

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 895 494**

(51) Int. Cl.:

<b>A61K 9/20</b>	(2006.01)	<b>A61P 31/20</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/12</b>	(2006.01)	<b>A61P 31/22</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/17</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/04</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/255</b>	(2006.01)	<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/275</b>	(2006.01)		
<b>A61K 47/26</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/04</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/10</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/12</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/14</b>	(2006.01)		

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2015 PCT/US2015/055027**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16057978**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2015 E 15801958 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.09.2021 EP 3203988**

---

(54) Título: **Composiciones de vacuna de espumado reducido**

(30) Prioridad:

**10.10.2014 US 201462062180 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.02.2022**

(73) Titular/es:

**ABIC BIOLOGICAL LABORATORIES LTD.  
(100.0%)  
3 Hamelacha Street, P.O. Box 489  
Beit Shemesh 99100, IL**

(72) Inventor/es:

**GENIN, NOEL YVES HENRI JEAN**

(74) Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 895 494 T3

---

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

**DESCRIPCIÓN**

Composiciones de vacuna de espumado reducido

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

5 Esta solicitud reclama la prioridad de la solicitud provisional estadounidense con número de serie 62/062.180, presentada el 10 de octubre de 2014.

**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a una composición de vacuna comprimida, compactada, estable que comprende una composición de vacuna comprimida que comprende al menos un componente antigénico liofilizado y un agente de control de espuma, y un proceso de elaboración del mismo. Esta composición de vacuna densa y estable conserva la estabilidad del título y, al mismo tiempo, proporciona una disolución completa en un diluyente con mínimo espumado. También se proporciona esta composición de vacuna estable para su uso en un método de vacunación de un sujeto.

15

**Antecedentes de la invención**

La publicación PCT núm. WO 99/21579 (Seager, et al.) describe una composición de rápida dispersión para una vacuna veterinaria que se deshidrocongela y se compacta de forma suelta. La patente estadounidense núm. 5.587.180 (Allen, Jr. et al) describe un proceso para hacer una matriz de soporte particulada para un comprimido que se disuelve rápidamente. La patente estadounidense núm. 5.336.666 (Neway et al.) describe una vacuna líquida deshidrocongelada que puede formar un comprimido para ser reconstituida en forma líquida. El documento WO 2004/026336 A1 describe procesos para la producción de vacunas que comprenden uno o más inmunógenos, que se estabilizan frente a la inactivación y pérdida de inmunogenicidad.

25

Una desventaja de las preparaciones de vacunas actuales es que contienen estabilizadores susceptibles de espumado cuando se mezclan con el diluyente, lo que provoca un excesivo espumado en la solución después de la disolución de la composición, lo que también causa problemas al usuario al contener la solución en el recipiente en el que se disuelve. El desbordamiento de la solución del recipiente debido al espumado puede provocar la pérdida de producto y una mayor exposición de la vacuna al usuario.

30

**Resumen de la invención**

En consecuencia, es un objetivo de la invención proporcionar una composición de vacuna estable, así como esta composición de vacuna para su uso en un método de inmunización logrado simplemente disolviendo una forma sólida y estable de una vacuna anhidra en un diluyente con un mínimo de espumado y una mínima pérdida de actividad antigénica.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar una vacuna viva o inactivada liofilizada que está compactada, comprimida o en forma de comprimido como un sólido estable denso que retendrá su capacidad inmunizante potencial durante la preparación y durante la duración requerida por un período de tiempo farmacéuticamente aceptable y puede disolverse en diluyente con mínimo espumado.

45

Otro objetivo de la invención es proporcionar una composición de vacuna, así como esta composición de vacuna para uso en un método de inmunización con mayor flexibilidad en las vacunas que se pueden formular con la misma.

50

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar una composición de vacuna, así como esta composición de vacuna para su uso en un método de inmunización que reduce la necesidad de un exceso de material de vacuna necesario para compensar las inexactitudes inherentes en el título causadas por el espumado excesivo y la pérdida de producto durante la disolución.

55

Otro objetivo de la invención es proporcionar una composición de vacuna, así como esta composición de vacuna para su uso en un método de inmunización que facilite la inmunización masiva de aves.

60

Estos y otros objetivos pueden lograrse mediante la presente invención que se refiere a una composición de vacuna sólida estable que comprende:

i) al menos un componente antigénico anhidro que comprende un estabilizador de almacenamiento a baja temperatura o un estabilizador de liofilización susceptible de espumado cuando la composición se mezcla con diluyente líquido; y  
ii) una cantidad eficaz de un agente de control de espuma que es un alcohol de azúcar, en donde la cantidad eficaz de alcohol de azúcar es del 25 % al 40 % en peso de la composición.

65

Además, la presente invención también proporciona la composición de vacuna sólida estable anterior para su uso en un método de vacunación de un sujeto contra una enfermedad que comprende las etapas de:

- (a) disolver la composición de vacuna sólida estable anterior, que proporciona protección contra dicha enfermedad, con un diluyente para formar una solución; y
- (b) administrar la solución resultante al sujeto en una cantidad eficaz para inmunizar al sujeto contra la enfermedad,

de manera preferible en donde la etapa de administración comprende pulverizar al sujeto con un aerosol formado a partir de la solución.

La invención también proporciona un proceso para reducir el espumado de una composición de vacuna sólida cuando se mezcla con diluyente líquido, en donde la composición comprende por lo menos un componente antigénico anhídrico que comprende un estabilizador de almacenamiento a baja temperatura o un estabilizador de liofilización susceptible de espumado;

5 en donde el proceso comprende:

- (a) añadir una cantidad eficaz de un alcohol de azúcar a la composición de vacuna sólida, en donde la cantidad eficaz de alcohol de azúcar es del 25 % al 40 % en peso de la composición.

10 La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de un alcohol de azúcar para reducir el espumado de una vacuna sólida cuando la composición se mezcla con diluyente líquido, en donde la composición comprende por lo menos un componente antigénico anhídrico que comprende un estabilizador de almacenamiento a baja temperatura o un estabilizador de liofilización susceptible de espumado.

15 La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que quede fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona sólo con fines informativos.

20 Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

25 La invención en sus características particulares se hará más evidente a partir de la siguiente descripción detallada considerada con referencia a los ejemplos adjuntos. La siguiente descripción continuará discutiendo los problemas y las soluciones ofrecidas por la presente invención en lo que respecta a las aplicaciones veterinarias.

Estas y otras realizaciones se divultan o se desprenden de la siguiente descripción detallada y están comprendidas en ella.

30 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una composición de vacuna comprimida estable como se reivindica, que comprende por lo menos un componente antigénico liofilizado, y un agente de control de espuma.

35 En una realización de la invención, la composición de vacuna se disuelve completa y rápidamente en un diluyente.

En una realización de la invención, la composición de vacuna se presenta en forma de un comprimido duro, una cápsula, un granulado, una cápsula dispersable, un pélet, una perla, una píldora o una torta liofilizada.

40 En una realización de la invención, la composición de vacuna comprende un agente de disolución que es un agente o par de agentes efervescentes.

En una realización de la invención, la composición de vacuna comprende un agente de disolución que comprende un par de agentes efervescentes.

45 En una realización de la invención, la composición de vacuna comprende un par efervescente que comprende una sal y un ácido, por ejemplo, ácido cítrico, y la sal es un bicarbonato.

50 De acuerdo con la invención, la composición de vacuna comprende un agente de control de espuma como se reivindica, que comprende del 25 % al 40 % en peso de la composición.

En una realización de la invención, la composición de vacuna comprende un agente de disolución que comprende hasta aproximadamente el 60 % en peso de la composición.

55 En una realización de la invención, la composición de vacuna comprende un agente de disolución que comprende hasta aproximadamente el 35 % en peso de la composición.

En una realización de la invención, la composición de vacuna se caracteriza por una disolución completa entre aproximadamente 90 y 700 segundos al entrar en contacto con un diluyente.

60 En una realización de la invención, la estabilidad de la composición se caracteriza por una pérdida de título no mayor que la diferencia mostrada en los ejemplos.

65 De acuerdo con la invención, la composición de vacuna comprende un agente de control de espuma que es un alcohol de azúcar.

- En una realización de la invención, la composición de vacuna comprende un agente de control de espuma que es xilitol, manitol y sorbitol.
- En una realización de la invención, la composición de vacuna comprende un agente de control de espuma que es el manitol.
- 5 En una realización de la invención, la composición de vacuna comprende un componente antigénico que es IB88 o IBH120.
- 10 En una realización de la invención, la composición de vacuna tiene una friabilidad de menos que aproximadamente 2%.
- 15 En una realización de la invención, la composición de vacuna comprende un virus vivo seleccionado del grupo que consiste en: el virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la bursitis infecciosa, virus de la viruela aviar, virus de la laringotraqueitis, virus de la bronquitis infecciosa de las aves de corral, virus de la viruela ovina, virus de la peste bovina, o una mezcla de uno o más de los anteriores, ya sea natural, recombinante o modificado.
- 20 En una realización de la invención, la composición de vacuna comprende un componente antigénico seleccionado del grupo que consiste en: bacilos del ántrax, *Salmonella SPP*, *E. coli*, o una mezcla de uno o más de los anteriores, ya sea natural, recombinante o modificado.
- Una realización de la invención proporciona la composición de vacuna sólida estable anterior para su uso en un método de vacunación de un sujeto contra una enfermedad que comprende las etapas de:
- 25 (a) disolver la composición de vacuna sólida estable anterior, que proporciona protección contra dicha enfermedad, con un diluyente para formar una solución; y  
 (b) administrar la solución resultante al sujeto en una cantidad eficaz para inmunizar al sujeto contra la enfermedad, de manera preferible en donde la etapa de administración comprende pulverizar al sujeto con un aerosol formado a partir de la solución.
- 30 En un aspecto de esta realización de la invención, la etapa de disolución se caracteriza además por la disolución completa de la composición de vacuna.
- En un aspecto de esta realización de la invención, la disolución se produce entre aproximadamente 90 y 700 segundos al entrar en contacto con un diluyente en donde la etapa de administración comprende pulverizar al sujeto con un aerosol formado a partir de la solución.
- Una realización de la invención proporciona un proceso de fabricación de una composición de vacuna estable comprimida de disolución rápida de la invención que comprende las etapas de: liofilizar al menos un componente antigénico; mezclar el componente antigénico liofilizado y el agente de control de espuma como se reivindica; y comprimir la mezcla del componente antigénico liofilizado y el agente de control de espuma con al menos un agente de disolución para formar una composición de vacuna estable comprimida de disolución rápida.
- 40 Los comprimidos compactados, comprimidos y duros de la composición de vacuna pueden realizarse en un punzón sencillo instrumentado MANESTY F3 de 12 mm con bisel plano o en punzones cóncavos estándar de 6mm. La composición de vacuna en forma de comprimido duro puede hacerse a presiones de un máximo de 4 Mg (4 toneladas). La dureza de los comprimidos puede ser probada en un probador de dureza de comprimidos ERWEKA, modelo TBH20, como se describió anteriormente, y se detectó que todas tienen una dureza superior a 21,0 N (3,0 SCU). Se entiende que el comprimido clásico normalmente asociado a los agentes terapéuticos es un "comprimido" de este tipo. Sin embargo, se entiende que se trata de cualquier forma densa compactada o comprimida, incluidas las que tienen un uso menos frecuente en el ámbito farmacéutico. Por ejemplo, las "briquetas" de gran tamaño serían adecuadas si la aplicación final requiere un gran volumen de material.
- 45 Específicamente, los rellenos de comprimidos son sustancias que comprometen el volumen del comprimido y actúan principalmente como portadores. Los rellenos típicos de los comprimidos incluyen, entre otros, sulfato de calcio, fosfato de calcio, carbonato de calcio, almidón, almidones modificados (carboximetilalmidón, etc.), celulosa microcristalina, lactosa, sacarosa, dextrosa, manitol y sorbitol. Los niveles de relleno de los comprimidos oscilan de aproximadamente 0% a 90% en peso del comprimido.
- 50 Los aglutinantes actúan como el "pegamento" que mantiene los polvos unidos para formar los gránulos. Los aglutinantes incluyen, entre otros, polímeros naturales como almidones o gomas de acacia, tragacanto y gelatina o polímeros sintéticos como PVP y metil-, etil- e hidroxipropilcelulosa. Los niveles de aglutinante oscilan de aproximadamente 0% a 20% en peso del comprimido.
- 55 Los auxiliares de disolución promueven la disolución de la composición de vacuna. Los ejemplos típicos incluyen, pero no

se limitan a, agentes efervescentes, desintegrantes, tensoactivos y solubilizadores.

Los desintegrantes hacen que los comprimidos se rompan. Los ejemplos típicos incluyen, pero no se limitan a, almidón, celulosa microcristalina, almidón de lana purificado, ácido algínico, almidón glicolato de sodio, goma guar, polivinilpirrolidona reticulada (PVP), resina de intercambio iónico y celulosas como la metil-, croscarmelosa sódica, carboximetil- de sodio e hidroxipropilmetyl-. Los niveles de agentes de disolución oscilan de aproximadamente 1% a 95 % en peso del comprimido.

Los lubricantes reducen la fricción entre el material a comprimir y la pared de la matriz durante la compresión y la expulsión. La mayoría de los lubricantes son insolubles en agua e incluyen estearatos (de magnesio, calcio y sodio), ácido esteárico, talco y ceras. Los lubricantes solubles en agua incluyen PEG, benzoato de sodio, oleato de sodio, acetato de sodio, lauril sulfato de sodio y lauril sulfato de magnesio. Los niveles de lubricante oscilan de aproximadamente 0% a 5% en peso de la composición.

Los colorantes se añaden para ayudar a identificar los tipos de formulaciones de vacunas, como en forma de comprimidos con fines estéticos y funcionales, por ejemplo, y no como limitación a la presente invención, los tintes divulgados en los ejemplos A a D tomados de la patente israelí núm. 46189. Los niveles de colorante son de aproximadamente <1 % de la formulación. En una realización, la composición de la presente invención es un comprimido duro preparado con un agente efervescente como auxiliar de disolución. Como aprecian los expertos en la técnica, el comprimido efervescente debe contener un componente básico y un componente ácido, como un par efervescente, para que al disolverse se produzcan las reacciones adecuadas para generar dióxido de carbono y ácido carbónico. Los componentes efervescentes adecuados incluyen la familia de los carbonatos de los compuestos básicos y los compuestos ácidos inorgánicos u orgánicos. Entre la familia de carbonatos de compuestos básicos, los agentes efervescentes preferidos para su uso en las composiciones de la presente invención son el carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de glicina, carbonato de potasio, bicarbonato de potasio, dihidrogencitrato de potasio y carbonato de calcio. Un compuesto básico más preferido es el bicarbonato de sodio. Los componentes ácidos preferidos para su uso en las composiciones de la presente invención son el ácido cítrico, el ácido adípico, el ácido tartárico, el ácido maleico, el ácido bórico, el ácido benzoico, el ácido hidroxibenzoico, el ácido metoxibenzoico, el ácido mandélico, el ácido malónico, el ácido láctico, el ácido pirúvico, el ácido glutárico, el ácido aspártico, el ácido clorhídrico, el ácido oxálico, el ácido salicílico, el ácido succínico y el ácido acético. Un componente efervescente ácido más preferido es el ácido cítrico.

Además de los ingredientes efervescentes básicos y ácidos descritos anteriormente, la composición de comprimido de la presente invención puede contener también otros excipientes empleados convencionalmente.

#### Definiciones

Los términos utilizados en la presente tendrán su significado habitual en la técnica, a menos que se especifique lo contrario.

El término "componente antigénico" o "antígeno", como se utiliza en la presente, es una sustancia que es reconocida por el sistema inmunitario e induce una respuesta inmunitaria. La sustancia puede comprender un organismo entero, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o porción de un organismo; un vector recombinante que contenga un inserto con propiedades antigénicas; una pieza o fragmento de ácido nucleico capaz de inducir una respuesta inmunitaria al presentarse a un animal huésped; una proteína, un polipéptido, un péptido, una glicoproteína, un epitopo, un hapteno, un carbohidrato, un azúcar o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el antígeno puede comprender una toxina o antitoxina. Un término similar utilizado indistintamente en este contexto es "inmunógeno" o "antigénico".

El término "compactado", como se utiliza en la presente, se refiere a una composición de vacuna que tiene una densidad superior a 1,0 g/cm<sup>3</sup>, pero sin dureza medible, medida en unidades Strong-Cobb (SCU) y probada para la dureza en un probador de dureza de comprimidos ERWEKA modelo TBH20 (0,143 SCU = 1 N).

El término "comprimido", como se utiliza en la presente, se refiere a una composición de vacuna que tiene una dureza de al menos 14,0 N (2,0 SCU).

El término "comprimido duro", como se utiliza en la presente, se refiere a una composición de vacuna en forma de comprimido u otra forma densa que tiene una dureza de al menos 21,0 N (3,0 SCU).

El término "completamente disuelto", como se utiliza en la presente, se entiende que no queda ningún componente soluble sin disolver.

El término "rápidamente desintegrado" o "rápidamente disuelto", como se utiliza en la presente, se entiende que la desintegración o disolución se completa en aproximadamente unos minutos o menos cuando se emplea un gran volumen de agua para un pequeño volumen de composición de vacuna liofilizada comprimida, por ejemplo, 100 mL de agua para un comprimido efervescente de 400 mg. El tiempo se incrementa cuando los volúmenes de diluyente se reducen comparativamente. Así, el mismo comprimido podría requerir 70 segundos con un volumen de agua de 10 mL, y 80 segundos en 2 mL de agua.

- El término "tiempo de desintegración" o "tiempo de disolución", como se utiliza en la presente, es el tiempo que tarda la disolución o desintegración de un comprimido cuando se mezcla en una cantidad medida de agua a temperatura ambiente.
- 5 El término "estable", como se utiliza en la presente, se entiende que las composiciones de la presente invención mantendrán su capacidad inmunizante (potencial) durante la preparación y durante el tiempo necesario para la vida útil de una vacuna comercial.
- 10 El término "excipiente", como se utiliza en la presente, se refiere a un término para los diluyentes o vehículos utilizados en la formulación de la composición de vacuna. Los excipientes pueden incluir: diluyentes o rellenos, aglutinantes o adhesivos, auxiliares de disolución, lubricantes, antiadherentes, deslizantes o promotores de flujo, colores, sabores, edulcorantes y adsorbentes.
- 15 El término "estabilizador", como se utiliza en la presente, es un compuesto químico utilizado para estabilizar el material antigenólico durante el almacenamiento a baja temperatura o la liofilización. Ejemplos de tales estabilizadores son los aminoácidos, como la alanina, la arginina, el ácido aspártico, la cistina, el ácido glutámico, la glicina, la histidina, la hidroxiprolina, la isoleucina, la leucina, la lisina, la metionina, la fenilalanina, la prolina, la serina, la treonina, la tirosina y la valina; sales de aminoácidos como la sal de hidrocoruro de L-arginina y la sal de metal alcalino del ácido glutámico, como el glutamato monosódico y el glutamato monopotásico; proteínas, o sales de las mismas, como hidrolizado de proteínas, proteína bovina, proteína de suero de ratón, proteína de suero de ternera, proteína de levadura, proteína de pollo, proteína de huevo; albúmina, como albúmina bovina y ovoalbúmina, gelatina y gelatina hidrolizada.
- 20 El estabilizador también incluye un monosacárido, por ejemplo, sorbitol, o un disacárido, por ejemplo, sacarosa, lactosa o maltosa. Se prefiere la sacarosa.
- 25 30 El término "mezclado", como se utiliza en la presente, significa mezclar una sustancia por sonicación, medios mecánicos o químicos. Los ejemplos de mezcla mecánica incluyen la agitación, sacudir, agitación magnética y el forzamiento de la sustancia a través de una jeringa adecuada. Los ejemplos de mezclado químico incluyen una reacción efervescente que provoca la formación de gas *in situ* (a través de la reacción química de uno o más ingredientes, incluida la formación de dióxido de carbono (gas CO<sub>2</sub>)) suficiente para provocar una acción de mezclado a medida que la liberación resultante de burbujas de gas pasa a través del líquido a la superficie.
- 35 El componente antigenólico, como se define en la presente, puede comprender patógenos vivos atenuados, como virus, bacterias, hongos o parásitos vivos atenuados. Sin embargo, un componente antigenólico activo también puede comprender virus muertos, inmunógenos heterólogos recombinantes, antígenos, subunidades antigenicas (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, péptidos, epítopos, haptenos) o epítopos de inmunógenos o antígenos derivados u originados por uno o más patógenos descritos en la presente, que pueden expresarse a partir de vectores virales, vectores bacterianos, vectores plasmídicos y similares.
- 40 45 El componente antigenólico activo de la presente invención puede comprender uno o más inmunógenos seleccionados de un patógeno canino que incluye, pero no se limita a, el virus de la rabia, el adenovirus canino tipo 2 (CAV2), el herpesvirus canino (CHV) parvovirus canino (CPV), coronavirus canino, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorragiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Borreliaburgdorferi*, *Bordetellabronchiseptica* y similares, incluidas las combinaciones de los mismos. El componente antigenólico activo puede incluir los genes HA, F, NP del CDV, el gen de la cápside del CPV, los genes de la espiga, M, N del coronavirus canino, los genes HN y F del cPi2, genes de *Leptospira*, genes de *Bordetella*, genes de *Borrelia* y los genes gB, gC y gD del herpesvirus canino, entre otros. Estos componentes pueden ser útiles como composiciones antigenicas o composiciones de vacuna para proteger a los caninos contra la enfermedad causada por estos patógenos.
- 50 55 El adenovirus canino tipo 2 (CAV2) está ampliamente propagado y es muy contagioso para los perros. Produce síntomas parecidos a los de un resfriado. Por lo general, los primeros signos de la enfermedad contagiosa son la fiebre, que suele remitir en uno o dos días. Los perros afectados pueden presentar amigdalitis, sensibilidad abdominal, agrandamiento del hígado, vómitos y diarrea. La enfermedad aguda suele ser mortal. El CAV2 puede ser inactivado o atenuado y combinado con el CDV (y/o cPi2) para producir una vacuna multivalente. Alternativamente, se pueden utilizar inmunógenos o antígenos de CAV2, o epítopos de inmunógenos de CAV2, como las proteínas de la cápside, la matriz o el hexón.
- 60 65 El parvovirus canino (CPV) es un virus intestinal común que puede causar vómitos, diarrea, gastroenteritis, miocarditis y hepatitis en perros jóvenes. Se ha comprobado que está ampliamente propagado en los perros. El CPV puede estar presente en las composiciones, suspensiones o soluciones antigenicas de la invención como inmunógenos inactivados, vivos atenuados o CPV, antígenos o epítopos de inmunógenos del CPV, como los productos génicos VP1, VP2 (cápside). Otro componente antigenólico activo útil en las composiciones y métodos de la presente invención puede comprender uno o más inmunógenos seleccionados de patógenos aviares que incluyen, pero no se limitan a, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus del síndrome de la gota de huevo (EDS), virus de la bursitis infecciosa (IBDV), virus del pavo, virus de la gripe aviar, virus de la enfermedad de Marek, los herpesviruses como el virus de la laringotraqueítis infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa

5 aviar, reovirus aviar, los poxvirus como el avipox, la viruela aviar, viruela del canario, viruela de las palomas, viruela de las codornices y viruela de las palomas, el poliomavirus aviar, neumovirus aviar, virus de la rinotraqueítis aviar, virus de la reticuloendoteliosis aviar, los retrovirus aviares, virus de la eritroblastosis aviar, virus de la hepatitis aviar, virus de la anemia aviar, virus de la enteritis aviar, virus de la enfermedad de Pacheco, virus de la leucemia aviar, parvovirus aviar, rotavirus aviar, virus de la leucosis aviar, virus del fibrosarcoma musculoaponeurótico aviar, virus de la mieloblastosis aviar, virus asociado a la mieloblastosis aviar, virus de la mielocitomatosis aviar, virus del sarcoma aviar, virus de la necrosis del bazo aviar, y combinaciones de los mismos.

10 En cuanto a los inmunógenos específicos, los componentes antigenéticos activos pueden ser también los genes HN y F del virus de la enfermedad de Newcastle, la poliproteína y los genes VP2 del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, los genes S y N del virus de la bronquitis infecciosa y los genes gB y gD del virus de la enfermedad de Marek. Estos componentes pueden ser utilizados como composiciones antigenéticas o composiciones de vacuna para proteger a las aves contra la enfermedad causada por estos patógenos.

15 Alternativamente, el componente antigenético activo comprende uno o más inmunógenos de un patógeno felino como, por ejemplo, el herpesvirus felino (FHV), el calicivirus felino (FCV), el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus de la peritonitis infecciosa felina, el virus de la panleucopenia felina, el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la rabia, y similares, y combinaciones de los mismos.

20 El componente antigenético activo también puede incluir los genes gB, gC y gD del herpesvirus felino, los genes env y gag/pro del FeLV, los genes env, gag/pol y tat del virus FIV, el gen de la cápside del calicivirus felino, el gen modificado S, el gen M y el gen N del virus de la peritonitis infecciosa felina y el gen VP2 del parvovirus felino. Estos componentes pueden ser utilizados como composiciones antigenéticas o composiciones de vacuna para proteger a las aves contra la enfermedad causada por estos patógenos.

25 El componente antigenético activo puede comprender uno o más inmunógenos de un patógeno equino, como el herpesvirus equino (tipo 1 o tipo 4), el virus de la gripe equina, el virus de la encefalomielitis equina (EEV), el tétanos, el virus del Nilo occidental, y similares o combinaciones de los mismos.

30 El componente antigenético activo también puede incluir, los genes gB, gC, gD y de expresión rápida del herpesvirus equino tipo 1, los genes gB, gC, gD y de expresión rápida del herpesvirus equino tipo 4, los genes HA, NA, M y NP del virus de la gripe equina, los genes del virus de la encefalitis equina oriental, los genes del virus de la encefalitis equina occidental, los genes del virus de la encefalitis equina venezolana, los genes prM--M-E del virus del Nilo occidental y los genes del virus de la arteritis equina, pero no se limitan a estas secuencias. Estos componentes pueden ser utilizados como composiciones antigenéticas o composiciones de vacuna para proteger a los caballos contra la enfermedad causada por estos patógenos.

35 El componente antigenético activo puede comprender uno o más inmunógenos de un patógeno bovino, como el virus de la rabia, el rotavirus bovino, el virus de la parainfluenza bovina tipo 3 (bCP12-3), el coronavirus bovino, el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) el virus de la fiebre aftosa (FMDV), el virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), *Escherichia coli*, *Pasteurellamultocida*, *Pasteurellahaemolytica*, y similares y combinaciones de los mismos.

40 El componente antigenético activo también puede seleccionarse entre los genes gB, gC, gD y de expresión rápida del herpesvirus bovino tipo 1, los genes F y G del BRSV, la poliproteína, los genes E1, E2 del BVDV, los genes HN y F del virus PI3 o los genes del rotavirus. Estos componentes pueden ser utilizados como composiciones antigenéticas o composiciones de vacuna para proteger al ganado contra la enfermedad causada por estos patógenos.

45 Además, el componente antigenético activo puede comprender uno o más inmunógenos de un patógeno porcino como, por ejemplo, el virus de la gripe porcina (SIV), el circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), el virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRSV) el virus de la pseudorrabia (PRV), el parvovirus porcino (PPV), el virus del cólera porcino (HCV), el virus de la fiebre aftosa (FMDV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, y similares, y combinaciones de los mismos.

50 El componente antigenético activo también puede incluir los genes gB, gC, gD y de expresión rápida del PRV, los genes HA, NA, M y NP del virus de la gripe porcina, la poliproteína, E1, E2 del virus del cólera porcino, los genes ORF1 y ORF2 del virus PCV2, los genes ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 o ORF7 del virus PRRS o los genes de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Estos componentes pueden ser utilizados como composiciones antigenéticas o composiciones de vacuna para proteger a los cerdos contra la enfermedad causada por estos patógenos.

55 El componente antigenético activo puede comprender secuencias que codifican una proteína expresada en patógenos como los virus de ARN o ADN como el VIH, VHC, VHB, VPH, VEB, VHS, CMV, HTLV, hantavirus, virus del ébola, virus de Marburgo, virus de la fiebre del Valle del Rift, Lassa virus y virus de la gripe, virus de la enteriditis hemorrágica (VHE), virus de la rinotraqueítis infecciosa (VRI), entre otros. Dichos inmunógenos pueden utilizarse ventajosamente como composiciones antigenéticas o composiciones de vacunas para proteger a los sujetos, como los seres humanos, contra la enfermedad causada por estos patógenos.

- El componente antigénico activo también puede ser, por ejemplo, de cualquiera de las siguientes bacterias patógenas y sus antígenos: especies de *Actinobacillus* como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella avium*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, especies de *Klebsiella* como *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium pneumoniae*, *Streptococcus* del Grupo A, *Streptococcus equi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Neisseria gonorrhoeae*, especies de *Erysipelothrix*, *Enterotoxicigenic Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnis*, *Haemophilus parasuis*, especies de *Salmonella*, *Salmonella agona*, *Salmonella blockley*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella hadar*, *Salmonella Heidelberg*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella senftenberg*, *Salmonella cholerasuis*, especies de *Rickettsia*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, especies de *Shigella*, especies de *Listeria*, *Legionella pneumoniae*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Borrelia*, *Borellia burgdorferi*, *Neisseria meningitidis*, especies de *Clostridium*, *Clostridium difficile*, *Ureaplasma urealyticum*, especies de *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pasteurella pestis*, especies de *Campylobacter*, *Campylobacter jejuni*, especies de *Treponema*, especies de *Leptospira*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Hemophilus ducreyi*, *Hemophilus influenzae*, especies de *Erlichhia*, entre otros.
- 15 El componente antigénico activo también puede derivarse de un hongo o moho como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, especies de *Penicillium*, especies de *Fusarium*, especies de *Candida* como *Candida trichophyton*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*, especies de *Rhizopus*, especies de *Cryptococcus* como *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus grubii*, *Cryptococcus gattii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* y otros hongos y mohos.
- 20 El componente antigénico activo también puede seleccionarse de entre los antígenos parasitarios derivados de especies parasitarias que incluyen, pero no se limitan a, especies de *Plasmodium*, especies de *Tripanosoma*, especies de *Giardia*, especies de *Boophilus*, especies de *Babesia*, especies de *Entamoeba*, especies de *Eimeria*, especies de *Leishmania*, especies de *Schistosoma*, especies de *Brugia*, especies de *Fasciola*, especies de *Dirofilaria*, especies de *Wuchereria*, especies de *Onchocerca*, especies de *Treponema*, especies de *Toxoplasma*, especies de *Cryptococcus*, especies de *Coccidia*, especies de *Histomoniasis*, especies de *Giardia*, entre otras; nemátodos, incluyendo especies de *Ascaris*, especies de *Trichinella*, y similares, helmintos tales como trematodos, tenias, entre otros; y otros organismos patógenos similares. Los métodos para preparar inmunógenos derivados de virus, bacterias, hongos, mohos, protozoos, nemátodos y helmintos son conocidos en la técnica.
- 25 Otros inmunógenos útiles pueden ser, por ejemplo, factores de virulencia de antígenos secretados purificados, como toxinas, citotoxinas y similares. Los antígenos de toxinas que se desintoxican mediante la modificación (toxoides), que pueden administrarse en combinación con un adyuvante como el hidróxido de aluminio, y pueden utilizarse para estimular la formación de anticuerpos neutralizantes de toxinas. Entre los ejemplos de toxinas que pueden utilizarse como inmunógenos se encuentran las endotoxinas y exotoxinas bacterianas, como el lipopolisacárido, las enterotoxinas, incluidas las enterotoxinas termolábiles (LT), las enterotoxinas termoestables (ST), la verotoxina (VT) y otras similares. Los inmunógenos exotoxinas bacterianas se secretan en el medio circundante, e incluyen, por ejemplo, la toxina de la difteria (*Corynebacterium diphtheriae*), la toxina del tétanos (*Clostridium tetani*), las enterotoxinas secretadas por *Staphylococcus aureus*, las toxinas botulínicas (*Clostridium botulinum*); y las toxinas producidas por algas, como las neurotoxinas; y similares. Las endotoxinas termoestables, liberadas por la autolisis de las bacterias, incluyen, por ejemplo, las toxinas del cólera liberadas por el *Vibrio cholerae* gramnegativo, las colicinas producidas por bacterias intestinales como *E. coli* (bacteriocina).
- 30 45 Los inmunógenos derivados u originados por virus, bacterias, hongos y similares pueden producirse mediante métodos de cultivo *in vitro* utilizando un medio de cultivo apropiado o líneas de células huésped y métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el PRRSV puede cultivarse en una línea celular apropiada, como la línea celular MA-104 (véanse las patentes estadounidenses núm. 5.587.164; 5.866.401; 5.840.563; 6.251.404, entre otras). De forma similar, el PCV-2 puede cultivarse utilizando la línea celular PK-15 (véase la patente estadounidense núm. 6.391.314); el SIV puede cultivarse en huevos (patente estadounidense núm. 6.048.537); y el *Mycoplasma hyopneumoniae* puede cultivarse en un medio de cultivo adecuado (patentes estadounidenses núms. 5.968.525; 5.338.543; Ross R. F. et al., (1984) Am. J. Vet. Res. 45: 1899-1905). Ventajosamente, el CDV puede cultivarse en células pulmonares de visón, como las descritas en la patente estadounidense núm. 5.178.862. Otras técnicas para la preparación de inmunógenos derivados de virus son conocidas en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Ulmer et al., Science 259: 1745 (1993); Male et al., Advanced Immunology, páginas 14.1-14.15. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa. (1989).
- 50 55 También son útiles los péptidos sintéticos antigenicos que imitan las secuencias de péptidos antigenicos. Dichos inmunógenos pueden sintetizarse utilizando una técnica en fase sólida como se describe, por ejemplo, en R. B. Merrifield, Science 85:2149-2154 (1963), purificarse y, opcionalmente, acoplarse a una proteína portadora como el dipéptido de muramilo (MDP), la albúmina de suero bovino (BSA), la hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), y similares, utilizando un agente de acoplamiento bifuncional como el glutaraldehído, y similares.
- 60 65 Los antígenos sintéticos también se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, los polipeptídos, los epítopos flanqueantes y otros antígenos recombinantes o derivados sintéticamente. Véase, por ejemplo, Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23, 2777-2781; Bergmann et al. (1996) J. Immunol. 157, 3242-3249; Suhrbier, A. (1997) Immunol. Cell

5 Biol. 75, 402-408; Gardner et al. (1998) 12<sup>a</sup> Conferencia Mundial sobre el SIDA, Ginebra, Suiza, 28 de junio a 3 de julio de 1998. Los fragmentos antigenicos, a efectos de la presente invención, pueden incluir normalmente al menos aproximadamente 3 aminoácidos, de manera preferible al menos aproximadamente 5 aminoácidos, más de manera preferible al menos aproximadamente 10 a 15 aminoácidos, y más de manera preferible 25 o más aminoácidos, de la molécula. No hay un límite superior crítico para la longitud del fragmento, que podría comprender casi la secuencia de la proteína de longitud completa, o incluso una proteína de fusión que comprenda dos o más, o por lo menos un epítopo de la proteína.

10 En consecuencia, una estructura mínima de un ácido nucleico que exprese un epítopo puede comprender nucleótidos para codificar un epítopo, inmunógeno o antígeno de una proteína o poliproteína. Un ácido nucleico que codifica un fragmento de la proteína o poliproteína total, más ventajosamente, comprende o consiste esencialmente o consiste en un mínimo de aproximadamente 21 nucleótidos, ventajosamente al menos aproximadamente 42 nucleótidos, y de manera preferible al menos aproximadamente 57, aproximadamente 87 o aproximadamente 150 nucleótidos consecutivos o contiguos de la secuencia que codifica la proteína o poliproteína total. Los procedimientos de determinación de epítopos, como la generación de genotecas de péptidos superpuestos (Hemmer B. et al., (1998) Immunology Today 19(4), 163-168), Pepscan (Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3998-4002; Geysen et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 178-182; Van der Zee R. et al., (1989) Eur. J. Immunol. 19, 43-47; Geysen H.M., (1990) Southeast Asian J. 15 Trop. Med. Public Health 21, 523-533; Multipin® Peptide Synthesis Kits de Chiron) and algorithms (De Groot A. et al., (1999) Nat. Biotechnol. 17, 533-561), y en la solicitud PCT con número de serie PCT/US2004/022605 pueden utilizarse en la práctica de la invención, sin necesidad de experimentación excesiva. También pueden consultarse otros documentos 20 citados en relación con los métodos para determinar los epítopos de un inmunógeno o antígeno y, por tanto, las moléculas de ácido nucleico que codifican dichos epítopos.

25 También se proporciona por la invención un proceso para producir una composición antigenica estable deshidrocongelada o una composición de vacuna que comprende, por ejemplo, el virus de la enfermedad de Newcastle, que comprende la etapa de liofilizar una suspensión o solución estabilizada formada por una suspensión o solución de virus vivo atenuado de la enfermedad de Newcastle, mezclada con un estabilizador según la invención y un alcohol de azúcar según la invención.

30 La "deshidrocongelación" o "liofilización" se refiere al proceso por el que se congela una suspensión, tras lo cual se elimina el agua por sublimación a baja presión. Tal como se utiliza en la presente, el término "sublimación" se refiere a un cambio en las propiedades físicas de una composición, en donde la composición cambia directamente de un estado sólido a un estado gaseoso sin convertirse en líquido. Como se utiliza en la presente, el "valor T'g" se define como la temperatura de transición vítreo, que corresponde a la temperatura por debajo de la cual la composición congelada se vuelve vítreo.

35 Un proceso de deshidrocongelación de una suspensión o solución antigenica de acuerdo con la invención puede comprender las etapas de: (a) poner en contacto la suspensión o solución antigenica con un estabilizador de la invención, formando así una suspensión o solución antigenica estabilizada; (b) enfriar, a presión atmosférica, la suspensión o solución antigenica estabilizada hasta una temperatura inferior a aproximadamente el valor T'g de la suspensión o solución antigenica estabilizada; (c) secar la suspensión o solución antigenica estabilizada (es decir, la etapa de desecación o sublimación primaria) mediante la sublimación del hielo a baja presión; y (d) eliminar el exceso de agua residual (es decir, la etapa de secado o desorción secundaria) reduciendo aún más la presión y aumentando la temperatura de la suspensión o solución antigenica estabilizada.

45 La etapa de enfriamiento (b) puede tener lugar a temperaturas inferiores a unos -40 °C (etapa de congelación del agua). El secado de las suspensiones o soluciones antigenicas estabilizadas por sublimación de hielo a baja presión (c) puede ocurrir, por ejemplo, a una presión inferior o igual a aproximadamente 200 mbar, mientras que una reducción adicional de la presión puede ocurrir a presiones inferiores o iguales a aproximadamente 100 mbar. Por último, la temperatura de la suspensión o solución antigenica estabilizada durante la eliminación del exceso de agua residual (d) se produce, por ejemplo, a temperaturas comprendidas entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 30 °C.

50 55 El proceso de deshidrocongelación también puede realizarse con una suspensión o solución antigenica que comprenda el virus vivo atenuado de la enfermedad de Newcastle y por lo menos un componente antigenico activo derivado de un patógeno que no sea un paramixovirus, que se mezcla con un estabilizador según la invención para obtener una composición antigenica o vacuna multivalente estabilizada deshidrocongelada.

60 El contenido de humedad del material deshidrocongelado puede oscilar entre aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5% p/p, de manera preferible entre aproximadamente 0,5% a aproximadamente 3% p/p, y de manera más preferible de aproximadamente 1,0% a aproximadamente 2,6% p/p.

65 Cada etapa, incluida la congelación del agua, y su eliminación durante la desecación primaria y secundaria, somete a los ingredientes biológicos, como los patógenos, en las suspensiones o soluciones antigenicas de la invención a choques mecánicos, físicos y bioquímicos, que tienen efectos potencialmente adversos sobre la estructura, el aspecto, la estabilidad, la antigenicidad, la infectividad y la viabilidad de los patógenos o ingredientes biológicos.

65 Los estabilizadores de la invención permiten una buena estabilidad de los patógenos vivos atenuados como el

- paramixovirus canino, y mantiene la infectividad de, en particular, el CDV y el cPi2 durante el proceso de deshidrocongelación y durante el almacenamiento. La estabilidad puede calcularse por la diferencia entre el título de infectividad antes de la etapa de deshidrocongelación y el título de infectividad después de 12 meses de almacenamiento de la composición antigénica estabilizada deshidrocongelada o la composición de vacuna a 4 °C. Una buena estabilidad puede comprender ventajosamente una diferencia de sólo 1,2 log<sub>10</sub>, y de manera preferible de sólo 1,0 log<sub>10</sub>. Los métodos para determinar el título de infectividad son bien conocidos por los expertos en la técnica. Algunos métodos para determinar el título de infectividad se describen en los ejemplos de la presente. Asimismo, la estabilidad puede estimarse ajustando el título log<sub>10</sub> y los puntos de tiempo de la valoración durante el periodo de almacenamiento mediante cálculos de regresión lineal y/o algoritmos.
- Además, los estabilizadores de la invención permiten que las pastillas deshidrocongeladas tengan un buen aspecto, es decir, que tengan una forma regular y un color uniforme. Una forma irregular puede caracterizarse por la presencia de toda o una parte de la pastilla pegada al fondo del recipiente y que permanece inmóvil tras el volteo y el cizallamiento (aspecto pegado). Asimismo, una pastilla con forma de sepé (aspecto de sepé), o la separación de la pastilla en dos partes, siguiendo un plano horizontal (aspecto desduplicado), o una pastilla con aspecto de *mousse* con agujeros irregulares (aspecto esponjoso), o una pastilla con aspecto de espuma en el recipiente (aspecto de merengue) tienen una forma irregular y no se aceptan.
- Las composiciones antigénicas deshidrocongeladas estabilizadas o las composiciones de vacunas que utilizan un estabilizador de acuerdo con la presente invención y que se obtienen mediante el proceso de deshidrocongelación descrito anteriormente se engloban en la presente invención.
- Otro aspecto de la presente invención proporciona un kit que comprende un primer recipiente que contiene la composición antigénica estabilizada deshidrocongelada o la composición de vacuna de la invención, y un segundo recipiente que contiene un diluyente.
- Para su uso y administración a un sujeto, la composición antigénica estabilizada deshidrocongelada o la composición de vacuna puede reconstituirse por rehidratación con un diluyente. El diluyente suele ser agua, como agua desmineralizada o destilada, pero también puede comprender soluciones fisiológicas o amortiguadores conocidos en la técnica.
- Las composiciones antigénicas reconstituidas listas para su uso o las composiciones de vacuna pueden administrarse a un animal por inyección por vía parenteral o mucosa, o preferiblemente por administración oral u ocular por pulverización. Sin embargo, la administración de dichas composiciones antigénicas reconstituidas y listas para su uso o de las composiciones de vacuna también puede comprender la administración intranasal, epicutánea o tópica.
- Los siguientes ejemplos ilustran la preparación y la potencia de la composición de vacuna de la presente invención cuando se utiliza para inmunizar a un sujeto contra diversas enfermedades infecciosas. También se presentan evaluaciones de estabilidad con un análisis de títulos de una forma de comprimido deshidrocongelado comprimido para varias formulaciones de vacunas. La fabricación de la composición de la invención puede ser realizada por un experto en la técnica siguiendo las enseñanzas de los documentos US 2003/0026813 y WO 01/13896.
- Los ejemplos se presentan para ilustrar y explicar la presente invención y no deben tomarse como limitantes en ningún sentido. A menos que se indique lo contrario en los ejemplos y en otras partes de la especificación y las reivindicaciones, todas las partes y los porcentajes son en peso. Las temperaturas se expresan en grados centígrados.
- Estudio de estabilidad**
- También se estudió el efecto del manitol en la estabilidad de las composiciones de vacuna. Se hicieron seis fórmulas diferentes como se describe en la tabla 1, para demostrar que el agente de control de espuma (manitol) no tenía ningún impacto negativo en la estabilidad de las formulaciones a intervalos de 6 y 9 meses. Los comprimidos elaborados a partir de las fórmulas se almacenaron a unos 5 °C en blísteres de aluminio estándar sellados durante el tiempo necesario antes de ser reconstituidos en diluyente y medidos los títulos. La determinación del título viral de las vacunas deshidrocongeladas se realizó mediante el cálculo del título medio de tres valoraciones repetidas sobre la misma vacuna. Los resultados del título se muestran en la tabla 2. Sólo la fórmula 4 es de acuerdo con la invención.
- | Tabla 1:                                   |                    |           |           |           |           |           |
|--|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|  | Fórmula 1          | Fórmula 2 | Fórmula 3 | Fórmula 4 | Fórmula 5 | Fórmula 6 |
|  | Fórmula por 100 kg |           |           |           |           |           |
| Antígeno deshidrocongelado y estabilizador | 30,00 kg           | 35,00 kg  | 33,00 kg  | 40,00 kg  | 25,00 kg  | 35,00 kg  |
| Bicarbonato de sodio                       | 41,02 kg           | 28,92 kg  | 39,25 kg  | 19,50 kg  | 43,97 kg  | 28,92 kg  |
| Manitol                                    | 0                  | 15,00 kg  | 0         | 26,00 kg  | 0         | 15,00 kg  |

		Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3	Fórmula 4	Fórmula 5	Fórmula 6
5	Ácido cítrico anhidro	28,48 kg	20,08 kg	27,25 kg	13,50 kg	30,53 kg	20,08 kg
10	Esterato de magnesio	0,50 kg	1,00 kg	0,50 kg	1,00 kg	0,50 kg	1,00 kg
15	Características del comprimido						
20	Diámetro	12 mm	12mm	15 mm	15mm	12 mm	12mm
25	Dureza	70 - 200 N	70 - 200 N	70 - 200 N	70 - 200 N	70 -200 N	70 -200 N
30	Peso (g)	0,74 - 0,90	0,63 0,77	1,10 - 1,34	0,90 - 1,10	0,74 - 0,90	0,527 - 0,645
35	Espesor (mm)	4,5 – 4,9	<5	4.5 - 4.9	< 5	4,5 - 4.9	3,5 – 3,9

Tabla 2 - Resultados de los títulos:

Fórmula #	Antígeno	Estabilizador	Título medio (0 meses)	Título medio (3 meses)	Título medio (6 meses)	Título medio (9 meses)
1	Virus de la enfermedad Newcastle de la cepa VG/GA	Hidrolizado de proteínas Glutamato de potasio Albúmina bovina	9,4	9,0	9,0	9,1
2	Virus de la enfermedad Newcastle de la cepa VG/GA	Hidrolizado de proteínas Glutamato de potasio Albúmina bovina	9,5	9,3	9,2	9,4
3	Virus de la bronquitis infecciosa cepa CR88121	Hidrolizado de proteínas	7,6	7,1	7,3	7,0
4	Virus de la bronquitis infecciosa cepa CR88121	Hidrolizado de proteínas	7,9	7,8	7,8	7,8
5	Virus de la bronquitis infecciosa cepa H120	Hidrolizado de proteínas	9,4	7,1	7,4	-
6	Virus de la bronquitis infecciosa cepa H120	Hidrolizado de proteínas	7,5	7,6	7,7	-
55	Unidades de título: Log10 DICC50/cp					

Los resultados muestran una muy buena estabilidad de las formulaciones que contienen manitol durante un largo período de almacenamiento a 5°C.

55

### Estudios de control de espuma

#### a) Concentraciones del agente de control de espuma:

- 60 Se hicieron tres formulaciones como se muestra en la tabla 3 para examinar el efecto de la cantidad de agente de control de espuma en la reducción del espumado en la solución. Sólo el % en peso de manitol de la Fórmula III es de acuerdo con la invención. Estas formulaciones se formaron en comprimido utilizando los medios convencionales para hacer comprimidos efervescentes. Los comprimidos se mezclaron en agua a temperatura ambiente y se midió el espumado en el punto máximo de espumado. El bicarbonato de sodio y el ácido cítrico actúan como agentes efervescentes para ayudar a mezclar el compuesto en el agua. Los resultados mostrados en la figura 1 muestran que la fórmula II (que contiene

15% de manitol), y la fórmula III (que contiene 33% de manitol), tienen menos formación de espuma que la fórmula I (control que contiene 0% de manitol). Esto muestra la disminución de la formación de espuma a medida que aumenta la cantidad de manitol en la composición.

5 **Tabla 3:**

<b>Composición</b>	<b>Fórmula I</b>	<b>Fórmula II</b>	<b>Fórmula III</b>
Placebo y estabilizador	33%	33%	33%
Bicarbonato de sodio y ácido cítrico anhidro	66%	51%	33%
Manitol	0%	15%	33%
Estearato de magnesio	1%	1%	1%

15 **b) Examen del efecto del manitol en diferentes composiciones de vacunas:**

Se hicieron seis composiciones de vacunas como se muestra en la tabla 4. Sólo la fórmula E es de acuerdo con la invención. Estas composiciones se formaron en comprimido utilizando los medios convencionales para hacer comprimidos efervescentes. Los comprimidos se mezclaron en agua a temperatura ambiente y se midió el espumado en el punto máximo de espumado. El bicarbonato de sodio y el ácido cítrico actúan como agentes efervescentes para ayudar a mezclar el compuesto en el agua. Los resultados mostrados en la figura 2 muestran que la fórmula B (que contiene 15% de manitol) tiene aproximadamente 50% menos de espuma que la fórmula A (que contiene 0% de manitol). La figura 3 muestra que la fórmula D (que contiene 15% de manitol) tiene aproximadamente 60% menos de espuma que la fórmula C (que contiene 0% de manitol). La figura 4 muestran que la fórmula E (que contiene 26% de manitol) tiene aproximadamente 80% menos de espumado que la fórmula F (que contiene 0% de manitol).

20 **Tabla 4:**

<b>Composición</b>	<b>Fórmula A</b>	<b>Fórmula B</b>	<b>Fórmula C</b>	<b>Fórmula D</b>	<b>Fórmula E</b>	<b>Fórmula F</b>
Antígeno deshidrocongelado y estabilizador	Virus de la enfermedad Newcastle de la cepa VG/GA (30%)	Virus de la enfermedad Newcastle de la cepa VG/GA (35%)	Infecciosa Virus de la bronquitis cepa H120 (25%)	Infecciosa Virus de la bronquitis cepa H120 (35%)	Infecciosa Virus de la bronquitis infecciosa cepa CR88121 (40 %)	Infecciosa Virus de la bronquitis infecciosa cepa CR88121 (33%)
Bicarbonato de sodio y ácido cítrico anhidro	69%	49%	74%	49%	33%	66
Manitol	0%	15%	0%	15%	26%	0%
Estearato de magnesio	1%	1%	1%	1%	1%	1%

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna sólida estable que comprende:
  - (i) al menos un componente antigénico anhidro que comprende un estabilizador de almacenamiento a baja temperatura o un estabilizador de liofilización susceptible de espumado cuando la composición se mezcla con diluyente líquido; y
  - (ii) una cantidad eficaz de un agente de control de espuma que es un alcohol de azúcar, en donde la cantidad eficaz de alcohol de azúcar es del 25 % al 40 % en peso de la composición.
2. La composición de vacuna sólida estable de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el alcohol de azúcar es xilitol, manitol, sorbitol o una mezcla de los mismos.
3. La composición de vacuna sólida estable de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el componente antigénico anhidro se liofiliza o se seca y/o en donde la composición de vacuna se comprime en un comprimido.
4. La composición de vacuna sólida estable de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1 a 3, en donde el estabilizador comprende uno o más aminoácidos o sales del mismo, proteína o sales de los mismos, albúmina, gelatina o combinaciones de los mismos y/o en donde el componente antigénico es el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de la bronquitis infecciosa, el virus de la viruela aviar, el virus de la encefalomielitis aviar, el virus de la enfermedad de Marek, el trichophyton verrucosum, el paramixovirus aviar, el mycobacterium paratuberculosis, el herpesvirus meleagrid, el virus orf, o el virus de la viruela ovina, de manera preferible cuando el componente antigénico es el virus de la enfermedad de Newcastle o el virus de la bronquitis infecciosa, de manera preferible la cepa CR88121 del virus de la bronquitis infecciosa, la cepa H120 del virus de la bronquitis infecciosa o la cepa VG/GA del virus de la enfermedad de Newcastle.
5. La composición de vacuna sólida estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un agente de disolución, de manera preferible en donde el agente de disolución es hasta el 60% en peso de la composición, más de manera preferible del 30% al 60% en peso de la composición, de manera preferible en donde el agente de disolución es un agente efervescente o un par de agentes efervescentes, de manera preferible en donde el par efervescente comprende una sal y un ácido, de manera preferible en donde el ácido es ácido cítrico, ácido tartárico, ácido mágico, ácido fumárico, ácido adipico, ácido succínico, anhídridos de ácido o mezclas de los mismos, de manera preferible en donde la sal es sales de carbonato, sales de bicarbonato, sales de sesquicarbonato o mezclas de las mismas.
6. La composición de vacuna sólida estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el componente antigénico es un virus vivo y la composición comprende además anticuerpos neutralizantes contra el virus.
7. La composición de vacuna sólida estable con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en un método de vacunación de un sujeto contra una enfermedad que comprende las etapas de:
  - (a) disolver la composición de vacuna sólida estable de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que proporciona protección contra dicha enfermedad, con un diluyente para formar una solución; y
  - (b) administrar la solución resultante al sujeto en una cantidad eficaz para inmunizar al sujeto contra la enfermedad, de manera preferible en donde la etapa de administración comprende pulverizar al sujeto con un aerosol formado a partir de la solución.
8. Un proceso para reducir el espumado de una composición de vacuna sólida cuando se mezcla con diluyente líquido, en donde la composición comprende por lo menos un componente antigénico anhidro que comprende un estabilizador de almacenamiento a baja temperatura o un estabilizador de liofilización susceptible de espumado; en donde el proceso comprende:
  - (a) añadir una cantidad eficaz de un alcohol de azúcar a la composición de vacuna sólida, en donde la cantidad eficaz de alcohol de azúcar es del 25 % al 40 % en peso de la composición.
9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el alcohol de azúcar es xilitol, manitol o sorbitol o una mezcla de los mismos.
10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde el proceso además comprende:
  - (b) comprimir la composición de vacuna sólida para formar una composición de vacuna comprimida estable.
11. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la composición se mezcla por sonicación, medios mecánicos o químicos, de manera preferible en donde los medios químicos son una reacción efervescente.
12. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde el componente antigénico anhidro es del 20 % al 50 % en peso de la composición, de manera preferible del 20 % al 40 % en peso de la composición.

13. Uso de una cantidad eficaz de un alcohol de azúcar para reducir el espumado de una vacuna sólida cuando la composición se mezcla con diluyente líquido, en donde la composición comprende por lo menos un componente antigénico anhidro que comprende un estabilizador de almacenamiento a baja temperatura o un estabilizador de liofilización susceptible de espumado.

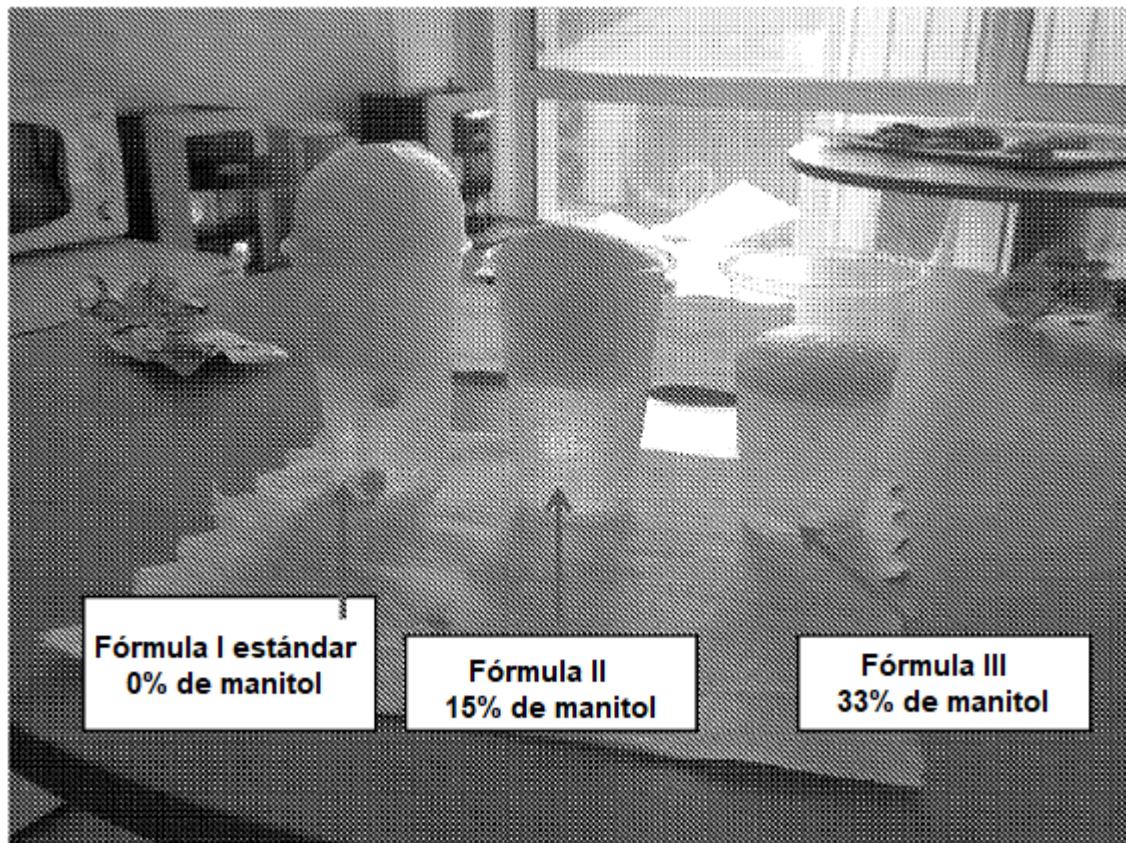


FIGURA 1

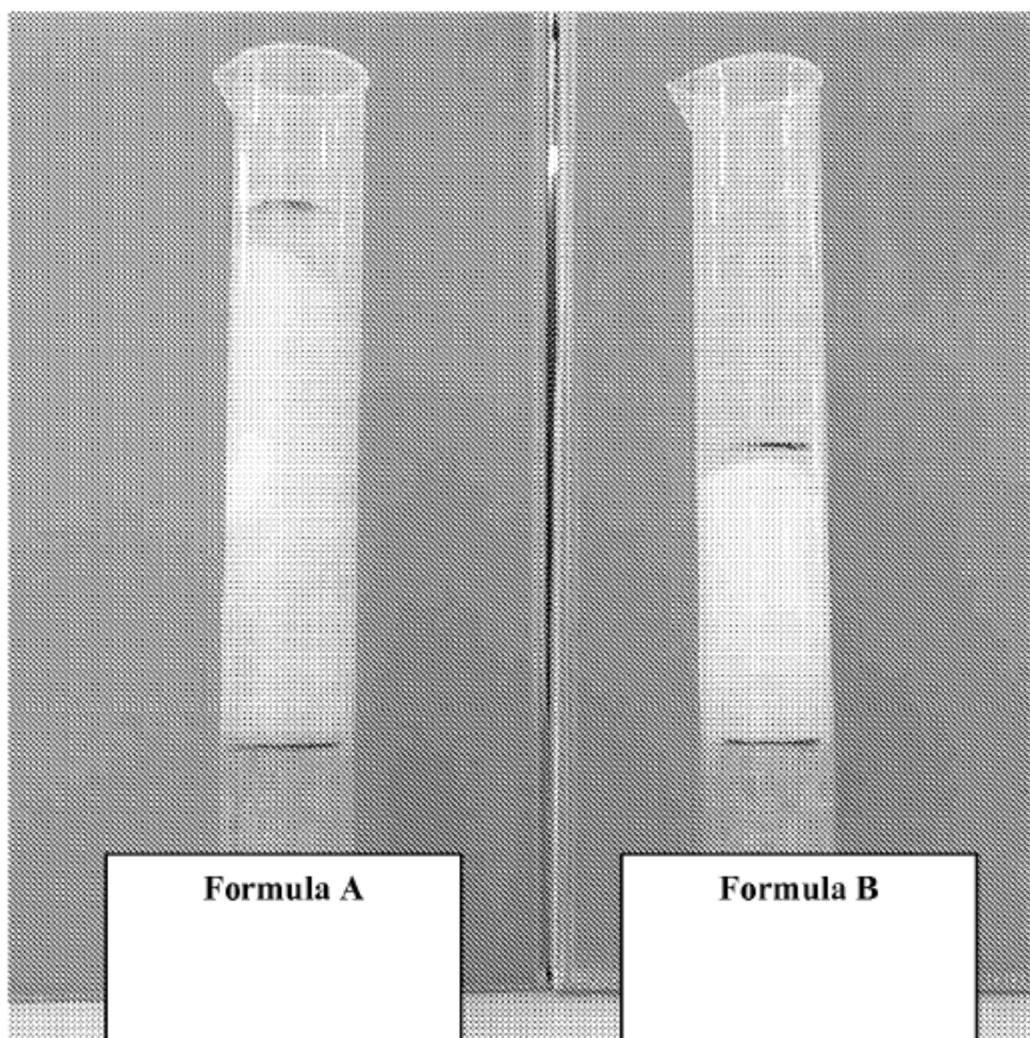


FIGURA 2

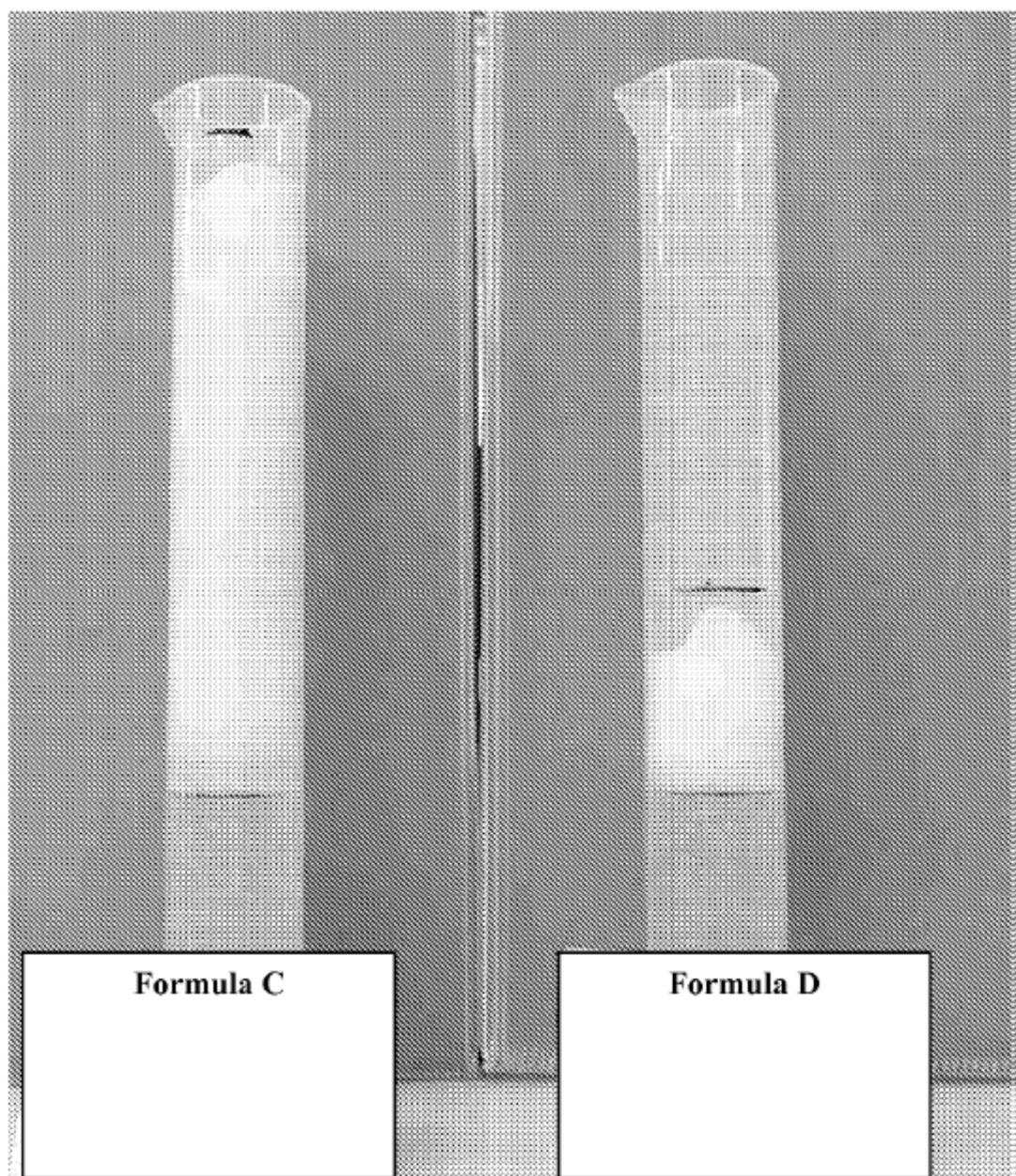


FIGURA 3

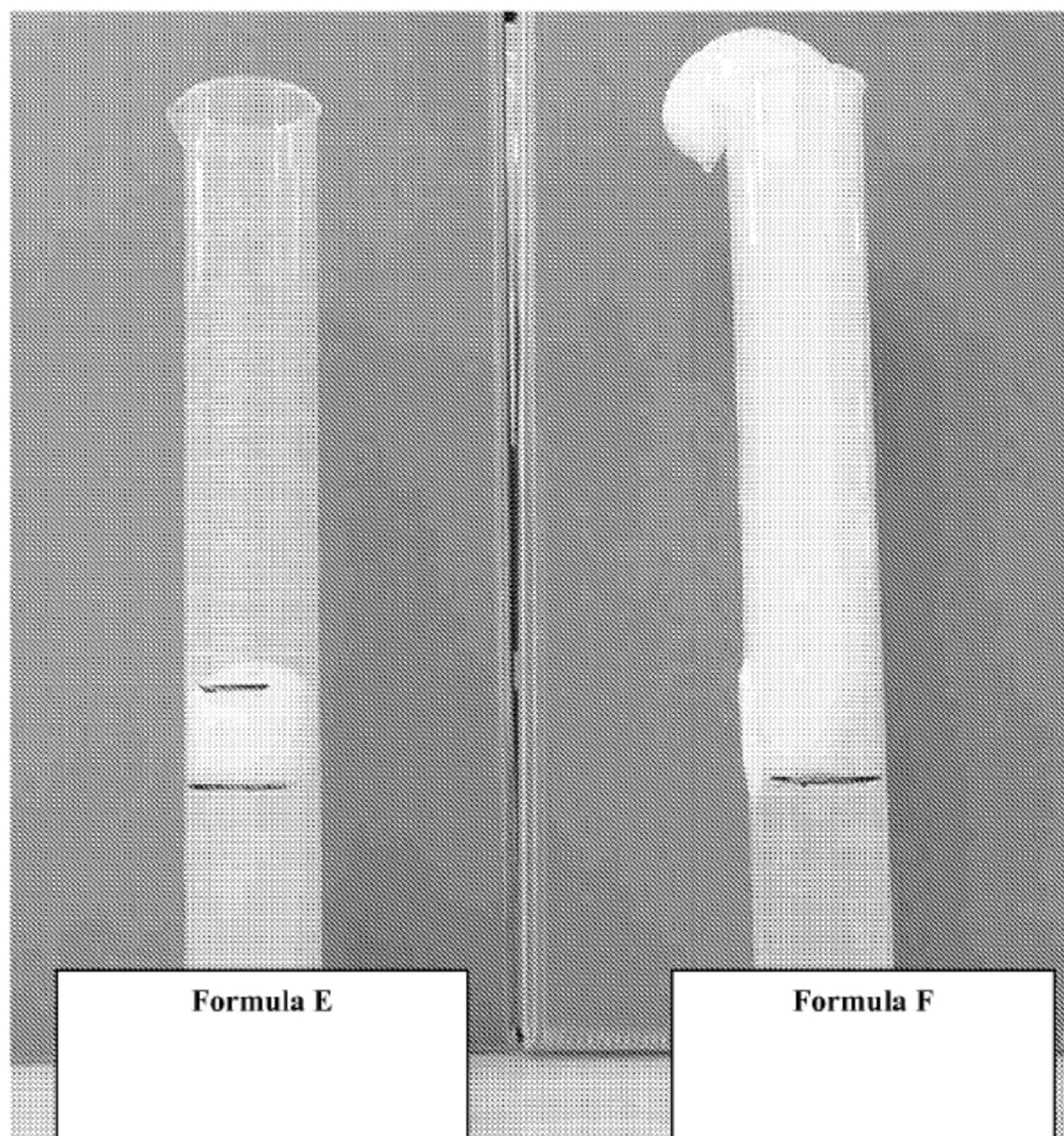


FIGURA 4