

PROCESO PARA REDUCIR LA ESPUMACIÓN DE UNA COMPOSICIÓN DE VACUNA SÓLIDA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona a un método para producir una composición de vacuna comprimida, compactada estable que comprende una composición de vacuna comprimida que comprende por lo menos un componente antigénico liofilizado y un agente de control de espuma, y un proceso para elaborar el mismo. Esta composición de vacuna densa estable retiene estabilidad del título y en tanto que además proporciona disolución completa en un diluyente con espumación mínima.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La Publicación de PCT No. WO 99/21579 (Seager, y colaboradores) describe una composición de dispersión rápida para una vacuna veterinaria que se seca por congelación y se compacta sueltamente. La Patente de los Estados Unidos No. 5,587,180 (Allen, Jr. y colaboradores) describe un proceso para elaborar una matriz de soporte particulada para una tableta que se disuelve rápidamente. La Patente de los Estados Unidos No. 5,336,666 (Neway y colaboradores,) describe una vacuna líquida secada por congelación que puede formar una tableta para ser reconstituida en forma líquida.

Una desventaja para las preparaciones de vacuna actuales es que contienen estabilizadores susceptibles a la espumación cuando se mezclan en diluyente, causando espumación excesiva de la solución después de la disolución de la composición que también causa problemas para el usuario en la contención de la solución en el recipiente en que se disuelve. El sobreflujo de la solución del recipiente debido a la espumación puede dar por resultado pérdida del producto y exposición incrementada de la vacuna al usuario.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Por consiguiente, es un objetivo de la invención proporcionar un método para producir una composición de vacuna estable y es un objeto de la invención proporcionar un método para producir una composición de vacuna estable para ser utilizada en un método para inmunizar realizado al simplemente disolver una forma estable, sólida de una vacuna anhidra en un diluyente con espumación mínima y pérdida mínima de actividad antigénica.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar un método para producir una vacuna viva o inactivada liofilizada que es compactada, comprimida o formada en tableta como un sólido estable denso que retendrá su capacidad de inmunización potencial durante la preparación y por la duración requerida para un período de tiempo farmacéuticamente aceptable y se puede disolver en diluyente con espumación mínima.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar un método para producir una composición de vacuna que reduce la necesidad por material de vacuna en exceso necesario para compensar las imprecisiones inherentes en el título causado por la sobre-espumación y pérdida del producto durante la disolución.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un método para producir una composición de vacuna para ser utilizada en un método para inmunizar lo que facilita la inmunización en masa de aves.

Estos y otros objetivos se pueden lograr por la presente invención que se relaciona a un método para producir una composición de vacuna estable que comprende por lo menos

un componente antigénico liofilizado pre-titulado, y agente de control de espuma, en donde la composición de vacuna está en la forma de una composición comprimida.

Además, la presente invención también proporciona un método para producir una composición de vacuna para ser utilizada en un método para inmunizar a un sujeto contra una enfermedad que comprende las etapas de: disolver la composición de vacuna comprimida que contiene el agente de control de espuma en un diluyente farmacéuticamente aceptable para formar una solución; y administrar la solución resultante al sujeto en una cantidad efectiva para inmunizar al sujeto contra la enfermedad.

La invención en sus características particulares llegará a ser más evidente a partir de la siguiente descripción detallada considerada con referencia a los ejemplos adjuntos. La siguiente descripción continuará discutiendo los problemas y soluciones ofrecidas por la presente invención como pertenecen a aplicaciones veterinarias.

Se observa que la invención no propone abarcar dentro del alcance de la invención cualquier producto, proceso para elaborar el producto o método para utilizar el producto previamente descrito, que cumple la descripción escrita y requerimientos de habilitación de la USPTO (35 U.S.C. 112, primer párrafo) o la EPO (Artículo 83 de la EPC), tal que el solicitante(s) se reserva el derecho y de esta manera describe un descargo de responsabilidad de cualquier producto, método para elaborar el producto o proceso para utilizar el producto previamente descrito.

Se observa adicionalmente que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, los términos tales como “comprende”, “comprendido”, “que comprende” y los similares pueden tener el significado atribuido a éste en la ley de Patentes de los Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar “incluye”, “incluido”, “que incluye”, y los similares; y que los términos tales como “que consiste esencialmente de” y “consiste esencialmente de” tienen el significado adscrito a estos en la ley de Patentes de los Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no explícitamente citados, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica previa o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

Estas y otras modalidades se describen o son evidentes de y abarcadas por, la siguiente Descripción Detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que se disuelve completamente y de manera rápida en un diluyente.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que está en la forma de una tableta dura, un comprimido, una granulación, una aspersion, una pelotilla, una cuenta, una píldora o una torta liofilizada.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un agente de disolución que es un agente efervescente o par de agentes.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un agente de disolución que comprende un par de agentes efervescentes.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un par efervescente que comprende una sal y un ácido, por ejemplo, ácido cítrico y la sal es un bicarbonato.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende una agente de control de espuma que comprende aproximadamente 25% a 40% en peso de la composición.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un agente de disolución que comprende hasta aproximadamente 60% en peso de la composición.

5 En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un agente de disolución que comprende hasta aproximadamente 35% en peso de la composición.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un componente antigénico liofilizado que comprende hasta 90% en peso de la composición.

10 En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un componente antigénico liofilizado que comprende hasta 80% en peso de la composición.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que se caracteriza por disolución completa entre
15 aproximadamente 90 y 700 segundos en contacto con un diluyente.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna en donde la estabilidad de la composición se caracteriza por una pérdida del título no mayor que la diferencia mostrada en los ejemplos.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la
20 composición de vacuna que comprende un agente de control de espuma que es un alcohol de azúcar.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un agente de control de espuma que es xilitol, manitol y sorbitol.

25 En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un agente de control de espuma que es manitol.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un componente antigénico que es IB88 o IBH120.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la
30 composición de vacuna que tiene una friabilidad de menos de aproximadamente 2%.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un virus vivo seleccionado del grupo que consiste de: virus de Enfermedad Newcastle, virus de Enfermedad Bursal Infecciosa, virus de viruela aviar, virus de Laringotraqueitis, Bronquitis Infecciosa de virus aves de corral, virus

de viruela ovina, virus de Peste bovina, o una mezcla de uno o más de los anteriores, ya sea que ocurren naturalmente, recombinantes o modificados.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un componente antigénico seleccionado del grupo que consiste de: anthrax bacilli, Salmonella SPP, E. coli, o una mezcla de uno o más de los anteriores, ya sea que ocurre naturalmente o recombinante o modificado.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna que comprende un componente antigénico que es un virus vivo y la composición comprende adicionalmente neutralizar los anticuerpos contra el virus.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna para ser utilizada en un método para vacunar un sujeto contra una enfermedad que comprende las etapas de: disolver la composición de vacuna de la invención que proporciona protección contra tal enfermedad con un diluyente para formar una solución; y administrar la solución resultante al sujeto en una cantidad efectiva para inmunizar el sujeto contra la enfermedad.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna para ser utilizada en un método para vacunar un sujeto en donde la etapa de disolver se caracteriza adicionalmente por disolución completa de la composición de vacuna.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona un método para producir la composición de vacuna para ser utilizada en un método para vacunar un sujeto, en donde la disolución ocurre entre aproximadamente 90 y 700 segundos en contacto con un diluyente en donde la etapa de administrar comprende rociar al sujeto con un aerosol formado de la solución.

En una modalidad de la invención, la invención proporciona procesos para elaborar una composición de vacuna de rápida disolución comprimida estable de la invención que comprende las etapas de: liofilizar por lo menos un componente antigénico; mezclar el componente antigénico liofilizado y el agente de control de espuma; y comprimir la mezcla del componente antigénico liofilizado y el agente de control de espuma con por lo menos un agente de disolución para formar una composición de vacuna de rápida disolución comprimida estable.

Otras modalidades de la invención serán descritas adicionalmente por los siguientes párrafos numerados:

1. Un proceso para reducir la espumación de una composición de vacuna sólida cuando se mezcla con diluyente líquido, en donde la composición comprende:
 - (i) por lo menos un componente antigénico anhidro que comprende un estabilizador susceptible a la espumación;
- 5 en donde el proceso comprende:
 - (a) adicionar una cantidad efectiva de un alcohol de azúcar a la composición de vacuna sólida.
2. Un proceso de acuerdo al párrafo 1, en donde el proceso además comprende:
 - (b) comprimir la composición de vacuna sólida para formar una
- 10 composición de vacuna comprimida estable.
3. Un proceso de acuerdo al párrafo 1 o 2, en donde el componente antigénico anhidro se liofiliza o se seca.
4. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 3, en donde el estabilizador comprende uno o más aminoácidos o sales de los mismos, proteína o sales
- 15 de la misma, albúmina, gelatina o combinaciones de los mismos.
5. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde el componente antigénico es virus de enfermedad newcastle, virus de bronquitis infecciosa, virus viruela aviar, virus de encefalomiелitis aviar, virus de enfermedad de marek, trichophyton verrucosum, paramixovirus aviar, mycobacterium paratuberculosis,
- 20 herpesvirus meleagrid, virus orf o virus de la viruela ovina.
6. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde el componente antigénico es virus de enfermedad newcastle o virus de bronquitis infecciosa.
7. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 6, en donde la composición se mezcla por medios de sonicación, mecánicos o químicos.
- 25 8. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 6, en donde la composición se mezcla por medios de sonicación o mecánicos.
9. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 6, en donde la composición se mezcla por medio químico.
10. Un proceso de acuerdo al párrafo 9, en donde el medio químico es una reacción
- 30 efervescente.
11. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 10, en donde la composición además comprende un agente de disolución.
12. Un proceso de acuerdo al párrafo 11, en donde el agente de disolución es un agente efervescente o par de agentes efervescentes.

13. Un proceso de acuerdo al párrafo 11, en donde el agente de disolución comprende un par de agentes efervescentes.
14. Un proceso de acuerdo al párrafo 13, en donde el par de agentes efervescentes comprende una sal y un ácido.
- 5 15. Un proceso de acuerdo al párrafo 14, en donde el ácido es ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido fumárico, ácido adípico, ácido succínico y anhídridos o mezclas de los mismos.
16. Un proceso de acuerdo al párrafo 14, en donde la sal es sales de carbonato, sales de bicarbonato, sales de sesquicarbonato o mezclas de los mismos.
- 10 17. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 16, en donde la cantidad efectiva de alcohol de azúcar es aproximadamente 10% a 40% en peso de la composición.
18. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 16, en donde la cantidad efectiva de alcohol de azúcar es aproximadamente 10% a 35% en peso de la composición.
19. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 16, en donde la cantidad efectiva de alcohol de azúcar es aproximadamente 15% a 35% en peso de la composición.
- 15 20. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 11 a 19, en donde el agente de disolución es hasta aproximadamente 60% en peso de la composición.
21. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 11 a 19, en donde el agente de disolución es aproximadamente 30% a aproximadamente 60% en peso de la composición.
- 20 22. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 21, en donde el componente antigénico anhidro es aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en peso de la composición.
23. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 21, en donde el componente antigénico anhidro es hasta aproximadamente 20% a aproximadamente 40% en peso de la composición.
- 25 24. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 23, en donde la composición de vacuna sólida se caracteriza por disolución completa de la composición en el diluyente entre aproximadamente 60 y 700 segundos en contacto con el diluyente.
- 30 25. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 24 en donde la composición de vacuna sólida se caracteriza por disolución completa de la composición en el diluyente entre aproximadamente 60 y 300 segundos en contacto con el diluyente.

26. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 25, en donde la espumación de la composición de vacuna sólida se reduce con relación a la espumación de la composición en la ausencia del alcohol de azúcar.
27. Un proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 26, en donde el alcohol de azúcar, es xilitol, manitol o sorbitol o una mezcla de los mismos.
28. Un método para producir una composición de vacuna estable que comprende:
- i) por lo menos un componente antigénico anhidro que comprende un estabilizador susceptible a la espumación cuando la composición se mezcla con diluyente líquido; y
 - ii) una cantidad efectiva de un agente de control de espuma que es un alcohol de azúcar.
29. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo al párrafo 28, en donde el componente antigénico anhidro se liofiliza o se seca.
30. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo al párrafo 28 o 29, en donde la composición de vacuna se comprime en una tableta.
31. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 30, en donde el estabilizador comprende uno o más aminoácidos o sales de los mismos, proteína o sales de la misma, albúmina, gelatina o combinaciones de los mismos.
32. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 30, en donde el estabilizador es un aminoácido o sales del mismo, proteínas o sales de las mismas o combinaciones de los mismos.
33. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 32, en donde el componente antigénico es virus de enfermedad newcastle, virus de bronquitis infecciosa, virus de viruela aviar, virus de encefalomiелitis aviar, virus de enfermedad de marek, trichophyton verrucosum, paramixovirus aviar, mycobacterium paratuberculosis, herpesvirus meleagrid, virus orf o virus de la viruela ovina.
34. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 33, en donde el componente antigénico es cepa de virus Bronquitis Infecciosa CR88121, cepa de virus de Bronquitis Infecciosa H120 o cepa de virus de Enfermedad Newcastle VG/GA.
35. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 34, además que comprende un agente de disolución.

36. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo al párrafo 35, en donde el agente de disolución es un agente efervescente o par de agentes efervescentes.
37. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo al párrafo 35, en donde el agente de disolución comprende un par de agentes efervescentes.
38. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo al párrafo 36, en donde el par efervescente comprende una sal y un ácido.
39. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo al párrafo 28, en donde la cantidad efectiva de alcohol de azúcar es aproximadamente 10% a 40% en peso de la composición.
40. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 39, en donde la cantidad efectiva de alcohol de azúcar es aproximadamente 10% a 35% en peso de la composición.
41. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 39, en donde la cantidad efectiva de alcohol de azúcar es aproximadamente 15% a 35% en peso de la composición.
42. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 35 a 41, en donde el agente de disolución es hasta aproximadamente 60% en peso de la composición.
43. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 35 a 41, en donde el agente de disolución es aproximadamente 30% a aproximadamente 60% en peso de la composición.
44. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 43, en donde el componente antigénico liofilizado es hasta 90% en peso de la composición.
45. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 43, en donde el componente antigénico liofilizado es hasta 80% en peso de la composición.
46. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 45, en donde la composición se caracteriza por disolución completa de la composición en el diluyente entre aproximadamente 60 y 700 segundos en contacto con el diluyente.
47. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 46, en donde la composición se caracteriza por reducción

en la espumación de la composición cuando está en contacto con el diluyente con relación a la espumación de la composición en la ausencia del alcohol de azúcar.

48. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 47, en donde el alcohol de azúcar es xilitol, manitol, sorbitol o una mezcla de los mismos.

49. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 47, en donde el alcohol de azúcar es manitol.

50. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo al párrafo 35, en donde la composición tiene una friabilidad de menos de aproximadamente 2%.

51. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 50, en donde el componente antigénico es un virus del hígado y la composición comprende además neutralizar anticuerpos contra el virus.

52. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 51, en donde la composición es estable a 5°C en condiciones anhidras durante por lo menos 9 meses.

53. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de las formulaciones 2, 4, 6, II, III, B, D o E mostradas en los ejemplos.

54. Un método para producir una composición de vacuna estable de acuerdo con cualquiera de los párrafos 28 a 53, en donde la espuma se reduce por aproximadamente 50%, por aproximadamente 60% o por aproximadamente 80% que la misma composición sin el alcohol de azúcar.

55. Un método para producir una vacuna para ser utilizada en un método para vacunar a un sujeto contra una enfermedad que comprende las etapas de:

(a) disolver la composición de vacuna de cualquiera de los párrafos 28 a 55, que proporciona protección contra tal enfermedad, con un diluyente para formar una solución; y

(b) administrar la solución resultante al sujeto en una cantidad efectiva para inmunizar al sujeto contra la enfermedad.

56. El método Un método para producir una vacuna del párrafo 54, en donde la etapa de administrar comprende rociar al sujeto con un aerosol formado de la solución.

Las tabletas compactadas, comprimidas y duras de la composición de vacuna se pueden hacer en un Plano Biselado de 12 mm de un Solo Punzón MANESTY F3 instrumentado o

- puzones cóncavos estándares de 6mm. La composición de vacuna en la forma de una tableta dura se puede hacer a una presión de un máximo de 4 toneladas. Las tabletas se pueden probar para dureza en un Probador de Dureza de Tableta ERWEKA Modelo TBH20 como es descrito en lo anterior, y todas se encontraron que tienen una dureza mayor que
- 5 3.0 seD. La tableta clásica normalmente asociada con agentes terapéuticos se entiende que es tal “tableta”. Sin embargo, se entiende que cualquier forma densa compactada o comprimida se propone, incluyendo aquellas que tienen menos uso frecuente en el campo farmacéutico. Por ejemplo, “briquetas” grandes serían adecuadas si la aplicación final requiere un volumen grande de material.
- 10 Específicamente, los rellenos de tableta son sustancias que comprometen el volumen de la tableta y primariamente actúan como un portador. Los rellenos de tableta típicos incluyen, pero no están limitados a, sulfato de calcio, fosfato de calcio, carbonato de calcio, almidón, almidones modificados (almidón de carboximetilo, etc.), celulosa microcristalina, lactosa, sacarosa, dextrosa, manitol y sorbitol. Los niveles del rellenos de tableta son de aproximadamente 0% a 90% en peso de la tableta.
- 15 Los aglutinantes actúan como el “pegamento” que mantiene los polvos conjuntamente para formar gránulos. Los aglutinantes incluyen, pero no están limitados a, polímeros naturales tales como almidones o gomas de acacia, tragacanto y gelatina o polímeros sintéticos tal como PVP y metil-, etil- e hidroxipropilcelulosa. Los niveles de aglutinante son de aproximadamente 0% a 20% en peso de la composición.
- 20 Los auxiliares de disolución promueven la disolución de la composición de vacuna. Ejemplos típicos incluyen, pero no están limitados a agentes efervescentes, desintegrantes, surfactantes y solubilizadores.
- Los desintegrantes causan que las tabletas comprimidas se rompan aparte. Ejemplos
- 25 típicos incluyen, pero no están limitados a, almidón, celulosa microcristalina, almidón de lana purificado, ácido algínico, goma guar de glicolato de almidón de sodio, polivinil pirrolidona reticulada (PVP), resina de intercambio iónico y celulosas tales como metil-, croscarmelosa sódica, carboximetil- y hidroxipropil-metilo de sodio. Los niveles del agente de disolución son de aproximadamente 1% a 95% en peso de la composición.
- 30 Los lubricantes reducen la fricción entre el material que es comprimido y la pared del molde durante la compresión e inyección. La mayoría de los lubricantes son insolubles en agua e incluyen estearatos (magnesio, calcio y sodio), ácido esteárico, talco y ceras. Los lubricantes solubles en agua incluyen PEG’s, benzoato de sodio, oleato de sodio, acetato

de sodio, lauril sulfato de sodio y lauril sulfato de magnesio. Los niveles de lubricante son de aproximadamente 0% a 5% en peso de la composición.

Los colorantes se adicionan para ayudar a identificar tipos de formulaciones de vacuna tal como en la forma de tabletas para propósitos estéticos y funcionales, por ejemplo y no

- 5 como limitación a la presente invención, los tintes descritos en los Ejemplos A hasta D tomados de la Patente Israelí No. 46189. Los niveles de colorante son de aproximadamente 1% de la formulación. En una modalidad, la composición de la presente invención es una tableta dura preparada que tiene un agente efervescente como un auxiliar de disolución. Como aquellos expertos en la técnica apreciaran, la tableta
- 10 efervescente debe contener un componente básico y un componente ácido, tal como un par efervescente, de modo que ocurren en las reacciones apropiadas de disolución para generar dióxido de carbono y ácido carbónico. Los componentes efervescentes adecuados incluyen la familia de carbonato de compuestos básicos y compuestos ácidos inorgánicos u orgánicos. Entre la familia de carbonato de compuestos básicos, los agentes
- 15 efervescentes preferidos para el uso en las composiciones de la presente invención son carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de glicina, carbonato de potasio, bicarbonato de potasio, dihidrogenocitrato de potasio y carbonato de calcio. Un compuesto básico mucho más preferido es bicarbonato de sodio. Los componentes ácidos preferidos para el uso en las composiciones de la presente invención son ácido
- 20 cítrico, ácido adípico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido bórico, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, ácido metoxibenzoico, ácido mandélico, ácido malónico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido glutárico, ácido aspártico, ácido clorhídrico, ácido oxálico, ácido salicílico, ácido succínico y ácido acético. Un componente efervescente ácido mucho más preferido es ácido cítrico.
- 25 Además de los ingredientes de tableta efervescentes básicos y ácidos descritos en lo anterior, la composición de tableta de la presente invención también puede contener otros excipientes convencionalmente empleados.

DEFINICIONES

- 30 Los términos utilizados en la presente tendrán su significado habitual en la técnica a menos de que sea especificado de otra manera.

El término “componente antigénico” o “antígeno” como se utiliza en la presente es una sustancia que se reconoce por el sistema inmune e induce una respuesta inmune. La sustancia puede comprender un organismo completo, exterminado, atenuado o vivo; una

subunidad o porción de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades antigénicas; una pieza de ácido nucleico o fragmento capaz de inducir una respuesta inmune en la presentación a un animal hospedero; una proteína, un polipéptido, un péptido, una glicoproteína, un epítipo, 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 intercambiamente 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 mayor que 1.0 g/cc, pero ninguna dureza medible como se mide en Unidades Strong-Cobb (SCU) y se prueba para dureza en un Probador de Dureza de Tableta ERWEKA Modelo TBH20.

El término “comprimido” como se utiliza en la presente se refiere a una composición de vacuna que tiene una dureza de por lo menos 2.0 SCU.

El término “tableta dura” como se utiliza en la presente se refiere a una composición de vacuna en la forma de una tableta u otra forma densa que tiene una dureza de por lo menos 3.0 SCU.

El término “completamente disuelto” como se utiliza en la presente se entiende que significa que ningún componente soluble se deja sin disolver.

El término “rápidamente desintegrado” o “rápidamente disuelto” como se utiliza en la presente se entiende que significa que la desintegración o disolución es completa dentro de aproximadamente unos pocos minutos o menos cuando un volumen grande de agua se emplea para el volumen pequeño de composición de vacuna liofilizado comprimido por ejemplo 100 ml de agua para una tableta efervescente de 400 mg. El tiempo se incrementa donde los volúmenes de diluyente se disminuyen comparablemente. De esta manera la misma tableta 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 tomado para la disolución o desintegración de una tableta cuando se mezcla en una cantidad medida de agua a temperatura ambiente.

El término “estable” como se utiliza en la presente se entiende que significa que las composiciones de la presente invención mantendrán su capacidad de inmunización (potencial) durante la preparación y para la duración requerida para la vida en anaquel de una vacuna comercial.

El término “excipiente” como se utiliza en la presente se refiere a un término para 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.

El término “estabilizador” como se utiliza en la presente es un compuesto químico utilizado para estabilizar material antigénico durante menor temperatura de almacenamiento o liofilización. Ejemplos de tales estabilizadores incluyen aminoácidos, tales como alanina, arginina, ácido aspártico, cistina, ácido glutámico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina y valina; sales de aminoácidos de los mismos tales como sal de clorhidrato de L-arginina y sal de metal alcalino de ácido glutámico tal como glutamato de monosodio y glutamato de monopotasio; proteínas, o sales de los mismos, tal como hidrolizado de proteína, proteína bovina, proteína de suero de ratón, proteína de suero de becerro, proteína de levadura, proteína de pollo, proteína de huevo; albúmina tal como albúmina y ovalbúmina bovina, gelatina y gelatina hidrolizada.

El estabilizador también incluye un monosacárido, por ejemplo, sorbitol, o un disacárido, por ejemplo, sacarosa, lactosa o maltosa. Se prefiere sacarosa.

El término “mezclado” como se utiliza en la presente significa mezclar una sustancia por medios de sonicación, mecánicos o químicos. Ejemplos de mezclado mecánico incluyen agitación, sacudimiento, agitación magnética y hacer pasar la sustancia a través de una jeringa adecuada. Ejemplos de mezclado químico incluyen una reacción efervescente que causa formación de gas in-situ (por la vía de la reacción química de uno o más ingredientes, que incluyen formación de dióxido de carbono (gas de CO₂) suficiente para causar una acción de mezclado como la liberación resultante de burbujas de gas que pasan a través del líquido a la superficie.

El componente antigénico como se define en la presente puede comprender patógenos atenuados vivos, tal como un virus atenuado vivo, bacterias, hongos o parásitos. Sin embargo, un componente antigénico también puede comprender virus exterminados, inmunógenos heterólogos recombinantes, antígenos, subunidades antigénicas (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, péptidos, epítomos, haptenos) o epítomos de inmunógenos o antígenos derivados de que se originan de uno o más patógenos descritos en la presente, que se pueden expresar de vectores virales, vectores bacterianos, vectores de plásmido y los similares.

El componente antigénico activo de la presente invención puede comprender uno o más inmunógenos seleccionados de un patógeno canino que incluye, pero no limitado a, virus de rabia, adenovirus de canino tipo 2 (CAV2), herpesvirus de canino (CHV), parvovirus de canino (CPV), coronavirus de canino, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*,
5 *Leptospira grippotyphosa*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella bronchiseptica* y los similares, incluyendo combinaciones de los mismos. El componente antigénico activo puede incluir los genes HA, F, NP del CDV, el gen cápside de CPV, la espiga, genes M, N de coronavirus Canino, los genes HN y F de cPi2, genes de *Leptospira*, genes de *Bordetella*, genes de *Borrelia*, y los genes gB, gC y gD del herpesvirus canino, entre otros. Estos componentes
10 pueden ser útiles como composiciones antigénicas o composiciones de vacuna para proteger caninos contra la enfermedad causada por estos patógenos.

El Adenovirus Canino tipo 2 (CAV2) se dispersa y es altamente contagioso para los perros. Produce síntomas parecidos a un resfriado. Generalmente los primeros signos de la enfermedad contagiosa son fiebre, que usualmente disminuye en uno a dos días. Los
15 perros afectados pueden tener tonsilitis, sensibilidad abdominal, hígado agrandado, vómito y diarrea. La enfermedad aguda es normalmente fatal. El CAV2 se puede inactivar o atenuar y combinar con el CDV (y/o cPi2) para producir una vacuna multivalente. Alternativamente, se pueden utilizar inmunógenos o antígenos de CAV2, o epítomos de inmunógenos CAV2, tal como cápside, matriz o proteína de exón.

20 El Parvovirus Canino (CPV) es un virus intestinal común que puede causar vómito, diarrea, gastroenteritis, miocarditis y hepatitis en perros jóvenes. Se ha encontrado que se generaliza en los perros. El CPV se puede presentar en las composiciones antigénicas, suspensiones o soluciones de la invención como inmunógenos inactivados, atenuados del hígado, o CPV, antígenos o epítomos de inmunógenos de CPV, tal como los productos del
25 gel VP1, VP2 (cápside).

Otro componente antigénico activo útil en las composiciones y métodos de la presente invención pueden comprender uno o más inmunógenos seleccionados de patógenos aviares que incluyen, pero no limitados a, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, virus de Bronquitis Infecciosa (IBV), virus de Enfermedad Newcastle (NDV), virus de
30 síndrome de gota del huevo (EDS), virus de Enfermedad Bursal Infecciosa (IBDV), virus del pavo, virus de influenza aviar, virus de enfermedad de Marek, Herpesvirus tal como virus laringotraqueitis infecciosa, virus de bronquitis infecciosa aviar, reovirus aviar, poxvirus que incluye avipox, fowlpox, canarypox, pigeonpox, quailpox, y dovepox, poliomavirus aviar, pneumovirus aviar, virus rinotraqueitis aviar, virus de reticuloendoteliosis aviar,

retrovirus aviar, virus endógeno aviar, virus de eritroblastosis aviar, virus de hepatitis aviar, virus de anemia aviar, virus de enteritis aviar, virus de enfermedad de Pacheco, virus de leucemia aviar, parvovirus aviar, rotavirus aviar, virus de leucosis aviar, virus de fibrosarcoma musculoaponeurótico aviar, virus de mieloblastosis aviar, virus asociado con mieloblastosis, virus de mielocitomatosis aviar, virus de sarcoma aviar, virus de necrosis de bazo aviar y combinaciones de los mismos.

En cuanto a inmunógenos específicos, los componentes antigénicos activos también pueden ser los genes HN y F de Virus de Enfermedad Newcastle, la poliproteína y genes VP2 de Virus de Enfermedad Bursal infecciosa, los genes S y N de Virus de Bronquitis Infecciosa y los genes gB y gD del Virus de Enfermedad de Marek. Estos componentes se pueden utilizar como composiciones antigénicas o composiciones de vacuna para proteger aves contra la enfermedad causada por estos patógenos.

Alternativamente, el componente antigénico activo comprende uno o más inmunógenos de un patógeno felino tal como, pero no limitado a, herpesvirus felino (FHV), calicivirus felino (FCV), virus de leucemia felino (FeLV), virus de peritonitis infecciosa felino, virus de panleucopenia felino, virus de inmunodeficiencia felino (FIV), virus de rabia, y los similares y combinaciones de los mismos.

El componente antigénico 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 cápside del calicivirus Felino, el gen S modificado, los genes M, y N del Virus de Peritonitis Infecciosa Felina, y el gen VP2 del parvovirus Felino. Estos componentes pueden ser útiles como vacunas antigénicas o de vacuna para proteger gatos contra la enfermedad causada por estos patógenos.

El componente antigénico activo puede comprender uno o más inmunógenos de un patógeno equino, tal como herpesvirus equino (tipo 1 o tipo 4), virus de influenza equina, virus de encefalomiелitis equina (EEV), tétano, virus del Nilo del Oeste, y los similares o combinaciones de los mismos.

El active componente antigénico también puede incluir, los genes gB, gC, gD e Inmediatos-Tempranos del herpesvirus Equino tipo 1, los genes gB, gC, gD e Inmediato-Tempranos del herpesvirus Equino tipo 4, los genes HA, NA, M y NP de virus de influenza Equina, genes del Virus de Encefalitis equina del Este, genes del Virus de Encefalitis Equina Occidental, genes del Virus de Encefalitis Equina de Venezuela, los genes prM—M-E del Virus del Nilo del Oeste, y genes del virus de arteritis Equina, pero no están limitados a estas secuencias.

Estos componentes pueden ser útiles como composiciones antigénicas o composiciones de vacuna para proteger caballos contra la enfermedad causada por estos patógenos.

El componente antigénico activo puede comprender uno o más inmunógenos de un patógeno bovino, tal como virus de rabia, rotavirus bovino, virus de parainfluenza bovino tipo 3 (bCPI2-3), coronavirus bovino, virus de diarrea viral bovino (BVDV), virus de enfermedad de pie y boca (FMDV), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), virus de Rinotraqueitis Bovina Infecciosa (IBR), *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, y los similares y combinaciones de los mismos.

El componente antigénico activo también se puede seleccionar de los genes gB, gC, gD e Inmediato-Temprano del Herpesvirus Bovino tipo 1, los genes F y G genes de BRSV, la poliproteína, los genes E1, E2 del BVDV, los genes HN y F el virus PI3 o genes del Rotavirus. Estos componentes pueden ser útiles como composiciones antigénicas o de vacuna para proteger ganado vacuno contra la enfermedad causada por estos patógenos.

Además, el componente antigénico activo puede comprender uno o más inmunógenos de un patógeno porcino tal como, pero no limitado a, virus de influenza de cerdo (SIV), circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), virus de síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRSV), virus pseudorrabia (PRV), parvovirus porcino (PPV), virus de cólera del cerdo (HCV), FMDV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, y los similares y combinaciones de los mismos.

El componente antigénico activo también puede incluir los genes gB, gC, gD e Inmediato-Temprano del PRV, los genes HA, NA, M y NP del virus de influenza del Cerdo, la poliproteína, E1, E2 del Virus de Cólera del Cerdo, los genes ORF1 y ORF2 del virus PCV2, el ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, o ORF7 del virus PRRSV o genes de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Estos componentes pueden ser útiles como composiciones antigénicas o de vacuna para proteger cerdos contra la enfermedad causada por estos patógenos.

El componente antigénico activo puede comprender secuencias que codifican una proteína expresada en patógenos tales como virus de RNA o ADN similares a VIH, HCV, HBV, HPV, EBV, HSV, CMV, HTLV, virus Hanta, virus Ebola, virus Marburg, virus de fiebre del Valle de Rift, virus Lassa y virus de influenza, virus de enteritis hemorrágica (HEV), virus de rinotraqueitis infecciosa (IBRV), entre otros. Tales inmunógenos se pueden utilizar ventajosamente como posiciones antigénicas o de vacuna para proteger sujetos, tales como humanos, contra la enfermedad causada por estos patógenos.

El componente antigénico activo también puede ser, por ejemplo, de cualquiera de una de las siguientes bacterias patogénicas y sus antígenos: especie *Actinobacillus* tales como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella avium*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, especie *Klebsiella* tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium pneumoniae*, Group A *Streptococcus*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Neisseria gonorrhoeae*, especie *Erysipelothrix*, *Enterotoxigenic Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, especie *Salmonella*, *Salmonella agona*, *Salmonella blockley*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella hadar*, *Salmonella Heidelberg*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella senftenberg*, *Salmonella choleraesuis*, especie *Rickettsia*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, especie *Shigella*, especie *Listeria*, *Legionella pneumoniae*, especie *Pseudomonas*, especie *Borrelia*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria meningitidis*, *Clostridium species*, *Clostridium difficile*, *Ureaplasma urealyticum*, especie *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pasteurella pestis*, especie *Campylobacter*, *Campylobacter jejuni*, especie *Treponema*, especie *Leptospira*, *Corynebacterium diphtheria*, *Hemophilus ducreyi*, *Hemophilus influenza*, especie *Ehrlichia*, entre otros.

El componente antigénico activo también se puede derivar de un hongo o moho tal como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, especie *Penicillium*, especie *Fusarium*, especie *Candida* tales como *Candida trichophyton*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, y *Candida albicans*, especie *Rhizopus*, especie *Cryptococcus* tal como *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus grubii*, *Cryptococcus gattii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, y otros hongos y mohos.

El componente antigénico activo también se puede seleccionar de antígenos parasíticos derivados de especies parasíticas que incluyen, pero no están limitados a, especie *Plasmodium*, especie *Trypanosome*, especie *Giardia*, especie *Boophilus*, especie *Babesia*, especie *Entamoeba*, especie *Eimeria*, especie *Leishmania*, especie *Schistosoma*, especie *Brugia*, especie *Fasciola*, especie *Dirofilaria*, especie *Wuchereria*, especie *Onchocerca*, especie *Treponema*, especie *Toxoplasma*, especie *Cryptococcus*, especie *Coccidia*, especie *Histomoniasis*, especie *Hexamitiasis*, especie *Giardia*, entre otros; nemátodos que incluyen especie *Ascaris*, especie *Trichinella*, y los similares, helmintos tales como tremátodos, lombriz solitaria, entre otros; y otros organismos patogénicos similares. Son

conocidos en la técnica métodos para preparar inmunógenos derivados de virus, bacterias, hongos, mohos, protozoarios, nemátodos y helmintos.

Otros inmunógenos útiles, por ejemplo, pueden ser factores de virulencia de antígeno segregados purificados, tales como toxinas, citotoxinas y los similares. Los antígenos de

- 5 toxina que se destoxifican al modificar (toxoides), que se pueden administrar en combinación con un adyuvante tal como hidróxido de aluminio, y se puede utilizar para estimular la formación de anticuerpos que neutralizan toxinas. Ejemplos de toxinas que se pueden utilizar como un inmunógeno incluyen endotoxinas y exotoxinas bacterianas tales como lipopolisacárido, enterotoxinas que incluyen enterotoxinas inestables al calor (LT),
10 enterotoxinas estables al calor (ST), verotoxina (VT) y los similares. Los inmunógenos de exotoxina bacterianos se secretan en el medio circundante, e incluyen, por ejemplo, toxina de difteria (*Corynebacterium diphtheriae*), toxina de tétano (*Clostridium tetani*), enterotoxinas secretadas por *Staphylococcus aureus*, toxinas botulínicas (*Clostridium botulinum*); y toxinas producidas por algas tal como neurotoxinas; y los similares.
15 Endotoxinas estables al calor, liberadas por autólisis de las bacterias, incluyen, por ejemplo, toxinas de cólera liberadas del *Vibrio cholerae* gram negativas, colicinas producidas por bacterias intestinales tal como *E. coli* (bacteriocina).

- Los inmunógenos derivados de, o que se originan de virus, bacterias, hongos y los similares se pueden producir por métodos de cultivo in vitro utilizando medio de cultivo
20 apropiado o líneas celulares hospederas y métodos convencionales bien conocidos por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. Por ejemplo, PRRSV se puede cultivar en una línea celular apropiada, tal como línea celular MA-104 (ver las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,587,164; 5,866,401; 5,840,563; 6,251,404 entre otras). De una manera similar, PCV-2 se puede cultivar utilizando líneas celulares PK-15 (ver Patente de los
25 Estados Unidos No. 6,391,314); SIV se puede cultivar en huevos (Patente de los Estados Unidos No. 6,048,537); y *Mycoplasma hyopneumoniae* se puede cultivar en un medio de cultivo apropiado (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,968,525; 5,338,543; Ross R. F. y colaboradores, (1984) Am. J. Vet. Res. 45:1899-1905). Ventajosamente, CDV se puede cultivar en células de pulmón de visón, tales como aquellas descritas en la Patente de los
30 Estados Unidos No. 5,178,862. Otras técnicas para la preparación de inmunógenos derivados de virus son conocidos en la técnica, y descritos, por ejemplo, en Ulmer y colaboradores, Science 259:1745 (1993); Male y colaboradores, Advanced Immunology, páginas 14.1-14.15, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa. (1989).

También son útiles péptidos sintéticos antigénicos que imitan las secuencias del péptido antigénico. Tales inmunógenos se pueden sintetizar utilizando una técnica de fase sólida como es descrita, por ejemplo, en R. B. Merrifield, *Science* 85:2149-2154 (1963), purificados, y opcionalmente acoplados a una proteína portadora tal como dipéptido de muramilo (MDP), albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), y los similares, utilizando un agente de acoplamiento bifuncional tal como glutaraldehído y los similares.

Los antígenos sintéticos también se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, poliepítopos, epítopos flanqueantes, y otros antígenos recombinantes o sintéticamente derivados. Ver, por ejemplo, Bergmann y colaboradores, (1993) *Eur. J. Immunol.* 23, 2777-2781; Bergmann y colaboradores, (1996) *J. Immunol.* 157, 3242-3249; Suhrbier, A. (1997) *Immunol. Cell Biol.* 75, 402-408; Gardner y colaboradores, (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, Jun. 28-Jul. 3, 1998. Los fragmentos antigénicos, para propósitos de la presente invención, pueden incluir usualmente por lo menos aproximadamente 3 aminoácidos, de preferencia por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos, más de preferencia por lo menos aproximadamente 10-15 aminoácidos, y mucho más de preferencia 25 o más aminoácidos, de la molécula. No hay límite superior crítico a la longitud del fragmento, que podría comprender casi la secuencia de proteína de longitud completa, o aun una proteína de fusión que comprende dos o más, o por lo menos un epítipo de la proteína.

Por consiguiente, una estructura mínima de un ácido nucleico que expresa un epítipo puede comprender nucleótidos para codificar un epítipo, inmunógeno, o antígeno de una proteína o poliproteína. Un ácido nucleico que codifica un fragmento de la proteína total o poliproteína, más ventajosamente, comprende o consiste esencialmente de o consiste de un mínimo de aproximadamente 21 nucleótidos, ventajosamente por lo menos aproximadamente 42 nucleótidos, y de preferencia por lo 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 epítipo, tales como, generar librerías de péptido sobrepuestas (Hemmer B. y colaboradores, (1998) *Immunology Today* 19(4), 163-168), Pepscan (Geysen y colaboradores, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 81, 3998-4002; Geysen y colaboradores, (1985) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82, 178-182; Van der Zee R. y colaboradores, (1989) *Eur. J. Immunol.* 19, 43-47; Geysen H.M., (1990) *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 21, 523-533; Multipin® Peptide Synthesis Kits de Chiron) y algoritmos (De Groot A. y

colaboradores, (1999) Nat. Biotechnol. 17, 533-561), y en la Solicitud de PCT No. de Serie PO7US2004/022605; todas de las cuales son incorporadas en la presente por referencia en sus totalidades se pueden utilizar en la práctica de la invención, sin experimentación indebida. Otros documentos citados e incorporados en la presente también se pueden

5 consultar como métodos para determinar epítomos de un inmunógeno o antígeno y de esta manera moléculas de ácido nucleico que codifican tales epítomos.

También proporcionado por la invención es un proceso para producir una composición antigénica estable secada por congelación o composición de vacuna que comprende, por ejemplo, virus de enfermedad newcastle, que comprende la etapa de liofilizar una

10 suspensión o solución estabilizada formada por un atenuado vivo es la suspensión o solución de virus de enfermedad newcastle, mezclada con un estabilizador de acuerdo con la invención y un alcohol de azúcar de acuerdo con la invención.

“Secado por congelación” o “liofilización” se refiere al proceso por el cual una suspensión se congela, después de lo cual el agua se remueve por sublimación a baja presión. Como

15 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 que llegue a ser un líquido. Como se utiliza en la presente, el “valor T’g” se define como la temperatura de transición vítrea, que corresponde a la temperatura por abajo de la cual la composición congelada llega a ser

20 vítrea.

Un proceso para secar por congelación una suspensión o solución antigénica de acuerdo con la invención puede comprender las etapas de: (a) poner en contacto la suspensión o solución antigénica con un estabilizador de la invención, para de esta manera formar una suspensión o solución antigénica estabilizada; (b) enfriar, a presión atmosférica, la

25 suspensión o solución antigénica estabilizada a una temperatura menor que aproximadamente el valor T’g de la suspensión o solución antigénica estabilizada; (c) secar la suspensión o solución antigénica estabilizada (es decir, la desecación primaria o etapa de sublimación) por sublimación del hielo a baja presión; y (d) remover el agua residual en exceso (es decir, secado secundario o etapa de desorción) al reducir además la presión e

30 incrementar la temperatura de la suspensión o solución antigénica estabilizada.

La etapa de enfriamiento (b) puede ocurrir a temperaturas de menos de aproximadamente -40°C (etapa de congelación de agua). Secar las suspensiones o solución antigénica estabilizada por sublimación de hielo a baja presión (c) puede ocurrir a, por ejemplo, presión menor que o igual a aproximadamente 200 bar, mientras una reducción

adicional en la presión puede ocurrir a presiones menores que o iguales a aproximadamente 100 μ bar. Finalmente, la temperatura de la suspensión o solución antigénica estabilizada durante la remoción del agua residual en exceso (d) ocurre a, por ejemplo, temperaturas entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 30°C.

- 5 El proceso de secado por congelación también se puede realizar con una suspensión o solución antigénica que comprende virus de enfermedad newcastle atenuado vivo y por lo menos un componente antigénico activo derivado de un patógeno diferente de un paramixovirus, el cual se mezcla con un estabilizador de acuerdo con la invención para obtener un antigénico multivalente estabilizado secado por congelación o composición de
10 vacuna.

El contenido de humedad del material secado por congelación puede variar de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% p/p, de preferencia de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 3% p/p, y más de preferencia de aproximadamente 1.0% a aproximadamente 2.6% p/p.

- 15 Cada etapa, que incluye congelación de agua, y su remoción durante la desecación primaria y secundaria, se somete a ingredientes biológicos, tales como patógenos, en las suspensiones o soluciones antigénicas de la invención para golpe mecánico, físico o bioquímico, que tiene efectos potencialmente adversos en la estructura, apariencia, estabilidad, antigenicidad, infectividad y viabilidad de los patógenos o ingredientes
20 biológicos.

- Los estabilizadores de la invención permiten buena estabilidad de patógenos atenuados vivos similares a paramixovirus canino, y mantiene la infectividad de, en particular, CDV y cPi2 durante el proceso de secado por congelación y durante el almacenamiento. La estabilidad se puede calcular por la diferencia entre el título de infectividad antes de la
25 etapa de secado por congelación, y el título de infectividad después de 12 meses de almacenamiento de la composición antigénica estabilizada secada por congelación o composición de vacuna a 4°C. La buena estabilidad puede comprender ventajosamente una diferencia de solamente 1.2 log₁₀, y de preferencia de solamente 1.0 log₁₀. Los métodos para determinar el título de infectividad son bien conocidos por aquellos
30 expertos en la técnica. Algunos métodos para determinar el título de infectividad son descritos en los Ejemplos en la presente. También, la estabilidad se puede estimar al ajustar el título log₁₀ y los puntos de tiempo de la titulación durante el período de almacenamiento utilizando cálculos y/o algoritmos de regresión lineal.

Además, los estabilizadores de la invención permiten pastillas secadas por congelación que tienen un buen aspecto, en otras palabras, que tienen forma regular y color uniforme. Una forma irregular se puede caracterizar por la presencia de todo o una parte de la pastilla pegada al fondo del recipiente y permanecer inmóvil después de dar la vuelta y cortar (aspecto atascado). También, una pastilla que tiene una forma de un carrete (aspecto en carrete), o separación de la pastilla en dos partes, después de un plano horizontal (aspecto des-duplicado), o una pastilla que tiene un aspecto de una crema batida con huecos irregulares (aspecto esponjoso), o una pastilla que tiene el aspecto de espuma en el recipiente (aspecto de merengue) tiene una forma irregular y no son aceptados.

Las composiciones antigénicas secadas por congelación estabilizadas o composiciones de vacuna utilizan un estabilizador de acuerdo con la presente invención y se obtienen por el proceso de secado por congelación descrito en lo anterior son abarcadas en la presente invención.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método para producir una composición de vacuna adecuada para utilizar en un kit que comprende un primer contenedor que contiene la composición de vacuna del método de la invención, y un segundo contenedor que contiene un diluyente.

Para su uso y administración en un sujeto, la composición de vacuna, producida por el método para producir una vacuna de acuerdo con la presente invención, se puede reconstituir por rehidratación con un diluyente. El diluyente es típicamente agua, tal como agua desmineralizada o destilada, pero también puede comprender soluciones fisiológicas o amortiguadores conocidos en la técnica.

Las composiciones antigénicas listas para usar reconstituidas o composiciones de vacuna, producidas por el método para producir una vacuna de acuerdo a la presente invención, se pueden administrar a un animal por inyección a través de la ruta parenteral o mucosa, o de preferencia mediante administración oral u ocular por rocío. Sin embargo, la administración de tales composiciones antigénicas listas para usar reconstituidas o composiciones de vacuna también pueden comprender administración intranasal, epicutánea o tópica.

Los siguientes ejemplos ilustran la preparación y potencia de la composición de vacuna de la presente invención cuando se utilizan para inmunizar un sujeto contra varias enfermedades infecciosas. También se presentan evaluaciones de estabilidad con un análisis de título de una forma de tableta secada por congelación comprimida para varias

formulaciones de vacuna. La fabricación de la composición de la invención se puede hacer por uno de habilidad ordinaria en la técnica siguiendo la enseñanza en los documentos US 2003/0026813 y WO 01/13896, que son incorporados en la presente en su totalidad.

Los ejemplos son presentados para ilustrar y explicar adicionalmente la presente invención y no se deben tomar como que limitan en cualquier respecto. A menos de que sea indicado de otra manera en los ejemplos y en otra parte en la especificación y las reivindicaciones, todas las partes y porcentajes están en peso. Las temperaturas están en grados Centígrados.

Estudios de Estabilidad

El efecto del manitol en la estabilidad de las composiciones de vacuna también se estudió. Seis diferentes fórmulas se hicieron como es descrito en la Tabla 1, para mostrar que el agente de control de espuma (manitol) no tiene cualquier impacto negativo en la estabilidad de las formulaciones en intervalos de 6 meses y 9 meses. Las tabletas hechas de las formulaciones se almacenaron a aproximadamente 5°C en paquetes de ampollitas de aluminio selladas estándar para la duración del tiempo antes de ser reconstituidas en diluyente y los títulos medidos. La determinación del título viral de las vacunas secadas por congelación se realizó por el cálculo del título medio de tres titulaciones repetidas en la misma vacuna. Los resultados del título se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1:

	Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3	Fórmula 4	Fórmula 5	Fórmula 6
Fórmula para 100 kg						
Antígeno Secado por Congelación 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
Ácido cítrico anhidro	28.48 kg	20,08 kg	27.25 kg	13,50 kg	30.53 kg	20,08 kg
Estearato de	0.50 kg	1,00 kg	0.50 kg	1,00 kg	0.50 kg	1,00 kg

magnesio						
Características de la Tableta						
Diámetro	12 mm	12mm	15 mm	15mm	12 mm	12mm
Dureza	70 - 200 N	70-200 N	70 - 200 N	70-200 N	70 -200 N	70 -200 N
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
Espesor (mm)	4.5-4.9	<5	4.5-4.9	<5	4.5-4.9	3.5-3.9

Tabla 2 – Resultados del Título:

Fórmula #	Antígeno	Estabilizador	Título Medio (0 meses)	Título Medio (3 meses)	Título Medio (6 meses)	Título Medio (9 meses)
1	Cepa de virus de Enfermedad Newcastle VG/GA	Hidrolizado de proteína Glutamato de potasio Albúmina Bovina	9.4	9.0	9.0	9.1
2	Cepa de virus de Enfermedad Newcastle VG/GA	Hidrolizado de proteína Glutamato de potasio Albúmina Bovina	9.5	9.3	9.2	9.4
3	Cepa de virus de Bronquitis Infecciosa CR88121	Hidrolizado de proteína	7.6	7.1	7.3	7.0
4	Cepa de virus de Bronquitis Infecciosa CR88121	Hidrolizado de proteína	7.9	7.8	7.8	7.8

5	Cepa de virus de Bronquitis Infecciosa HI20	Hidrolizado de proteína	9.4	7.1	7.4	-
6	Cepa de virus de Bronquitis Infecciosa HI20	Hidrolizado de proteína	7.5	7.6	7.7	-

Unidades del Título: Log10 DICC50/cp

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

5 **Estudios de Control de Espuma**

a) Concentraciones del Agente de Control de Espuma:

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 reducir la espumación en la solución. Estas formulaciones se hicieron en tabletas utilizando medios convencionales para elaborar

10 tabletas efervescentes. Las tabletas se mezclaron en agua a temperatura ambiente y la espumación se midió en la espumación pico. El bicarbonato de sodio y ácido cítrico actúan como un agente efervescente para ayudar a mezclar la composición 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

15 espuma que la Fórmula I (control que contiene 0% de manitol). Esto muestra la disminución en la formación de espuma a medida que la cantidad de manitol se incrementa en la composición.

Tabla 3:

Composición	Fórmula I	Fórmula II	Fórmula III
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%
-----------------------	----	----	----

b) Examen del Efecto del Manitol en Diferentes Composiciones de Vacuna:

Se hicieron seis composiciones de vacuna como se muestran en la Tabla 4. Estas composiciones se formaron en tabletas utilizando medios convencionales para elaborar tabletas efervescentes. Las tabletas se mezclaron en agua a temperatura ambiente y la espumación se midió en la espumación pico. El bicarbonato de sodio y ácido cítrico actúan como un agente efervescente para ayudar a mezclar la composición en el agua. Los resultados mostrados en la Figura 2 muestran que la Fórmula B (que contiene 15% de manitol) tiene aproximadamente 50% menos 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 espuma que la Fórmula C (que contiene 0% de manitol). La Figura 4 muestra que la Fórmula E (que contiene 26% de manitol) tiene aproximadamente 80% menos espumación que la Fórmula F (que contiene 0% de manitol).

Tabla 4:

Composición	Fórmula A	Fórmula B	Fórmula C	Fórmula D	Fórmula E	Fórmula F
Antígeno Secado por Congelación y Estabilizador	Cepa de virus de Enfermedad Newcastle VG/GA (30%)	Cepa de virus de Enfermedad Newcastle VG/GA (35%)	Cepa de virus de Bronquitis Infecciosa H120 (25%)	Cepa de virus de Bronquitis Infecciosa H120 (35%)	Cepa de virus de Bronquitis Infecciosa CR88121 (40%)	Cepa de virus de Bronquitis Infecciosa CR88121 (33%)
Bicarbonato de Sodio 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%

Habiéndose descrito de esta manera en detalle las modalidades preferidas de la presente invención, se va a entender que la invención definida por las reivindicaciones adjuntas no va a ser limitada por detalles particulares expuestos en la descripción anterior ya que

muchas variaciones evidentes de las mismas son posibles sin apartarse del espíritu o alcance de la misma.

5

LAC\LAC\ID-671184\WPC21839

10