los viales se envasaron completamente al vacío con un tapón de caucho, y después se taparon adicionalmente con un engarzador.

EJEMPLO 4

RESULTADOS DE ESTABILIDAD DE LOS CDV, CAV2, CPI Y CPV LIOFILIZADOS

Para los virus secos en microesferas, las microesferas liofilizadas con los antígenos son envasadas en recipientes en una caja seca con nitrógeno seco [< 1,0 % de humedad relativa (HR)] y después se probó la estabilidad a diferentes temperaturas. Para las muestras secas en forma de torta en viales, el vial precintado se coloca en una caja de almacenamiento y después se prueba la estabilidad en estufas de incubación a diferentes temperaturas. En diferentes puntos temporales, las muestras son recuperadas de la estufa de incubación y se titula la potencia de cada una mediante el uso de los ensayos de titulación basados en un cultivo celular.

En cada punto temporal se recuperaron al menos tres viales de la misma formulación y se reconstituyeron con 1 ml de PBS por vial para un ensayo de potencia. La potencia de los virus se determinó mediante el uso de la metodología de $TCID_{50}$ y/o $FAID_{50}$ basados en un cultivo celular. Los cribados de la formulación se llevan a cabo etapa por etapa en diferentes estudios. Cada estudio incluye al menos una formulación del momento inicial, para comparar con otros estudios. En cada estudio se puntuaron las diferentes formulaciones con uno o más "+", y después se clasificaron sobre la base de los datos de estabilidad relativa en múltiples puntos temporales. Cuanto mayor es el número de +, mejor es la estabilidad relativa del virus en particular probado en la muestra.

Para la mayor parte de las formulaciones SPxx, la estabilidad física de las microesferas (por ejemplo, liosferas/esfereones) son aceptables sin cambios en el aspecto de la microesfera o de la torta durante el almacenamiento a largo plazo, por lo que no se recoge ninguna clasificación de estabilidad física. Para las formulaciones SPCPVxx, la estabilidad física variaba dependiendo de los componentes de la formulación. La estabilidad física de la vacuna seca se clasificó según la Tg y mediante una inspección visual del aspecto físico.

La Tabla 6 muestra la estabilidad de los cuatro virus a 27 ºC en diferentes formulaciones y con su periodo de validez proyectado a 27 ºC. En estas pruebas, el título aportado de antígeno objetivo [Log_{10} ($TCID_{50}$)] para el CDV, el CPI, el CAV2 y el CPV era de 7,0, de 7,0, de 4,0 y de 5,0, respectivamente. El título mínimo en la caducidad para cada antígeno se estableció como de 4,7, de 5,0, de 3,3 y de 4,5 para el CDV, el CPI, el CAV2 y el CPV, respectivamente. El periodo de validez estimado para el virus DHPPi en las diferentes formulaciones se calcula a partir de la tendencia del cambio del título en múltiples puntos temporales durante los estudios de estabilidad. El periodo de validez estimado para el CPI se basa en el título mínimo en la caducidad, que es de 5,0, y el aporte de antígeno para el CPI es 0,5 log mayor. En otros estudios, numerosas formulaciones destacadas mostraron una estabilidad mejorada a 45 ºC y a 37 ºC para las formulaciones recogidas en la Tabla 6. Estas formulaciones destacadas pueden ser probadas de nuevo mediante unas pruebas de estabilidad a largo plazo en tiempo real a 27 ºC. Los datos mostrados en la Tabla 6 indican que, mediante el uso de las actuales especificaciones para la elaboración de la vacuna, la formulación SP10 puede proporcionar mínimamente 18 meses o más de periodo de validez a 27 ºC para el CDV, el CAV2 y el CPI (con un aporte del antígeno del CPI 0,5 log mayor).

La Tabla 7 muestra varias formulaciones destacadas identificadas mediante el uso de las pruebas de estabilidad acelerada a 45 ºC. Los virus CDV, CAV2, CPI y CPV se mezclan en estas formulaciones y después se liofilizan en microesferas. Las microesferas se envasaron al vacío en viales con nitrógeno seco y después se llevaron a las pruebas de estabilidad a 45 ºC. De forma análoga, la clasificación de la estabilidad se basa en el título en cada punto temporal y el índice de cambio en el título con el transcurso del tiempo. Según se muestra en la Tabla 7, las formulaciones SP43 y SP44 proporcionan una estabilidad significativamente mejor para el CDV y el CPI que la SP10. Existe una mejora de más de un semilog en las semanas 1, 2 y 4 tanto para el CDV como para el CPI en la SP44 con respecto a la de la SP10. De forma análoga, la SP44 también proporciona una estabilidad significativamente mejor para el CAV2 que la SP10. Las mejoras en la estabilidad para la formulación SP44 con respecto a la SP10 pueden ser extrapoladas para producir una vacuna estable de CDV, CAV2 y CPI (vacuna DHPi) que tenga un periodo de validez de 24 meses o más largo a 27 ºC, cuando se comparan los datos obtenidos a partir de los estudios acelerados a 45 ºC para la SP44 con los obtenidos a 27 ºC para la SP10.

Los efectos de los estabilizantes o de los excipientes sobre la estabilidad del virus se han evaluado concienzudamente durante el cribado de la formulación del CDV, del CPI, del CAV2 y del CPV. Varios ejemplos de cribado se recogen en las Tablas 8-13.

El efecto del tampón y del pH sobre la estabilidad del virus se muestra en la Tabla 8. En el estudio descrito en la Tabla 8, las vacunas se liofilizaron en forma de tortas en viales. Se mezcló la totalidad de los cuatro virus en las formulaciones como en la tabla, se introdujeron en viales de vidrio y después se liofilizaron en un liofilizador según se describe en los métodos, usando el ciclo de secado mostrado en la Tabla 5. Excepto para la diferencia en el tampón [tampón de fosfato de potasio (KPO4), histidina, tampón de bis-tris propano (BTP) y MOPS (ácido 3-(N-morfolino)

propansulfónico)] y el pH recogidos, todas las formulaciones de este estudio contenían un 4 % de manitol, un 5 % de sacarosa, un 0,8 % de gelatina, un 1,0 % de NZ Amine y MgSO4 2 mM. Todas las formulaciones de este estudio también contenían tampón 10 mM con un pH final recogido en la tabla. Los datos de estabilidad a 45 ºC y a 37 ºC para cada virus se usan para la clasificación de las formulaciones.

Los datos proporcionados en la Tabla 8 indican que el CDV, el CPI y el CAV2 tienen una mayor estabilidad a un pH menor (6,5) que a un pH neutro o mayor, mientras que el CPV tiene una mayor estabilidad a un pH neutro o mayor (7,6). El CDV y el CPI son más estables en KPO4 o en histidina que en los otros dos tampones probados, mientras que la estabilidad del CAV2 y del CPV parece ser menos dependiente del tampón usado.

Se investigó el efecto de la concentración y de la combinación de azúcar sobre la estabilidad de los virus según se muestra en las Tablas 9a y 9b. Las concentraciones de azúcar están recogidas en la Tabla 9a, y la estabilidad de los virus en estas formulaciones a 45 ºC y a 37 ºC están recogidas en la Tabla 9b. En este estudio, todas las formulaciones tenían el mismo aporte de antígeno vírico en volumen, y los virus de estas formulaciones estaban liofilizados en microesferas. La clasificación de la estabilidad relativa se basa en los datos de estabilidad tanto a 45 ºC como a 37 ºC y en múltiples puntos temporales para cada virus en las diferentes formulaciones. Los datos de las Tablas 9a y 9b sugieren que la estabilidad del CDV, del CPI y del CAV2 tienen una fuerte dependencia en la concentración de azúcar, con una mayor estabilidad de los virus a una mayor concentración de azúcar en el intervalo del 4-30 %. Los datos también sugieren que la combinación de sacarosa y trehalosa (Suc +TrH) parece funcionar mejor que tanto la sacarosa como la trehalosa solas. También se investigó el efecto de la concentración de L-arginina sobre la estabilidad de los virus (Tabla 10). Las formulaciones SP02B, SP26 y SP27 difieren únicamente en la concentración de clorhidrato de L-arginina. [Para algunos puntos de datos, los datos no están disponibles debido a la invalidez del ensayo (n/a)]. Tomando como base los datos obtenidos a 45 ºC y a 37 ºC, parece que la estabilidad del CDV, del CPI y del CAV2 depende de la concentración de arginina, siendo más estables con mayores concentraciones de arginina (Tabla 10).

Se investigó adicionalmente el efecto de diferentes sales de arginina o concentraciones de arginina junto con ácido glutámico (Tablas 11a y 11b). La Tabla 11a muestra la concentración y la sal de arginina y la concentración de ácido glutámico en cada formulación y el correspondiente inicio de la Tg de la vacuna seca. Todas las formulaciones son iguales, excepto por las diferencias mencionadas anteriormente en arginina y ácido glutámico. La L-arginina se ajustó a un pH de 7,2 con diferentes ácidos para producir las diferentes sales de arginina. El inicio de la Tg es el inicio de la temperatura de transición vítrea de las microesferas de la vacuna liofilizada de la formulación. El inicio de la Tg se determina mediante una calorimetría diferencial de barrido y es el promedio de al menos 3 réplicas. Los datos de la estabilidad a 45 ºC y a 37 ºC de las formulaciones recogidas en la Tabla 11a se muestran en la Tabla 11b. La estabilidad relativa también está clasificada y recogida en la Tabla 11b. Según se muestra en la Tabla 11a y 11b, las diferentes sales de L-arginina pueden tener diferentes efectos de estabilidad. Aunque el fosfato de arginina en la formulación SP33 proporciona una Tg mucho mayor, la estabilidad de los 3 virus disminuyó con respecto a las otras sales de arginina. La combinación de cloruro de arginina 0,15 M con ácido glutámico de sodio monobásico 0,15 M en la formulación SP35 mejoró ligeramente la estabilidad de los tres virus con respecto a la encontrada en la SP10.

La ectoína y la hidroxiectoína son compuestos naturales que se encuentran en los microorganismos halófilos. Ambos son solutos compatibles que sirven como sustancia protectora actuando como un osmolito, y por lo tanto ayudan a los organismos a sobrevivir en un estrés osmótico extremo confiriendo resistencia frente al estrés por sal y temperatura. Tanto la ectoína como la hidroxiectoína han demostrado ser potentes estabilizantes de las proteínas, así como otros muchos productos biológicos. Por lo tanto, se probó su efecto estabilizante sobre la estabilidad del CDV, del CPI y del CAV2. Las formulaciones SP39 y SP40 son idénticas a la formulación SP10 excepto porque además contienen bien ectoína o bien hidroxiectoína, respectivamente (Tabla 13). Se usaron los datos de estabilidad a tres temperaturas de almacenamiento para evaluar sus efectos estabilizantes. La mezcla de vacuna que contiene estas 3 fracciones de virus se liofilizó en microesferas usando el mismo ciclo de secado.
La clasificación de estabilidad se basa en los datos de estabilidad a partir de las 3 temperaturas (a 45 ºC, a 37 ºC y a 27 ºC). Los datos de estabilidad y la clasificación de estabilidad de la Tabla 13 indican que tanto la ectoína como la hidroxiectoína pueden mejorar la estabilidad del CDV y del CPI a 37 ºC y a 27 ºC, aunque los efectos estabilizantes a 45 ºC no son tan significativos. El efecto estabilizante de la ectoína y de la hidroxiectoína sobre el CAV2 es difícil de determinar debido a su baja curva de degradación.

EJEMPLO 5

RESULTADOS DE ESTABILIDAD DEL CPV LIOFILIZADO

También se ha evaluado la estabilidad del CPV monovalente en diferentes formulaciones. Aunque el CPV puede ser incluido junto con los otros tres virus caninos en una formulación viable estable a la temperatura ambiente, por ejemplo, las formulaciones SPCPV-02 y SPCPV-03 pueden proporcionar alrededor de 18 meses de periodo de validez a 27 ºC para el CPV, de los cuatro virus caninos diferentes probados, el CPV difiere de la mayoría con respecto a su estabilidad óptima a la temperatura ambiente.

Consecuentemente, el CPV tiene una preferencia diferente hacia los azúcares que el CDV, el CPI o el CAV2, por ejemplo, siendo más estable con un alcohol de azúcar tal como sorbitol, que con un azúcar reductor. Sin embargo,

incluso en presencia de sorbitol, la estabilidad física de cualquiera de las microesferas o tortas liofilizadas puede dar lugar a menudo a un encogimiento o colapsado de las microesferas secas durante el almacenamiento. Por lo tanto, se monitorizaron tanto la estabilidad de la potencia como la estabilidad física de las formulaciones secas del CPV durante el cribado de la formulación. Notablemente, el cribado de las formulaciones de la vacuna monovalente del CPV demostraron ser un modelo de estudio para conseguir un producto de vacuna que equilibra la estabilidad de la potencia del virus con la estabilidad física del producto seco.

La Tabla 14 muestra los datos de estabilidad del CPV a 45 ºC, a 37 ºC y a 27 ºC en cinco formulaciones diferentes. El CPV monovalente se mezcla en estas formulaciones y después se liofiliza en forma de microesferas de 100 ul de tamaño. Todas las formulaciones de este estudio contenían KPO4 10 mM a pH 7,2 como tampón, y dextrano 70k al 2 % y glicina al 2 % como estabilizantes de volumen. La concentración de sorbitol (p/v) de cada formulación se muestra en la tabla. Todas las formulaciones también contenían proteínas estabilizantes “GN” (gelatina y NZ-Amine). 1x de GN es gelatina al 0,8 % y NZ Amine al 1,0 %; mientras que 2,5x de GN es: gelatina al 2,5 % y NZ Amine al 2,5 %. La clasificación de la estabilidad de la potencia se basa en el cambio del título del virus a 45 ºC, a 37 ºC y a 27 ºC. La clasificación de la estabilidad física se basa en la temperatura de transición vítrea (Tg) y en el aspecto de la estructura física de las microesferas liofilizadas después de la liofilización y durante el estudio de estabilidad. Una mayor Tg y una mayor tendencia a mantener la estructura física de las microesferas da lugar a una mayor puntuación en estabilidad física.

Los datos de estabilidad de la Tabla 14 indican que una mayor concentración de sorbitol beneficia a la estabilidad de la potencia del CPV, pero reduce la estabilidad física de las vacunas; mientras que una mayor concentración de proteína es beneficiosa para la estabilidad física. Además, la inclusión de L-arginina no tuvo ningún efecto negativo sobre la estabilidad del CPV.

Se evaluó adicionalmente el efecto del dextrano y de diferentes concentraciones de sorbitol en un estudio resumido en la Tabla 15. Todas las formulaciones de la Tabla 15 contienen glicina al 2 %, gelatina al 2,5 % y NZ Amine al 2,5 %. y tampón de KPO4 10 mM a un pH de 7,2. Adicionalmente, todas las formulaciones contienen sorbitol y dextrano 70k. El CPV monovalente se mezcla en estas formulaciones y después se liofiliza en forma de microesferas de 100 ul de tamaño. La potencia y la estabilidad física de estas formulaciones se clasifica de una forma similar a la del estudio de la Tabla 15. Los datos de la Tabla 15 indican que la mayor concentración de dextrano 70k es beneficiosa para la estabilidad física de las microesferas de CPV liofilizadas, pero deteriora la estabilidad de la potencia al 6 %. Por otro lado, una mayor concentración de sorbitol es beneficiosa para la estabilidad de la potencia, pero necesita una concentración del medio de dextrano 70k para mantener su estructura. Los datos de este estudio sugieren que es necesaria una combinación óptima de sorbitol y dextrano 70k para que una vacuna de CPV liofilizada óptima tenga tanto una elevada potencia como una elevada estabilidad física.

EJEMPLO 6

EFECTOS DE LOS DIFERENTES FORMATOS DE SECADO SOBRE LA ESTABILIDAD DEL VIRUS

Para investigar si las vacunas secadas en diferentes formatos tienen diferentes perfiles de estabilidad, los virus de la misma formulación se secaron bien en forma de una torta en un vial o bien en forma de microesferas en una bandeja, y se comparó su estabilidad. La Tabla 16 muestra los resultados de las pruebas de estabilidad del CDV, del CAV2 y del CPI en microesferas en la SP02B y en una torta en la FDIV-03. (La SP02B y la FDIV-03 son, de hecho, la misma formulación). Según se observa a partir de la Tabla 16, la estabilidad del CDV, del CPI y del CAV2 en un vial era equivalente (o ligeramente mejor que) la observada en las microesferas. Los datos de este estudio sugieren que las formulaciones óptimas identificadas en las microesferas también pueden ser usadas para las vacunas de virus secos en forma de tortas en viales.

TABLA 1a

Estabilizantes y excipientes (p/p) en los productos de vacuna seca liofilizada que contienen CDV, CAV2, CPV y CPI														
Nombre de la formulación	Azúcar (p/p)				Proteína (p/p)		Aminoácido (p/p)		MgSO4 (p/p)	Otros estabilizantes (p/p)	Tampón (p/p)	pH	Peso de la dosis (mg) de la vacuna seca	
	Sacarosa	Trehalosa	Sorbitol	Manitol	Gelatina	NZ-Amine	L-Arg	L-Glu					Microesferas de 100 ul	Microesferas de 250 ul
SP01	64,2 %				13,5 %	16,9 %					2,5 %	7,2	5,6	14,0
SP06			47,8 %		23,9 %	23,9 %					1,4 %	7,2	10,0	25,0
SP02B	65,4 %				3,1 %	3,8 %	24,2 %				0,6 %	7,2	25,2	63,1
SP10	51,6 %	20,5 %			2,4 %	3,0 %	19,1 %				0,5 %	7,2	32,0	80,1
SP11	39,4 %	26,0 %			3,1 %	3,8 %	24,2 %				0,6 %	7,2	25,2	63,1
SP12	26,0 %	39,4 %			3,1 %	3,8 %	24,2 %				0,6 %	7,2	25,2	63,1
SP13	20,5 %	51,6 %			2,4 %	3,0 %	19,1 %				0,5 %	7,2	32,0	80,1
SP14		65,4 %			3,1 %	3,8 %	24,2 %				0,6 %	7,2	25,2	63,1
SP15	53,9 %				4,2 %	5,2 %	33,0 %				0,8 %	7,2	18,4	46,1
SP16	26,9 %	26,9 %			4,2 %	5,2 %	33,0 %				0,8 %	7,2	18,4	46,1
SP17		53,9 %			4,2 %	5,2 %	33,0 %				0,8 %	7,2	18,4	46,1
SP26	71,4 %				3,3 %	4,2 %	17,6 %				0,6 %	7,2	23,1	57,8
SP27	78,5 %				3,7 %	4,6 %	9,7 %				0,7 %	7,2	21,0	52,5
SP33	48,8 %	19,4 %			2,3 %	2,9 %	23,3 %				0,4 %	7,2	33,9	84,7
SP34	50,6 %	20,1 %			2,4 %	3,0 %	20,6 %				0,4 %	7,2	32,7	81,7
SP35	52,6 %	20,9 %			2,5 %	3,1 %	9,7 %	7,8 %			0,5 %	7,2	31,4	78,5
SP36	47,0 %	18,7 %			2,2 %	2,7 %	14,5 %	11,6 %			0,4 %	7,2	35,2	88,0
SP39	50,5 %	20,1 %			2,4 %	3,0 %	18,7 %			2,1 %	0,4 %	7,2	32,7	81,8
SP40	50,4 %	20,0 %			2,4 %	2,9 %	18,6 %			2,3 %	0,4 %	7,2	32,8	82,0
SP43	51,6 %	20,5 %			2,4 %	3,0 %	19,1 %				0,5 %	6,5	32,0	80,1
SP44	48,5 %	19,3 %		5,7 %	2,3 %	2,8 %	17,9 %		0,1 %		0,5 %	6,5	34,0	85,1
FDIV-03	65,4 %				3,1 %	3,8 %	24,2 %				0,6 %	7,2	25,2	63,1

(continuación)

Estabilizantes y excipientes (p/p) en los productos de vacuna seca liofilizada que contienen CDV, CAV2, CPV y CPI														
Nombre de la formulación	Azúcar (p/p)				Proteína (p/p)		Aminoácido (p/p)		MgSO4 (p/p)	Otros estabilizantes (p/p)	Tampón (p/p)	pH	Peso de la dosis (mg) de la vacuna seca	
	Sacarosa	Trehalosa	Sorbitol	Manitol	Gelatina	NZ-Amine	L-Arg	L-Glu					Microesferas de 100 ul	Microesferas de 250 ul
FDIV-11	42,8 %		3,1 %	16,6 %	3,3 %	4,2 %	26,3 %		0,1 %		0,6 %	7,2	23,2	58,0

- El aporte de antígeno es de aproximadamente un 1 % (p/p) y el RMC es de aproximadamente un 2 % (p/p) en la vacuna liofilizada.
- El peso de la dosis de la vacuna seca es el peso de una cantidad de dosis de vacuna cuando se seca a partir de una mezcla de vacuna de 100 ul o de 250 ul usando las correspondientes formulaciones de la siguiente Tabla 1b.
- La L-arginina (L-Arg) en la SP33 es fosfato de arginina, y la L-arginina en la SP34 es arginina acética.
- Tanto en la SP35 como en la SP36, la L-arginina es cloruro de arginina y el L-Glu es ácido glutámico de sodio.
- La SP39 contiene ectoína y la SP40 contiene hidroxiectoína como otros estabilizantes (Otros estabilizantes).
- La SP43 y SP44 contienen histidina como el tampón en la mezcla de vacuna, todas las demás formulaciones contienen fosfato de potasio (KPO4) como tampón.

Tabla 1b

Formulación de mezcla para los CDV, CPI, CAV2 y CPV liofilizados												
Nombre de la formulación	Azúcar (p/v)				Proteína (p/v)		Aminoácido (M)		$MgSO_4$ (mM)	Otros estabilizantes (p/v)	Tampón (10 mM)	pH
	Sacarosa	Trehalosa	Sorbitol	Manitol	Gelatina	NZ-Amine	L-Arg	L-Glu				
SP01	3,8 %				0,8 %	1,0 %					KPO4	7,2
SP06			5 %		2,5 %	2,5 %					KPO4	7,2
SP02B	17,1 %				0,8 %	1,0 %	0,3 M				KPO4	7,2
SP10	17,1 %	6,8 %			0,8 %	1,0 %	0,3 M				KPO4	7,2
SP11	10,3 %	6,8 %			0,8 %	1,0 %	0,3 M				KPO4	7,2
SP12	6,8 %	10,3 %			0,8 %	1,0 %	0,3 M				KPO4	7,2
SP13	6,8 %	17,1 %			0,8 %	1,0 %	0,3 M				KPO4	7,2
SP14		17,1 %			0,8 %	1,0 %	0,3 M				KPO4	7,2
SP15	10,3 %				0,8 %	1,0 %	0,3 M				KPO4	7,2
SP16	5,2 %	5,2 %			0,8 %	1,0 %	0,3 M				KPO4	7,2
SP17		10,3 %			0,8 %	1,0 %	0,3 M				KPO4	7,2
SP26	17,1 %				0,8 %	1,0 %	0,2 M				KPO4	7,2
SP27	17,1 %				0,8 %	1,0 %	0,1 M				KPO4	7,2
SP33	17,1 %	6,8 %			0,8 %	1,0 %	Arg3PO4 0,3 M				KPO4	7,2
SP34	17,1 %	6,8 %			0,8 %	1,0 %	ArgAc 0,3 M				KPO4	7,2
SP35	17,1 %	6,8 %			0,8 %	1,0 %	0,15 M	0,15 M			KPO4	7,2
SP36	17,1 %	6,8 %			0,8 %	1,0 %	0,25 M	0,25 M			KPO4	7,2
SP39	17,1 %	6,8 %			0,8 %	1,0 %	0,3 M			0,71 % de ectonina	KPO4	7,2
SP40	17,1 %	6,8 %			0,8 %	1,0 %	0,3 M			0,79 % de hidroxiectonina	KPO4	7,2
SP43	17,1 %	6,8 %			0,8 %	1,0 %	0,3 M				Histidina	6,5
SP44	17,1 %	6,8 %		2 %	0,8 %	1,0 %	0,3 M		2 mM		Histidina	6,5
FDIV-03	17,1 %				0,8 %	1,0 %	0,3 M				KPO4	7,2
FDIV-11	10,3 %		0,75 %	4 %	0,8 %	1,0 %	0,3 M		2 mM		KPO4	7,2

- Las unidades para la cantidad final de cada estabilizante en la vacuna está recogida en el encabezado de cada categoría, p/v es peso por volumen.
- KPO4 es el tampón de fosfato de potasio. El pH es el pH final de la mezcla de la vacuna cuando están incluidos los antígenos/virus.
- Para la L-Arg, las formulaciones SP33 y SP34 contienen el fosfato y la sal del ácido acético de la L-arginina, respectivamente. Todas las demás L-Arg recogidas en la tabla son la sal de cloruro.

Tabla 2a

Estabilizantes y excipientes (p/p) en los productos de vacuna seca liofilizada que contienen CPV											
Nombre de la formulación	Azúcar (p/p)			Agente de volumen (p/p)		Proteína (p/p)		L-Arg (p/p)	KPO4 (p/p)	Peso de la dosis (mg) de la vacuna seca	
	Sacarosa	Trehalosa	Sorbitol	Gly	Dextrano	Gelatina	NZ-Amine			Microesferas de 100 ul	Microesferas de 250 ul
SPCPV-02			28,1 %	11,2 %	11,2 %	4,5 %	5,6 %	35,5 %	0,8 %	17,1	42,8
SPCPV-06	28,1 %			11,2 %	11,2 %	4,5 %	5,6 %	35,5 %	0,8 %	17,1	42,8
SPCPV-10		65,0 %		16,2 %		6,5 %	8,1 %		1,2 %	11,8	29,5
SPCPV-13			38,3 %	9,6 %	9,6 %	3,8 %	4,8 %	30,3 %	0,7 %	20,1	50,3
SPCPV-14			48,0 %	8,0 %	8,0 %	3,2 %	4,0 %	25,3 %	0,6 %	24,1	60,3
SPCPV-15			23,7 %	9,5 %	9,5 %	11,9 %	11,9 %	30,0 %	0,7 %	20,3	50,8
SPCPV-17			34,3 %	13,7 %	13,7 %	17,2 %	17,2 %		1,0 %	14,0	35,0
SPCPV-23			30,1 %	12,0 %	24,0 %	15,0 %	15,0 %		0,9 %	16,0	40,0
SPCPV-24			26,7 %	10,7 %	32,1 %	13,4 %	13,4 %		0,8 %	18,0	45,0
SPCPV-26			40,6 %	10,1 %	20,3 %	12,7 %	12,7 %		0,8 %	19,0	47,5

- El aporte de antígeno es de aproximadamente un 1 % (p/p) y el RMC es de aproximadamente un 2 % (p/p) en la formulación liofilizada de la vacuna.
- El peso de la dosis de la vacuna seca es el peso de una cantidad de dosis de la vacuna cuando se seca a partir de 100 ul o 250 ul de mezcla de vacuna usando las correspondientes formulaciones de la siguiente Tabla 2b.
- L-Arg es cloruro de arginina; Gly es glicina.

Tabla 2b

Formulación de mezcla para el CPV liofilizado										
Nombre de la formulación	Azúcar (p/v)			Agente de volumen (p/v)		Proteína (p/v)		L-Arg (M)	KPO4 (mM)	pH
	Sacarosa	Trehalosa	Sorbitol	Glicina	Dextrano	Gelatina	NZ-Amine			
SPCPV-02			5,0 %	2,0 %	2,0 %	0,8 %	1,0 %	0,3 M	10 mM	7,2
SPCPV-06	5,0 %			2,0 %	2,0 %	0,8 %	1,0 %	0,3 M	10 mM	7,2
SPCPV-10		8,0 %		2,0 %		0,8 %	1,0 %		10 mM	7,2
SPCPV-13			8,0 %	2,0 %	2,0 %	0,8 %	1,0 %	0,3 M	10 mM	7,2
SPCPV-14			12,0 %	2,0 %	2,0 %	0,8 %	1,0 %	0,3 M	10 mM	7,2
SPCPV-15			5,0 %	2,0 %	2,0 %	2,5 %	2,5 %	0,3 M	10 mM	7,2
SPCPV-17			5,0 %	2,0 %	2,0 %	2,5 %	2,5 %		10 mM	7,2
SPCPV-23			5,0 %	2,0 %	4,0 %	2,5 %	2,5 %		10 mM	7,2
SPCPV-24			5,0 %	2,0 %	6,0 %	2,5 %	2,5 %		10 mM	7,2
SPCPV-26			8,0 %	2,0 %	4,0 %	2,5 %	2,5 %		10 mM	7,2

- Las unidades para la cantidad final de cada estabilizante en la vacuna está recogida en el encabezado de cada categoría, p/v es el peso por volumen.
- KPO4 es el tampón de fosfato de potasio.
- El pH es el pH final de la mezcla de vacuna cuando se incluyen los antígenos/virus.

Tabla 3

Correlación entre las pruebas de estabilidad acelerada (a 45 ºC y a 37 ºC) y en tiempo real (a 27 ºC) para el cribado de la formulación														
Virus	Formulación	Título de virus durante el estudio de estabilidad a diferentes temperaturas y clasificación de la formulación												
		D0	45 ºC				37 ºC				27 ºC			
			Semana 1	Semana 2	Semana 4	Clasificación	Semana 4	Semana 6	Semana 12	Clasificación	Mes 6	Mes 12	Mes 18	Clasificación
CDV	SP06	7,50	4,58	4,25	2,58	+	3,50	1,58	1,50	+	5,33	3,88	3,67	+
CDV	SP02B	7,00	n/a	5,25	5,00	++	4,67	4,83	4,00	++	5,33	4,50	4,75	++
CDV	SP10	6,83	n/a	5,58	5,08	+++	5,33	5,17	5,25	+++	5,42	5,50	5,33	+++
		D0	Semana 1	Semana 2	Semana 4		Semana 4	Semana 6	Semana 12		Mes 6	Mes 12	Mes 18	
CPI	SP01	6,83	5,17	4,50	4,58	++	4,33	3,58	2,50	++	5,08	4,67	3,92	++
CPI	SP06	6,67	4,58	4,17	2,50	+	3,33	2,58	1,50	+	5,33	4,33	3,67	+
CPI	SP02B	6,83	5,33	4,67	4,83	+++	4,58	4,25	3,75	+++	5,08	4,92	4,92	+++
		D0	Semana 2	Semana 4	Semana 8		Semana 4	Semana 6	Semana 12		Mes 6	Mes 12	v18	
CAV2	SP01	4,00	1,58	2,33	n/a	+	1,50	1,50	n/a	+	1,58	1,50	1,67	+
CAV2	SP15	4,58	3,17	3,33	n/a	++	2,83	3,00	n/a	++	3,17	2,92	n/a	++
CAV2	SP02B	4,33	4,33	4,25	2,83	+++	3,33	3,25	1,50	+++	3,67	3,58	3,67	+++
CAV2	SP10	4,08	4,33	4,17	3,67	++++	3,50	3,50	3,08	++++	3,92	3,75	3,83	++++
		D0	Semana 2	Semana 4	Semana 8		Mes 2	Mes 4	Mes 6		Mes 6	Mes 10	Mes 12	
CPV	SPCPV-02	4,83	4,83	4,33	4,67	+++	4,50	3,83	3,67	+++	4,75	4,92	4,58	+++
CPV	SPCPV-06	4,92	3,83	3,42	3,25	++	3,83	3,17	3,33	++	5,25	4,33	3,92	++
CPV	SPCPV-10	5,13	3,75	3,25	2,50	+	4,00	3,08	2,83	+	4,50	3,83	3,50	+

- n/a indica que el dato está ausente debido a errores en el ensayo o a que no se probaron las muestras.
- "+" se usa para la clasificación de las formulaciones, indicando un mayor número de "+" una mejor estabilidad.
- El punto temporal está expresado como la combinación de día (D), semana (Semana) o mes (Mes) y la duración. Por ejemplo, D0 es el día 0, la Semana 1 es la semana 1 y el Mes 6 es el mes 6.

ES 2 749 197 T3

Tabla 4

Ciclos de liofilización para las vacunas para las vacunas de microesferas congeladas				
Etapa	**Temperatura**	**Tiempo**	**Velocidad de cambio**	**Presión de la cámara**
Carga	-20 ºC	1 hora	N/A	N/A
Congelación	entre -20 ºC y -45 ºC	N/A	1 ºC/minuto	N/A
Mantenimiento	-45 ºC	1 hora	1 ºC/minuto	N/A
Apareamiento	-20 ºC	N/A	N/A	N/A
Mantenimientoº	-20 ºC	1 hora	N/A	N/A
Congelación	entre -20 ºC y -45 ºC	N/A	1 ºC/minuto	N/A
Mantenimiento	-45 ºC	1 hora	N/A	N/A
Secado primario	-45 ºC	10 minutos	N/A	30 mTorr
	entre -45 ºC y 35 ºC	N/A	0,5 ºC/minuto	30 mTorr
	35 ºC	9 horas	N/A	30 mTorr
Secado secundario	35 ºC	3 horas	N/A	255 mTorr
N/A: no aplica				

Tabla 5

Ciclos de liofilización para la vacuna en el vial				
Etapa	**Temperatura**	**Tiempo**	**Velocidad de cambio**	**Presión de la cámara**
Carga	4 ºC	1 hora	N/A	N/A
Congelación	entre 4 ºC y -50 ºC	N/A	1 ºC/minuto	N/A
Mantenimiento	-50 ºC	2 hora	1 ºC/minuto	N/A
Apareamiento	-15 ºC	N/A	N/A	N/A
Mantenimiento	-15 ºC	2 horas	N/A	N/A
Congelación	- entre 15 ºC y -30 ºC	N/A	1 ºC/minuto	N/A
Mantenimiento	-30 ºC	4 horas	N/A	N/A
Secado primario	-30 ºC	40 horas	N/A	50 mTorr
	entre -30 ºC y 10 ºC	N/A	1 ºC/minuto	200 mTorr
	10 ºC, 8 horas		N/A	200 mTorr
Secado secundario	entre 10 ºC y 35 ºC	N/A	1 ºC/minuto	200 mTorr
	35 ºC	4	N/A	200 mTorr
N/A: no aplica				

Tabla 6

Período de validez estimado del CDV, del CPI, del CAV2 y del CPV a 27 ºC en diferentes formulaciones						
Virus	Formulaciones	Título de virus en diferentes momentos a 27 ºC				Período de validez estimado a 27 ºC
		D0	Mes 6	Mes 12	Mes 18	
CDV	SP02B	7,00	5,33	4,50	4,75	~ 24 meses
CDV	SP10	6,83	5,42	5,50	5,33	> 24 meses
		D0	Mes 6	Mes 12	Mes 18	
CPI	SP02B	6,67	5,00	4,75	4,83	> 18 meses
CPI	SP10	7,17	4,92	4,92	4,92	> 18 meses

(continuación)

Período de validez estimado del CDV, del CPI, del CAV2 y del CPV a 27 ºC en diferentes formulaciones						
Virus	Formulaciones	Título de virus en diferentes momentos a 27 ºC				Período de validez estimado a 27 ºC
		D0	Mes 6	Mes 12	Mes 18	
CAV	SP02B	4,33	3,67	3,58	3,67	~1 8 meses
CAV	SP10	4,08	3,92	3,75	3,83	> 24 meses
		D0	Mes 6	Mes 10	Mes 12	
CPV	SPCPV-02	4,83	4,75	4,92	4,58	~ 18 meses
CPV	SPCPV-03	5,08	4,33	4,92	4,75	~ 18 meses

Tabla 7

Varias formulaciones destacadas identificadas mediante el uso de las pruebas de estabilidad acelerada a 45 ºC						
Virus	Formulación	Título de virus a 45 ºC				Clasificación de estabilidad
		D0	Semana 1	Semana 2	Semana 4	
CDV	SP10	7,00	5,83	5,45	5,44	+++
CDV	SP43	7,11	6,11	6,00	5,89	++++
CDV	SP44	7,44	6,50	6,28	6,11	+++++
		D0	Semana 1	Semana 2	Semana 4	
CPI	SP10	6,83	5,66	5,17	4,83	+++
CPI	SP43	6,94	5,72	5,28	5,39	++++
CPI	SP44	7,17	6,28	5,83	5,56	+++++
		D0	Semana 1	Semana 2	Semana 4	
CAV2	SP10	4,56	4,56	4,72	4,50	+++
CAV2	SP43	4,61	4,56	4,61	4,67	+++
CAV2	SP44	4,67	5,22	5,00	4,61	++++

Tabla 8

Efectos del tampón y del pH sobre la estabilidad del virus									
Virus	Formulación	Tampón	pH	Título de virus en diferentes puntos temporales					Clasificación de estabilidad del virus
				D0	45 ºC	45 ºC	27 ºC	27 ºC	
					Semana 2	Semana 4	Mes 3	Mes 6	
CDV	IB3-01	KPO4	6,5	n/a	5,58	4,67	6,00	5,50	+++++
CDV	IB3-02	KPO4	7,2	6,63	4,58	3,00	5,38	5,25	+++
CDV	IB3-03	KPO4	7,6	6,88	4,00	2,00	5,00	4,63	+
CDV	IB3-04	Histidina	6,5	7,13	5,33	4,33	5,50	5,38	++++
CDV	IB3-05	Histidina	7,2	7,00	4,50	3,17	5,25	5,25	+++
CDV	IB3-06	Histidina	7,6	6,88	4,08	2,83	4,75	5,13	++
CDV	IB3-07	BTP	6,5	6,88	5,25	3,83	5,75	5,38	++++
CDV	IB3-08	MOPS	6,5	7,00	4,75	3,92	5,63	5,38	++++

(continuación)

Efectos del tampón y del pH sobre la estabilidad del virus									
Virus	Formulación	Tampón	pH	Título de virus en diferentes puntos temporales					Clasificación de estabilidad del virus
				D0	45 ºC	45 ºC	27 ºC	27 ºC	
					Semana 2	Semana 4	Mes 3	Mes 6	
CPI	IB3-01	KPO4	6,5	n/a	5,42	4,58	6,25	5,25	+++++
CPI	IB3-02	KPO4	7,2	6,50	4,50	3,42	5,38	4,75	+++
CPI	IB3-03	KPO4	7,6	6,38	3,75	2,17	4,75	4,25	+
CPI	IB3-04	Histidina	6,5	7,00	5,33	4,17	5,75	4,88	++++
CPI	IB3-05	Histidina	7,2	6,88	4,25	3,00	5,25	4,63	+++
CPI	IB3-06	Histidina	7,6	6,88	4,17	3,00	5,13	4,88	++
CPI	IB3-07	BTP	6,5	6,75	4,75	4,08	5,13	5,25	++++
CPI	IB3-08	MOPS	6,5	7,00	5,00	4,00	5,75	5,13	++++
CAV2	IB3-01	KPO4	6,5	4,80	4,50	4,50	5,25	5,38	++++
CAV2	IB3-02	KPO4	7,2	5,18	4,58	4,42	5,00	5,00	+++
CAV2	IB3-03	KPO4	7,6	4,18	4,25	4,67	5,38	5,13	+++
CAV2	IB3-04	Histidina	6,5	4,68	4,58	5,08	5,50	5,25	++++
CAV2	IB3-05	Histidina	7,2	4,80	4,58	4,50	5,25	5,13	+++
CAV2	IB3-06	Histidina	7,6	4,93	4,42	4,75	4,75	5,00	++
CAV2	IB3-07	BTP	6,5	4,55	4,83	4,75	5,13	5,75	+++++
CAV2	IB3-08	MOPS	6,5	4,55	4,75	4,67	4,75	5,63	++++
CPV	IB3-01	KPO4	6,5	4,25	2,92	3,25	4,63	n/a	++
CPV	IB3-02	KPO4	7,2	4,25	3,67	4,33	5,63	n/a	+++
CPV	IB3-03	KPO4	7,6	4,00	3,83	4,75	5,50	n/a	+++
CPV	IB3-04	Histidina	6,5	n/a	4,17	4,00	5,25	n/a	+++
CPV	IB3-05	Histidina	7,2	4,25	4,25	4,83	5,50	n/a	++++
CPV	IB3-06	Histidina	7,6	3,50	3,67	4,92	5,50	n/a	++++
CPV	IB3-07	BTP	6,5	4,88	3,58	3,83	4,88	n/a	++
CPV	IB3-08	MOPS	6,5	4,50	3,92	4,00	5,38	n/a	+++

Tabla 9a

Contenido de oligosacárido no reductor y de oligosacárido no reductor total en las formulaciones de mezcla usadas en la Tabla 9b			
Formulaciones	Concentración de azúcar (p/v)		Contenido total de azúcar (p/v)
	Sacarosa	Trehalosa	
SP02B	17,1 %	-	17,1 %
SP10	17,1 %	6,8 %	23,9 %
SP11	10,3 %	6,8 %	17,1 %
SP12	6,8 %	10,3 %	17,1 %
SP13	6,8 %	17,1 %	23,9 %
SP14	-	17,1 %	17,1 %
SP15	10,3 %	-	10,3 %
SP16	5,2 %	5,2 %	10,3 %
SP17	-	10,3 %	10,3 %

Tabla 9b

Efectos de la concentración de azúcar sobre la estabilidad de los CDV, CPI y CAV2 liofilizados										
Virus	Formulación	Título de virus en diferentes puntos temporales a 45 ºC y a 37 ºC								Clasificación de estabilidad
		D0	45 ºC	45 ºC	45 ºC	37 ºC	37 ºC	37 ºC	37 ºC	
			Semana 2	Semana 4	Semana 8	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 12	
CDV	SP02B	7,00	5,25	5,00	4,67	4,92	4,67	4,83	4,00	++
CDV	SP10	6,83	5,58	5,08	5,50	5,25	5,33	5,17	5,25	++++
CDV	SP11	6,92	5,00	5,00	n/a	5,58	5,17	4,83	n/a	+++
CDV	SP12	6,75	5,00	5,00	n/a	5,17	4,42	4,67	n/a	++
CDV	SP13	7,17	5,08	5,00	4,75	5,08	5,33	5,08	5,13	++++
CDV	SP14	6,92	4,83	4,92	5,17	5,33	4,92	4,83	4,38	++
CDV	SP15	7,00	5,17	4,92	n/a	4,92	4,88	4,67	n/a	++
CDV	SP16	6,75	5,00	4,33	n/a	4,92	4,75	4,50	n/a	+
CDV	SP17	6,83	4,33	4,75	n/a	4,92	4,33	4,08	n/a	+
CPI	SP02B	6,67	4,67	4,58	4,42	4,75	4,67	4,00	2,92	++
CPI	SP10	7,17	5,17	4,92	4,67	5,17	5,00	4,33	3,75	++++
CPI	SP11	6,67	5,17	4,78	n/a	5,00	4,75	4,42	n/a	+++
CPI	SP12	6,92	4,92	4,75	n/a	4,92	4,67	3,75	n/a	++
CPI	SP13	6,92	5,33	4,83	4,67	4,67	4,67	4,50	4,25	++++
CPI	SP14	6,67	4,92	4,83	4,33	4,75	4,58	4,33	2,50	++
CPI	SP15	7,08	5,08	4,92	n/a	4,92	4,67	4,00	n/a	++
CPI	SP16	6,83	4,92	4,58	n/a	5,00	4,67	4,00	n/a	++
CPI	SP17	6,67	4,58	4,17	n/a	4,92	4,33	3,58	n/a	+
CAV2	SP02B	4,33	4,33	4,25	2,83	3,33	3,33	3,25	1,50	++
CAV2	SP10	4,08	4,33	4,17	3,67	3,58	3,50	3,50	3,08	+++
CAV2	SP11	4,25	3,58	3,75	n/a	3,00	3,17	2,75	n/a	+
CAV2	SP12	4,58	3,92	3,83	n/a	3,33	3,67	3,17	n/a	++
CAV2	SP13	4,42	4,50	4,42	3,33	3,58	3,75	4,17	3,08	+++
CAV2	SP14	4,33	3,92	3,92	3,50	3,58	3,58	3,42	3,25	+++
CAV2	SP15	4,58	3,17	3,33	n/a	2,83	2,83	3,00	n/a	++
CAV2	SP16	4,08	3,33	3,17	n/a	2,92	2,58	2,50	n/a	+
CAV2	SP17	4,33	2,58	2,58	n/a	2,33	2,67	2,92	n/a	+
n/a: punto de datos no disponible										

Tabla 10

Efectos sobre la estabilidad del virus de la concentración de L-arginina en la mezcla											
Virus	Formulación		Título de virus durante las pruebas de estabilidad a 45 ºC y a 37 ºC								Clasificación de estabilidad
			D0	45 ºC	45 ºC	45 ºC	45 ºC	37 ºC	37 ºC	37 ºC	
	Nombre	L-Arg		Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 8	Mes 2	Mes 4	Mes 6	
CDV	SP02B	0,3 M	5,75	5,50	5,83	5,58	4,83	5,25	5,42	4,83	+++
CDV	SP26	0,2 M	6,58	5,58	5,83	5,33	4,33	5,17	4,75	4,83	++
CDV	SP27	0,1 M	n/a	6,33	5,25	4,92	4,33	5,42	4,25	4,58	+

(continuación)

Efectos sobre la estabilidad del virus de la concentración de L-arginina en la mezcla											
Virus	Formulación		Título de virus durante las pruebas de estabilidad a 45 ºC y a 37 ºC								Clasificación de estabilidad
			D0	45 ºC	45 ºC	45 ºC	45 ºC	37 ºC	37 ºC	37 ºC	
	Nombre	L-Arg		Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 8	Mes 2	Mes 4	Mes 6	
CPI	SP02B	0,3 M	7,00	5,08	5,25	4,83	4,92	4,75	5,17	4,42	+++
CPI	SP26	0,2 M	6,83	5,42	5,67	4,67	4,17	5,00	4,50	4,42	++
CPI	SP27	0,1 M	6,67	5,33	4,83	4,58	4,25	4,58	4,42	4,00	+
CAV2	SP02B	0,3 M	4,00	3,75	3,42	3,58	3,67	3,67	3,83	3,00	+++
CAV2	SP26	0,2 M	4,33	3,42	3,25	2,92	3,67	3,25	3,50	1,67	+
CAV2	SP27	0,1 M	4,33	3,33	2,83	2,50	2,67	3,33	2,92	2,42	+
n/a: punto de datos no disponible											

Tabla 11a

Inicio de la Tg de las microesferas liofilizadas con diferentes sales de arginina y en combinación con ácido glutámico			
Formulación	Estabilizantes		Inicio de la Tg (C)
	Arginina	Ácido glutámico	
SP10	ArgCl 0,3 M		58,7
SP33	Arg3PO4 0,3 M		80,9
SP34	ArgAc 0,3 M		36,1
SP35	ArgCl 0,15 M	Glu 0,15 M	52,9
SP36	ArgCl 0,25 M	Glu 0,25 M	27,8

Tabla 11b

Efectos de las diferentes sales de arginina y del ácido glutámico sobre la estabilidad del CDV, del CAV2 y del CPI										
Virus	Formulación	Título de virus durante los estudios de estabilidad a 45 ºC o a 37 ºC								Clasificación de estabilidad
		D0	45 ºC	45 ºC	45 ºC	45 ºC	37 ºC	37 ºC	27 ºC	
			Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 8	Mes 2	Mes 4	Mes 7	
CDV	SP10	6,92	6,00	5,50	5,50	5,33	5,50	5,08	5,67	+++
CDV	SP33	7,08	4,75	4,83	4,25	3,50	5,00	4,25	4,50	+
CDV	SP34	7,50	5,75	5,50	5,42	4,83	5,67	5,17	5,67	+++
CDV	SP35	7,25	5,67	5,33	5,42	5,25	5,58	5,17	5,42	+++
CDV	SP36	7,00	6,17	5,42	4,92	3,58	5,75	4,83	6,00	+++
CPI	SP10	6,83	5,42	5,08	5,00	4,67	5,08	5,33	5,08	+++
CPI	SP33	6,83	4,92	4,83	3,75	3,25	4,58	3,83	4,00	+
CPI	SP34	6,67	5,50	5,42	4,42	4,75	5,50	4,83	5,58	+++
CPI	SP35	6,58	5,67	5,33	5,08	4,25	5,25	4,50	5,25	++
CPI	SP36	6,58	5,83	5,83	4,58	3,83	5,25	5,08	5,33	+++
CAV2	SP10	4,25	4,25	4,42	4,25	4,00	4,00	4,42	4,33	+++
CAV2	SP33	4,00	4,33	4,33	4,00	3,08	3,58	3,92	3,83	++
CAV2	SP34	4,50	4,42	4,58	4,17	4,33	3,92	4,58	4,33	+++
CAV2	SP35	4,50	4,83	4,17	4,25	4,00	4,00	4,58	4,08	+++
CAV2	SP36	4,58	4,67	4,75	4,17	3,83	4,08	4,50	4,42	+++

Tabla 12

Efecto del manitol y de la glicina como estabilizantes para la vacuna tetravalente									
Formulación	Estabilizante de volumen	Título de virus (Log_{10} de la $TCID_{50}$) después de un almacenamiento a 45 ºC							
		CDV		CAV2		CPI		CPV	
		D0	w2	D0	w2	D0	w2	D0	w2
IB1-02	Manitol	7,75	4,50	4,83	4,67	7,25	4,17	5,83	5,17
IB1-06	Glicina	7,75	3,58	5,25	4,25	8,00	3,83	6,33	5,42
IB1-10	-	7,58	2,83	4,83	4,08	7,33	3,25	6,58	4,92

• D0 es el título del virus después de la liofilización y w2 es el título de virus después de un almacenamiento a 45 ºC durante 2 semanas.
• La diferencia entre las formulaciones IB1-02, IB1-06 e IB1-10 es el estabilizante de volumen. La IB1-02 contiene manitol al 4 %, la IB1-06 contiene glicina al 2 %, mientras que la IB1-10 no contiene ningún estabilizante de volumen.

Tabla 13

Efectos de la ectoína y de la hidroxiectoína sobre la estabilidad del virus										
Virus	Formulación	Título de virus durante las pruebas de estabilidad								Clasificación de estabilidad
		D0	45 ºC	45 ºC	45 ºC	45 ºC	37 ºC	37 ºC	27 ºC	
			Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 8	Mes 2	Mes 4	Mes 7	
CDV	SP10	6,92	6,00	5,50	5,50	5,33	5,50	5,08	5,67	+++
CDV	SP39	7,50	5,50	5,67	5,58	5,17	5,67	5,67	5,67	+++
CDV	SP40	6,92	5,67	5,58	5,58	5,42	5,92	5,50	6,42	++++
CPI	SP10	6,83	5,42	5,08	5,00	4,67	5,08	5,33	5,08	+++
CPI	SP39	6,50	5,92	5,50	4,92	4,92	5,25	5,33	5,08	+++
CPI	SP40	6,50	5,75	5,25	5,00	5,17	5,33	5,25	5,42	++++
CAV2	SP10	4,25	4,25	4,42	4,25	4,00	4,00	4,42	4,33	+++
CAV2	SP39	4,50	5,00	4,83	4,25	3,75	4,17	4,67	4,17	+++
CAV2	SP40	3,92	4,25	4,67	4,08	3,92	4,50	4,50	4,00	+++

Tabla 14

Efectos del sorbitol, de la proteína y de la arginina sobre la potencia del CPV y la estabilidad física de la vacuna seca														
Formulaciones	Excipientes			Título de virus en diversos puntos temporales									Clasificación de la estabilidad de la potencia	Clasificación de la estabilidad física
	Sorbitol	Proteína	L-Arg	Pre-Lio	D0	45 ºC			37 ºC			27 ºC		
						Semana 1	Semana 2	Semana 4	Mes 2	Mes 4	Mes 6	Mes 6		
SPCPV-02	5 %	1x de GN	0,3 M	4,80	5,08	5,33	5,00	4,33	4,36	5,17	4,42	5,17	+++	++
SPCPV-13	8 %	1x de GN	0,3 M	5,30	5,17	5,25	4,83	4,25	4,75	5,58	4,75	5,58	++++	+
SPCPV-14	12 %	1x de GN	0,3 M	5,05	5,08	5,25	4,92	4,33	4,42	5,58	5,00	5,58	++++	+
SPCPV-15	5 %	2,5x de GN	0,3 M	5,05	5,17	5,17	4,83	4,17	4,08	5,25	4,67	5,00	+++	+++
SPCPV-17	5 %	2,5x de GN	-	5,30	5,42	4,92	4,83	3,92	4,33	5,08	4,58	5,00	+++	+++

- EL título de virus en Pre-Lio es el título del virus en la mezcla de vacuna antes de su liofilización.
- 1x de GN es gelatina al 0,8 % (p/v) y NZ Amine al 1,0 % (p/v). 2,5x de GN es gelatina al 2,5 % (p/v) y NZ Amine al 2,5 % (p/v).

Tabla 15

Efectos del sorbitol y del dextrano sobre la estabilidad del CPV								
Formulaciones	Excipientes (p/v)		Título de virus después de un almacenamiento a 45 ºC				Clasificación de la estabilidad de la potencia	Clasificación de la estabilidad física
	Sorbitol	Dextrano	D0	Semana 1	Semana 2	Semana 4		
SP-CPV-17	5 %	2 %	4,83	4,39	3,95	3,83	+++	+++
SP-CPV-23	5 %	4 %	5,17	4,33	4,05	4,00	+++	++++
SP-CPV-24	5 %	6 %	4,94	4,11	3,61	3,55	+	+++++
SP-CPV-26	8 %	4 %	5,83	4,45	4,78	4,33	+++++	++++

- El dextrano usado tiene un peso molecular de 70k.
- La clasificación de la estabilidad física se basa en la estructura física de las microesferas después de la liofilización, que se determinó en diferentes momentos durante el almacenamiento a 45 ºC.

Tabla 16

Efectos de los diferentes formatos de secado sobre la estabilidad del virus										
Formato de la liofilización	Formulación	Título de virus durante las pruebas de estabilidad a 45 ºC								
		CDV			CPI			CAV2		
		D0	Semana 2	Semana 4	D0	Semana 2	Semana 4	D0	Semana 2	Semana 4
Microesferas	SP02B	n/a	5,25	5,00	6,67	4,67	4,58	4,33	4,33	4,25
Vial	FDIV-03	7,25	5,00	4,92	7,13	5,42	4,92	4,63	n/a	4,25
n/a, los datos del título para este punto temporal no están disponibles debido a una invalidación del ensayo										

REIVINDICACIONES

1. Una formulación seca de una vacuna que comprende un virus vivo atenuado, entre un 30 % y un 80 % (p/p) de un oligosacárido no reductor, entre un 5 % y un 40 % (p/p) de un estabilizante aminoácido, entre un 2 % y un 20 % (p/p) de un estabilizante proteico, entre un 2 % y un 25 % (p/p) de un estabilizante de volumen y un tampón que tiene un pH de entre 6,0 y 8,0; en donde antes de ser secada, la vacuna ha sido tratada mediante un proceso seleccionado entre el grupo que consiste en su aplicación en una membrana, su congelación en microesferas, su congelación en viales, un secado por pulverización y una liofilización por pulverización.

2. La formulación seca de la reivindicación 1, en la que la proporción entre el estabilizante de volumen y el oligosacárido no reductor es de entre 0,05 y 0,40.

3. La formulación seca de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el virus vivo atenuado es un virus vivo atenuado seleccionado entre el grupo que consiste en un virus del moquillo, un adenovirus, un virus paragripal, un vector vírico recombinante que codifica y expresa un antígeno heterólogo, y cualquier combinación de los mismos.

4. La formulación seca de la reivindicación 3, en la que el virus vivo atenuado es un virus vivo atenuado canino seleccionado entre el grupo que consiste en un virus del moquillo canino (CDV), un adenovirus canino de tipo 2 (CAV2), un virus paragripal canino (CPI), un vector vírico paragripal recombinante canino (rCPI) que codifica y expresa un antígeno heterólogo, y cualquier combinación de los mismos.

5. La formulación seca de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente un parvovirus canino (CPV) y entre un 2 % y un 5 % (p/p) de sorbitol.

6. La formulación seca de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el estabilizante aminoácido es arginina.

7. La formulación seca de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende adicionalmente entre un 0,02 % y un 1 % (p/p) de una sal de un catión divalente seleccionado entre el grupo que consiste en Mg^{++}, Ca^{++} y Zn^{++}.

8. La formulación seca de las reivindicaciones 1 a 7, que antes de ser secada, la vacuna ha sido tratada mediante un proceso seleccionado entre el grupo que consiste en su aplicación a una membrana, su congelación en microesferas, su congelación en viales, un secado por pulverización y una liofilización por pulverización.

9. La formulación seca de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el oligosacárido no reductor es una combinación de entre un 20 % y un 80 % (p/p) de sacarosa y entre un 18 % y un 66 % (p/p) de trehalosa; el estabilizante de volumen es entre un 5 % y un 17 % (p/p) de manitol; el estabilizante aminoácido es entre un 9 % y un 34 % (p/p) de arginina; en donde el estabilizante proteico comprende entre un 2 % y un 5 % (p/p) de gelatina y entre un 2 % y un 6 % (p/p) de un hidrolizado proteolítico de caseína completa; y en donde la proporción entre el estabilizante de volumen y el oligosacárido no reductor es de entre 0,08 y 0,37.

10. Un método de elaboración de una formulación seca de una vacuna estable a la temperatura ambiente, que comprende:

a) la preparación de una formulación de vacuna mediante la combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de un virus vivo atenuado canino con entre un 8 % y un 30 % (p/v) de un oligosacárido no reductor, entre un 1 % y un 6 % (p/v) de un estabilizante de volumen, entre 0,1 M y 0,5 M de un estabilizante aminoácido, entre un 0,9 % y un 10 % (p/v) de un estabilizante proteico y un tampón que tiene un pH de entre 6,0 y 8,0; en donde la proporción entre el estabilizante de volumen y el oligosacárido no reductor es de entre 0,05 y 0,40; y
b) el secado de la formulación de vacuna de la etapa a. a vacío para la elaboración de una formulación seca estable a la temperatura ambiente según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11. Una vacuna que comprende una formulación seca de las reivindicaciones 1 a 9 combinada con una formulación seca de una vacuna que comprende un parvovirus vivo atenuado, entre un 10 % y un 80 % (p/p) de un alcohol de azúcar, entre un 10 % y un 70 % (p/p) de un estabilizante de volumen, entre un 4 % y un 50 % (p/p) de un estabilizante proteico y un tampón que tiene un pH de entre 6,8 y 8,0, y un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable.

12. La formulación seca de la reivindicación 11 en donde, en la formulación seca de una vacuna que comprende un parvovirus vivo atenuado, el alcohol de azúcar se selecciona entre el grupo que consiste en sorbitol, manitol, xilitol, maltitol y combinaciones de los mismos, en donde el estabilizante de volumen se selecciona entre el grupo que consiste en dextrano, maltodextrina, polivinilpirrolidona, hidroxietil almidón, glicina, manitol, o combinaciones de los mismos, en donde el estabilizante proteico se selecciona entre el grupo que consiste en gelatina, un hidrolizado proteolítico de caseína completa, o una combinación de los mismos.