

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 246**

51 Int. Cl.:
A61K 39/15 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06707035 .9**
96 Fecha de presentación: **15.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1863526**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2007**

54 Título: **VACUNA DE ROTAVIRUS VIVO ATENUADO PARA ADMINISTRACIÓN ORAL.**

30 Prioridad:
17.02.2005 GB 0503337

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.11.2011

73 Titular/es:
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART BRUSSELS, BE

72 Inventor/es:
VANDE VELDE, Vincent.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 246 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

Vacuna de rotavirus vivo atenuado para administración oral

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a nuevas formulaciones líquidas de rotavirus que son útiles como composiciones farmacéuticas y vacunas, al procedimiento para prepararlas y a su uso en la prevención del rotavirus, en particular de enfermedades asociadas con rotavirus humanos.

Antecedentes técnicos

10 La diarrea infecciosa aguda es una causa principal de enfermedad y muerte en muchas zonas del mundo. En los países en desarrollo, el impacto de la enfermedad diarreaica es muy importante. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica existen entre 3-4 billones de casos de diarrea cada año y, de estos casos, aproximadamente de 5-10 millones tienen como resultado la muerte (Walsh, J.A. y col.: N. Engl. J. Med., 301:967-974 (1979)).

15 Se ha reconocido que los rotavirus son una de las causas más importantes de diarrea grave en lactantes y niños pequeños (Estes, M.K. Rotaviruses and Their Replication in Fields Virology, Tercera Edición, editado por Fields y col., Raven Publishers, Filadelfia, 1996). Se ha estimado que la enfermedad por rotavirus es responsable de alrededor de 600.000 muertes anuales. La enfermedad inducida por rotavirus afecta principalmente a niños de edades comprendidas entre los 6 y los 24 meses, y la prevalencia máxima de la enfermedad suele producirse durante los meses más fríos en climas templados y durante todo el año en zonas tropicales. Los rotavirus se transmiten típicamente de una persona a otra por la vía orofecal, con un periodo de incubación de aproximadamente 20 1 a aproximadamente 3 días. Al contrario que la infección en el grupo de 6 meses-24 meses de edad, por lo general, los neonatos son asintomáticos o sólo presentan la enfermedad leve. En contraste con la enfermedad grave que se suele encontrar en niños pequeños, la mayoría de los adultos están protegidos como resultado de previas infecciones por rotavirus, por lo que en la mayoría de los adultos las infecciones son leves o asintomáticas (Offit, P.A. y col. Comp. Ther., 8(8):21-28, 1982).

25 Los rotavirus son esféricos y su nombre deriva de su característica estructura de cápside de cubierta externa e interna o de doble cubierta. Normalmente, la estructura de la cápside de doble cubierta de un rotavirus rodea una cubierta proteica interna o núcleo que contiene el genoma. El genoma de un rotavirus está compuesto por 11 segmentos de ARN bicatenario que codifica al menos 11 proteínas virales distintas. Dos de estas proteínas virales, denominadas VP4 (proteína P) y VP7 (proteína G) son proteínas estructurales dispuestas en el exterior de la estructura de cápside de doble cubierta. La cápside interna del rotavirus presenta una proteína, que es la proteína del rotavirus denominada VP6. La importancia relativa de estas tres proteínas concretas de los rotavirus a la hora de provocar la respuesta inmunitaria que sigue a la infección por rotavirus todavía no está clara. No obstante, la proteína VP6 determina el antígeno grupo y subgrupo y las proteínas VP4 y VP7 son los determinantes de la especificidad de serotipo.

35 Hasta la fecha, se han identificado al menos 14 serotipos G de rotavirus y 11 serotipos P de rotavirus (Linhares A.C. & Bresse J.S., Pan. Am. J. Publ. Health 2000, 9, 305-330). Entre estos, 10 serotipos G y 6 serotipos P se han identificado entre los rotavirus humanos.

40 La proteína VP7 es una glucoproteína de PM de 38.000 (PM de 34.000 cuando no está glicosilada) que es el producto de la traducción del segmento genómico 7, 8 ó 9, dependiendo de la cepa. Esta proteína estimula la formación del principal anticuerpo neutralizante tras la infección por rotavirus. La proteína VP4 es una proteína no glicosilada de aproximadamente 88.000 de PM, que es el producto de la traducción del segmento genómico 4. Esta proteína también estimula el anticuerpo neutralizante tras la infección por rotavirus. Dado que las proteínas VP4 y VP7 son las proteínas víricas contra las que están dirigidos los anticuerpos neutralizantes, se cree que son los candidatos primarios para el desarrollo de vacunas de rotavirus, proporcionando protección contra la enfermedad por rotavirus.

45 Se sabe que la infección natural por rotavirus durante la primera etapa de la infancia produce inmunidad protectora.

El primer desarrollo de vacunas para prevenir las infecciones por rotavirus comenzó en la década de 1970 tras el descubrimiento del virus. Inicialmente, se estudiaron las cepas atenuadas de animales y seres humanos, mientras que los esfuerzos más recientes se han centrado en reagrupados de seres humanos-animales.

50 El desarrollo de nuevas formulaciones de rotavirus debe satisfacer una serie de requisitos, incluidos la potencial distribución por todo el mundo y la estabilidad en un amplio abanico de condiciones ambientales y de almacenamiento. En particular, la estabilidad de una formulación, especialmente de una composición farmacéutica o de vacuna, será, en general, mejor a temperaturas inferiores en comparación con temperaturas ambiente o superiores.

55 En consecuencia un procedimiento de estabilización ha consistido en desarrollar formulaciones vacunales que se puedan almacenar congeladas (-20°C a -70°C) o, como alternativa, desarrollar vacunas liofilizadas que se puedan conservar durante un periodo de tiempo prolongado a aproximadamente la temperatura de la nevera (2°C a 8°C). Sin embargo, es un hecho conocido que el procedimiento de liofilización tiene una capacidad limitante y está asociada con un elevado coste de producción. Además, la administración de las vacunas liofilizadas supone una manipulación más sofisticada, ya que puede requerir dispositivos más complejos, y por tanto relativamente caros, tales como vacunas en multicámara/viales, con el ingrediente activo en una cámara y el líquido de reconstitución en otra cámara. Las vacunas liofilizadas también están asociadas con un coste más elevado de envío y almacenamiento. Estas opciones pueden ser inadecuadas para algunos países del mundo en desarrollo, donde el dispositivo de administración debe ser económicamente asequible y donde la disponibilidad de la infraestructura para la producción y el almacenamiento puede ser inexistente o no fiable.

Dado que los rotavirus convencionalmente se administran por vía oral a los lactantes humanos, esta vía introduce varios retos en las composiciones inmunogénicas de rotavirus.

El rotavirus se inactiva con rapidez en un ambiente ácido, tras la exposición a tampón ácido o a, por ejemplo, jugo gástrico ácido (C. Weiss y H.F. Clark, 1985, J. Gen. Virol.,66, 2725-2730; T. Vesikari y col., 1984, The Lancet, página 700 ; R.H.Foster y A.J.Wagstaff, 1998, BioDrugs Feb: 9(2) 155-178). Por tanto, es deseable que las composiciones de rotavirus se formulen de un modo tal que sean estables durante el almacenamiento y tras la administración al receptor huésped.

Las vacunas de rotavirus están principalmente destinadas a administrarse a bebés, a una edad tan temprana como de 4 semanas. Para esa población será ventajoso un pequeño volumen de dosis de vacuna, tal como un volumen de dosis inferior a 2 ml o incluso inferior a 1,5. Por tanto, es deseable que las composiciones de rotavirus se formulen en un volumen de dosis pequeño.

Se conocen formulaciones estabilizantes para vacunas víricas líquidas. Por ejemplo en el documento EP 0 065 905 se divulgan composiciones estabilizantes en general adecuadas para una serie de virus tales como los causantes del sarampión o la gripe, y, en particular se describen soluciones estabilizantes que contienen tampón fosfato adecuadas para virus vivos atenuados.

El documento WO 02/11540 divulga una formulación de vacuna de rotavirus liofilizada reconstituida que comprende una cepa de rotavirus, un azúcar y un carboxilato en un tampón fosfato.

Otras formulaciones estabilizantes se describen en el documento WO 98/13065 y en Clark y col. (Pediatr Infect Dis J. 2003 Oct; 22(10):914-20). Tales formulaciones también requieren, entre otros constituyentes, la presencia de fosfato que actúe como agente tampón para neutralizar la acidez del estómago. Sin embargo, estas formulaciones no son compatibles con los requisitos indicados anteriormente para el desarrollo satisfactorio de una formulación de rotavirus, específicamente no son compatibles con un volumen reducido de la dosis de la vacuna que es mejor para un lactante humano. En particular, el presente inventor ha descubierto que adaptar esta formulación de la técnica anterior a un contexto de volumen bajo tal como 1,5 ml o menor, manteniendo una capacidad antiácida eficaz, conduce a problemas que surgen de una concentración inadecuada de los constituyentes de la formulación, en particular del tampón fosfato.

Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar formulaciones de rotavirus alternativas, en particular formulaciones líquidas alternativas que puedan aguantar la acidez gástrica y que sean estables en la nevera a pesar de la ausencia de fosfato. Además, existe una necesidad de que tales formulaciones alternativas también se formulen con éxito en un volumen de dosis vacunal lo más pequeño posible.

Por tanto, la presente invención no sólo proporciona composiciones inmunogénicas estables alternativas que están desprovistas de fosfato o que contienen sólo mínimas cantidades de fosfatos, sino que también permiten que los rotavirus se formulen en un volumen de dosis bajo que sea adecuado para la administración oral a lactantes humanos.

Descripción de las figuras

Figura 1 – Curvas estándar de valoración ácido base para cuatro carboxilatos

Figura 2A – Capacidad antiácido de diversas formulaciones que contienen adipato

Figura 2B – Dispersión experimental del análisis de Baby Rossett-Rice (análisis Rossett-Rice para bebés)

Figura 3 – índice de refracción de las formulaciones que contienen adipato. La Figura 3A muestra que en la etapa del tampón adipato el valor diana es sacarosa 58,5% p/p que da un índice de refracción de 1,4578 en la mezcla. La Figura 3B muestra que en la etapa de formulación final la diana es sacarosa 55% p/p, que conduce a un índice de refracción de 1,4480.

Figura 4 – Visión global del diseño del estudio clínico en fase II

Declaración de la invención

En consecuencia, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición inmunogénica líquida de rotavirus que es adecuada para la administración oral a un lactante humano, que comprende un antígeno de rotavirus, un azúcar y un carboxilato, donde dicha composición tiene un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0 y comprende fosfato inferior a 1 mM, donde dicho carboxilato se deriva de un ácido dicarboxílico y con un promedio de pKa > 4.

En un aspecto específico de la invención, normalmente, una dosis vacunal adecuada será de 1,5 ml o adecuadamente cualquier volumen inferior a 2,5 ml tal como un volumen de 2 ml o menor, que sea adecuado para la administración oral a bebés o a lactantes. En particular, el volumen de dosis será tal que la viabilidad técnica de la formulación sea posible y que no haya un efecto perjudicial sobre el potencial inmunogénico de la formulación. Las composiciones reivindicadas ofrecen la ventaja sobre las formulaciones que contienen fosfato de la técnica anterior de que pueden resistir la acidez gástrica, se mantienen inmunogénicas y estables durante un periodo de validez prolongado, mientras que son compatibles con la formulación en un volumen de dosis menor que el habitual, tal como menor que 2,0 ml o incluso compatible con un volumen de dosis de 1,5 ml o menor.

En una forma de realización específica, la composición líquida inmunogénica según la invención posee una capacidad antiácido de entre 6 y 23 minutos, evaluada mediante el análisis de Baby Rossett-Rice (adaptado como se detalla en el Ejemplo III.2.2 de la prueba básica de Rossett-Rice). De un modo adecuado, la capacidad antiácido

será de al menos 8 minutos, normalmente de al menos 12 minutos y un intervalo adecuado se encuentra entre 12 y 20 minutos. Sorprendentemente, se ha mostrado que las composiciones reivindicadas poseen una capacidad antiácido no sólo aceptable, sino superior, incluso en un volumen de dosis menor, en comparación con las formulaciones que contienen fosfato de la técnica anterior.

- 5 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para la preparación de dicha composición inmunogénica líquida de rotavirus que comprende mezclar un antígeno de rotavirus, un azúcar y un carboxilato con un diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 La invención también cubre en otro aspecto el uso de un antígeno de rotavirus mezclado con un carboxilato y un azúcar para la fabricación de una composición inmunogénica oral para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas con rotavirus en seres humanos, donde dicha composición no contiene fosfato superior a 1 mM y tiene un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, y donde dicho carboxilato se obtiene de un ácido dicarboxílico con un pKa medio > 4.

15 En otro aspecto más, también se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir enfermedades asociadas con rotavirus en seres humanos mediante la administración a un sujeto humano que lo necesite una cantidad eficaz de dicha composición inmunogénica líquida.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describen posteriormente en la siguiente descripción detallada de las formas de realización preferidas de la misma.

Descripción detallada

20 El presente inventor ha desarrollado nuevas composiciones líquidas de rotavirus que son inmunogénicas, estables a la temperatura de la nevera (entre 2 y 7°C, normalmente a 4°C), que pueden resistir la naturaleza ácida inherente del estómago cuando se administran por vía oral y que son compatibles con un volumen de dosis pequeño.

Con composición líquida se pretende que signifique una formulación en forma fluida, en lugar de una forma seca, cuyo volumen se fija en condiciones específicas constantes (por ejemplo, a temperatura ambiente o a temperatura de la nevera, a presión atmosférica) y cuya forma queda determinada por el recipiente que llena.

25 La materia objeto y la información descrita en las publicaciones y patentes o solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente memoria descriptiva como referencia.

Con los términos 'que comprende', 'comprenden' y 'comprende' en la presente memoria descriptiva, el inventor pretende que se puedan sustituir con los términos "que consiste en" 'consisten en', and 'consiste en', respectivamente, en todos los casos.

30 La presente invención proporciona una composición inmunogénica líquida de rotavirus que comprende un antígeno de rotavirus, un azúcar y un carboxilato, en la que dicha composición posee un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0 y comprende fosfato menor que 1 mM y donde dicho carboxilato se obtiene de un ácido dicarboxílico con un pKa medio > 4. Las composiciones de la invención muestran un perfil de estabilidad muy bueno, cuando se comparan con las formulaciones que contienen fosfato, mientras que se mantiene el perfil de inmunogenicidad. Estas composiciones son al menos tan estables como sus homólogas que contienen fosfato. Otra ventaja de las presentes composiciones es que se pueden preparar en un volumen de dosis pequeño, tal como inferior a 2,0ml, normalmente 1,5 ml por ejemplo, en comparación con las formulaciones de la técnica anterior en las que existe fosfato.

40 En una forma de realización específica, la concentración de fosfato en la composición inmunogénica no supera 1 mM, en particular no supera 0,5 mM. Fosfato se refiere a la sal de ácido fosfórico (también conocido como ácido ortofosfórico (H_3PO_4)), normalmente se usan sales de sodio o de potasio o de mezcla de sodio y potasio (por ejemplo: Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4). De un modo adecuado, la concentración de fosfato es 0,4 mM o menor, normalmente 0,2 mM o menor, idealmente 0,1 mM o menor. En otra forma de realización específica, la composición según se reivindica en la presente memoria descriptiva no tiene fosfato. Normalmente el fosfato, cuando está presente, procede del medio de cultivo celular o del tampón salino usado como diluyente, tal como DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco), medio basal BME Eagle o PBS.

45 La concentración de fosfato a la que se hace referencia en la memoria descriptiva será una concentración calculada, determinada a partir de la o las cantidades de productos químicos que contienen fosfato usados en la preparación de la o las composiciones reivindicadas. Como alternativa, la concentración de fosfato presente en la composición como se reivindica en la presente memoria descriptiva se puede medir de forma experimental usando técnicas analíticas habituales.

50 Una técnica adecuada es un análisis colorimétrico denominado 'Nanocolor' comercializado por Macherey-Nagel (nº del catálogo 918 78). Este procedimiento se basa en la determinación fotométrica del complejo amarillo formado por ácido fosfórico-molibdato-vanadato en una solución ácida. El límite de cuantificación del análisis es 2 µg/ml de fosfato ó 0,02 mM.

55 Un procedimiento alternativo es la dosificación de fósforo (P) mediante una técnica de espectroscopía por emisión atómica, tal como Espectroscopía de emisión atómica en plasma por acoplamiento inductivo (ICP-AES) (Boss & Fredeen, en Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy, Perkin Elmer eds, segunda edición, 1997 – véase Metodología a partir de la página 72). El límite de cuantificación del análisis es 0,030 µg/ml de fósforo correspondientes a una concentración de fosfato de 0,00032 mM.

En una forma de realización, el pH de la composición se encuentra entre pH 5,0 y pH 8,0. En otra forma de realización específica, el pH de la composición reivindicada se encuentra entre un pH de aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,5. Por 'un pH de aproximadamente' se quiere decir dentro de 0,2 unidades del valor de pH indicado. En particular, el pH de la composición se encuentra entre un pH de 5,5 y un pH de 7,5. Por ejemplo, el pH de la composición se encuentra entre un pH de aproximadamente 6,0 a un pH de aproximadamente 7,0, en particular entre un pH de 6,0 y un pH de 7,0, normalmente entre un pH de 6,2 y un pH de 6,8 o entre un pH de 6,2 y un pH de 6,6. Se contempla un pH de aproximadamente 6,4, en particular de 6,4. Se sabe que el rotavirus se ve afectado de forma negativa a pH ácido tal como un pH inferior a 4,0, y cabría esperar obtener una estabilidad máxima a un pH neutro o incluso ligeramente básico, es decir un intervalo de pH de 7,0 a 8,0, que se obtiene por ejemplo en las formulaciones tamponadas con fosfato de la técnica anterior. Como se muestra en la sección experimental, las composiciones de la invención, a pesar de la ausencia de fosfato, han mostrado un buen perfil de estabilidad al intervalo de pH reivindicado, y, además, sorprendentemente se ha mostrado un perfil de estabilidad y de inmunogenicidad aceptable incluso en condiciones levemente ácidas, es decir a un pH de alrededor de 6,0 a 7,0, tal como a un pH de alrededor de 6,4 por ejemplo.

La composición líquida como se reivindica en la presente memoria descriptiva comprende un carboxilato.

El carboxilato “(-COO⁻)” es la forma disociada del ácido carboxílico resultante de la neutralización de la función ácida “(-COOH)” por acción de una sustancia básica. Un ácido carboxílico es un compuesto que contiene el grupo carboxilo “-COOH”; que formalmente se prepara mediante la combinación del grupo carbonilo (“-CO-”) y un grupo hidroxilo (“-OH”). Sin embargo, la interacción entre estas dos partes modifica sus propiedades químicas de tal modo que todo el grupo se considera como una función nueva con sus propias propiedades características (Organic Chemistry por J.B. Hendrickson, D.J. Cram, y G.S. Hammond, McGraw-Hill Book Company, tercera edición 1970 página 131). Aunque la Unión Internacional para la química pura y aplicada (IUPAC) recomienda usar la nomenclatura de ácido alcanoico (para los ácidos monocarboxílicos) y ácido alcanodioico (para los ácidos dicarboxílicos), en este texto se han usado la mayoría de los nombres vulgares de los ácidos carboxílicos porque estos productos son bien conocidos para el experto en la técnica. Por ejemplo, el nombre según la IUPAC del ácido acético es ácido etanoico y para el ácido adípico el nombre será ácido hexanodioico.

En una forma de realización específica, se usa una sal carboxilato procedente de un ácido inorgánico o, de forma adecuada, de un ácido orgánico. En una forma de realización específica, dicho carboxilato deriva de un ácido débil. Por ejemplo, dicho carboxilato es una sal carboxilato seleccionada del grupo que consiste en: adipato, citrato, malato, acetato, succinato, propionato, butirato, malonato, glutarato, maleato, glicolato, lactato, gluconato, fumarato, tartarato, pimelato y cualquier combinación de dos o más de los mismos. Carboxilatos adecuados son carboxilatos derivados de un ácido carboxílico con un pK_a > 4 o carboxilatos derivados de un ácido di- o tri-carboxílico (di- o tri-carboxilatos) con un pK_a numérico medio > 4 (Tabla 9). Entre los ejemplos de la clase anterior se incluyen carboxilatos derivados de los ácidos propínico, butírico y acético. Entre los ejemplos de la última clase se incluyen carboxilatos derivados de los ácidos cítrico, maleico, malónico, succínico, adípico, glutárico y málico.

En una forma de realización específica, dicho carboxilato pertenece a la lista GRAS, es decir carboxilatos que están 'Generalmente reconocidos como seguros por la Food and Drug Administration de EE.UU.', y se selecciona de la lista que comprende acetato, propionato, malato, glutarato, adipato, lactato, fumarato y tartrato. De forma adecuada, el carboxilato es una sal de ácido adípico, es decir sal monosódica de ácido adípico, sal monopotásica de ácido adípico, de forma adecuada adipato de sodio o adipato de dipotasio o adipato de calcio.

En una forma de realización específica, de forma adecuada se usa una concentración de carboxilato de entre 50 mM a 2 M en la composición líquida de rotavirus. Debe entenderse que concentración de carboxilato en el intervalo mencionado antes puede adaptarse adecuadamente, mediante experimentación rutinaria, de acuerdo con la naturaleza del carboxilato, la capacidad antiácida que se quiere conseguir y el volumen de la dosis vacunal. Por ejemplo, cuando se requiere un potencial antiácido elevado, tal como superior a 8 minutos, adecuadamente superior a 10 minutos o superior a 12 minutos evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice para un volumen de dosis de 1,5 ml, se pueden usar concentraciones elevadas de carboxilato superiores a 1 M. Normalmente se usan concentraciones de 1 M o inferiores, tal como concentraciones de entre 100 mM y 1 M, normalmente concentraciones de entre 200 mM y 800 mM. Concentraciones adecuadas de carboxilato están comprendidas entre aproximadamente 300 mM y aproximadamente 800 mM, adecuadamente entre 400 mM y 700 mM. En particular, cuando el carboxilato es adipato un intervalo de concentraciones adecuado es entre 400 y 500 mM. Sin embargo, la persona experta reconocerá que pueden ser adecuadas concentraciones dentro del 10-20 por ciento de los valores indicados, es decir cuando se indica 100 mM, también se describe y se pretende cubrir un intervalo de 80-90 mM a 110-120 mM. En la Tabla 1 a continuación se facilitan concentraciones a modo de ilustración para diversos carboxilatos.

Tabla 1 – Capacidad antiácido de carboxilatos a una concentración específica

Estos parámetros ilustrativos se facilitan para un volumen de dosis de 1,5 ml y corresponden al número de ejemplo mencionado proporcionado en la Tabla 1.

Carboxilato (Pm)	Concentración de carboxilato (M)	pH en BRR a t=0	Capacidad antiácido (min)*	Nº de muestra en el Ejemplo II
Adipato (144)	0,372	6,38	8	91
Adipato (144)	0,465	6,24	12	92
Adipato (144)	0,548	6,50	16	93

(cont.)				
Adipato (144)	0,652	6,11	20	94
D,L-malato (132)	0,621	6,15	8	72
D,L-malato (132)	0,746	6,08	12	64
D,L-malato (132)	0,895	5,35	15	77
Acetato (59)	1,000	6,14	12	89
Citrato (189)	0,441	6,55	12	129

* evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2

El pH de la composición inmunogénica líquida de rotavirus como se reivindica en la presente memoria descriptiva se puede obtener mezclando un ácido carboxílico y una sal carboxilato. En particular, el ácido carboxílico se puede usar en mezcla con una sal carboxilato diferente, por ejemplo, un citrato se combina se combina con ácido adípico. Esto puede ser una ventaja cuando se usan productos químicos disponibles comercialmente, algunos de los cuales pueden no estar disponibles con facilidad, o para simplificar la etapa de formulación. Por ejemplo, uno (o más) de dichos ácidos carboxílicos se pueden seleccionar de la lista constituida por: ácido adípico, ácido cítrico, ácido málico, ácido acético, ácido succínico, ácido carbónico, ácido propiónico, ácido butírico, ácido malónico, ácido glutárico, ácido maleico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido gluconico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido pimélico, y se mezcla (mezclan) en proporciones adecuadas con una (o más) sales carboxilato seleccionadas de la lista constituida por: adipato, citrato, malato, acetato, succinato, propionato, butirato, malonato, glutarato, maleato, glicolato, lactato, gluconato, fumarato, tartarato, pimeliato.

La composición líquida como se reivindica en la presente memoria descriptiva comprende un azúcar. La sacarosa es particularmente adecuada. La dextrosa es otro azúcar adecuado. Otros azúcares o alcoholes de azúcar también se pueden usar en lugar de sacarosa o dextrosa, incluidos, por ejemplo : glicerol, eritrosa, eritriol, xilitol, arabitol, ribosa, xilosa, arabinosa, glucosa, tagalosa, manosa, galactosa, fructosa, inositol, sorbitol, manitol, galactitol, mezcla de glucosa y fructosa, maltosa, soforosa, lactosa, celobiosa, melibiosa, trehalosa, sacarosa, palatinosa, maltulosa, lactulosa, maltitol, lactitol, rafinosa, maltotriosa, melezitosa, celotriosa, ciritol, maltotetraosa, estaquiosa, celotetraosa, maltopentaosa, celopentaosa, maltohexaosa, celohexaosa, oligosacáridos.

Las concentraciones típicas de azúcar varían de aproximadamente 1% p/p a aproximadamente 70% p/p, por ejemplo de aproximadamente 25% p/p a aproximadamente 60% p/p. Sin embargo, la persona experta reconocerá que la naturaleza y la concentración de azúcar debe optimizarse de forma que garantice la viabilidad viral satisfactoria mientras mantiene la viscosidad a un nivel que es compatible con las etapas de procesamiento posteriores de la formulación, tal como filtración. En una forma de realización específica se usa sacarosa. Normalmente, su concentración se mantiene a un mínimo de 30% p/p. Además, se pueden usar concentraciones de sacarosa superiores, es decir por encima del 30% p/p, para garantizar el almacenamiento prolongado, dado que cabe esperar que la elevada presión isoosmótica de tales formulaciones impedirá el crecimiento bacteriano. En consecuencia, el límite inferior para la concentración de sacarosa en la composición líquida como se reivindica en la presente memoria descriptiva es, de forma adecuada del 30% p/p o superior, tal como del 35% p/p o superior, adecuadamente del 40% p/p o superior. Una concentración adecuada de sacarosa varía de aproximadamente el 40% p/p a aproximadamente el 70% p/p. Por ejemplo, una concentración adecuada de sacarosa se encontrará entre 45% p/p y 60% p/p, de forma adecuada entre el 50% p/p y el 55% p/p. En particular, se usa sacarosa a una concentración de aproximadamente el 50% p/p o de aproximadamente el 55% p/p. Son adecuadas concentraciones finales de sacarosa del 50% p/p o del 55% p/p.

El experto entenderá que se puede llevar a cabo la optimización rutinaria de la concentración de azúcar con el fin de garantizar la estabilidad viral cuando se sustituye la sacarosa por otro azúcar.

Además, los valores indicados para los azúcares pueden adaptarse ligeramente para tener en cuenta los parámetros de formulación/fabricación tales como el volumen de la dosis. Por tanto, el experto reconocerá que pueden ser apropiadas las concentraciones dentro del 10% de los valores indicados, es decir cuando se indica 50% p/p, también se describe y se pretende cubrir un intervalo del 45% p/p - 55% p/p.

La composición líquida inmunogénica de rotavirus de la presente invención también comprende un antígeno de rotavirus. En particular, la composición líquida como se reivindica en la presente memoria descriptiva es una composición inmunogénica, por ejemplo una composición vacunal. Se entiende que con antígeno de rotavirus se quiere decir cualquier antígeno de rotavirus que es adecuado para usar en una formulación vacunal. En especial se contemplan los antígenos de rotavirus vivos orales. Por ejemplo, cualquier antígeno de rotavirus adecuado se puede seleccionar del grupo que consiste en: un rotavirus vivo atenuado procedente de animales o seres humanos, en particular un rotavirus vivo atenuado humano; un rotavirus reagrupado, en particular, aunque no limitado a un rotavirus reagrupado de ser humano-ser humano, un rotavirus reagrupado de ganado bovino-ser humano o un rotavirus reagrupado de mono rhesus-ser humano.

En la presente invención se contemplan todas las cepas de rotavirus, cepas humanas o animales. Las cepas de rotavirus humanas son adecuadas. En particular, el antígeno de rotavirus es en una forma de realización la población de rotavirus atenuados humanos que comprende una única variante o sustancialmente una única variante, estando dicha variante definida por la secuencia nucleotídica que codifica al menos una de las proteínas virales principales denominadas VP4 y VP7 como se describe en el documento WO 01/12797, en particular cualquiera, incluida una o más, de las variantes definidas por las mutaciones expuestas en la Tabla 2, las Tablas 3.1 y 3.2 del documento WO 01/12797. En formas de realización específicas, el antígeno de rotavirus es cualquiera de las siguientes cepas de rotavirus vivos atenuados humanos: cepa HRV 89-12C2 depositada con número de depósito en la ATCC VR 2272 (como se describe en el documento EP 0 557 427), su progenie, derivados reagrupados e inmunológicamente activos de la misma; cepa HRV P43 depositada con número de depósito ECACC 99081301 (como se describe en el documento WO 01/12797), su progenie, derivados reagrupados e inmunológicamente activos de la misma.

Las poblaciones de rotavirus que tienen las características de cualquiera de las cepas depositadas mencionadas anteriormente también son cepas vacunales adecuadas. Los derivados de dichas cepas depositadas se pueden obtener sometiendo a dichas cepas a posterior procesamiento, tal como su propagación mediante posteriores pasajes, clonación u otros procedimientos utilizando el virus vivo o mediante la modificación de dichas cepas depositadas de una forma que incluya técnicas de ingeniería genética o técnicas de reagrupación. Tales etapas y técnicas son bien conocidas en la técnica. Antígenos de rotavirus de particular interés son la progenie de cualquiera de dichas cepas depositadas y derivados inmunológicamente activos de las mismas. Derivados inmunológicamente activos quiere decir materiales obtenidos de o con cualquiera de las cepas depositadas, en particular de o con la cepa HRV P43 depositada con el número de depósito ECACC 99081301, particularmente antígenos del virus, que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria que es reactiva contra el rotavirus cuando se inyecta en un animal huésped.

Materiales derivados de las cepas depositadas citadas anteriormente también son antígenos de rotavirus adecuados e incluyen material proteico y genético. De particular interés son los rotavirus reagrupados, que comprenden al menos un antígeno o al menos un segmento de cualquiera de dichas cepas depositadas, por ejemplo reagrupados que comprenden una cepa virulenta de rotavirus en la que uno o parte de uno de los 11 segmentos del genoma ha sido reemplazado por el segmento genómico o parte del mismo de cualquiera de dichas cepas depositadas. Específicamente, un reagrupado de rotavirus en el que el segmento o segmento parcial que codifica la NSP4 es un segmento o segmento parcial de cualquiera de dichas cepas depositadas, puede poseer propiedades útiles. Los rotavirus reagrupados y técnicas para prepararlos son bien conocidos (Foster, R. H. y Wagstaff, A. J. Tetravalent Rotavirus Vaccine, a review. ADIS drug evaluation, BioDrugs, Gev, 9 (2), 155-178, 1998).

El antígeno de rotavirus de la composición reivindicada se puede producir de acuerdo con técnicas de producción de rutina. Normalmente, las preparaciones de antígeno de rotavirus pueden derivar de procedimientos de cultivo tisular usados para propagar el virus o expresar antígenos de rotavirus recombinantes. Entre los sustratos celulares adecuados para cultivar el virus se incluyen, por ejemplo, células renales de perro tales como MDCK o células de un clon de MDCK, células similares a las MDCK, células renales de mono tales como células AGMK, incluidas células Vero que son particularmente adecuadas, otras líneas celulares de origen renal de mono tales como BSC-1, LLC-MK2 y MA104, líneas celulares de cerdo adecuadas, o cualquier otro tipo de célula de mamífero adecuado para la producción de rotavirus con fines vacunales. Entre los sustratos celulares adecuados también se incluyen células humanas, por ejemplo células MRC-5. Los sustratos celulares adecuados no se limitan a líneas celulares, por ejemplo también se incluyen células primarias.

Asimismo, dentro del alcance de la invención están las mezclas de cualquiera de las cepas depositadas anteriormente citadas con otras variantes de rotavirus, por ejemplo otras variantes clonadas u otros rotavirus reagrupados, o con otros virus, en particular otros virus atenuados. En particular, la composición según la invención contiene dos antígenos de rotavirus. En particular un antígeno en la composición es la cepa HRV P43 depositada con el número de depósito ECACC 99081301, y el otro antígeno es un derivado reagrupado de la misma o cualquier derivado inmunológicamente activo de la misma.

El antígeno de rotavirus para incluir en la composición reivindicada puede ser una cepa de rotavirus monovalente, es decir que contenga una única cepa de rotavirus, o ser multivalente, es decir que contenga al menos dos o más cepas de rotavirus.

El experto entenderá que también son adecuadas otras cepas atenuadas disponibles con facilidad, de origen animal o humano, que se pueden obtener de instituciones depositarias y pueden usarse como sustitutos de las cepas depositadas citadas antes.

De acuerdo con la presente invención, una composición inmunogénica adecuada contiene un antígeno de rotavirus, en particular la cepa humana atenuada P43 (depositada con el número de depósito ECACC 99081301, véase el documento WO 01/12797) a una concentración de $10^5 - 10^6$ ufc por dosis (o equivalente a $10^{5.5} - 10^{6.5}$ expresado en DIC50 por dosis), 55% de sacarosa p/p, adipato disódico 0,465 M (correspondiente a 132,74 mg por dosis), y tiene un pH de aproximadamente 6,2 a 6,6, en un volumen de dosis de 1,5 ml. Para esta composición, el contenido de DMEM es del 6% p/p y, por tanto, representa una concentración de fosfato inferior a 0,1 mM.

La composición según la presente invención puede además incluir un componente antiácido adicional tal como un antiácido inorgánico, por ejemplo hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$ e hidróxido de magnesio $Mg(OH)_2$. El hidróxido de aluminio es particularmente adecuado. Otros antiácidos comercialmente disponibles, que son adecuados para usar en la invención, incluyen MylantaTM, que contiene hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio. Estos son insolubles en agua y se proporcionan en suspensión. Otro antiácido particularmente adecuado que puede usarse de forma adicional en la composición de la vacuna de la presente invención es la sal inorgánica insoluble, carbonato cálcico ($CaCO_3$). Una concentración típica de $CaCO_3$ es 80 mg por dosis de vacuna por ejemplo.

Tras la eliminación de la cadena acilo de la posición 3 de la estructura disacárida se obtiene como resultado una versión más destoxificada del MPL, que se denomina monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL). Se puede purificar y preparar mediante los procedimientos enseñados en el documento GB 2122204B, cuya referencia también describe la preparación de difosforil lípido A y de variantes 3-O-desaciladas del mismo.

Una forma adecuada de 3D-MPL está en la forma de una emulsión que tiene un tamaño de partícula pequeño menor a 0,2µm de diámetro, y su procedimiento de fabricación se describe en el documento WO 94/21292. En el documento WO9843670A2 se han descrito composiciones acuosas que comprenden lípido monofosforilico A y un tensioactivo.

Los adyuvantes derivados del lipopolisacárido bacteriano que se van a formular en las composiciones de la presente invención se pueden purificar y procesar a partir de fuentes bacterianas, o, como alternativa, pueden ser sintéticos. Por ejemplo, el lípido monofosforilico A purificado se describe en Ribí y col. 1986 (supra), y el lípido A monofosforilico o difosforilico 3-O-desacilado derivado de *Salmonella sp.* se describe en los documentos GB 2220211 y US 4912094. Otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos se han descrito (Hilgers y col., 1986, *Int.Arch.Allergy.Immunol.*, 79(4):392-6; Hilgers y col., 1987, *Immunology*, 60(1):141-6; y el documento EP 0 549 074 B1). Un adyuvante del lipopolisacárido bacteriano particularmente adecuado es 3D-MPL.

En consecuencia, los derivados de LPS que se pueden usar en la presente invención son los inmunoestimulantes que son de estructura similar a la del LPS o el MPL o el 3D-MPL. En otro aspecto de la presente invención, los derivados del LPS pueden ser un monosacárido acilado, que es una subporción de la estructura anterior del MPL.

Los derivados sintéticos del lípido A también son conocidos, incluidos, entre otros:

OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetra-decanoilamino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosildihidrógenofosfato), (documento WO 95/14026)

OM 294 DP (3S, 9 R) -3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrógenofosfato) (documentos WO99/64301 y WO 00/0462)

OM 197 MP-Ac DP (3S-, 9R) -3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1-dihidrógenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (documento WO 01/46127)

Saponinas purificadas como adyuvantes orales se describen en el documento WO 98/56415. Las saponinas y el lípido monofosforilico A se pueden emplear por separado o en combinación (por ejemplo el documento WO 94/00153) y se pueden formular en sistemas adyuvantes junto con otros agentes. El 3D-MPL es un adyuvante bien conocido fabricado por Ribí Immunochem, Montana y su fabricación se describe en el documento GB 2122204.

Otro inmunoestimulante preferido para usar en la presente invención es la saponina Quil A y sus derivados. Las saponinas se explican en: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pág. 363-386). Las saponinas son glucósidos triterpenos o esteroides ampliamente distribuidos en los reinos animal marino y vegetal. Se sabe que las saponinas forman soluciones coloidales en agua que forman espuma cuando se agitan, y que precipitan el colesterol. Cuando las saponinas están cerca de membranas celulares, crean estructuras similares a poros en la membrana, lo que hace que la membrana estalle. La hemólisis de los eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, que es una propiedad de ciertas saponinas, aunque no de todas.

Las saponinas se conocen como adyuvantes en las vacunas para administración sistémica. La actividad adyuvante y hemolítica de las saponinas individuales se ha estudiado extensamente en la técnica (Lacaille-Dubois y Wagner, supra). Por ejemplo, la Quil A (derivada de la corteza del árbol de Sudamérica Quillaja Saponaria Molina), y fracciones de la misma, se describen en el documento US 5,057,540 y en "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2):1-55; y el documento EP 0 362 279 B1. Las estructuras particuladas, denominadas Complejos estimulantes inmunológicos (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A son hemolíticas y se han usado en la fabricación de vacunas (Morein, B., documentos EP 0 109 942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones de Quil A purificadas por HPLC) se han descrito como potentes adyuvantes sistémicos y el procedimiento de su producción se describe en la patente de EE.UU. nº.5.057.540 y el documento EP 0 362 279 B1. La QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina, que induce las células T citotóxicas CD8+ (CTL), las células Th1 y una respuesta de anticuerpos IgG2a predominante, y es una saponina adecuada en el contexto de la presente invención. Otras saponinas que se han usado en los estudios de vacunación sistémica incluyen las derivadas de otras especies vegetales tales como *Gypsophila* y *Saponaria* (Bomford y col., *Vaccine*, 10(9):572-577, 1992).

Un sistema potenciado implica la combinación de un derivado inocuo del lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica donde QS21 se inactiva con colesterol como se describe en el documento WO 96/33739. Las saponinas que forman parte de la presente invención pueden estar por separado en forma de micelas o pueden estar en forma de grandes estructuras ordenadas tales como ISCOM (documento EP 0 109 942 B1) o liposomas cuando se formulan con colesterol y lípido, o en la forma de una emulsión de aceite en agua (documento WO 95/17210). Las saponinas pueden asociarse de forma adecuada con una sal metálica, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (documento WO 98/15287).

Una composición de adyuvante particularmente potente que implica QS21 y 3D-MPL en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210 y en el documento WO 99/11241 y en el documento WO 99/12565, y son composiciones adecuadas.

Una exposición general de vehículos y adyuvantes para la inmunización oral se puede encontrar en Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, editado por Powell y Newman, Plenum Press, Nueva York, 1995.

La composición de la vacuna de acuerdo con la invención puede contener componentes adicionales, incluidos, por ejemplo, aromatizantes (en particular para una vacuna oral) y agentes bacteriostáticos.

5 En una forma de realización específica, la composición líquida según la invención posee una capacidad antiácido de entre 6 y 23 minutos evaluada mediante el análisis Baby Rossett-Rice (adaptado como se detalla en el Ejemplo III.2.2 de la prueba básica de Rossett-Rice). De acuerdo con la presente invención, por "capacidad antiácido" se quiere decir el periodo de tiempo, expresado en minutos, durante el cual el pH de la formulación a analizar permanece por encima de 4, evaluado según el procedimiento experimental que se expone en el Ejemplo III.2.2. De
10 forma adecuada, la capacidad antiácido se encontrará entre 12 y 20 minutos. Una capacidad antiácido superior a 23 minutos, tal como de 29-30 minutos por ejemplo, también es perfectamente aceptable desde una perspectiva del desarrollo de vacunas, pero una capacidad tan alta es superflua. En particular, una capacidad antiácido de al menos 8 minutos, al menos 10 minutos, al menos 12 minutos se contempla especialmente. Una capacidad antiácido de al menos 12 minutos, al menos 13 minutos, al menos 14 minutos, al menos 15 minutos, al menos 16 minutos, es
15 adecuada. Se sabe que el estómago de los lactantes pequeños que no han comido durante un periodo de tres horas es muy ácido, y que el rotavirus se ve afectado negativamente por tal pH ácido. En manos del inventor, al trabajar con una formulación de volumen bajo, que es deseable, ha sido imposible medir la capacidad antiácido de las formulaciones clásicas que contienen fosfato, ya que la solubilidad del fosfato se superó fácilmente y durante la formulación y/o el almacenamiento a corto plazo se produjo la cristalización de los constituyentes. Por el contrario,
20 las composiciones reivindicadas han mostrado de forma sorprendente una capacidad antiácido aceptable pero mayor, incluso en un volumen de dosis menor, en comparación con las formulaciones que contienen fosfato de la técnica anterior.

En otra forma de realización dicha composición líquida inmunogénica es estable en al menos una de las siguientes condiciones: durante 7 días a 37°C, durante un año a 4°C, durante 18 meses a 4°C, durante dos años a 4°C. De
25 acuerdo con la presente invención, la estabilidad de una composición dada se evalúa midiendo el título viral (es decir, la estabilidad viral) según el procedimiento establecido en el ejemplo III.1, tras almacenar la formulación durante un periodo definido de tiempo a una temperatura dada. La estabilidad de la composición se puede evaluar mediante una prueba de estabilidad acelerada, por ejemplo tras almacenar la formulación durante una semana a 37°C. La estabilidad de la composición puede evaluarse, como alternativa, durante un periodo de tiempo más
30 prolongado, tal como durante varios meses, bien a una temperatura de nevera (entre 2 y 7°C, normalmente a 4°C) o a temperatura ambiente (20-22°C). En estas condiciones, una composición estable es aquella que tiene una pérdida máxima de título de rotavirus de 1, expresado en \log_{10} uff/dosis en las condiciones de prueba definidas. Composiciones particularmente adecuadas son aquellas en las que se pierde un máximo de 0,5 \log_{10} , por ejemplo 0,4 o menos, 0,3 o menos, 0,2 o menos o, de forma adecuada, 0,1 \log_{10} uff por dosis de vacuna, tras la prueba de
35 estabilidad acelerada a 37°C durante una semana.

Como alternativa, la composición líquida inmunogénica según se reivindica en la presente memoria descriptiva se puede congelar y almacenar congelada a -20°C, o menos, o a -70°C durante varios años, y permanecer estable a 4°C durante al menos un año después de descongelar. Normalmente, la formulación congelada será estable durante al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 2 años o al menos 3 años, y permanece estable a 4°C durante al menos un año y de forma adecuada 18 meses o 2 años tras la descongelación.
40

La composición según la presente invención es una composición inmunogénica, por ejemplo una vacuna. Por ejemplo, la composición inmunogénica reivindicada es capaz, normalmente tras una, de forma idónea tras dos dosis separadas uno o dos meses, de provocar una respuesta inmunitaria, por ejemplo respuestas de toma vacunal excelente y de IgA sérica específica de rotavirus. 'Toma vacunal' se define como el porcentaje de sujetos que muestran respuesta serológica, por ejemplo aparición de IgA sérica frente a rotavirus en los sueros postinmunización a un título ≥ 20 U/ml (ELISA), y/o con eliminación de rotavirus (ELISA) en alguna muestra de heces. La toma vacunal se puede definir como la eliminación del virus vacunal en cualquier muestra de heces recogida entre la primera dosis y hasta 1 ó 2 meses después de la segunda dosis. En una forma de realización específica, la vacuna según la invención es capaz de disminuir la aparición de cualquier, y preferentemente e la gastroenteritis por rotavirus grave en comparación con el placebo. Normalmente, la vacuna es capaz de conferir protección cruzada contra cepas circulantes distintas a la presente en la vacuna. Normalmente, cuando la vacuna contiene una cepa de tipo G1, tal como la del virus humano atenuado P43, se induce una respuesta inmunitaria frente a G1 y al menos uno de los serotipos distintos a G1 seleccionados del grupo que consiste en: los serotipos G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13 y G14. De forma adecuada, una vacuna que contenga una cepa G1 es capaz de conferir protección contra las cepas G1 y no G1, tales como las cepas G2, G3 y/o G4, y en particular contra el serotipo G9 de emergencia global.
45
50
55

En una forma de realización específica, dicha gastroenteritis o gastroenteritis grave está causada por una cepa de rotavirus de un serotipo distinto al contenido en la composición reivindicada. En particular, si la cepa de rotavirus presente en la composición reivindicada es un serotipo G1, tal como, entre otras, la cepa de rotavirus vivos atenuados humana HRV P43 (ECACC 99081301), se confiere prevención contra la gastroenteritis o la gastroenteritis grave causada por una cepa de rotavirus de un serotipo G1 y también por una cepa de rotavirus de un serotipo distinto al G1, por ejemplo por una cepa de rotavirus que posee un serotipo seleccionado de la lista constituida por: G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13 y G14. En una forma de realización particular, la composición inmunogénica reivindicada en la presente memoria descriptiva es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra, y/o proporcionar protección contra la gastroenteritis o la gastroenteritis grave causada por, al menos uno, de forma adecuada todos los siguientes serotipos distintos a G1: G2, G3, G4 y G9. En otra forma de realización específica, si la cepa de rotavirus presente en la composición reivindicada es un tipo de rotavirus P[8], tal como, entre otras, la cepa de rotavirus vivos atenuados humana HRV P43 (ECACC 99081301), se confiere prevención contra la gastroenteritis o la gastroenteritis grave causada por una cepa de rotavirus de tipo P[8] y por una de tipo distinto a P[8], por ejemplo por una cepa de rotavirus que posee un serotipo seleccionado de la lista constituida por los tipos:
60
65
70

- P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P9 y P11. En particular, la composición inmunogénica reivindicada en la presente memoria descriptiva es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra, y/o proporcionar protección contra la gastroenteritis o la gastroenteritis grave causada por, al menos uno, de forma adecuada todos los siguientes tipos distintos a P[8]: P4, P6. En otra forma de realización, la composición reivindicada es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra, y/o proporcionar protección contra la gastroenteritis o la gastroenteritis grave causada por una cepa de rotavirus de un tipo G diferente y un tipo P diferente al presente en la composición administrada. Específicamente, la composición reivindicada comprende una cepa G1P[8] de rotavirus y también es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra, y/o proporcionar protección contra la gastroenteritis o la gastroenteritis grave causada por una cepa G2P[4] de rotavirus.
- De forma adecuada, la composición según la invención se administra mediante administración oral. De forma adecuada, la composición se suministra en un dispositivo de dosis única, tal como un vial o jeringa de vidrio o de plástico, adecuado para su administración a lactantes pequeños.
- Las vacunas de la invención se pueden formular y administrar mediante técnicas conocidas, usando una cantidad adecuada de virus vivo para proporcionar protección eficaz contra la infección por rotavirus sin efectos secundarios adversos significativos en los vacunados típicos.
- En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de una formulación o composición inmunogénica líquida de rotavirus como se ha descrito en la presente memoria descriptiva, que comprende mezclar un antígeno de rotavirus, un azúcar y un carboxilato con un diluyente farmacéuticamente aceptable.
- Normalmente, una cantidad adecuada de virus vivo estará entre 10^4 y 10^7 uff por dosis. Una dosis típica de vacuna puede comprender $10^5 - 10^6$ uff por dosis y se puede administrar en varias dosis en un periodo de tiempo, por ejemplo en dos dosis administradas con un intervalo de dos meses. El título de rotavirus también se puede expresar en DICC50 y se puede estimar en el contexto de esta invención que una DICC50 de $10^{6,0}$ es equivalente a $10^{5,5}$ uff por dosis. Sin embargo se pueden obtener beneficios tomando más de 2 dosis, por ejemplo un régimen de 3 ó 4 dosis, particularmente en países en desarrollo. La primera dosis se puede administrar de forma adecuada a lactantes de 4 semanas a 14 ó 15 semanas de edad, de forma adecuada entre las 6 y las 14 semanas de edad. El intervalo entre dosis es de al menos 4 semanas pero puede ser de una duración mayor o menor a dos meses, por ejemplo la segunda dosis, y cualquier dosis posterior, si es adecuado, puede administrarse un mes o tres meses después de la dosis previa, dependiendo del calendario de inmunización local. Una cantidad óptima de virus vivos para una dosis única o para un régimen de múltiples dosis, y el momento adecuado para las dosis, se puede determinar mediante estudios estándar que implican la observación de los títulos de anticuerpos y otras respuestas en los sujetos.
- Típicamente, el volumen de una dosis de vacuna según la invención normalmente será de 2,5 ml o menor, típicamente estará entre 0,5 ml y 2,5 ml. En un aspecto específico de la invención, una dosis de vacuna adecuada normalmente será de 1,5 ml o, de forma adecuada, cualquier volumen menor que 2,5 ml, tal como un volumen de 2 ml o menor, que es adecuado para administración oral a bebés o lactantes. En particular, el volumen de la dosis será tal que la viabilidad técnica de la formulación sea posible y que no exista un efecto perjudicial sobre el potencial inmunogénico de la formulación. Las composiciones reivindicadas ofrecen la ventaja sobre las formulaciones que contienen fosfato de la técnica anterior de que pueden aguantar la acidez gástrica, permanecen inmunogénicas y estables durante un periodo de validez prolongado mientras que son compatibles con la formulación en un volumen de dosis menor que el habitual, tal como menor que 2,0 ml o incluso, de forma adecuada, 1,5 ml o menor. Típicamente, el volumen de una dosis de vacuna según la invención se encuentra entre 0,5 ml y 2,0 ml, de forma adecuada aproximadamente entre 1,0 ml y 1,5 ml, tal como aproximadamente 1,3 ml o aproximadamente 1,4 ml o aproximadamente 1,5 ml. Un volumen de dosis típico también puede ser de 2 ml o inferior, tal como, por ejemplo, 1,1 ml, 1,2 ml, 1,3 ml, 1,4 ml o 1,5 ml. Volúmenes de 1 ml o volúmenes inferiores a 1 ml, por ejemplo entre 200 μ l a 800 μ l, también se contemplan dentro del alcance de la presente invención. El volumen de líquido que puede administrarse oralmente también puede determinarse en parte mediante el dispositivo de liberación de la vacuna.
- La composición inmunogénica de la invención también se puede formular para que contenga otros antígenos, en particular antígenos de otros virus vivos adecuados para protección contra otras enfermedades, por ejemplo poliovirus. Dichos ingredientes activos adicionales adecuados para la administración oral pueden proporcionarse mezclados con la composición de rotavirus o, como alternativa, pueden coadministrarse (es decir, en una dosis separada pero a la vez) con la composición de rotavirus reivindicada en la presente memoria descriptiva.
- La composición reivindicada también se puede administrar de forma concomitante con otras vacunas no orales, por ejemplo con vacunas parenterales adecuadas para la población pediátrica a vacunar, tal como vacunas DTPw o DTPa (vacunas contra Bordetella pertussis –tos ferina, difteria, tétanos), vacunas contra meningitis inducida por Haemophilus influenza B, hepatitis B, o sarampión, paperas, rubéola (triple vírica), vacunas contra Streptococcus pneumoniae, con el fin de optimizar el número de visitas al médico.
- En otra forma de realización, la invención también proporciona un procedimiento para tratar o prevenir enfermedades asociadas con rotavirus en seres humanos, en especial en niños pequeños tal como bebés o lactantes, mediante la administración a dicho sujeto humano que lo necesite una cantidad eficaz de una formulación líquida, en particular una composición inmunogénica o una vacuna, como se reivindica en la presente memoria descriptiva. En particular, las composiciones reivindicadas prevendrán frente a las infecciones por rotavirus. En una forma de realización específica, las composiciones reivindicadas en la presente memoria descriptiva son capaces de proporcionar protección frente a la gastroenteritis por rotavirus, en particular frente a la gastroenteritis grave. Una gastroenteritis grave se define como un episodio que requiere hospitalización y/o tratamiento de rehidratación (equivalente al plan B o C de la OMS) en una instalación médica, o un episodio con una puntuación >11 en la escala de 20 puntos de Vesikari (Ruuska T y Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for severity of diarrheal episodes. Scand J Infect Dis 1990, 22:259-67).

5 En otra forma de realización más, la invención proporciona el uso de un antígeno de rotavirus, un carboxilato y un azúcar en la fabricación de una composición inmunogénica, por ejemplo una vacuna, para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con rotavirus en seres humanos, en la que dicha composición inmunogénica posee un pH de entre 5,0 y 8,0 y que comprende fosfato menor que 1 mM y donde dicho carboxilato se obtiene de un ácido dicarboxílico con un pKa medio > 4. En particular, se contempla especialmente la prevención de infecciones por rotavirus y/o la protección contra gastroenteritis y más especialmente contra gastroenteritis grave.

10 En otra forma de realización específica, la invención también proporciona el uso de un rotavirus vivo atenuado humano para la fabricación de una composición inmunogénica como se reivindica en la presente memoria descriptiva para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con rotavirus sin causar intususpección. En particular, dicho tratamiento o prevención comprende administrar dos dosis orales, o más, de una cantidad segura y eficaz de la composición de rotavirus vivo atenuado humano a un lactante con de 4 a 14 ó 15 semanas de edad en el momento de la dosis 1. Típicamente, el lactante tendrá de 6 a 14 semanas de edad en el momento de la primera dosis. En el contexto de la presente invención, se pretende que un lactante humano quiera decir un lactante con de 4 a 14 ó 15 semanas de edad tras el nacimiento.

15 En otra forma de realización, la invención también proporciona una composición inmunogénica líquida que comprende un antígeno de rotavirus, un azúcar, fosfato y un carboxilato, donde dicha composición tiene un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0 y donde dicho carboxilato se selecciona de la lista constituida por: adipato, malato, acetato, propionato, butirato, malonato, glutarato, glicolato, gluconato, pimelato, y cualquier combinación de dos o más de los mismos. En otra forma de realización específica, dicho carboxilato es adipato.
 20 Típicamente, el fosfato estará presente a una concentración de 10 mM a 1 M. El presente inventor ha descubierto que estos carboxilatos específicos, que no se han asociado con el desarrollo de formulaciones de vacunas orales, han satisfecho todos los requerimientos deseados de estabilidad, resistencia al ácido, inmunogenicidad y formulación en un volumen de dosis pequeño, como se establece en la presente descripción para el desarrollo de una vacuna de rotavirus adecuada oral para lactantes humanos. En particular, dichos carboxilatos no tienen ningún efecto perjudicial sobre el título de rotavirus en la formulación. Estos carboxilatos pueden actuar de forma adecuada como alternativas para los carboxilatos convencionales tales como succinato, glutamato y citrato, por ejemplo en formulaciones de rotavirus que contienen fosfato. Todas las demás formas de realización específicas como se han descrito anteriormente en la presente, se aplican igualmente a este aspecto de la presente invención. Típicamente, el intervalo de pH de la composición es como se ha definido en la presente memoria descriptiva, como la capacidad antiácido y la estabilidad en el periodo de validez. La invención también proporciona un procedimiento de preparación de dicha composición, usos y procedimientos de prevención o tratamiento de lactantes humanos usando dicha composición.

La invención se describirá más con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes:

35 **Ejemplo I – Formulación de una vacuna líquida de rotavirus vivos atenuados humanos i) en ausencia de fosfato y carboxilato añadidos, e ii) en presencia de citrato como un carboxilato en ausencia de fosfato añadido**

I.1. Preparación de las formulaciones

I.1.1. Composición del medio DMEM (para preparar 1 litro de DMEM):

Agua para inyectables: 0,8 litros

40 Disolver sucesivamente los siguientes compuestos:

Cloruro sódico: 6,40 g

Cloruro potásico: 0,40 g

Sulfato de magnesio.7 H₂O: 0,20 g

Añadir solución de nitrato de hierro a 0,1g/l: 1,00 ml

45 NaH₂PO₄.2H₂O: 0,1412 g

Piruvato sódico: 0,11 g

Glucosa anhidra: 4,50 g

Solución vitamínica (concentrada a 500x): 2,00 ml

Agua para inyectables: 1,50 ml

50 Ácido clorhídrico (concentrado): 0,083 ml

L-Cistina: 0,048 g

L-Tirosina: 0,072 g

Agua para inyectables: 2,00 ml

Solución de aminoácidos: 20,00 ml

L-Glutamina: 0,5846

Cloruro de calcio.2H₂O: 0,2649 g

Bicarbonato de sodio: 3,70 g

Agua para inyectables: hasta 1 litro

5 DMEM representa el 5%, 6% u 8% de las formulaciones detalladas en el Ejemplo II. Esto corresponde a:

- Una concentración final de fosfato de 0,059 mM, 0,071 mM y 0,094 mM respectivamente, y

- Una concentración final de piruvato de 0,065 mM, 0,078 mM y 0,104 mM respectivamente.

Solución vitamínica (concentrada a 500x):

Agua para inyectables : 80,00 l

10 Ácido fólico: 200,10 g

Pantenoato de calcio: 200,10 g

Cloruro de colina: 200,10 g

Inositol: 350,00 g

Nicotinamida: 200,00 g

15 Clorhidrato de piridoxina: 200,10g

Clorhidrato de tiamina: 200,10 g

Riboflavina: 20,002 g

Agua para inyectables: hasta 100 litros.

Solución de aminoácidos:

20 Agua para inyectables : 144,00 l

L-Arginina: 755,70 g

Glicina: 270,10 g

L-Histidina: 378,00 g

L-Isoleucina: 943,40 g

25 L-Leucina: 943,50 g

L-Lisina 2 HCl: 1.315,80 g

L- Metionina: 270,00 g

L-Fenilalanina: 594,10 g

L-Treonina: 856,30 g

30 L-Triptófano: 144,00 g

L-Serina: 377,90 g

L-Valina: 842,00 g

Agua para inyectables : hasta 180 litros.

Solución de nitrato de hierro

35 Agua para inyectables : 1.035,000 ml

Nitrato de hierro.9H₂O: 0,115 g

Agua para inyectables : hasta 1,150 litros

1.1.2. Preparación de las formulaciones de rotavirus en ausencia de fosfato y carboxilato añadidos

40 La formulación 60 presentada en la Tabla 2 se ha preparado a una escala total de 325 g (250 ml), representando 166,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una.

5 Formulación n°60: a 143 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g) se añade: 162,5 g de sacarosa (50% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, el volumen de la dosis es 1,5 ml. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

Los resultados de capacidad antiácida, título vírico inicial y estabilidad viral se muestran en las Tablas 2 a 4.

Tabla 2: Volumen de dosis de 1,5 ml

N°	Sacarosa % p/p	DMEM % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico tras 1 semana 37°C	Pérdida viral tras 1 semana 37°C
60	50,0%	6%	7,82	<1	6,3	5,4	0,9

* evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2

10 **Tabla 3: Volumen de dosis de 1,5 ml – Estabilidad viral a temperatura ambiente**

n°	Titulación vírica tras almacenamiento a temperatura ambiente (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7m*	8m*	9m*	10m*
60	5,6	5,6	5,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

* = mes(es); ND = no determinado

Tabla 4: Volumen de dosis de 1,5 ml – Estabilidad viral a 4°C

n°	Titulación vírica tras almacenamiento a 4°C (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)							
	T=0	Tras 1 sem. 37°C	1 m* 4°C	2 m* 4°C	4 m* 4°C	6 m* 4°C	9 m* 4°C	12 m* 4°C
60	6,3	5,4	6,2	5,8	6,0	5,5	ND	ND

* = mes(es); ND = no determinado

1.1.3. Preparación de las formulaciones de rotavirus que contienen un carboxilato

15 El ácido cítrico (cuando está presente) y la sal de citrato se mezclan en las proporciones y condiciones que se ilustran en las Tablas 5 y 6. La estabilidad del rotavirus y la capacidad antiácido de las formulaciones se miden según los procedimientos proporcionados en los Ejemplos III.1 y III.2, respectivamente.

20 Se prepararon las formulaciones 110-115 y 128-130. El volumen de la dosis para las formulaciones 110-115 fue de 2,5 ml y de 1,5 ml para las formulaciones 128-130. Las formulaciones 110-115 presentadas en la Tabla 5 se han preparado a una escala total de 325 g (250 ml), representando 100 dosis de 2,5 ml (3,25 g) cada una.

25 La formulación 110 se preparó del siguiente modo. A 123,71 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g) se añaden consecutivamente: 19,29 g de citrato de tri-sodio (Na₃Citrato.2H₂O, Pm 294) (correspondiente a una concentración final de 262 mM) y 162,50 g de sacarosa (50% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, el volumen de la dosis única es 2,5 ml o 3,25 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado.

En este ejemplo, el medio DMEM representa el 6% p/p, correspondiente a una concentración final de fosfato de 0,059 mM.

30 Las formulaciones 111-115 se preparan según un procedimiento similar al explicado en relación con la formulación 110, excepto que la cantidad de ingredientes se adapta como se detalla en la Tabla 5. Por ejemplo, la formulación 111 se preparó mezclando los siguientes ingredientes:

123,73 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g), 19,07 g de citrato trisódico (Citrato Na₃.2H₂O, Pm 294) (correspondiente a una concentración final de 259 mM), 0,197 g de ácido cítrico

(Pm 192) (correspondiente a una concentración final de 4 mM) y 162,50 g de sacarosa (50% p/p). El resto del procedimiento se realizó como en la formulación 110.

Los resultados de capacidad antiácida, título vírico inicial y estabilidad viral se muestran en las Tablas 5 a 8.

Tabla 5: Volumen de dosis de 2,5 ml

N°	Ácido cítrico (M)	Na ₃ Citrat o. 2H ₂ O (M)	Sacarosa % p/p	DMEM % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
110	0	0,262	50%	6%	8,15	14	5,7	4,8	0,9
111	0,004	0,259	50%	6%	6,95	14	5,3	5,4	0
112	0,010	0,256	50%	6%	6,51	12-13	5,6	5,6	0
113	0,014	0,249	50%	6%	6,34	12	5,6	5,4	0,2
114	0,034	0,283	50%	6%	5,94	12-13	5,6	5,3	0,3
115	0,093	0,333	50%	6%	5,37	14	5,7	5,6	0,1

5 * evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2

Las formulaciones presentadas en la Tabla 6 se han preparado a una escala total de 325 g (250 ml), representando 166,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido cítrico.1H₂O (Pm 210), Citrato Na₃.2H₂O (Pm 294).

10 La formulación 128 se ha preparado mezclando 110,89 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g) con los siguientes ingredientes: 31,78 g de citrato trisódico (Na₃Citrato.2H₂O, Pm 294) (correspondiente a una concentración final de 432 mM), 0,328 g de ácido cítrico (Ácido cítrico.1H₂O, Pm 210) (correspondiente a una concentración final de 6 mM) y 162,50 g de sacarosa (50% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm.

15 En condiciones estériles se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener 10^{8,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,5 ml o 1,95 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado .

En este ejemplo, el medio DMEM representa el 6% p/p, correspondiente a una concentración final de fosfato de 0,059 mM.

20 Las formulaciones 129 y 130 se han preparado de forma similar al procedimiento descrito para la formulación 128, pero adaptando las cantidades de los ingredientes según la Tabla 6. Brevemente, la formulación 129 se ha preparado mezclando 0,77 g de ácido cítrico (Ácido cítrico .1H₂O, Pm 210) (correspondiente a una concentración final de 15 mM) y 31,36 g de citrato trisódico (Na₃Citrato.2H₂O (Pm 294) correspondiente a una concentración final de 426 mM). La formulación 130 se ha preparado mezclando 2,75 g de ácido cítrico (Ácido cítrico .1H₂O, Pm 210) (correspondiente a una concentración final de 52 mM) y 34,7 g de citrato trisódico (Citrato Na₃.2H₂O (Pm 294) correspondiente a una concentración final de 472 mM). El resto de los ingredientes y proporciones se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6: Volumen de dosis de 1,5 ml

N°	Acido cítrico.1H 2O (M)	Na ₃ Citrat o. 2H ₂ O (M)	Sacarosa % p/p	DMEM % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico Tras sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
128	0,006	0,432	50,0%	6%	6,97	13	6,1	5,8	0,3
129	0,015	0,426	50,0%	6%	6,55	12	5,9	5,8	0,1
130	0,052	0,472	50,0%	6%	5,92	13	5,9	5,8	0,1

* evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2

Tabla 7: Volumen de dosis de 1,5 ml – Estabilidad viral a temperatura ambiente

n°	Titulación vírica tras almacenamiento a temperatura ambiente (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7m*	8m*	9m*	10m*
128	ND	ND	ND	ND	5,4	5,1	ND	ND	ND	ND
129	ND	ND	ND	ND	5,4	5,0	ND	ND	ND	ND
130	ND	ND	ND	ND	5,6	5,0	ND	ND	ND	ND

* = mes(es); ND = no determinado

Tabla 8: Volumen de dosis de 1,5 ml – Estabilidad viral a 4°C

n°	Titulación vírica tras almacenamiento a 4°C (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)								
	T=0	Tras 1 semana 37°C	1 m*	2 m*	4 m*	6 m*	9 m*	12 m*	
128	6,1	5,8	ND	ND	ND	5,8	ND	5,7	
129	5,9	5,8	ND	ND	ND	5,8	ND	5,6	
130	5,9	5,8	ND	ND	ND	5,9	ND	5,4	

* = mes(es); ND = no determinado

5 **1.2 Estabilidad del rotavirus y capacidad antiácida - resultados**

La titulación vírica del rotavirus a diferentes puntos de tiempo se ha evaluado de acuerdo con el procedimiento que se ilustra en el Ejemplo III.1 y se ha evaluado la capacidad antiácida de la formulación siguiendo el protocolo del Ejemplo III.2. Los resultados se ilustran en las Tablas 2 a 8.

10 El pH para la formulación control 60, que estaba desprovista de carboxilato y fosfato añadido, no tenía capacidad antiácido y además exhibió un pH cercano al límite superior de pH 8,0 para la estabilidad del virus.

15 Para todas las formulaciones experimentales analizadas en las Tablas 5 a 8, el pH se mantuvo en un intervalo de aproximadamente 5,0-7,0 excepto para la formulación 110, que exhibió un pH superior a 8,0. Como se puede observar a partir de los resultados del título vírico y la pérdida viral, la estabilidad de los rotavirus en la formulación líquida está relacionada con el pH de esta formulación. En el intervalo de aproximadamente un pH de 5,4 (es decir, la formulación 115) al pH 7,0 (es decir, las formulaciones 111 y 128), la pérdida viral tras 7 días a 37°C se mantuvo a un nivel bajo (es decir, por debajo de 0,5 log), y esto contrastó con el resultado obtenido para la formulación 110 (pH > 8, con una pérdida de título vírico de 0,9 log).

20 Además, las formulaciones 111-115 y 128-130, mostraron una capacidad antiácido similar a la de la formulación 110, evaluada mediante el análisis de Baby Rossett-Rice (véase el Ejemplo III.2.2). Esta capacidad antiácido superó con mucho el límite inferior de 8 min para las formulaciones en un volumen de dosis de 2,5 ml así como para las formulaciones con volumen de dosis de 1,5 ml, y en realidad alcanzó un mínimo de 12 minutos, y, por tanto, se consideró muy satisfactoria.

25 También se han analizado los carboxilatos alternativos, ya que estos pueden representar alternativas técnicamente viables cuando pueden ser deseables cantidades relativamente bajas de carboxilatos, por ejemplo cuando se trabaja con volúmenes de dosis muy pequeños.

Ejemplos de formulaciones que contienen tales carboxilatos alternativos se proporcionan en el Ejemplo II y las Tablas 10-39.

Ejemplo II – Formulaciones con una sal carboxilato alternativa en ausencia de fosfato añadido

30 Las siguientes sales de carboxilato se han usado para crear una capacidad tampón: acetato, malonato, succinato, glutarato, adipato y malato. Según el pK_a de un ácido carboxílico dado, y dependiendo de su peso molecular, es posible encontrar cantidades a formular para que alcancen la capacidad antiácido diana de al menos 8 minutos, de forma adecuada al menos 12 minutos evaluada mediante el análisis BRR, estando en una ventana de pH de entre un pH de 5,0 a pH de 8,0.

35 Químicamente hablando, se obtiene un efecto “tampón” mezclando un ácido fuerte (como HCl) y una sal derivada de un ácido débil (como acetato sódico). El valor de pH correspondiente al centro de la meseta del tampón es igual al pK_a del ácido débil. El pK_a del ácido carboxílico es una medida de la potencia ácida, en otras palabras un indicador del intervalo de tamponamiento eficaz del compuesto.

Dado que el rotavirus se degrada rápidamente a pH inferiores a 4 (C. Weiss y H.F. Clark, 1985 J. Gen. Virol.,66,

2725-2730), es deseable una meseta del tampón superior a pH 4, es decir los carboxilatos adecuados son aquéllos con un $pK_a > 4$ o dicarboxilatos con un $pK_a \text{ medio} > 4$. Los carboxilatos adecuados se indican en la Tabla 9. Se proporcionan los valores numéricos del $pK_a \text{ medio}$.

Tabla 9: Características de diversos carboxilatos

Ácidos carboxílicos	PM	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	$pK_{a \text{ Med.}}$	Toxicidad (DL50 oral, en ratas)
Cítrico*	192	6,39	4,76	3,13	4,76	3,0 g/kg
Otros ácidos carboxílicos con $pK_a > 4$						
Propínico*	74	4,88				2,6 g/kg
Butírico	88	4,82				
Acético*	60	4,76				3,3 g/kg
Ácidos dicarboxílicos con un $pK_a \text{ medio} > 4$						
Maleico	116	6,23	1,92		4,07	
Malónico	104	5,7	2,83		4,26	1,31 g/kg
Succínico	118	5,6	4,21		4,90	2,26 g/kg
Adípico*	146	5,4	4,43		4,91	5,7 g/kg
Glutárico	132	5,22	4,34		4,78	
Málico*	134	5,05	3,40		4,22	1,6 g/kg

5 *Cinco ácidos carboxílicos disponen de la condición "aditivo alimentario": Cítrico E330, Acético E260, Propiónico E280, Málico E296 y Adípico E355.

10 Una curva estándar de valoración ácido-base para cuatro carboxilatos (malato sódico, acetato de sodio, citrato sódico y adipato sódico) se ilustra en la Figura 1. Muestra que la capacidad antiácido útil entre pH 4,0 y pH 7,0 por ejemplo es del 72,50%, 68,75%, 57,70% y 41,25% para adipato sódico, acetato sódico, citrato sódico y malato sódico, respectivamente.

Se han preparado formulaciones con los siguientes carboxilatos: acetato, malonato, succinato, glutarato, adipato y malato. Todas las formulaciones mostradas en este Ejemplo se han preparado en un volumen de dosis de 1,5 ml.

II.1. Formulaciones con acetato

15 II.1.1. Las formulaciones que se presentan en la Tabla 10 se han preparado a una escala de 325 g (250 ml) representando 166,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: ácido acético (Pm 60), NaOH (Pm 40).

20 Formulación 36: a 148,84 g de agua (cantidad suficiente para alcanzar una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: 10,66 g de NaOH, ácido acético glacial hasta un pH 7,16 y 130 g de sacarosa (40% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 μm . En condiciones estériles a la solución se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener $10^{8,0}$ uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,5 ml o 1,95 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

Formulaciones 37 y 42: se procede como para la formulación 36, pero las cantidades se ajustan de acuerdo con la Tabla 10.

25 Formulación 87: a 75,00 g de agua se añaden de forma sucesiva: 8,00 g de NaOH, 15,00 g de ácido acético glacial, suficiente solución de NaOH 1N para alcanzar un pH de 7,00 (en este caso se añadieron 2 g de NaOH 1N), agua adicional para alcanzar la cantidad suficiente de 325 g (en este caso se añadieron 43,00 g de agua), y 162,50 g de sacarosa (50% p/p). El resto del procedimiento se realiza como para la formulación 36.

30 Ejemplo para las formulaciones 88-90: se procedió como para la formulación n° 87, a excepción de que las cantidades se adaptan como se menciona en la Tabla 10.

Ejemplo para las formulaciones 33-35: se procedió como para la formulación n° 36 a excepción de que las cantidades se adaptan como se menciona en la Tabla 10 y de que se reemplazó el NaOH por $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Las formulaciones 33-35 no se incluyeron en el estudio de estabilidad a corto plazo porque no satisfacían el análisis de

estabilidad de 1 semana a 37°C. No obstante se presentan resultados satisfactorios en presencia de ion calcio adicional en la serie de adipato (véase el Ejemplo II. 5. 4, y la Tabla 26).

Tabla 10

N°	NaOH (M)	Ácido acético (M)	Sacarosa % p/p	DMEM % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
36	1,07	Hasta pH 7,16	40%	6%	7,2/ 7,23°	13/14°	5,8	5,3	0,5
37	1,07	Hasta pH 7,55	50%	6%	7,62/ 7,63°	13/15°	5,8	5,4	0,4
42	1,05	Hasta pH 7,7	50%	6%	8,06/ 8,03°	15/16°	5,9	5,1	0,8
87	Hasta pH 7,0	1	50%	6%	7,24	13	6,2	6,1	0,1
88	Hasta pH 6,5	1	50%	6%	6,7	13	5,8	5,9	0
89	Hasta pH 6,0	1	50%	6%	6,14	12	5,9	5,5	0,4
90	Hasta pH 6,0	1	55%	6%	6,10	13	6,0	5,5	0,5
	Ca(OH)₂								
33	0,540	Hasta pH 7,32	40%	6%	7,66	12	5,8	4,3	>1
34	0,540	Hasta pH 7,55	45%	6%	8,09	13	5,9	<3,8	>1
35	0,540	Hasta pH 7,35	50%	6%	7,76	13	6,3	<3,8	>1

5 * evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2;

°= repeticiones

II.1.2. Las formulaciones que se presentan en la Tabla 11 se han preparado a una escala de 325 g (250 ml) representando 166,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: acetato sódico.3H₂O (Pm 136).

10 Ejemplo para la formulación 58: a 113,00 g de agua (cantidad suficiente para alcanzar una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: 30,00 g de acetato sódico 3 H₂O y 162,50 g de sacarosa (50% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles a la solución se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,5 ml o 1,95 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

15 Formulaciones 59, 66, 69, and 70: se procede de forma similar a la formulación 58, pero con cantidades ajustadas (véase la Tabla 11).

Tabla 11

N°	Acetato Na 3H2O (M)	Sacarosa p/p	% DMEM % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
58	0,882	50%	6%	7,98	11	6,3	5,6	0,7
59	0,706	50%	6%	7,94	7	6,2	5,4	0,8
66	0,941	54%	6%	8,13/ 8,14°	13	5,9	5,3	0,6
69	0,753	55%	6%	8,15	8	6,0	5,3	0,7
70	1,338	50%	6%	8,23	20	6,0	5,4	0,6

*evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2.;

° = repetición

II.1.3. Estabilidad del rotavirus y capacidad antiácido - resultados

- 5 La titulación vírica del rotavirus a diferentes puntos de tiempo se ha evaluado de acuerdo con el procedimiento que se ilustra en el Ejemplo III.1 y se ha evaluado la capacidad antiácida de la formulación siguiendo el protocolo del Ejemplo III.2.2. Los resultados se ilustran en las Tablas 10, 11, 12 y 13.

En conclusión, la estabilidad del rotavirus en una formulación líquida de acetato está relacionada con el pH. Un intervalo de trabajo adecuado se encuentra entre un pH de 6,0 a 7,5.

10 **Tabla 12 – Estabilidad viral a temperatura ambiente**

n°	Titulación vírica tras almacenamiento a temperatura ambiente (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7m*	8m*	9m*	10m*
36	5,8	5,2	4,7							
37	5,8	5,5	5,3	5,0	5,0	4,4				
42	5,2	5,4	5,1							
87		6,0	5,9			5,6		5,3	5,3	4,7
88		5,9	5,6							
89		5,2	4,7							
90		4,8	4,6							
58	5,6	5,4	4,9							
59	5,7	5,5	4,9							
66	5,8	5,4	5,5							
69	5,9	5,5	5,5							
70	5,9	5,5	5,4							

* = mes(es); recuadros en blanco = criterios no determinados

Tabla 13 - Estabilidad viral a 4°C

n°	Titulación vírica tras almacenamiento a 4°C (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)								
	T=0	Tras 1 sem. 37°C	1 m* 4°C	2 m* 4°C	4 m* 4°C	6 m* 4°C	9 m* 4°C	12 m* 4°C	15m* 4°C

(cont.)

36	5,8	5,3	5,8	5,8	5,6				
37	5,8	5,4	5,9	5,8	5,8	5,7			
42	5,9	5,1	5,9	5,7	5,7				
87	6,2	6,1		6,3		6,1			6,1
88	5,8	6,0		6,0					
89	5,9	5,5		5,8					
90	6,0	5,5		5,7					
58	6,3	5,6	6,2	5,8	6,0				
59	6,2	5,4	6,2	5,7	6,0				
66	5,9	5,3	5,9	5,8					
69	6,0	5,3	6,0	5,9					
70	6,0	5,4	6,0	5,9					

* = mes(es); recuadros en blanco = criterios no determinados

II.2. Formulaciones con malonato

II.2.1. La formulación 67 (véase la Tabla 14) se ha preparado a una escala total de 325 g (250 ml) representando 166,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido malónico (Pm 104), NaOH (Pm 40).

5 La formulación 54 (véase la Tabla 14) se ha preparado a una escala total de 44 g (35 ml) representando 20 dosis de 1,75 ml (2,2 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido malónico (Pm 104), NaOH (Pm 40).

10 Formulación n°67: a 110,70 g de agua (cantidad suficiente para alcanzar una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: 14,00 g de NaOH, 18,230 g de ácido malónico y 162,5 g de sacarosa (50% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,5 ml o 1,95 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

15 Formulación n°54: a 16,64 g de agua (cantidad suficiente para alcanzar una preparación final de 44 g) se añaden de forma sucesiva: 2,4 g de NaOH, 3,1213 g de ácido malónico y 19,5 g de sacarosa (44% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 2,34 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,2 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

Tabla 14

N°	NaOH (M)	Ácido malónico (M)	Sacarosa % p/p	DMEM % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
67	1,4	0,701	50%	6%	6,53	11-12	6,0	5,7	0,3
54	1,71	0,857	44%	6%	8,36	23	∞	∞	∞

20 * evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2.

∞ La formulación 54 se descartó del estudio de est. habilidad a largo plazo a causa de su pH inicial superior a 8,0

II.2.2. La formulación que se presenta en la Tabla 15 se ha preparado a una escala total de 325 g (250 ml) representando 147,7 dosis de 1,75 ml (2,20 g) cada una. Material antiácido: malonato disódico (Pm 148).

25 Formulación n°62: a 138,50 g de agua (cantidad suficiente para alcanzar una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: 23,00 g de malonato disódico y 144,00 g de sacarosa (44% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles a la solución se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En

este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,20 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

Tabla 15

N°	Malonato Na (M)	Sacarosa p/p	% DMEM % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
62	0,601	44%	6%	8,21	12	6,1	5,0	0,9

* evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2.

5 II.2.3. Estabilidad del rotavirus y capacidad antiácido - resultados

En conclusión, la estabilidad del rotavirus en una formulación líquida de malonato está relacionada con el pH: un pH de 6,5 proporciona una buena estabilidad durante 1 semana a 37°C, mientras que a pH 8,2 se observa una pérdida de más de 0,9 log.

II.3 Formulaciones con succinato

10 II.3.1. La formulación 127 (véase la Tabla 16) se ha preparado a una escala total de 325 g (250 ml) representando 166,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido succínico (Pm 118), NaOH (Pm 40).

La formulación 51 (véase la Tabla 16) se ha preparado a una escala total de 44 g (35 ml) representando 20 dosis de 1,75 ml (2,2 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido succínico (Pm 118), NaOH (Pm 40).

15 Formulación 127: a 120,16 g de agua (cantidad suficiente para alcanzar una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: 9,10 g de NaOH, 13,74 g de ácido succínico y 162,5 g de sacarosa (50% p/p). El resto de las etapas de la formulación son idénticas a las descritas para la formulación 67. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

20 Formulación 51: a 16,22 g de agua (cantidad suficiente para alcanzar una preparación final de 44 g) se añaden de forma sucesiva: 2,4 g de NaOH, 3,5414 g de ácido succínico y 19,5 g de sacarosa (44% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 2,34 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,2 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

Tabla 16

N°	NaOH (M)	Ácido succínico (M)	Sacarosa % p/p	DMEM % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
127	0,91	0,466	50%	6%	6,33	9	5,9	5,7	0,2
51	1,71	0,857	44%	6%	7,20	>29	∞	∞	∞

25 * evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2.

∞ La formulación 51 se descartó para el estudio de estabilidad a largo plazo porque se determinó que su capacidad antiácido era demasiado larga

II.3.2. La formulación 56 se presenta en la Tabla 17 y se ha preparado a una escala total de 325 g (250 ml) representando 166,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: succinato disódico (Pm 162).

30 Formulación 56: A 122,50 g de agua (cantidad determinada para que alcance una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: 20,50 g de succinato disódico y 162,50 g de sacarosa (50% p/p). El resto de las etapas de la formulación son idénticas a las descritas para la formulación 62. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

35

Tabla 17

N°	succinato disódico (M)	sacarosa p/p	% DMEM % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
56	0,506	50%	6%	8,12/ 8,30°	13	6,3	5,5	0,8

* evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2.;

°= repetición

II.3.3. Estabilidad del rotavirus y capacidad antiácido - resultados

- 5 En conclusión, la estabilidad del rotavirus en una formulación líquida de succinato está relacionada con el pH: un pH de 6,3 proporciona una buena estabilidad durante 1 semana a 37°C, mientras que a pH 8,1 se observa una pérdida de 0,8 log.

II.4. Formulaciones con glutarato

II.4.1. Las formulaciones con glutarato se presentan en la Tabla 18.

- 10 La formulación 65 se ha preparado a una escala total de 320,8 g (246 ml) representando 164 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido glutárico (Pm 132), NaOH (Pm 40).

15 A 114,1 g de agua (cantidad determinada para que alcance una preparación final de 320,8 g) se añaden de forma sucesiva: 9,3 g de NaOH, 15,40 g de ácido glutárico y 162,5 g de sacarosa. (50,6% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,5 ml o 1,95 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6,08% p/p.

La formulación 50 se ha preparado a una escala total de 44 g (35 ml) representando 20 dosis de 1,75 ml (2,2 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido glutárico (Pm 132), NaOH (Pm 40).

- 20 A 15,8 g de agua (cantidad determinada para que alcance una preparación final de 44 g) se añaden de forma sucesiva: 2,4 g de NaOH, 3,964 g de ácido glutárico y 19,5 g de sacarosa. (44% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 2,34 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,2 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

Las formulaciones 125 y 126 se han preparado a una escala total de 325 g (250 ml) representando 166,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: ácido glutárico (Pm 132), NaOH (Pm 40).

- 30 Formulación 125: a 100,35 g de agua (cantidad determinada para que alcance una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: 9,10 g de NaOH, 15,40 g de ácido glutárico y 162,5g de sacarosa. El resto de las etapas de la formulación son idénticas a las descritas para la formulación 67. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

Formulación 126: se procedió como para la formulación 125, pero con cantidades ajustadas (véase la Tabla 18).

Tabla 18

N°	NaOH (M)	Ácido glutárico (M)	Sacarosa % p/p	DMEM % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
125	0,910	0,467	50%	6%	6,17	10-11	5,8	5,7	0,1
65	0,945	0,474	50,6%	6%	6,49	11	6,0	5,6	0,4
126	0,950	0,467	50%	6%	8,13	12	6,1	5,4	0,7
50	1,71	0,858	44%	6%	8,45	>29	∞	∞	∞

* evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2.

∞ La formulación 50 se descartó para el estudio de estabilidad a largo plazo a causa de su pH inicial (superior a 8,0) y su capacidad antiácido (que se ha determinado que era demasiado larga).

II.4.2. Estabilidad del rotavirus y capacidad antiácido - resultados

5

En conclusión, la estabilidad del rotavirus en una formulación líquida de glutarato está relacionada con el pH: un pH de 6,17 proporciona una buena estabilidad durante 1 semana a 37° C, mientras que a pH 8,1 se observa una pérdida de 0,7 log.

II.5. Formulaciones con adipato

10 II.5.1. Las formulaciones que contienen adipato que se presentan en la Tabla 19 se han preparado a la escala de 325 g (250 ml) representando 166,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una a excepción de la formulación nº 45, que se ha preparado en la escala de 44 g (35 ml) representando 20 dosis de 1,75ml (2,2 g) cada una, y la nº 63, que se ha preparado en la escala de 320,8 gramos (247 ml), representando 164 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: ácido adípico (Pm 146), NaOH (Pm 40).

15 Formulación 45: a 15,38 g de agua (cantidad determinada para que alcance una preparación final de 44 g) se añaden de forma sucesiva: 2,4 g de NaOH, 4,3809 g de ácido adípico y 19,5 g de sacarosa (44% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 2,34 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,2 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

20 Formulación 63: a 112,50 g de agua (cantidad determinada para que alcance una preparación final de 320,8 g) se añaden de forma sucesiva: 9,3 g de NaOH, 17,00 g de ácido adípico y 162,5 g de sacarosa. Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,5 ml o 1,95 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6,08% p/p.

25 Formulación 81: a 116,70 g de agua (cantidad determinada para que alcance una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: 9,28 g de NaOH, 17,00 g de ácido adípico y 162,5 g de sacarosa (50% p/p). El resto de las etapas de la formulación son idénticas a las descritas para la formulación 67. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

30 Formulaciones 82, 83, 91-97, 100-109, 122-124, 131-134, 136-145, 147, 148: A agua (cantidad determinada para que alcance una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: NaOH, ácido adípico y sacarosa en cantidades como se describen en las Tablas 19 y 23. Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,5 ml o 1,95 g. La mezcla resultante se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

35 Para comprobar el rendimiento de las formulaciones resultantes con respecto a la capacidad antiácido y la estabilidad del virus se variaron varios parámetros, que se muestran en negrita en la Tabla 19.

40 **Tabla 19**

Nº	NaOH (M)	Ácido adípico (M)	Sacarosa % p/p	DMEM % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico a tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
45	1,71	0,857	44%	6%	7,29	>29	∞		
Efecto del azúcar %									
63	0,945	0,472	50.6%	6%	6,49	12	6,0	5,6	0,4
81	0,917	0,460	50%	6%	6,2	11-12	5,9	5,7	0,2
82	0,899	0,451	45%	6%	6,39	11-12	5,9	5,7	0,2
83	0,928	0,466	55%	6%	6,38	12	5,9	5,8	0,1

ES 2 369 246 T3

(cont.)									
Formulaciones con diferente capacidad antiácido									
91	0,71	0,358	50%	6%	6,37	8	6,0	5,7	0,3
92	0,925	0,464	50%	6%	6,24	11-12	6,0	5,7	0,3
93	1,100	0,553	50%	6%	6,5	15-16	6,1	5,8	0,3
94	1,324	0,664	50%	6%	6,11	19-20	5,9	5,8	0,1
Tres repeticiones									
95	0,928	0,466	55%	6%	6,3	12	6,0	5,9	0,1
96	0,928	0,466	55%	6%	6,55	12-13	6,1	6,0	0,1
97	0,928	0,466	55%	6%	6,3	12-13	5,9	5,8	0,1
Efecto del pH									
103	Hasta pH 5,09	0,466	55%	6%	4,94	∞	∞	∞	∞
104	0,610	0,466	55%	6%	4,94	∞	∞	∞	∞
105	0,69	0,466	55%	6%	5,15	6	5,8	5,5	0,3
106	0,928	0,466	55%	6%	6,09/ 6,10°	12	6,1	6,0	0,1
107	0,928	0,466	55%	6%	∞	12	∞	∞	∞
108	0,69	0,630	53,15%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
109	0,69	0,630	55%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
131	0,93	0,466	55%	6%	6,45	12	ND	ND	ND
132	0,94	0,466	55%	6%	6,76	13	6,1	5,8	0,3
136	0,94	0,463	55%	6%	9,36	∞	∞	∞	∞
137	0,94	0,460	55%	6%	9,37	∞	∞	∞	∞
138	0,94	0,457	55%	6%	9, 67	∞	∞	∞	∞
139	0,94	0,455	55%	6%	9, 92	∞	∞	∞	∞
140	0,94	0,452	55%	6%	10, 25	∞	∞	∞	∞
141	0,93	0,466	55%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
142	0,93	0,471	55%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
145	0,93	0,463	55%	6%	7,66/ 7,55°	13	6,1	5,8	0,3
144	0,93	0,460	55%	6%	7,73/ 7,80°	12-13	6,1	6,0	0,1
143	0,93	0,458	55%	6%	7,96/ 7,90°	13-14	6,0	5,5	0,5
124	0,95	0,466	55%	6%	9,48	13	5,9	<2,85	>3
Diferentes fuentes de adipato comercial									
122	0,92	0,466	55%	6%	6,36	12	6,0	5,9	0,1

(cont.)									
123	0,92	0,466	55%	6%	6,32	13	5,8	5,7	0,1
Diferentes fuentes de sacarosa comercial									
133	0,92	0,466	55%	6%	6,34	13	5,8	5,8	0
147	0,92	0,466	55%	6%	6,32	11-12	6,0	5,7	0,3
134	0,92	0,466	55%	6%	6,34	13	6,3	5,8	0,5
148	0,92	0,466	55%	6%	6,34	11-12	5,8	5,9	0

* evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2; ND = no determinado; ° = repetición

° La formulación 45 se descartó porque la capacidad antiácida era demasiado larga

° Las formulaciones 103, 104 y 108, 109 se descartaron porque el ácido adípico recristaliza al reposar a 4-8°C

5 ° Las formulaciones n°107, 141 y 142 se descartaron porque eran similares a una formulación ya en evaluación

° Las formulaciones n°136-140 se descartaron porque el pH inicial era demasiado elevado

II.5.2. Estabilidad del rotavirus y capacidad antiácida - resultados

La titulación vírica del rotavirus a diferentes puntos de tiempo se ha evaluado de acuerdo con el procedimiento que se ilustra en el Ejemplo III.1 y se ha evaluado la capacidad antiácida de la formulación siguiendo el protocolo del Ejemplo III.2.2. Los resultados se ilustran en las Tablas 19, 20, 21 y 22.

10

Tabla 20 - Estabilidad viral a temperatura ambiente

n°	Titulación vírica tras almacenamiento a temperatura ambiente (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)							
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7m*	8m*
63	5,8	5,8	5,5	5,5	5,0			
81		5,5				4,9		
82		5,4				4,9		
83		5,6				5,1	5,0	
91		5,6			5,4	5,3	5,0	
92		5,5			5,3	5,2	5,0	
93		5,6			5,5	5,5	5,2	4,9
94		5,6			4,6			
95		5,6		5,5	5,4	5,4	5,4	5,1
96		5,8		5,8	5,5	5,7	5,7	5,2
97		5,7		5,5	5,4	5,3	5,4	4,9
105					4,8			
106						5,2	4,7	
132				5,8	5,8	5,5		

* = mes(es); Cuadros en blanco = no determinado

15

Tabla 21 - Estabilidad viral a 4°C

n°	Titulación vírica tras almacenamiento a 4°C (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)								
		Tras	1 m*	2 m*	4 m*	6 m*	9 m*	12 m*	15m*
	T=0	1 sem. 37°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
63	6,0	5,6	6,0	5,9	6,1	6,0		5,8	
81	5,9	5,7		5,6		5,4		6,0	
82	5,9	5,7		5,7		5,4		5,8	
83	5,9	5,8		5,8		5,7		5,9	
91	6,0	5,7		5,8		5,8		5,8	
92	6,0	5,7		5,9		5,9		5,8	
93	6,1	5,8		5,7		6,1		5,7	
94	5,9	5,8		6,1		6,2		5,8	
95	6,0	5,9		5,9		5,8		5,8	5,9
96	6,1	6,0		5,7		5,9		5,9	5,8
97	5,9	5,8		5,7		5,8		5,8	5,9
105	5,8	5,5				5,9		5,7	
106	6,1	6,0				6,0		5,8	
132	6,1	5,8				5,8		5,8	
122	6,0	5,9				5,8		5,9	
123	5,8	5,7				5,9		5,8	
133	5,8	5,8				6,0		5,8	
134	6,3	5,8				6,0		5,7	
143	6,0	5,5						5,5	
144	6,1	6,0						5,4	
145	6,1	5,8						5,4	

* = mes(es); Cuadros en blanco = no determinado

La capacidad antiácido de las formulaciones 91-94 se midió mediante el "procedimiento de 'Baby Rossett-Rice' (véase el Ejemplo III.2.2) y muestra las posibilidades de alcanzar 8, 12, 16 ó 20 min a un pH > 4. Los resultados se muestran en la Tabla 22 y en la Figura 2A.

5

Tabla 22

tiempo (min)	Formulación 94	Formulación 93	Formulación 92	Formulación 91
	pH	pH	pH	pH
0	6,11	6,5	6,24	6,37
1	5,11	5,07	4,93	4,79
2	5,03	4,98	4,84	4,67
3	4,96	4,9	4,75	4,56
4	4,90	4,83	4,67	4,45
5	4,85	4,76	4,58	4,34

(cont.)				
6	4,79	4,69	4,51	4,23
7	4,74	4,62	4,42	4,12
8	4,68	4,56	4,34	4,00
9	4,63	4,49	4,26	3,86
10	4,57	4,42	4,17	3,70
11	4,51	4,36	4,08	
12	4,46	4,29	3,98	
13	4,40	4,22	3,87	
14	4,35	4,15	3,75	
15	4,29	4,07	3,6	
16	4,23	3,98		
17	4,17	3,88		
18	4,11	3,78		
19	4,05	3,66		
20	3,98			
21	3,91			
22	3,83			
23	3,75			
24	3,65			

En conclusión, como se ha observado para las otras formulaciones de carboxilato, en la serie de adipato, un valor elevado de pH no proporcionó buenos datos de estabilidad (véase, por ejemplo, la formulación 124 que posee un pH de 9,5 y exhibe una pérdida viral superior a 2,85 log tras 1 semana de almacenamiento a 37°C).

- 5 El valor del límite superior de aceptabilidad de pH es de aproximadamente 8,0 (véase, por ejemplo, el valor de pH de 7,96 obtenido para la formulación 143) para el cual se observa una pérdida viral de 0.5 log tras 1 semana de almacenamiento a 37°C.

Un intervalo de pH adecuado se encuentra entre aproximadamente un pH de 5,5 y aproximadamente un pH de 8 para estas formulaciones, con un intervalo más adecuado entre un pH de 6,0 y un pH de 7,7.

- 10 La formulación de adipato (buen material aditivo alimentario) es un buen compromiso con valores óptimos de pK_a (pK_{a1} 5,4 y pK_{a2} 4,43), que permite alcanzar la capacidad antiácido diana (por ejemplo, $t=12$ minutos) usando cantidades razonables de material (aproximadamente 100 mg por dosis). Además, estas cantidades son compatibles con los parámetros de solubilidad, lo que permite formular la vacuna en un volumen de dosis de 1,5 ml. Esto no es posible con las formulaciones clásicas de fosfato citrato debido a la falta de viabilidad técnica, tal como la cristalización de fosfato (véase el Ejemplo comparativo IV). Asimismo, son compatibles con los parámetros de toxicidad, ya que los datos de toxicidad son bastante bajos (DL50 oral en ratas: 5,7 g/kg) para el adipato en comparación con otros carboxilatos.

II.5.3. Efecto del título del virus en la dosis vacunal sobre la estabilidad del virus

- 20 El siguiente experimento se llevó a cabo para evaluar el efecto del título inicial de rotavirus (de $10^{6,0}$, $10^{6,5}$, $10^{5,2}$) en una dosis vacunal de 1,5 ml sobre la estabilidad del rotavirus.

La titulación vírica del rotavirus a diferentes puntos de tiempo se ha evaluado de acuerdo con el procedimiento que se ilustra en el Ejemplo III.1 y se ha evaluado la capacidad antiácida de la formulación siguiendo el protocolo indicado en el Ejemplo III.2.2. Los resultados se ilustran en las Tablas 23, 24 y 25.

Tabla 23

N°	NaOH (M)	Ácido adípico (M)	Título vírico diana log ₁₀ uff	Sacarosa % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico a tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
100	0,928	0,466	6,0	55%	6,59	12	6,0	5,7	0,3
101	0,928	0,466	6,5	55%	6,96	12	6,7	6,5	0,2
102	0,928	0,466	5,2	55%	6,45	12	5,4	5,4	0

* evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2.

Tabla 24: Estabilidad viral a temperatura ambiente

N°	Titulación vírica tras almacenamiento a temperatura ambiente (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7m*	8m*	9m*	10m*
100					5,4	5,0				
101					6,0	5,5				
102					4,9	4,4				

* = mes(es); Cuadros en blanco = no determinado

5 Tabla 25: Estabilidad viral a 4°C

N°	Título vírico a t=0	Título vírico Tras 1 sem. 37°C	1m*	2m*	3m*	4m*	6m*	12m*
100	6,0	5,7					6,0	5,8
101	6,7	6,5					6,6	6,4
102	5,4	5,4					5,3	5,2

* = mes(es); Cuadros en blanco = no determinado

En conclusión, en el intervalo evaluado, la estabilidad del rotavirus permanece similar y aceptable cualquiera que sea el título vírico inicial.

II.5.4. Formulaciones con adipato en presencia de iones de calcio

10 Se ha comunicado que el calcio puede influir sobre la estabilidad y la conformación de la glicoproteína VP7 del rotavirus SA11 expresada en Dictyostelium discoideum (K.R. Emslie y col., 1996, Journal of Biotechnology 50, 149-159). Puede ser beneficioso añadir iones de calcio a la formulación líquida de adipato de rotavirus de la invención, ya que pueden contribuir a la estabilización del rotavirus dentro de la formulación. En consecuencia, se han analizado diversas cantidades de iones de calcio en la formulación de adipato (Tabla 26). Se han analizado dos
15 alternativas: CaCl₂ y Ca(OH)₂.

Formulaciones 98, 116-118: a 9.28 g de NaOH se añaden de forma sucesiva: agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g), 17,00 g de ácido adípico, CaCl₂ según se especifica en la Tabla 26, (se produce precipitación, pero el precipitado se vuelve a disolver tras una hora de agitación a temperatura ambiente, excepto en la formulación n° 117), y 178,75 g de sacarosa. El resto de las etapas de la formulación son idénticas a las descritas para la formulación 82. En esta formulación DMEM representa el 6% p/p.
20

Formulación 99: a agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: Ca(OH)₂ según se especifica en la Tabla 26, 17,00 g de ácido adípico, 9,02 g de NaOH y 178,75 g de sacarosa. El resto de las etapas de la formulación son idénticas a las descritas para la formulación 82. En esta formulación DMEM representa el 6% p/p. La titulación vírica del rotavirus a diferentes puntos de tiempo se ha

evaluado de acuerdo con el procedimiento que se ilustra en el Ejemplo III.1 y se ha evaluado la capacidad antiácida de la formulación siguiendo el protocolo indicado en el Ejemplo III.2.2. Los resultados se ilustran en las Tablas 26, 27 y 28.

- 5 **Formulaciones 119-121:** al CaCl₂ según se especifica en la Tabla 26 se añaden de forma sucesiva: agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g), 9,28 g de NaOH (en este caso se produce precipitación de Ca(OH)₂, pero el precipitado se vuelve a disolver tras la adición del ácido adípico excepto en la formulación n°121), 17,00 g de ácido adípico y 178,75 g de sacarosa. El resto de las etapas de la formulación son idénticas a las descritas para la formulación 82. En esta formulación DMEM representa el 6% p/p.

Tabla 26

N°	NaOH (M)	Ácido adípico (M)	CaCl ₂ (M)	Sacarosa % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico a tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
98	0,928	0,466	0,013	55%	6,59	12-13	6	5,8	0,2
118	0,928	0,466	0,004	55%	6,96	12	6,1	5,8	0,3
116	0,928	0,466	0,0129	55%	6,45	12	5,9	5,8	0,1
119	0,928	0,466	0,0132	55%	6,36	12	5,9	6	0
117	0,928	0,466	0,018	55%	∞	∞	∞	∞	∞
120	0,928	0,466	0,019	55%	6,18	11-12	6	5,8	0,2
121	0,928	0,466	0,051	55%	∞	∞	∞	∞	∞
			Ca(OH) ₂ (M)						
99	0,902	0,466	0,0086	55%	6,54	13-14	5,8	5,7	0,1

- 10 * evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2.

∞ Las formulaciones 117 y 121 se descartaron porqu e se produjo alguna precipitación de material insoluble durante sus preparaciones

Tabla 27: Estabilidad viral a temperatura ambiente

N°	Titulación vírica tras almacenamiento a temperatura ambiente (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7m*	8m*	9m*	10m*
98					5,5	5,7	5,5	5,2		
118					6,0	5,7				5,0
116					5,9	5,6				5,1
119					5,8	5,3				
120					5,7	5,1				
99					5,4	5,4	5,2	4,9		

* = mes(es); Cuadros en blanco = no determinado

Tabla 28: Estabilidad viral a 4°C

N°	Título vírico a t=0	Título vírico tras 1 sem 37°C	1m*	2m*	3m*	4m*	6m*	12m*
98	6	5,8					5,8	6,0
118	6,1	5,8					6,2	6,1
116	5,9	5,8					5,9	6,,1
119	5,9	6					5,9	5,9
120	6	5,8					5,9	5,9
99	5,8	5,7					5,9	5,9

* = mes(es); Cuadros en blanco = no determinado

5 Conclusión: se ilustra la estabilidad del rotavirus en presencia de iones de calcio: se experimenta una pérdida no superior a 0,3 log tras 1 semana a 37°C, que es similar a los resultados obtenidos para las formulaciones preparadas en las mismas condiciones y que contienen los mismos ingrediente a excepción de los iones de calcio añadidos (véase, por ejemplo, la formulación 83 en las Tablas 19-21).

II.5.5 Formulaciones con adipato en presencia de poliovirus orales

10 Algunos esquemas de inmunización rutinarios pueden asociar en el mismo punto de tiempo las vacunaciones de polio oral y rotavirus. El objetivo del experimento siguiente era evaluar si ambas vacunaciones eran compatibles. Por tanto, se preparó una vacuna experimental combinada de polio oral /rotavirus.

Composición del medio para PVO usado para las formulaciones 149,151-155

Agua para inyectables: 80,00 l

Hidrolisado de lactoalbúmina: 1500,00 g

Agua para inyectables: 200,00 l

15 Cloruro de sodio: 2040,00 g

Cloruro potásico: 120,00 g

Sulfato de magnesio 7.H₂O: 30,00 g

KH₂PO₄: 38,00 g

Glucosa anhidra: 1200,00 g

20 Sulfato de neomicina: 15,00 g

Tween 80: 6,00 g

Cloruro de calcio.2H₂O: 80,00 g

Hidróxido de sodio: 30,00 g

Bicarbonato sódico: 660,00 g

25 Rojo fenol: 6,00 g

L-cistina: 30,00 g

Ácido clorhídrico 1N: 550,00 g

Sulfato de polimixina B : 30,00 g

Agua para inyectables hasta 300,00 l

30 Formulaciones 149-155: A agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: NaOH y ácido adípico en cantidades como se describe en la Tabla 29, y 178,75 g de sacarosa. Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles, y siguiendo las cantidades como se describe en la Tabla 29, se añadieron medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener 10^{5,6} DICCC50 por dosis y medio PVO que contiene las cantidades necesarias de Polio virus para obtener 10^{6,8} DICCC50 del tipo I, 10^{6,8} del tipo II, 10^{6,1} del tipo III por dosis.

35

En este caso, la dosis es 1,5 ml o 1,95 g. La mezcla resultante se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En estos ejemplos, DMEM representa el 6% p/p, sacarosa está al 55% p/p, NaOH es 0,92 M, ácido adípico es 0,466M.

Tabla 29

	NaOH	Acido adípico	Agua	Medio DMEM para rota	Rota-virus	Medio PVO	PVO Tipo I	PVO Tipo II	PVO Tipo III
	g	g	g	g	g	g	g	g	g
149	9,2	17	92,55	19,5	-	8,00	-	-	-
150	9,2	17	100,55	14,24	5,26	-	-	-	-
151	9,2	17	92,55	14,24	5,26	8,00	-	-	-
152	9,2	17	92,55	19,5	-	0,07	5,30	0,53	2,10
153	9,2	17	92,55	19,5	-	2,70	5,30	-	-
154	9,2	17	92,55	19,5	-	7,47	-	0,53	-
155	9,2	17	92,55	19,5	-	5,90	-	-	2,10

5

La titulación vírica del rotavirus a diferentes puntos de tiempo se ha evaluado de acuerdo con el procedimiento que se ilustra en el Ejemplo III.1 y se ha evaluado la capacidad antiácida de la formulación siguiendo el protocolo indicado en el Ejemplo III.2.2. Los resultados se ilustran en la Tabla 30.

Tabla 30 (En esta tabla: todos los títulos víricos en DICC50 / dosis**)

	BRR* min	Rota diana	PVO Tipo I diana	PVO Tipo II diana	PVO Tipo III diana	Título de rota t=0 4°C	Título de rota 1 sem. 37°C	Título de PVO I	Título de PVO II	Título de PVO III
149	12	no	no	no	no					
150		10 ^{6,0}	no	no	no	10 ^{6,2}	10 ^{6,2}			
151		10 ^{6,0}	no	no	no	10 ^{6,0}	10 ^{6,0}			
152		no	10 ^{6,0}	10 ^{5,0}	10 ^{6,1}			10 ^{6,7}	10 ^{5,0}	10 ^{6,2}
153		no	10 ^{6,0}	No	no					
154		no	no	10 ^{5,0}	no					
155		no	no	no	10 ^{6,1}					

10 * evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2.

** Se puede estimar que la correspondencia entre uff y DICC50 es de aproximadamente 0,5 log (por ejemplo 10^{6,0} expresado en DICC50 es equivalente a aproximadamente 10^{5,5} expresado en uff por dosis).

Cuadros en blanco: no determinado

"no" significa que el virus correspondiente no se había incorporado en la fórmula

15 Conclusiones:

1) El medio para polio es compatible con la capacidad antiácido (BRR 12 min en la formulación n°149).

2) El medio para polio es compatible con el rotavirus (comparando la formulación n°150 a la formulación n°151, donde se puede observar que se obtienen los mismos títulos con ambas formulaciones, ambos a t=0 4°C y tras una semana a 37°C).

20 3) La composición de rotavirus es compatible con los poliovirus (título vírico esperado de polio obtenido en la formulación n°152).

II.5.6 Estabilidad de las formulaciones de adipato durante un episodio de congelación

II.5.6.1. Congelación a -20°C

La formulación de rotavirus nº 95, tras 6 meses almacenada entre +4°C y +8°C, se sometió a 3 episodios sucesivos de congelación (-20°C) según los tiempos siguientes (Tabla 31)

5 *II.5.6.2. Congelación a -70°C*

La formulación de rotavirus nº 95, tras 14 meses almacenada entre +4°C y +8°C, se sometió a un episodio de congelación a -70°C según los tiempos siguientes (Tabla 31):

Tabla 31

Duración a -20°C	T= +4°C	T= -20°C	T= -70°C
t = 0 (tras 6 meses a 4-8°C)		9 viales	
t = 120 días	Desde -20: 9 viales		
t = 120 días	3 viales: 1x-20°C	6 viales	
t = 196 días	Desde -20: 6 viales		
t = 197 días	3 viales: 2x-20°C	3 viales	
t = 224 días	Desde -20: 3 viales: 3x-20°C		
Duración a -70°C			
t = 0 (tras 14 meses a 4-8°C)			3 viales
t = 15 días	Desde -70: 3 viales 1x -70°C		

- 10 Las muestras se analizaron y compararon con el título vírico a t= 0 (4°C) y también con el título vírico de muestras del mismo momento almacenadas a la temperatura habitual de la nevera (15 meses a + 4°C en este caso). Los resultados se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32

	t=0, 4°C	t=15 meses, 4°C
Nº95	6,0	5,9
Nº95 1x-20°C		5,8
Nº95 2x-20°C		5,9
Nº95 3x-20°C		5,9
Nº95 1x-70°C		5,9

- 15 En conclusión, la composición de la formulación nº95 (formulación de adipato) es compatible con al menos 3 episodios sucesivos de congelación a -20°C. También es compatible con al menos un episodio de congelación a -70°C.

II.6. Formulaciones con malato como carboxilato

ES 2 369 246 T3

II.6.1. Las formulaciones que se presentan en la Tabla 33 (a excepción de las formulaciones 46, 64, 84, 85 y 86) se han preparado a una escala de 325 g (250 ml) representando 166,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido D,L-málico (Pm 146), NaOH (Pm 40).

5 La formulación n°46 se ha preparado a una escala total de 44 g (35 ml) representando 20 dosis de 1,75 ml (2,2 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido D,L-málico (Pm 146), NaOH (Pm 40).

10 **Formulación 46:** a 15,74 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 44g) se añade de forma sucesiva: 2,4 g de NaOH, 4,0211 g de ácido málico y 19,5 g de sacarosa (44% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 2,34 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,2 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

La formulación n°64 se ha preparado a una escala de 318,4 g (244,5 ml) representando 163 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido D,L-málico (Pm 146), NaOH (Pm 40).

15 La formulación n°84 se ha preparado a una escala de 130 g (100 ml) representando 66,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido D-málico (Pm 146), NaOH (Pm 40).

La formulación n°85 se ha preparado a una escala de 130 g (100ml) representando 66,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido L-málico (Pm 146), NaOH (Pm 40).

La formulación n°86 se ha preparado a una escala de 130 g (100ml) representando 66,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Materiales antiácidos: Ácido D,L-málico (Pm 146), NaOH (Pm 40).

20 **Formulación 64:** a 97,3 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 318,4 g) se añaden de forma sucesiva: 14,6 g de NaOH, 24,50 g de ácido málico y 162,5 g de sacarosa (51% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,5 ml o 1,95 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6,12% p/p.

Formulación 71: a 103,9 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325) se añaden de forma sucesiva: 14,90 g de NaOH, 25,00 g de ácido adípico y 162,5 g de sacarosa (50% p/p). El resto de las etapas de la formulación son idénticas a las descritas para la formulación 67. En este ejemplo, DMEM representa el 6 % p/p.

30 **Formulaciones 72-77, 84-86:** se procedió como para la formulación 71 pero con cantidades ajustadas (véase la Tabla 33).

35 **Formulación 78:** a 75,00 g de agua se añaden de forma sucesiva: 8,00 g de NaOH, 25,00 g de ácido málico, suficiente solución de NaOH 1N para alcanzar un pH de 6,48, agua adicional para alcanzar 325 g y 162,50 g de sacarosa (50% p/p). El resto de las etapas de la formulación son idénticas a las descritas para la formulación 67. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p

Formulaciones 79 y 80: se procedió como para la formulación 78 pero con cantidades ajustadas (véase la Tabla 33).

Tabla 33

N°	NaOH (M)	Ácido málico (M)	Sacarosa % p/p	DMEM % p/p	BRR*		Título vírico t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
					pH a t= 0	Tiempo a pH > 4 (min)			
46	1,71	0,787	44%	6%	6,92	20	6,0	5,9	0,1
64	1,490	0,747	51%	6,12%	6,08	11-12	6,0	5,9	0,1
71	1,490	0,746	50%	6%	5,67	11	5,9	5,8	0,1
72	1,240	0,621	50%	6%	6,15/ 6,16°	8	5,8	5,8	0
73	2,00	0,918	50%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
74	1,490	0,746	53%	6%	5,19	8	5,8	5,8	0
75	1,490	0,746	56%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
76	1,79	0,896	47%	6%	5,21	14	5,7	5,8	0

(cont.)

77	1,79	0,896	44%	6%	5,35	15	5,8	5,9	0
78	Hasta pH 6,48	0,746	50%	6%	7,1/ 7,05°	9	5,9	5,6	0,3
79	Hasta pH 5,98	0,746	50%	6%	6,42/ 6,41°	9	5,9	5,5	0,4
80	Hasta pH 7,05	0,746	50%	6%	7,43	9-10	6,0	5,4	0,6
86	1,490	0,746	50%	6%	5,82	11	6,1	5,8	0,3
84	1,490	0,746	50%	6%	5,82	11	5,8	5,8	0
85	1,490	0,746	50%	6%	6,03	11	5,7	5,7	0

* evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2; ° = repetición

¶ La formulación 73 se descartó a causa de dificultad de adhesión durante la filtración estéril debido a la elevada viscosidad de la solución

5 ° La formulación 75 se descartó por la baja solubilización de la sacarosa

La titulación vírica del rotavirus a diferentes puntos de tiempo se ha evaluado de acuerdo con el procedimiento que se ilustra en el Ejemplo III.1 y se ha evaluado la capacidad antiácida de la formulación siguiendo el protocolo indicado en el Ejemplo III.2.2. Los resultados se ilustran en las Tablas 33, 34 y 35.

Tabla 34: Estabilidad viral a temperatura ambiente

N°	Titulación vírica tras almacenamiento a temperatura ambiente (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7m*	8m*	9m*	10m*
64	5,8	5,9	5,6	5,7	5,2	ND	ND	ND	ND	ND
85	ND	5,7	5,2	ND	ND	4,7	ND	ND	ND	ND

10 * = mes(es); ND = no determinado

Tabla 35 - Estabilidad viral a 4°C

N°	Título vírico a t=0	Título vírico a tras 1 sem. 37°C	1m*	2m*	3m*	4m*	6m*	12m*
64	6,0	5,9	5,8	5,8	ND	5,8	ND	5,5
85	5,7	5,8	ND	5,8	ND	ND	5,6	5,7

* = mes(es); ND = no determinado

II.6.2. Estabilidad del rotavirus y capacidad antiácida - resultados

15 La estabilidad del rotavirus en una formulación líquida de malato está relacionada con el pH. El intervalo de pH que se investigó, es decir un intervalo de pH de 6,0 a 7,0 proporciona una estabilidad buena durante 1 semana a 37°C.

II.7. Formulaciones con glutamato

El aspartato y el glutamato son aminoácidos con un grupo carboxilato en su cadena lateral. Los valores del pKa de dichos ácidos carboxílicos de cadena lateral son 3,65 y 4,25 respectivamente. Por tanto, glutamato con un pKa superior a 4 se puede usar como tampón para crear la capacidad antiácida. Véase la Tabla 36.

20 **Formulaciones 41:** A agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: NaOH, ácido glutámico y sacarosa en cantidades como se describen en la Tabla 36. Tras la

disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,5 ml o 1,95 g. La mezcla resultante se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

5 Formulación 43: a agua (cantidad determinada para que alcance una preparación final de 44 g) se añaden de forma sucesiva: 7,1 g de glutamato monosódico 1H₂O y 19,5 g de sacarosa (44% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden a la solución 2,64 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,2 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

10 Formulación 61: A agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: 52,43 g de glutamato monosódico 1H₂O y 144 g de sacarosa (44% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden a la solución 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,2 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

15 Formulación 68: A agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 250 g) se añaden de forma sucesiva: 0,2 g de glutamato monosódico 1H₂O, 2,5 g de seroalbúmina bovina, 0,250 g de Na₂HPO₄.2H₂O, 0,125 g de KH₂PO₄, 0,5 g de EDTA y 18,75 g de sacarosa (7,5% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden a la solución 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,5 ml o cercana a 1,5 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 7,8% p/p.

20 La titulación vírica del rotavirus a diferentes puntos de tiempo se ha evaluado de acuerdo con el procedimiento que se ilustra en el Ejemplo III.1 y se ha evaluado la capacidad antiácida de la formulación siguiendo el protocolo indicado en el Ejemplo III.2.2. Los resultados se ilustran en las Tablas 36, 37 y 38.

Tabla 36

N°	NaOH (M)	Ácido glutámico (M)	Sacarosa % p/p	DMEM % p/p	BRR* pH a t= 0	BRR* Tiempo a pH > 4 (min)	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico a tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
41	1,06	0,542	51%	6%	10,36	15	∞	∞	
	Glutamato Na (M)								
43	1,088		44%	6%	6,92	12	6,0	5,8	0,2
61	1,085		44%	6%	6,93	11-12	6,1	6,1	0
68	0,0043		7,5%	7,8%	6,85	<1	6,0	<3	>3

* evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2.

∞ La formulación 41 se descartó porque su pH inici al era demasiado elevado

30 ∞ La formulación 68 se descartó del estudio de estabilidad a largo plazo a causa del resultado de pérdida viral no satisfactorio obtenido tras 1 semana a 37°C

Tabla 37: Estabilidad viral a temperatura ambiente

N°	Titulación vírica tras almacenamiento a temperatura ambiente (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)									
	1 m*	2 m*	3 m*	4 m*	5 m*	6 m*	7m*	8m*	9m*	10m*
41										
43										
61	6,1	5,7	5,6							
68										

* = mes(es); cuadros en blanco = no determinado

Tabla 38: Estabilidad viral a 4°C

N°	Título vírico t=0	Título vírico a tras 1 sem. 37°C	1m*	2m*	18m*
41					
43					
61	6,1	6,1	6,1	6,0	5,6
68					

* = mes(es); cuadros en blanco = no determinado

5 La estabilidad del rotavirus en una formulación líquida de glutamato es similar a la estabilidad obtenida con otros carboxilatos descritos anteriormente en la presente. En resumen:

- la estabilidad es mejor a un pH de alrededor de 7 (6,93 en la formulación n°61) en comparación con el medio más básico (pH 10,36 en la formulación n°43)

10 - la estabilidad también es mejor en porcentajes elevados de sacarosa (44% de sacarosa en la formulación n°61 en comparación con el 7,5% de sacarosa en la formulación n°68)

- las curvas del perfil de la estabilidad a 1 semana a 37°C, a temperatura ambiente y a 4-8°C son similares a otros carboxilatos descritos en la presente anteriormente.

II.8. Formulaciones con fumarato

15 Formulación 44: a 16,28 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 44g) se añaden de forma sucesiva: 2,4 g de NaOH, 3,4811 g de ácido fumárico y 19,5 g de sacarosa (44% p/p). Tras agitar durante una hora a temperatura ambiente, el material insoluble permanece en suspensión. La preparación se descartó.

II.9. Formulaciones con lactobionato

20 Formulación 47: a 16,02 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 44g) se añaden de forma sucesiva: 1,2 g de NaOH, 10,7414 g de ácido lactobiónico y 13,7 g de sacarosa (31% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 2,34 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,2 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

25 II.10. Formulaciones con maleato

30 Formulación 48: a 16,88 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 44 g) se añaden de forma sucesiva: 2,4 g de NaOH, 2,8821 g de anhídrido maleico y 19,5 g de sacarosa (44% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 2,34 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,2 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

35 Formulación 57: a 110,3 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g) se añaden de forma sucesiva: 32,7 g de maleato disódico y 162,5 g de sacarosa (50% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 19,5 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,5 ml o 1,95 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

II.11. Formulaciones con glucuronato

40 Formulación 49: a 16,14 g de agua (cantidad determinada para que alcance una preparación final de 44 g) se añaden de forma sucesiva: 1,2 g de NaOH, 5,8211 g de ácido glucurónico y 18,5 g de sacarosa (42% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 2,34 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,2 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

45

II.12. Formulaciones con galacturonato

5 **Formulación 52:** a 16,14 g de agua (cantidad determinada para que alcance una preparación final de 44 g) se añaden de forma sucesiva: 1,2 g de NaOH, 5,8218 g de ácido galacturónico y 18,5 g de sacarosa (42% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 2,34 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,2 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

10 II.13. Formulaciones con galactarato

10 **Formulación 53:** a 15,96 g de agua (cantidad determinada para que alcance una preparación final de 44 g) se añaden de forma sucesiva: 2,4 g de NaOH, 6,3008 g de ácido galactárico y 17,0 g de sacarosa (38% p/p). Tras agitar durante una hora a temperatura ambiente, el material insoluble permanece en suspensión. La preparación se descartó.

15 II.14. Formulaciones con tartarato

15 **Formulación 55:** a 15,26 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 44g) se añaden de forma sucesiva: 2,4 g de NaOH, 4,4996 g de ácido tartárico y 19,5 g de sacarosa (44% p/p). Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm. En condiciones estériles se añaden 2,34 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus, para obtener 10^{6,0} uff por dosis. En este caso, la dosis es 1,75 ml o 2,2 g. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p.

20 II.15. Conclusión global para las formulaciones que contienen un carboxilato en ausencia de fosfato añadido

20 Se han preparado varias formulaciones estables con diversos carboxilatos en ausencia de fosfato añadido. El único fosfato presente en estas formulaciones experimentales procedía del tampón DMEM y nunca superó 0,059 mM (5% p/p de DMEM), 0,071 mM (6% p/p DMEM), o 0,094 mM (8% p/p DMEM). Todos los carboxilatos analizados han exhibido capacidad para actuar como agentes tampón para neutralizar la acidez del estómago, previniendo de este modo o minimizando la inactivación del ingrediente activo, es decir el antígeno de rotavirus, presente en la formulación. Todas las formulaciones analizadas, preparadas a diversos volúmenes de dosis de administración (es decir 1,5 ml, 2,0 ml y 2,5 ml), exhibieron un pH de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0, y para la mayoría de las formulaciones un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5. Estas formulaciones funcionaron bien durante la prueba de estabilidad a las tres temperaturas de almacenamiento analizadas (es decir, 37°C, temperatura ambiente o 4°C). Además, estas formulaciones exhibieron una capacidad antiácido satisfactoria, es decir una capacidad antiácido de al menos 8 minutos, y para la mayoría de las formulaciones de al menos 12 minutos, evaluada mediante la prueba BRR (véase el procedimiento en el Ejemplo III.2.2).

35 En la Tabla 39 a continuación se presenta un breve resumen de los datos de estabilidad obtenidos para formulaciones de adipato seleccionadas según el pH de la formulación. Se evaluaron los siguientes criterios: i) pérdida viral tras el almacenamiento durante una semana a 37°C (estabilidad acelerada) (*), ii) tiempo expresado en meses dentro del cual la pérdida de título vírico permanece por debajo de 1,0 log (tras el almacenamiento a temperatura ambiente) junto con el título vírico alcanzado en el periodo de tiempo mencionado (**), iii) título vírico en uff/dosis de vacuna alcanzado tras almacenamiento durante un año (12 meses) a 4°C (***).

Tabla 39

	pH ^o	Pérdida viral tras 1sem. 37°C	*	T. ambiente ^o	**	4°C	***	****
sacarosa 45%								
82	6,39	0,2		6M 4,9		5,8		
sacarosa 50%								
63	6,49	0,4		5M 5,0		5,8		
81	6,2	0,2		6M 4,9		6		
sacarosa 55%								
124	9,48	>3		No realizado				
143	8	0,5		No realizado		5,5		
144	7,75	0,1		No realizado		5,4		

(cont.)

145	7,35	0,3			No realizado		5,4		
132	6,76	0,,3			6M 5,5		5,8		
96	6,55	0,1			8M 5,2		5,9		
83	6,38	0,1			7M 5,0		5,9		
95	6,3	0,1			8M 5,1		5,8		
97	6,3	0,1			8M 4,,9		5,8		
106	5,97	0,1			6M 5,2		5,8		
105	5,98	0,3			5M 4,8		5,7		
104	5,12	0,2		Cristaliza					
103	5,09	0,4		cristaliza					

M=meses

[§] = pH evaluado a T=0 (4°C) mediante la prueba BRR de acuerdo con el ejemplo III.2.2

10 mejores resultados basados en la prueba de estabilidad de 1 semana a 37°C – se tolera una pérdida de título vírico máxima de 0,5 log

5 ** mejores resultados basados en la prueba de estabilidad a temperatura ambiente – se tolera una pérdida de título vírico máxima de 1,0 log

*** mejores resultados basados en la prueba de estabilidad a 4-8°C – se tolera una pérdida de título vírico máxima de 0,5 log

10 **** mejores resultados acumulados –tanto una pérdida de título vírico $\geq 0,5$ log pero $< 1,0$ log, como una pérdida de título $< 0,5$ log son tolerados y aceptables según este criterio

Sombreado gris: formulación aceptable para los criterios evaluados (*, **, *** o ****) con una pérdida viral $< 0,5$ log; cuadro rayado: formulación aceptable para los criterios evaluados (*, **, *** o ****) con una pérdida viral $\geq 0,5$ log pero $< 1,0$ log; sombreado negro: formulación inaceptable porque se produce cristalización.

15 Claramente, en las formulaciones de adipato analizadas, el intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0 (6-8) exhibió un perfil de estabilidad bueno y aceptable compatible con una pérdida de título vírico máxima de 1,0 log, y el subintervalo de pH de aproximadamente 6,0 a 6,8 (6-6,8) mostró un perfil de estabilidad bueno y aceptable compatible con una pérdida de título vírico máxima de 0,5 log.

Ejemplo III – Procedimientos

III.1 Titulación vírica de rotavirus

20 La detección de rotavirus infecciosos se realiza mediante incubación de la formulación que contiene el rotavirus y diversos componentes en células MA104 permisivas (ATCC CRL 2378).

25 El Rotavirus (por ejemplo, rotavirus P43, ECACC 99081301) se formuló como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Tras la inoculación de muestras de virus, las células se incuban durante 16 a 18 horas. A continuación, las células se fijan y permeabilizan con acetona al 80%. Las células infectadas se identifican mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal anti-rotavirus específico contra la proteína VP6 (AcMo 9F6) que se detecta mediante IgG conjugada con fluoresceína y se analiza con microscopio UV. Son adecuados todos los anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente contra la proteína VP6 de rotavirus, y las diluciones de trabajo adecuadas se determinarán mediante experimentación rutinaria. Por ejemplo, son adecuados los siguiente monoclonales:

30 - RV 11-2 (IgG2a, líquido ascítico conjugado con isotiocianato de fluoresceína) de Rural Technologies Inc (www.ruraltechinc.com)

- 5F8 F9 (IgG1, número en el catálogo RVM-1601^a-5) o 2F2 I9 (IgG2b, número en el catálogo RVM-1601B-5) de Austral Biologicals (www.australbiologicals.com)

- MABR10 (fracción de IgG) de Immunological and Biochemical testsystems GmbH (www.afsbio.com)

35 Los anticuerpos policlonales anti-Vp6 de rotavirus, por ejemplo AB1129F de Chemicon (www.chemicon.com) también son adecuados.

Cada foco fluorescente corresponde a un virus infeccioso. Los títulos se expresan como el logaritmo de unidades formadoras de focos por ml (log (uff/ml)). La precisión de la titulación del virus es de alrededor + o - 0,2 log. Los

resultados de la titulación del virus en uff/ml se convierten en uff/dosis de acuerdo con el volumen de la dosis de la muestra inicial. Todos los datos presentados en las Tablas se encuentran log en base 10 (log₁₀) de uff por dosis.

5 Los resultados buenos son aquéllos en los que se consigue una disminución <0,5 log durante la "1 semana a 37°C" (prueba de estabilidad acelerada). Las formulaciones, que exhiben una pérdida viral de 1 log o superior, se descartan de las posteriores pruebas de estabilidad.

III.2 Procedimiento para la medición antiácido: Titulación de Baby Rossett-Rice (BRR)

III.2.1. Introducción

La prueba de titulación de Baby Rossett-Rice (BRR) se ha adaptado a una población de bebés a partir de la prueba de titulación de Rossett-Rice desarrollada inicialmente para la población adulta.

10 La **titulación de Rossett-Rice** es una prueba bien conocida en el campo de la antiacidez (véase N.E. Rossett y Marion L. Rice in *Gastroenterology*, 1954 volumen 26 páginas 490-495: 'An in vitro evaluation of the efficacy of the more frequently used antacids with particular attention to tablets'). La titulación de Rossett-Rice mide el índice de reacción de la sustancia antiácida sometida a ensayo con ácido clorhídrico 0,1N y la duración del pH elevado. Para simular las condiciones de un estómago vacío se añade de una vez ácido clorhídrico reciente al principio de la medición. Para simular las condiciones del estómago durante el proceso de la digestión, a la mezcla de reacción bbajo ensayo se añade ácido clorhídrico reciente a una velocidad constante.

Brevemente, la titulación de Rossett-Rice para adultos se divide en dos partes:

- la adición inicial de 30 ml de HCl 0,1N, que representa el contenido ácido del bolo en un estómago vacío,
- seguida por la adición continua, a una velocidad de 4 ml/min de HCl 0,1N, que es una imitación de la secreción de ácido en el estómago durante la digestión.

Estas son las condiciones experimentales que normalmente se consideran representativas de un estómago adulto medio.

III.2.2. Análisis de titulación **Baby Rossett-Rice**

25 Sobre la base de las condiciones estándar de Rossett-Rice como se describen en el procedimiento original, la prueba se adaptó para que fuera representativa del estómago de un **bebé** de seis meses de edad y más adelante se hace referencia a él como análisis de titulación 'Baby Rossett-Rice (BRR)'.

De acuerdo con las Tablas de Geigy Scientific (Volumen 1 página 126, Ciba-Geigy 1981, eds), los datos siguientes son de interés en cuanto a lo que se refiere a la excreción de HCl en el estómago (véase la Tabla 40):

Tabla 40

	Secreción ácida basal		Secreción máxima ácida	
Niños	Media	Límites	Media	Límites
9-11 semanas	0,149 mmol/h	0,05-0,30 mmol/h	0,56 mmol/h	0,39-0,84 mmol/h
6-7 meses	0,193 mmol/h	0,07- 0,40 mmol/h	2,08 mmol/h	1,33- 2,88 mmol/h

30 Por tanto, sobre la base de dichos datos, escogemos las condiciones más extremas para abarcar todas las situaciones :

- Cantidad inicial de HCl: 0,40 mmol (4ml de HCl 0,1N)
- Adición continua de una cantidad de HCl 0,1N: 2,90 mmol/h (o 0,048 mmol/min). En la práctica se usa una velocidad de 0,5ml/min de HCl 0,1N.

En la figura 2B se muestra un esquema de la disposición experimental de la BRR.

En la Tabla 41 se resume la diferencia entre la prueba BRR en comparación con el procedimiento publicado originalmente .

Tabla 41

Nombre de la prueba:	Rossett-Rice	Baby-Rossett-Rice
Referencia	- Gastroenterology 1954 vol. 26 páginas 490-495. - véase también Prueba de antiácido en la Farmacopea	- GSK, datos no publicados - Los valores para las velocidades de secreción de HCl en el estómago de bebés son de Geigy Scientific Tables (1981) Volumen 1 página 126.
Aplicar en:	Adultos	Bebés de 6 meses de edad
Temperatura aplicada durante la prueba	37°C	37°C
Volumen del vaso de precipitados	400 ml	50 ml
Volumen inicial de agua	70ml	8,5 ml si la muestra de antiácido es de 1,5 ml 8,0 ml si la muestra de antiácido es de 2,0 ml 7,5 ml si la muestra de antiácido es de 2,5ml
Cantidad de antiácido	Equivalente a 0,330 g de Al ₂ O ₃	Variable según la muestra analizada y el volumen de dosis; por lo general entre 0,8 y 1,8 miliequivalentes de HCl
Cantidad inicial de HCl 0,1N añadida a t=0	30 ml	4 ml
Velocidad del HCl 0,1N adicional añadido durante la medición	4 ml/min	0,5 ml/min
Medición del tiempo para que el pH alcance :	pH = 3	pH= 4
Resultados típicos	3-4 horas por encima de pH 3	8-20 min por encima de pH 4

III.2.2.1. Procedimiento de trabajo para el análisis BRR

En la Figura 2B se presenta la disposición experimental.

- 5 1° Utilizando un vaso de precipitados de 50 ml, introducir en él suficiente agua para inyectables con el fin de tener, después de la etapa nº 4 (en adelante) un volumen líquido final de 10 ml.
- 2° Instalar el vaso de precipitados en un baño de agua.
- 3° La temperatura del baño de agua se ajusta con el fin de obtener 37°C dentro del vaso de precipitados.
- 4° La muestra del antiácido que se va a medir se introduce en el vaso de precipitados.
- 10 5° La medición del valor de pH en esta etapa representa el "pH inicial" (el t=0 en la tabla de datos).
- 6° Añadir de golpe 4 ml de HCl 0,1N (0,40 mmol), y al mismo tiempo poner en marcha el reloj y accionar la bomba (adición continua de 0,5 ml/min de HCl 0,1N). Estas tres acciones deberán producirse en los primeros 5 segundos del punto de partida del reloj.
- 15 7° Registrar los valores de pH en el tiempo, hasta obtener el pH 4. En la opción del operador, la disminución del pH se puede dejar que progrese hasta pH 3 (como en el procedimiento Rossett-Rice original), pero los valores relevantes de la capacidad antiácido se registran después de alcanzar un pH 4.
- 8° Parar el reloj y la bomba.

III.2.2.2. Presentación de los datos experimentales

- 20 Los datos experimentales se presentan en la Tabla, por ejemplo véase la Tabla 22, de la que se puede extraer una presentación gráfica: por ejemplo véase la Figura 2ª.

III.2.2.3. Interpretación de los resultados

5 El rotavirus se destruye cuando se coloca a un pH inferior a 4. Con el fin de conservar el virus, el tiempo por encima de pH 4 se debe considerar. El resultado de la titulación de Baby Rossett-Rice se expresa en unidades de tiempo (minutos). Es el tiempo para el cual se midió el valor de pH por encima de 4, es decir la denominada capacidad antiácido de la formulación. En algunos casos, se registran dos valores (por ejemplo, 11-12 minutos como en la formulación nº 92 de la Tabla 22, donde a 11 min el pH era 4,08 y a 12 min el pH era 3,98, lo que indica que el pase a pH 4,00 estaba más cercano a 12 min que a 11 min).

III.2.2.4. Calibración

10 La temperatura se mide con un termómetro calibrado (escala de -10°C- +50°C). El pHmetro se calibra usando o tampones estándar a pH 7 y pH 4 que están disponibles comercialmente.

La velocidad de la bomba se ajusta por mediciones de volumen frente al tiempo con el fin de obtener 0,5 ml/min. La bomba peristáltica es un modelo de 8 cilindros de Ismatec S.A. Modelo MS-Reglo. Con el fin de evitar la formación de gotas, la extremidad del tubo se coloca a lo largo de la pared del vaso de precipitados por encima del nivel del líquido.

15 Ácido clorhídrico 0,1N es la solución comercial de titulación estándar .

20 Para comprobar la disposición experimental antes del análisis de muestras de antiácido desconocidas se usa una solución tampón estándar conocida. Esta solución tampón estándar está formada por 24,066 g de trisodiofosfato dodecahidrato (producto de Merck nº 1.06578.1000) disueltos en suficiente agua para obtener 1 litro de solución. Típicamente, 10 ml de esta solución darán un pH de 9,0 entre los minutos nº6 y 7 (primer salto de pH del fosfato) y un pH de 4,0 entre los minutos nº19 y 20 (segundo salto de pH del fosfato) en la así descrita disposición para la titulación de Baby Rossett-Rice. Los resultados se muestran en la Tabla 42.

Tabla 42

		10 ml de Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O a 24,066 g/litro	10 ml de agua Sin antiácido
	Tiempo (min)	pH	pH
	0	12,4	5,94
	1	11,7	1,31
	2	11,58	1,23
	3	11,44	1,18
	4	11,27	1,14
	5	11,02	1,11
Primer salto de pH	6	10,6	1,10
	7	8,86	1,07
	8	7,95	1,05
	9	7,6	1,03
	10	7,38	1,01
	11	7,19	0,99
	12	7,03	0,98
	13	6,88	0,97
	14	6,74	0,96
	15	6,58	0,95
	16	6,41	0,95
	17	6,21	0,94
	18	5,93	0,93

(cont.)			
Segundo salto de pH	19	5,45	0,92
	20	3,47	0,91
	21	2,88	0,90
	22	2,62	0,89
	23	2,44	0,88
	24	2,3	0,87
	25	2,18	0,87
	26	2,09	0,86
	27	2,01	0,86
	28	1,93	0,86
	29	1,87	0,85
	30		

III.3 Medición del índice de refracción de una formulación dada

5 Varias formulaciones ilustradas en la presente invención se preparan a un volumen pequeño (por ejemplo, un volumen de dosis de 1,5 ml y menor), contienen una concentración elevada de sacarosa (por ejemplo, 55%) y todavía deben satisfacer los requisitos de estabilidad y capacidad antiácido. Por tanto, puede ser importante verificar que la formulación se ha preparado con éxito y que se ha conseguido la solubilización completa de cada constituyente. Una forma sencilla de hacer esto consiste en medir el índice de refracción de la formulación. El índice de refracción es una medición sencilla y bien conocida, que se puede usar tanto en la etapa del tampón carboxilato (antes de la adición del rotavirus) como en la etapa de formulación final (tras la adición del rotavirus).

10 III.3.1. Procedimiento

El índice de refracción de las soluciones acuosas es un procedimiento estándar para determinar la concentración de sacarosa en solución. En el manual de Química y Física 70 edición 1989-1990 CRC Press página E 386 se puede encontrar la Tabla de los índices de refracción frente a las concentraciones de sacarosa.

15 Usando un instrumento Index Instrument Automatic Refractometer GPR 11-37 se coloca una gota de solución en el instrumento y se registra el índice de refracción. Como patrón se usa agua para comprobar el instrumento (índice de refracción de 1,3330).

Se han preparado varias formulaciones de adipato que contienen diversas cantidades de sacarosa y se han sometido a medición del índice de refracción. Se realizó una repetición de la medida.

III.3.2. Resultados

20 Los resultados de dichas medidas se muestran en las Figuras 3^a y 3B. En conclusión, en el intervalo de concentraciones analizadas existe una correlación lineal entre las concentraciones de azúcar y de otros ingredientes solubles y el índice de refracción medido.

25 Por ejemplo, en la formulación n° 95, tras la disolución completa de los ingredientes en la etapa del tampón carboxilato (antes de la adición del rotavirus) se obtendrá un valor del índice de refracción de 1,4578 (siendo la concentración diana de sacarosa 58,5% p/p en este caso), mientras que en la etapa final de la formulación (tras la adición del rotavirus o la adición del 6% p/p de DMEM en el caso de la preparación de placebo) se obtendrá un índice de refracción de 1,4480 (siendo la concentración diana de sacarosa 55% p/p en este caso). En ambos casos, los valores medidos de índice de refracción son superiores a los obtenidos para una única solución de sacarosa en agua de 58,5% (índice de refracción de 1,4385) o 55% (índice de refracción de 1,4307), lo que indica la contribución
30 en el índice de refracción de otros ingredientes de la preparación tampón.

III.3.3. Conclusión

Por tanto, la medición del índice de refracción puede usarse para comprobar con rapidez, durante un control interno del procedimiento, la disolución completa de todos los ingredientes añadidos de la formulación.

Ejemplo IV – Formulación con tampón fosfato citrato – ejemplo comparativo

35 IV.1. Preparación de las formulaciones (Tablas 43 y 44)

Tabla 43

N°	NaH2 PO4 2H2O (M)	Na2 HPO4. 2H2O (M)	Citrato Na3. 2H2O (M)	Sacaro sa % p/p	DMEM % p/p	BRR [§] pH a t= 0 t= 0	BRR [§] Tiempo a pH > 4 min	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
Volumen de dosis de administración 2,5 ml – concentración de fosfato = 0,390 M										
1	0,195	0,195	0,135	50%	3,33%	6,66	9	5,9	5,4	0,5
2	0,195	0,195	0,135	50%	5%	6,65	10	5,8	5,4	0,4
3	0,195	0,195	0,135	50%	8%	6,67	9	5,6	5,3	0,3
4	0,195	0,195	0,135	45%	3,33%	6,67	10	5,8	5,3	0,5
5	0,195	0,195	0,135	40%	3,33%	6,69	11	5,8	5,5	0,3
6	0,195	0,195	0,135	30%	3,33%	6,71	10	5,7	5,5	0,2
7	0,195	0,195	0,135	20%	3,33%	6,75	11	5,6	4,1	1,5
8	0,195	0,195	0,135	45%	8%	6,69	12	5,7	5,4	0,3
9	0,195	0,195	0,135	40%	8%	6,70	12	6,1	5,6	0,5
10	0,195	0,195	0,135	30%	8%	6,72	11	6,1	5,4	0,5
11	0,195	0,195	0,135	20%	8%	6,73	11	6,1	4,4	1,7
Volumen de dosis de administración 2 ml – concentración de fosfato = 0,488 M**										
17	0,244	0,244	0,162	50%	6%	6,68	10	5,7	5,5	0,2
Volumen de dosis de administración 1,5 ml – concentración de fosfato = 0,650M**										
12	0,325	0,325	0,216	40%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
13	0,325	0,325	0,216	40%	8%	∞	∞	∞	∞	∞
14	0,325	0,325	0,216	40%	10%	∞	∞	∞	∞	∞
15	0,325	0,325	0,216	45%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
16	0,325	0,325	0,216	45%	8%	∞	∞	∞	∞	∞

§ evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2;

** Esto es equivalente a 0,390 M en un volumen de dosis de 2,5 ml

∞ Las formulaciones 12-16 se descartaron porque se produjo recristalización en reposo a 4-8°C

5 **Tabla 44 – cantidad reducida de fosfato en un volumen de dosis de 1,5 ml**

N°	NaH2 PO4 2H2O (M)	Na2 HPO4. 2H2O (M)	Citrato Na3. 2H2O (M)	Sacaro sa % p/p	DMEM % p/p	BRR [§] pH a t= 0 t= 0	BRR [§] Tiempo a pH > 4 min	Título vírico a t=0 (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)	Título vírico tras 1 sem. 37°C	Pérdida viral tras 1 sem. 37°C
Volumen de dosis de administración 1,5 ml – cantidad reducida de fosfato (0,450 M para las formulaciones 25-29)**										
25	0,225	0,225	0,285	40%	6%	6,69	12	6,2	5,8	0,4

ES 2 369 246 T3

(cont.)										
26	0,225	0,225	0,285	40%	8%	Se produce cristalización- datos no disponibles				
27	0,225	0,225	0,285	40%	10%	6,67	12	6,2	6,0	0,2
28	0,225	0,225	0,285	45%	6%	Se produce cristalización- datos no disponibles				
29	0,225	0,225	0,285	45%	8%	6,69/ 6,72°	12/ 12-13°	6,1	6,1	0
Volumen de dosis de administración 1,5 ml – cantidad reducida de fosfato (0,0085 M para las formulaciones 30-32, 38-40)***										
30	0,00424	0,00424	0,438	40%	6%	7,75	12-13	6,2	5,3	0,8
31*	0,00424	0,00424	0,438	45%	6%	7,9	13	6,1	5,8	0,3
32*	0,00424	0,00424	0,438	50%	6%	7,76	13-14	6,0	5,7	0,3
38	0,0042	0,0042	0,435	45%	6%	7,76	14	5,7	5,2	0,5
39	0,00424	0,00424	0,446	50%	6%	7,74	14	5,6	5,3	0,3
40	0,0043	0,0043	0,448	54%	6%	7,73	15	5,6	5,4	0,2
Volumen de dosis de administración 1,5 ml – sin fosfato añadido										
18	-	-	0,438	40%	6%	8,42	12	5,7	5,5	1,2
19			0,437	40%	8%	8,42	11	5,7	4,3	1,4
20			0,437	40%	10%	8,31	11	5,7	4,4	1,3
21			0,437	45%	6%	8,35	11	5,9	4,7	1,2
22			0,437	45%	8%	8,35	10	5,8	4,9	0,9
23			0,437	45%	10%	8,37	12	5,7	4,7	1,0
24	-	-	0,438	50%	6%	8,31	11	5,7	4,9	0,8

° = repetición

§ evaluado mediante la prueba de Baby Rossett Rice (BRR) adaptada de acuerdo con el Ejemplo III.2.2;

6 Las formulaciones 31 y 32 se repitieron en una prueba inicial diferente con un dato similar (formulaciones 38 y 39 respectivamente, no se muestran).

5 ** Esto es equivalente a 0,271 M en un volumen de dosis de 2,5 ml; es decir fosfato reducido

*** Esto es equivalente a 0,0051 M en un volumen de dosis de 2,5 ml; es decir fosfato reducido

Nota acerca de los resultados de las formulaciones 18-24, 26- 30 en la Tabla 44

10 Las formulaciones 18-24 y 30 se descartaron del estudio de estabilidad a largo plazo a causa de los insatisfactorios resultados obtenidos durante la prueba de estabilidad de 1 semana a 37°C. Las formulaciones 26 y 28 se descartaron porque se produjo cristalización en reposo a 4-8°C. Las formulaciones 25, 27 y 29 se descartaron por el alto riesgo de recristalización durante el reposo a 4-8°C.

IV.1.1. Formulaciones 1-11: formulaciones de volumen de dosis de 2,5 ml

15 Las formulaciones 1-11 (véase la Tabla 43) se prepararon a la escala de 325 g (250 ml) representando 100 dosis de 2,5 ml (3,25 g) cada una. Materiales antiácidos: NaH₂PO₄·2H₂O (Pm 156); Na₂HPO₄·2H₂O (Pm 178); Citrato Na₃·2H₂O (Pm 294).

La formulación líquida 1 se preparó del siguiente modo. A 125,84 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g) se añaden consecutivamente: 7,605 g de NaH₂PO₄·2H₂O, 8,677 g de Na₂HPO₄·2H₂O, 9,555 g de citratoNa₃·2H₂O y 162,5 g de sacarosa. Tras la disolución completa, la solución se esteriliza mediante filtración en una membrana de 0,2 µm.

20 En condiciones estériles se añaden 10,82 g de medio DMEM que contiene la cantidad necesaria de rotavirus para obtener 10^{6,0} uff por dosis. La mezcla se homogeneiza y distribuye en el recipiente de dosis adecuado. En este caso una dosis consiste en 2,5 ml o 3,25 g de la preparación formulada final. En este ejemplo, el medio DMEM representa el 3,33 % p/p.

Las formulaciones 2-11 se prepararon de forma similar (véase ingredientes y proporciones en la Tabla 43)

En esta serie se analizaron cantidades diferentes de sacarosa y DMEM.

Se obtuvieron resultados similares con la excepción de las formulaciones 7 y 11 preparadas con una concentración baja de sacarosa (20%), que no estabilizó de forma adecuada los rotavirus.

5

IV.1.2. *Formulación 17: formulación de volumen de dosis de 2,0 ml*

La formulación 17 (véase la Tabla 43) se preparó en la escala de 325 g (250 ml) representando 125 dosis de 2,0 ml (2,60 g) cada una. Materiales antiácidos: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Pm 156); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Pm 178); $\text{CitratoNa}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Pm 294). Brevemente, se pesan 110,7 g de agua (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g) y se añaden consecutivamente 9,51 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10,84 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 11,94 g de $\text{CitratoNa}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 162,5 g de sacarosa (50% p/p). En este ejemplo se usan 19,5 g de DMEM, que representa el 6 % p/p.

10

IV.1.3. *Formulaciones 12-16: formulaciones de volumen de dosis de 1,5 ml*

Otros intentos para reducir el volumen de dosis de administración de las formulaciones de citrato/fosfato (para los detalles, véase la Tabla 43) hasta un volumen inferior a 2 ml fracasaron.

15

Las concentraciones de ingredientes usados para la formulación 17 (volumen de dosis 2 ml) se ajustaron a un volumen de dosis de 1,5 ml. Tras el almacenamiento de la formulación a 4°C se produjo la recristalización del componente fosfato rápidamente. Este fenómeno se debe a la solubilidad bastante baja del Na_2HPO_4 en el componente de citrato fosfato (véase la Tabla 45).

20 **Tabla 45 – Límites de la solubilidad teórica para fosfato y citrato**

	Solubilidad en agua
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,44 M (20°C)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,52 M (20°C)
Citrato $\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,44 M (25°C)

De acuerdo con estos parámetros, los intentos para formular la formulación 17 en un volumen de dosis de 1,5 ml en teoría tendrían como resultado una concentración final de fosfato de 0,65 M ((0,244 M + 0,244 M) * 2/1,5), que es superior a los datos de solubilidad de Na_2HPO_4 (0,52 M).

25 Para evitar este problema de baja solubilidad del fosfato, se sugiere no usar fosfato adicional y ajustar el pH jugando con el equilibrio entre la forma de ácido carboxílico (R-COOH) y la forma de sal carboxilato (R-COO⁻). Un ejemplo de esto se da en las formulaciones 100-115 preparadas a un volumen de administración de 2,5 ml (véase la Tabla 5) o las formulaciones 128-130 realizadas a un volumen de administración de 1,5 ml (véase la Tabla 6).

IV.1.4. *Formulaciones 25-32 y 38-40: formulaciones de volumen de dosis de 1,5 ml y cantidad menor de fosfato*

30 Se prepararon varias formulaciones (véase la Tabla 44 para obtener detalles) que contenían una cantidad reducida de fosfato en la escala de 325 g (250 ml) representando 166,6 dosis de 1,5 ml (1,95 g) cada una. Con el fin de compensar esta disminución de fosfato mientras se mantiene una capacidad antiácido aceptable, se incrementó la concentración de citrato. Brevemente, se preparó la formulación 25 mezclando 8,76 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10,00 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 21,00 g de $\text{CitratoNa}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se añaden consecutivamente 130 g de sacarosa (40% p/p). En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p. Las formulaciones 26-29 se prepararon de forma similar, siempre que las concentraciones de sacarosa y DMEM se modificaran ligeramente (véase la Tabla 44). La formulación 30 se preparó mezclando 0,1653 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1884 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 32,16 g de $\text{CitratoNa}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se añaden consecutivamente 130 g de sacarosa (40% p/p). En este ejemplo, DMEM representa el 6% p/p. Las formulaciones 31 y 32 se prepararon de forma similar, siempre que las concentraciones de sacarosa y DMEM se modificaran ligeramente (véase la Tabla 44).

35

40

A pesar del hecho de que, en las formulaciones 25-29, la concentración total de fosfato fue 0,45 M, es decir por debajo de límite teórico de solubilidad de 0,52 M para Na_2HPO_4 , algunas de las formulaciones (por ejemplo las formulaciones 26 y 28) exhibieron recristalización durante el almacenamiento a +4°C. Probablemente, esta diferencia práctica entre el valor de solubilidad teórico y el práctico se deba a la presencia de otros compuestos disueltos en el medio (sacarosa, citrato u otros importados a través del medio DMEM), aunque se obtuvieron resultados inconsistentes para formulaciones similares (compárense, por ejemplo, las formulaciones 26 y 27). La variabilidad experimentada con tales formulaciones no es compatible con la fiabilidad necesaria al preparar formulaciones a gran escala que tienen que permanecer físicamente estables durante un periodo de tiempo mínimo.

45

Disminuyendo todavía más la cantidad de fosfato en la fórmula (véanse los n° 30-32 y 38-40 en la Tabla 44) proporciona malos resultados en la estabilidad viral a 4-8°C (véase la Tabla 47).

50

También se han preparado otras formulaciones de volumen de dosis de 1,5 ml (18-24) en ausencia de fosfato añadido (véase la Tabla 44 para obtener detalles). La capacidad antiácido de estas formulaciones se mantuvo al

5 valor diana de 12 min usando citrato trisódico a una concentración mayor (438 mM). Brevemente, la formulación 18 se preparó mezclando agua 143,34 g (cantidad determinada de forma que alcance una preparación final de 325 g), y se añaden consecutivamente 32,16 g de citratoNa₃.2H₂O, 130 g de sacarosa (40% p/p). Para las formulaciones n°19-23 se analizaron diversas cantidades de sacarosa y DMEM (véase la Tabla 44). Para la formulación 24, se usó sacarosa a una concentración del 50% p/p (162,5 g). En estas formulaciones, DMEM representa el 6 % p/p.

El pH de estas formulaciones (n°18-24) fue superior a 8,3, al que la estabilidad del rotavirus se ve afectada como se pone de manifiesto por una pérdida viral superior a 0,8 tras una semana de almacenamiento a 37°C.

10 Dada la mala estabilidad de estas formulaciones durante la prueba rápida a 37°C, no se llevó a cabo ni ningún plan de estabilidad a medio plazo ni a temperatura ambiente ni a 4°C.

Los resultados indican que, cuando en la formulación se incluye menos y menos fosfato, con más y más citrato (para mantener la capacidad antiácido), el pH resultante de la formulación se incrementa más y más:

- pH alrededor de 6,7 en las formulaciones 25-29
- pH alrededor de 7,7 en las formulaciones 30-32 y 38-40, y
- 15 - pH alrededor de 8,3 en las formulaciones sin fosfato n°18-24

Como se muestra a continuación en la presente (Tablas 46 y 47) dichos valores de pH mayores no favorecen una buena estabilidad del rotavirus.

20 Además, dichos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos para las formulaciones 110-115 (véase la Tabla 5) y 128-130 (véase la Tabla 6) donde el pH se corrigió únicamente ajustando la proporción ácido cítrico/citrato sódico (por tanto, sin fosfato adicional).

IV.2. Titulación vírica de rotavirus y capacidad antiácida

La titulación vírica del rotavirus a diferentes puntos de tiempo se ha evaluado de acuerdo con el procedimiento que se ilustra en el Ejemplo III.1 y se ha evaluado la capacidad antiácida de la formulación siguiendo el protocolo del Ejemplo III.2. Los resultados se ilustran en las Tablas 46 y 47.

25 **Tabla 46 – Estabilidad viral a temperatura ambiente**

n°	Titulación vírica tras almacenamiento a temperatura ambiente (20-22°C) (log ₁₀ uff por dosis de vacuna)					
	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses
1	6,0	6,0	5,8	5,6		5,1
2	6,3	5,9	6,0	5,6		5,0
3	6,2	6,0	5,9	5,5		5,0
4	6,0	6,0	5,5	5,0		
5	6,0	5,7	5,3	4,5		
6	5,5	5,1	4,8			
7	∞	∞	∞	∞	∞	∞
8	6,0	5,6	5,5	4,9		
9	5,9	5,6	5,1			
10	5,6	5,1	4,6			
11	∞	∞	∞	∞	∞	∞
17	6,0	5,8	5,8	5,7		5,0
25	5,9	5,5	4,8			
27	5,8	5,1	4,7			
29	6,1	5,7	5,5	5,4		3,9
31	5,7	5,3	4,7			

(cont.)						
32	5,9	5,5	5,0			
38	∞	∞	∞	∞	∞	∞
39		5,3	5,5	4,5		
40		5,5	5,2	4,8		4,6

Cuadros en blanco = no determinado

∞ Las formulaciones 7, 11 y 38 se descartaron de la estabilidad a largo plazo a causa de los malos resultados obtenidos durante la prueba de 1 semana a 37 °C

Tabla 47 – Estabilidad viral a 4°C

n°	Titulación vírica tras almacenamiento a 4°C (log ₁₀ u _{ff} por dosis de vacuna)								
	T=0	tras 1 sem. 37°C	1 m* 4°C	2 m* 4°C	4 m* 4°C	6 m* 4°C	7m* 4°C	9 m* 4°C	12 m* 4°C
1	5,9	5,4	5,9	6,0	6,1	6,1		5,9	5,9
2	5,8	5,4	5,9	6	6	6		5,9	5,8
3	5,6	5,3	6	6	6,2	6		6	5,9
4	5,8	5,3	5,7	6,0	6,1		5,9	5,9	5,7
5	5,8	5,5	6,1	6,1	6,1		5,8	6,0	5,7
6	5,7	5,5	6,0	6,0	5,9		5,4	5,6	4,9
7	5,6	4,1							
8	5,7	5,4	5,9	6,0	5,9		5,8	5,9	5,6
9	6,1	5,6	6,1	6,1	5,8		5,7	5,6	5,5
10	6,1	5,4	6,0	5,5	5,5				
11	6,1	4,4							
17	5,7	5,5	5,7	5,9	6	5,8		5,9	5,9
25	6,2	5,8	5,9	5,9	ND*	ND*		ND*	ND*
27	6,2	6,0	6	5,8	ND*	ND*		ND*	
29	6,1	6,1	6,1	5,9	5,9	6,2			
31	6,1	5,8	5,7	5,7	5,6	5,6			
32	6,0	5,7	6	5,8	5,6	5,6			
38	5,7	5,2							
39	5,6	5,3		5,7	5,4				
40	5,6	5,4		5,7	5,3				

5 Iç. ND = no disponible – falló durante la prueba de estabilidad a temperatura ambiente

Cuadros en blanco = no determinado

IV.3. Resultados y conclusiones

Formulaciones 2-3 (volumen de dosis de 2,5 ml) y formulación 17 (volumen de dosis disminuido de 2,5 ml a 2 ml):

10 Como se muestra en las Tablas 46 y 47, para las formulaciones 2, 3 y 17 se obtuvo como resultado una pérdida de 1-log del título vírico tras almacenamiento durante 6 meses a temperatura ambiente. A 4°C, no se experimentó una pérdida significativa del título vírico en un periodo de almacenamiento de hasta 12 meses.

Formulaciones 25, 27, 29 y 31-32 (volumen de dosis disminuido a 1,5 ml):

A temperatura ambiente, en general se alcanzó una pérdida de 1-log en la titulación vírica a los 3 meses o antes, a excepción de la formulación 29 que pasó el periodo de tiempo de 4 meses. Las formulaciones 25 a 27 recrystalizaron durante el periodo de almacenamiento a 4°C, lo que indica que la disminución en la concentración de fosfato no es suficiente, como se ha indicado anteriormente. Por tanto, tales formulaciones no son adecuadas para periodos de almacenamiento que serían de al menos un año a 4°C.

Cuando se disminuye la concentración de fosfato todavía más (formulaciones 30-32), el pH de la formulación final aumenta a causa de la cantidad relativamente creciente de citrato, que es necesaria para mantener el mismo valor de capacidad antiácido. Este incremento de pH afecta a la estabilidad del rotavirus y puede detectarse con rapidez durante el estudio de estabilidad a temperatura ambiente. Dichas tendencias se confirman al extraer completamente el fosfato de la formulación (formulaciones 18 y 24).

Conclusión global del Ejemplo IV

Estos resultados indican que, con el fin de alcanzar un volumen de dosis inferior a 2 ml, comparada con un volumen de dosis de 2,5 ml, la cantidad de fosfato presente en la formulación debe reducirse debido a su solubilidad en agua bastante baja y a su propensión a recrystalizar. Como consecuencia, con el fin de conservar el mismo valor diana de capacidad antiácido (es decir, un mínimo de al menos 8 min, de forma adecuada al menos 12 min según se ha evaluado mediante la prueba BRR), la cantidad de la sal de citrato debe incrementarse. Esto genera un incremento del pH final de la formulación, que es perjudicial para la estabilidad del rotavirus en la formulación líquida.

Ejemplo V – Formulaciones adicionales

Se prepararon las siguientes formulaciones (Tabla 48), pero no se incluyeron en el programa de estabilidad a largo plazo porque no cumplían al menos uno de los criterios establecidos. Las razones específicas para descartar algunas formulaciones se destacan en la columna de comentarios de la Tabla 48.

Tabla 48

Nº	Breve descripción de la formulación	Formulación referencia de	Comentarios
		+ Tabla	
7	2,5ml;Citrato; fosfato; 20% sacarosa	IV.1 tabla 43	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
11	2,5ml;Citrato; fosfato; 20% sacarosa	IV.1 tabla 43	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
12	1,5ml;Citrato; fosfato; 40% sacarosa	IV.1 tabla 43	Cristaliza en reposo a +4°C
13	1,5ml;Citrato; fosfato; 40% sacarosa	IV.1 tabla 43	Cristaliza en reposo a +4°C
14	1,5ml;Citrato; fosfato; 40% sacarosa	IV.1 tabla 43	Cristaliza en reposo a +4°C
15	1,5ml;Citrato; fosfato; 45% sacarosa	IV.1 tabla 43	Cristaliza en reposo a +4°C
16	1,5ml;Citrato; fosfato; 45% sacarosa	IV.1 tabla 43	Cristaliza en reposo a +4°C
18	1,5ml; Citrato; 40% sacarosa; pH 8,42	IV.1 tabla 44	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
19	1,5ml; Citrato; 40% sacarosa; pH 8,42	IV.1 tabla 44	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
20	1,5ml; Citrato; 40% sacarosa; pH 8,31	IV.1 tabla 44	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
21	1,5ml; Citrato; 45% sacarosa; pH 8,35	IV.1 tabla 44	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
22	1,5ml; Citrato; 45% sacarosa; pH 8,35	IV.1 tabla 44	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
23	1,5ml; Citrato; 45% sacarosa; pH 8,37	IV.1 tabla 44	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
24	1,5ml; Citrato; 50% sacarosa; pH 8,31	IV.1 tabla 44	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C

ES 2 369 246 T3

(cont.)			
25	1,5ml; Citrato;fosfato; 40% sacarosa	IV.1 tabla 44	Riesgo de cristalización a +4°C
26	1,5ml; Citrato;fosfato; 40% sacarosa	IV.1 tabla 44	Cristaliza en reposo a +4°C
27	1,5ml; Citrato;fosfato; 40% sacarosa	IV.1 tabla 44	Riesgo de cristalización a +4°C
28	1,5ml; Citrato;fosfato; 45% sacarosa	IV.1 tabla 44	Cristaliza en reposo a+4°C
29	1,5ml; Citrato;fosfato; 45% sacarosa	IV.1 tabla 44	Riesgo de cristalización a +4°C
30	1,5ml; Citrato;fosfato; 40% sacarosa	IV.1 tabla 44	Pérdida 0,8 log a 1 sem. 37°C
33	1,5ml; Acetato + Calcio	II.1 tabla 10	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
34	1,5ml; Acetato + Calcio	II.1 tabla 10	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
35	1,5ml; Acetato + Calcio	II.1 tabla 10	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
41	1,5ml Glutamato; 50% sacarosa	II.7 tabla 36	pH demasiado alto: 10,36
44	1,75ml; Fumarato; 44% sacarosa	II.8	Materiales insolubles
45	1,75ml; Adipato; 44% sacarosa	II.5 tabla 19	BRR demasiado largo: >29 min.
47	1,75ml; Lactobionato; 31% sacarosa	II.9	BRR demasiado corto: <1 min.
48	1,75ml; Maleato; 44% sacarosa	II.10	pH demasiado alto: 10,4, BRR demasiado largo: 24 min.
49	1,75ml; Glucuronato; 42% sacarosa	II.11	pH demasiado alto: 8,45; BRR demasiado corto: <1 min.
50	1,75ml; Glutarato; 44% sacarosa	II.4 tabla 18	BRR demasiado largo: >29 min.
51	1,75ml; Succinato; 44% sacarosa	II.3 tabla 16	BRR demasiado largo: >29 min.
52	1,75ml; Galacturonato; 42% sacarosa	II.12	pH demasiado alto: 10,69, BRR demasiado corto: <1 min.
53	1,75ml; Galactarato; 38% sacarosa	II.13	Materiales insolubles
54	1,75ml; Malonato;44% sacarosa	II.2 tabla 14	pH demasiado alto: 8,36
55	1,75ml; Tartratarato; 44% sacarosa	II.14	BRR demasiado corto: <1 min.
57	1,75ml; Maleato; 44% sacarosa	II.10	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
68	1,5ml; Glutamato; 7,5% sacarosa	II.7 tabla 36	Pérdida > 1 log a 1 semana 37°C
73	1,5ml; Malato 0,597M; 50% sacarosa	II.6 tabla 33	Filtración estéril demasiado difícil

(cont.)			
75	1,5ml; Malato; 56% sacarosa	II.6 tabla 33	Dificultades en la solubilización de sacarosa
103	1,5ml; Adipato; 55% sacarosa; pH 5,09	II.5.1 tabla 19	El ácido adípico cristaliza en reposo a +4°C
104	1,5ml; Adipato; 55% sacarosa; pH 5,12	II.5.1 tabla 19	El ácido adípico cristaliza en reposo a +4°C
107	1,5ml; Adipato 0,466M; 55% sacarosa	II.5.1 tabla 19	Ok pero datos similares de estabilidad ya en curso
108	1,5ml; Adipato 0,63M; 53,15% sacarosa; pH 5,38	II.5.1 tabla 19	El ácido adípico cristaliza en reposo a +4°C
109	1,5ml; Adipato 0,63M; 55% sacarosa; pH 5,38	II.5.1 tabla 19	El ácido adípico cristaliza en reposo a +4°C
117	1,5ml; Adipato ; 55% sacarosa; Ca ⁺⁺	II.5.4 tabla 26	Precipitación de adipato de calcio
121	1,5ml; Adipato ; 55% sacarosa; Ca ⁺⁺	II.5.4 tabla 26	Precipitación de adipato de calcio
135	1,5ml; Adipato ; 55% sacarosa	como la nº134	Placebo sin rotavirus
136	1,5ml; Adipato ; 55% sacarosa	II.5.1 tabla 19	pH demasiado alto: 9,36
137	1,5ml; Adipato ; 55% sacarosa	II.5.1 tabla 19	pH demasiado alto: 9,37
138	1,5ml; Adipato ; 55% sacarosa	II.5.1 tabla 19	pH demasiado alto: 9,67
139	1,5ml; Adipato ; 55% sacarosa	II.5.1 tabla 19	pH demasiado alto: 9,92
140	1,5ml; Adipato ; 55% sacarosa	II.5.1 tabla 19	pH demasiado alto: 10,25
141	1,5ml; Adipato ; 55% sacarosa; pH 6,47	II.5.1 tabla 19	Ok pero datos de estabilidad ya en curso
142	1,5ml; Adipato ; 55% sacarosa; pH 6,30	II.5.1 tabla 19	Ok pero datos similares de estabilidad ya en curso
146	1,5ml; Adipato ; 50% sacarosa	como la nº93	Placebo sin rotavirus
149	1,5ml; Adipato ; 55% sacarosa	como la nº151	Placebo sin virus

Ejemplo VI – Inmunogenicidad, reactogenicidad y seguridad en fase II de dos dosis orales de una vacuna de rotavirus líquida monovalente humana en lactantes sanos

VI.1. Introducción

- 5 Se llevó a cabo un estudio en fase II aleatorizado, a doble ciego y controlado con placebo para evaluar la inmunogenicidad, la reactogenicidad y la seguridad de una vacuna que contiene una cepa de rotavirus G1P8 atenuados humanos (depositada en ECAAC con el número de depósito 99081301 – véase el documento WO 01/12797), para la inmunización de lactantes. El estudio se llevó a cabo en múltiples centros en Finlandia. En la Figura 4 se proporciona una visión general del diseño del estudio.
- 10 Durante este estudio, se administró una primera dosis de la vacuna, bien la formulación líquida de la vacuna de HRV candidata (rotavirus humano) (N=100) bien la formulación liofilizada de la vacuna de HRV (N=100) y el placebo respectivo (2 grupos con cada uno N=25) a alrededor de los 2,5 meses de edad (entre las 6 y las 12 semanas de

edad), en el momento de una primera visita al médico. Una segunda dosis se administró a alrededor de los 3,5 meses de edad (durante la segunda visita al médico, típicamente 4 semanas después de la primera dosis). Se realizó una visita de seguimiento 1 mes después de la segunda dosis, a alrededor de los 4,5 meses de edad, para la extracción de sangre y la evaluación de la inmunogenicidad.

- 5 El estudio clínico era aleatorizado, controlado con placebo y autónomo. Se reclutó un total de 250 sujetos, 100 por grupo de HRV y 25 por grupo de placebo. Se llevó a cabo a doble ciego entre cada formulación de vacuna HRV y su placebo respectivo. Sin embargo, entre las 2 formulaciones diferentes el cegado fue técnicamente imposible.

Las vacunaciones rutinarias en la infancia se administraron de acuerdo con la práctica local, aunque separadas al menos 14 días de cada dosis de la vacuna de HRV.

10 **VI.2. Descripción de la vacuna**

Específicamente, la vacuna usada comprende como componente rotavirus la cepa G1 atenuada humana depositada como depósito ECACC 99081301 (documento WO 01/12797).

- 15 La vacuna es una vacuna candidata de rotavirus atenuado humano (HRV) derivada de la cepa 89-12 HRV perteneciente al serotipo G1P1A y genotipo [P8], que se aisló de las heces de un niño de 15 meses en Cincinnati, EE.UU. En un estudio prospectivo de 2 años (Bernstein DI, y col. Protection from rotavirus reinfection: 2 years prospective study. *J Infect Dis.* 1991;164: 277-83) se mostró que la infección natural con la cepa 89-12 proporcionaba protección contra la enfermedad posterior y contra la reinfección .

El antiácido prevendrá la inactivación del HRV durante el paso a través del estómago.

- 20 La Tabla 49 compara las composiciones de la formulación líquida de adipato y una formulación liofilizada preparada de acuerdo con el documento WO 01/12797 y se demostró que era eficaz en un estudio clínico a gran escala (De Vos y col. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 Oct 23 (10 Suppl): S179-82).

Tabla 49 Composición cuantitativa de la formulación líquida de adipato y la formulación liofilizada de la vacuna de HRV (dosis nominal)

	Formulación líquida de adipato	Formulación liofilizada (tras la reconstitución)
Sustancia activa	Cepa P43 – al menos una DICC50 de 10 ^{6,0} por dosis al final del periodo de validez (volumen de dosis 1,5 ml)	Cepa P43 – al menos una DICC50 de 10 ^{6,0} por dosis al final del periodo de validez (volumen de dosis 1,0 ml)
Estabilizante	Sacarosa 55% p/p (1,073 g)	Sacarosa 9 mg Dextrano 18 mg Sorbitol 13,5 mg Aminoácidos 9 mg
Antiácido	Adipato de disodio 132,74 mg	Carbonato cálcico 60 mg
Agente espesante	-	Goma xantán 2,5 mg
Diluyente a granel	DMEM** 6% p/p	DMEM** 2,25 mg
Disolvente	Agua para inyectables c.s. hasta 1,5 ml	Agua para inyectables c.s. hasta 1 ml

** Medio Eagle modificado de Dulbecco

- 25 En la Tabla 50 se presenta un resumen del volumen y la capacidad antiácido de las dos formulaciones de la vacuna HRV.

Tabla 50 Volumen y capacidad antiácido de la formulación líquida de adipato y la formulación liofilizada de la vacuna HRV

Formulación	Volumen de llenado por dosis	Capacidad antiácido (BRR* en min)
Vacuna HRV líquida con adipato	1,5 ml	12
Formulación liofilizada	1,3 ml	17

- 30 * BRR = Prueba de titulación de Baby Rossett-Rice (BRR) para medir la velocidad de reacción de la sustancia antiácido con ácido clorhídrico 0,1N y la duración del mantenimiento a un pH superior a 4. Véase el procedimiento en el Ejemplo III.2.2.

Las monodosis de la vacuna formulada de HRV líquida con adipato se llenan conforme a las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) en jeringas monodosis de vidrio.

El título vírico del rotavirus (es decir, la potencia del rotavirus) se puede medir de acuerdo con el procedimiento que se detalla en el Ejemplo III.1, identificándose las células MA104 infectadas mediante inmunofluorescencia indirecta. Como alternativa se mide mediante titulación in vitro de los virus sobre las células MA104 con detección del virus mediante inmunofluorescencia directa usando anticuerpos anti-rotavirus específicos. El procedimiento determina la dosis que infecta el 50% del cultivo celular y los títulos de rotavirus se expresan en mediana de Dosis infecciosa del cultivo celular (DICC50). Se ha evaluado la reproducibilidad entre ensayos y dentro del mismo, y proporciona resultados equivalentes (la variabilidad se evalúa a 0,3 log).

10 VI.3. Administración

VI.3.1. Formulación liofilizada de la vacuna HRV o el placebo

Para preparar la vacuna o el placebo para administración, se inyectó todo el contenido de una jeringa precargada que contiene el tampón carbonato cálcico en el vial del producto liofilizado (vacuna o placebo) y a continuación lentamente se administró el producto resuspendido como una dosis oral única.

15 VI.3.2. Formulación líquida de la vacuna HRV o el placebo

La jeringa de vidrio precargada se agitó antes de usar. A continuación, lentamente se administró el producto (vacuna o placebo) como una dosis oral única.

VI.4. Seguridad y reactogenicidad

Se aplicaron los siguientes criterios de seguridad y reactogenicidad: los acontecimientos adversos generales notificados fueron fiebre, irritabilidad/sensación de fastidio, diarrea, vómitos, pérdida de apetito y tos/rinitis. Se registraron durante 15 días después de cada dosis de la vacuna del estudio, usando tarjetas diario proporcionadas a los padres/tutores de los sujetos para registrar los síntomas observados. Se documentaron todos los episodios de gastroenteritis (diarrea) que se produjeron entre visitas y se recogieron muestras de heces (como muy tarde 7 días después del inicio de la gastroenteritis). Se registraron los acontecimientos adversos no comunicados que se produjeron dentro de los 31 días posteriores a cada dosis. Los acontecimientos adversos graves se registraron durante todo el periodo de estudio.

VI.5. Análisis de laboratorio

VI.5.1. Análisis de heces

Las muestras de heces recogidas de todos los sujetos el día, o un día antes, de cada dosis de la vacuna del estudio, el día 7 ± 1 y el día 15 ± 1 tras cada dosis, y el día de, o un día antes, de la visita 3 se analizan en GSK Biologicals o en un laboratorio designado por GSK Biologicals, para detectar la presencia de vacuna RV usando Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA – véase la sección VI.6.1) para evaluar la eliminación viral.

La presencia de un antígeno de rotavirus demostrada mediante ELISA en cualquiera de las heces recogidas en puntos de tiempo predeterminados tras la Dosis 1 y hasta la Visita 3 se consideró como eliminación del virus vacunal y se tomó como signo de una respuesta vacunal (es decir, toma vacunal), si el sujeto presentó negatividad para el rotavirus el día de la Dosis 1 de la vacuna HRV o el placebo. Para los sujetos tratados con placebo, en este caso se realiza secuenciación.

Un sujeto inicialmente negativo para rotavirus se define como un sujeto que era negativo para anticuerpos IgA anti-rotavirus en suero y para el antígeno de rotavirus en una muestra de heces en un punto de tiempo previo a la vacunación, si ambos resultados están disponibles, o negativo para al menos uno de estos marcadores si sólo se dispone de un resultado.

Asimismo, las muestras de heces recogidas durante cada episodio de GE desde la visita 1 hasta la visita 3 se están analizando en GSK Biologicals o en un laboratorio designado por GSK Biologicals, usando ELISA para detectar RV. Si es positivo, el tipo G se determina usando enfoques basados en PCR. Estos procedimientos moleculares están dirigidos a regiones dentro del gen de VP7 que son muy distintas entre los diferentes tipos G y que están altamente conservadas dentro de cada tipo G dado. Por ejemplo, el procedimiento de RT-PCR desarrollado por Gouvea y col. (1990, J Clin Microbiol., 28:276-282) utiliza una mezcla de diferentes cebadores específicos de genotipo localizados en diferentes regiones del gen de VP7. El tamaño de los productos resultantes de la PCR estimado mediante electroforesis en gel proporciona la información para identificar los correspondientes genotipos G. Si se detecta algún RV G1, el virus vacunal se diferencia del serotipo salvaje mediante análisis de la secuencia o un enfoque equivalente.

Cualquier detección de virus vacunal en las heces recogidas hasta la Visita 3 se toma como signo de una respuesta vacunal (es decir, toma vacunal).

VI.5.1. Análisis sérico

Los sueros obtenidos de muestras de sangre entera recogidas de sujetos en cada visita del estudio se analizaron mediante ELISA en el laboratorio designado por GSK Biologicals para medir las concentraciones de anticuerpos IgA anti-rotavirus en suero. El corte del ensayo es 20 U/ml. Se definió un sujeto seronegativo para los anticuerpos IgA anti-rotavirus como un sujeto que tenía una concentración de anticuerpos por debajo del valor de corte del ensayo. Un sujeto seropositivo para los anticuerpos IgA anti-rotavirus se definió como un sujeto que tenía una concentración de anticuerpos superior o igual al valor de corte del ensayo.

VI.6. Inmunogenicidad: Análisis sérico

VI.6.1. *Medición de anticuerpos IgA mediante ELISA*

Este ensayo permite la detección de IgA de rotavirus en suero humano e inicialmente fue diseñado por R. Ward (1, 2) y ha sido adaptado por GSK Biologicals. Se usó para medir la respuesta inmunitaria tras la vacunación y/o la infección. Las muestras se analizaron en GSK Biologicals, Rixensart, Bélgica (o en un laboratorio designado).

Descripción del ensayo ELISA

Placas de 96 pocillos se recubren mediante incubación durante la noche con diluciones de anticuerpos anti-rotavirus. Los pocillos se lavan y se añade un lisado de células, bien infectadas con la cepa vacunal (pocillos positivos) o bien no infectadas (pocillos negativos). Tras la incubación en una plataforma rotatoria, las placas se lavan y las diluciones de las muestras de suero o el suero estándar se incuban en ambos tipos de pocillos (positivos y negativos). El uso de pocillos negativos permite la evaluación de la unión inespecífica de IgA.

Las placas se lavan y se detecta la IgA humana unida mediante adición de anti IgA humana de conejo biotinilada (30 minutos en agitación). Tras lavar las placas, a cada pocillo se añade avidina-biotina conjugada con peroxidasa a una concentración óptima y se incuban (30 minutos, TA en agitación). Las placas se lavan de nuevo y se añade ortofenilendiamina (OPD). A continuación las placas se incuban (30 minutos, temperatura ambiente (TA) en oscuridad) antes de cesar la reacción con H₂SO₄ 2N. La absorción óptica se mide a 490/620 nm. Las densidades ópticas específicas se calculan para cada muestra/patrón midiendo la diferencia entre los pocillos positivos y negativos. Las concentraciones de las muestras se determinan usando la función logística de cuatro parámetros generada mediante la curva patrón. Se determina la parte más exacta de la curva patrón (intervalo de trabajo) para el cálculo de los resultados. Las concentraciones de anticuerpos en unidades por mililitro (U/ml) se calculan en relación con el patrón (concentración = 1000U/ml) haciendo la media de los valores para cada desconocido que caiga dentro del intervalo de trabajo de la curva patrón y después corregido por el factor de dilución. Cada experimento incluye controles negativos y positivos. Para todos los reactivos se predetermina la concentración óptima.

25 Referencias

- Bernstein DI, Smith VE, Sherwood JR y col. Safety and immunogenicity of a live attenuated human rotavirus 89-12 vaccine. *Vaccine*. 1998; 16:381-7.
- Bernstein DI, Sack DA, Rothstein E y col. Efficacy of live attenuated human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 1999; 354:287-90.

30 VI.7. Resultados: respuesta de anticuerpos IgA anti-rotavirus

La Tabla 51 presenta los TMG de los anticuerpos IgA anti-rotavirus y los índices de seroconversión (cohorte total vacunada para inmunogenicidad). La Tabla 52 presenta los TMG de los anticuerpos IgA anti-rotavirus calculados en sujetos seropositivos para anticuerpos IgA anti-rotavirus calculados sobre la cohorte total vacunada.

35 La respuesta de anticuerpos contra la vacuna HRV en términos de índices de seroconversión fue similar en los dos grupos de vacuna un mes después de la segunda dosis (82,2 % en el grupo HRV_Lio y 90,1 % en el grupo HRV_Liq). En el grupo acumulado tratado con placebo, 0 % de los sujetos seroconvirtieron un mes después de la segunda dosis, lo que indica que el estudio se llevó a cabo en un momento en el que no había infecciones de tipo salvaje en la comunidad.

40 **Tabla 51 TMG de anticuerpos IgA anti-rotavirus e índices de seropositividad – Cohorte total vacunada para inmunogenicidad**

			≥20 U/ML				TMG		
					IC 95%				
Grupo	Momento	N	n	%	LI	LS	valor	LI	LS
HRV_LIO	PRE	98	0	0,0	0,0	3,7	< 20	-	-
	PI(M1)	96	68	70,8	60,7	79,7	191,3	122,7	298,2
	PII(M2)	90	74	82,2	72,7	89,5	330,4	217,5	502,0
HRV_LIQ	PRE	98	0	0,0	0,0	3,7	< 20	-	-
	PI(M1)	87	66	75,9	65,5	84,4	172,9	112,1	266,7
	PII(M2)	81	73	90,1	81,5	95,6	292,3	199,3	428,8
PL_ACUM.	PRE	49	0	0,0	0,0	7,3	< 20	-	-
	PI(M1)	46	0	0,0	0,0	7,7	< 20	-	-
	PII(M2)	48	0	0,0	0,0	7,4	< 20	-	-

1. N = número de sujetos con resultados disponibles
2. n/% = número/porcentaje de sujetos con concentración superior al corte
3. IC 95% = Intervalo de confianza al 95%; LI = Límite inferior, LS = Límite superior
4. PRE = pre-vacunación
5. PI(M1) = un mes después de la primera dosis de vacuna HRV o placebo (visita 2)
6. PII(M2) = un mes después de la segunda dosis de vacuna HRV o placebo (visita 3)
7. Emisión de la base de datos= 07DIC2005

Tabla 52 TMG de anticuerpos IgA anti-rotavirus calculado en sujetos seropositivos para anticuerpos IgA anti-rotavirus -Cohorte total vacunada para inmunogenicidad

			TMG		
			IC 95%		
Grupo	Momento	N	valor	LI	LS
HRV_LIO	PI(M1)	68	644,7	471,4	881,8
	PII(M2)	74	703,8	525,0	943,6
HRV_LIQ	PI(M1)	66	428,1	302,1	606,8
	PII(M2)	73	423,1	305,9	585,2

1. N = número de sujetos seropositivos para anticuerpos IgA anti-rotavirus
2. IC 95%= Intervalo de confianza al 95%; LI = Límite inferior, LS = Límite superior
3. PI(M1) = un mes después de la primera dosis de vacuna HRV o placebo (visita 2)
4. PII(M2) = un mes después de la segunda dosis de vacuna HRV o placebo (visita 3)
5. Emisión de la base de datos=07DIC2005

15 VI.8. Conclusiones

- La inmunogenicidad en términos de índices de seroconversión fue similar entre las dos formulaciones de la vacuna.
- La formulación líquida de la vacuna fue muy inmunogénica cuando se administró a niños según el calendario de 0, 1 meses.

20 Dado que la IgA es un buen marcador de la eficacia de una vacuna de rotavirus, estos datos avalan el efecto protector de la formulación analizada en las clínicas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica líquida de rotavirus adecuada para administración oral a un lactante humano, que comprende un antígeno de rotavirus, un azúcar y un carboxilato, en la que dicha formulación posee un pH de entre aproximadamente un pH de 5,0 y aproximadamente un pH 8,0, y comprende fosfato inferior a 1 mM, , en el que dicho carboxilato se deriva de un ácido dicarboxílico y con un promedio de $pK_a > 4$.
2. La composición líquida según la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende fosfato inferior a 0,1mM.
3. La composición líquida según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha composición carece de fosfato.
4. La composición líquida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el pH de dicha composición está entre aproximadamente un pH 5,5 y aproximadamente un pH 7,5.
5. La composición líquida según la reivindicación 4, en la que el pH de dicha composición está entre aproximadamente un pH 6,0 y aproximadamente un pH 7,0.
6. La composición líquida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho carboxilato se selecciona del grupo que consiste en: adipato, malato, succinato, malonato, glutarato, maleato, fumarato, tartarato, y cualquier combinación de dos o más de los mismos.
7. La composición líquida según la reivindicación 6, en la que dicho carboxilato es adipato.
8. La composición líquida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho carboxilato está presente a una concentración de entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 2 M.
9. La composición líquida según la reivindicación 8, en la que dicho carboxilato está presente a una concentración de entre aproximadamente 100 mM y entre aproximadamente 1 M.
10. La composición líquida según la reivindicación 9, en la que dicho carboxilato está presente a una concentración de entre aproximadamente 400 mM y aproximadamente 700 mM.
11. La composición líquida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicho azúcar se selecciona de la lista que consiste en: glicerol, eritrosa, eritriol, xilitol, arabitol, ribosa, xilosa, arabinosa, glucosa, tagalosa, manosa, galactosa, fructosa, inositol, sorbitol, manitol, galactitol, una combinación de glucosa y fructosa, maltosa, soforosa, lactosa, celobiosa, melibiosa, trehalosa, sacarosa, palatinosa, maltulosa, lactulosa, maltitol, lactitol, rafinosa, maltotriosa, melezitosa, celotriosa, ciritol, maltotetraosa, estaquirosa, celotetraosa, maltopentaosa, celopentaosa, maltohexaosa, celohexaosa, oligosacáridos.
12. La composición líquida según la reivindicación 11, en la que dicho azúcar es sacarosa o dextrosa.
13. La composición líquida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la concentración de dicho azúcar se encuentra entre aproximadamente 1 p/p y aproximadamente 70% p/p.
14. La composición líquida según la reivindicación 13, en la que la concentración de dicho azúcar se encuentra entre aproximadamente 25 p/p y aproximadamente 60% p/p.
15. La composición líquida según la reivindicación 14, en la que la concentración de dicho azúcar es 50% p/p o 55% p/p.
16. La composición líquida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que adicionalmente comprende un ácido carboxílico.
17. La composición líquida según la reivindicación 16, en la que dicho ácido carboxílico se selecciona de la lista que consiste en ácido adípico, ácido málico, ácido acético, ácido succínico, ácido carbónico, ácido propiónico, ácido butírico, ácido malónico, ácido glutárico, ácido maleico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido glucónico, ácido fumárico, ácido tartárico.
18. La composición líquida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que además comprende iones de calcio.
19. La composición líquida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que dicho antígeno de rotavirus es un rotavirus vivo, tal como un rotavirus vivo atenuado.
20. La composición líquida según la reivindicación 19, en la que dicho rotavirus vivo atenuado es un rotavirus vivo atenuado humano.
21. La composición líquida según la reivindicación 20, en la que dicho rotavirus vivo atenuado humano se selecciona del grupo que consiste en: cepa HRV 89-12C2 depositada con número de acceso ATCC VR 2272, su progenie, derivados reagrupados e inmunológicamente activos de la misma; cepa HRV P43 depositada con número de acceso ECACC 99081301, su progenie, derivados reagrupados e inmunológicamente activos de la misma.
22. La composición líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en la que dicha composición posee una capacidad antiácido de al menos 8 minutos evaluada mediante el análisis de Baby Rosett-Rice.

23. La composición líquida según la reivindicación 22, en la que dicha composición posee una capacidad antiácido de al menos 12 minutos evaluada mediante el análisis de Baby Rosett-Rice.
24. La composición líquida según la reivindicación 22, en la que dicha composición posee una capacidad antiácido de entre 8 y 23 minutos evaluada mediante el análisis de Baby Rosett-Rice.
- 5 25. La composición líquida según la reivindicación 24, en la que dicha composición posee una capacidad antiácido de entre 12 y 23 minutos evaluada mediante el análisis de Baby Rosett-Rice.
26. La composición líquida según la reivindicación 23 o la reivindicación 25, en la que dicha composición posee una capacidad antiácido de entre 12 y 20 minutos evaluado mediante el análisis de Baby Rosett-Rice.
- 10 27. La composición líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en la que dicha composición es estable bajo al menos una de las siguientes condiciones: durante 7 días a 37°C, durante un año a 4°C, durante dos años a 4°C.
28. La composición líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, que es una vacuna.
29. La composición líquida según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en la que dicha composición se proporciona en un volumen de dosis de entre 0,2 ml y 2,0 ml.
- 15 30. La composición líquida según la reivindicación 29, en la que dicha composición se proporciona en un volumen de dosis de entre 0,5 ml y 1,5 ml.
31. La composición líquida según se reivindica en la reivindicación 30, en la que dicha composición se proporciona en un volumen de dosis de aproximadamente 1,5 ml.
- 20 32. La composición líquida según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 para su uso en medicina
33. El uso de un antígeno de rotavirus, un azúcar y un carboxilato en la fabricación de una composición inmunogénica para el tratamiento o prevención de enfermedades asociadas con rotavirus, en el que dicha composición inmunogénica es como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31.
- 25 34. El uso según la reivindicación 33, en el que dicho tratamiento o prevención comprende administrar dos dosis orales de una cantidad segura y eficaz de la composición de rotavirus vivo atenuado humano a un lactante con 4 -15 semanas de edad en el momento de la dosis 1.
35. El uso según se reivindica en la reivindicación 33 ó 34 para la prevención de la infección por rotavirus en seres humanos.
- 30 36. El uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35 para la prevención de la gastroenteritis por rotavirus en seres humanos.
37. El uso según se reivindica en la reivindicación 36 para la prevención de la gastroenteritis grave por rotavirus en seres humanos.
- 35 38. El uso según se reivindica en la reivindicación 36 ó 37, en el que dicha gastroenteritis o gastroenteritis grave está causada por una cepa de rotavirus de un serotipo diferente al de la cepa de rotavirus contenida en dicha formulación líquida.
39. El uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 33 a 38 en el que dicha composición se proporciona en un volumen de dosis de entre 0,2 ml y 2,0 ml.
40. El uso según se reivindica en la reivindicación 39, en el que dicha composición se proporciona en un volumen de dosis de entre 0,5 ml y 1,5 ml.
- 40 41. El uso según se reivindica en la reivindicación 39 o la reivindicación 40, en el que dicha composición se proporciona en un volumen de dosis de aproximadamente 1,5 ml.
42. Un procedimiento para la preparación de una composición líquida de rotavirus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, que comprende mezclar un antígeno de rotavirus, un azúcar y un carboxilato con un diluyente farmacéuticamente aceptable.

45

FIG. 1

Curvas estándar de valoración ácido base de cuatro carboxilatos

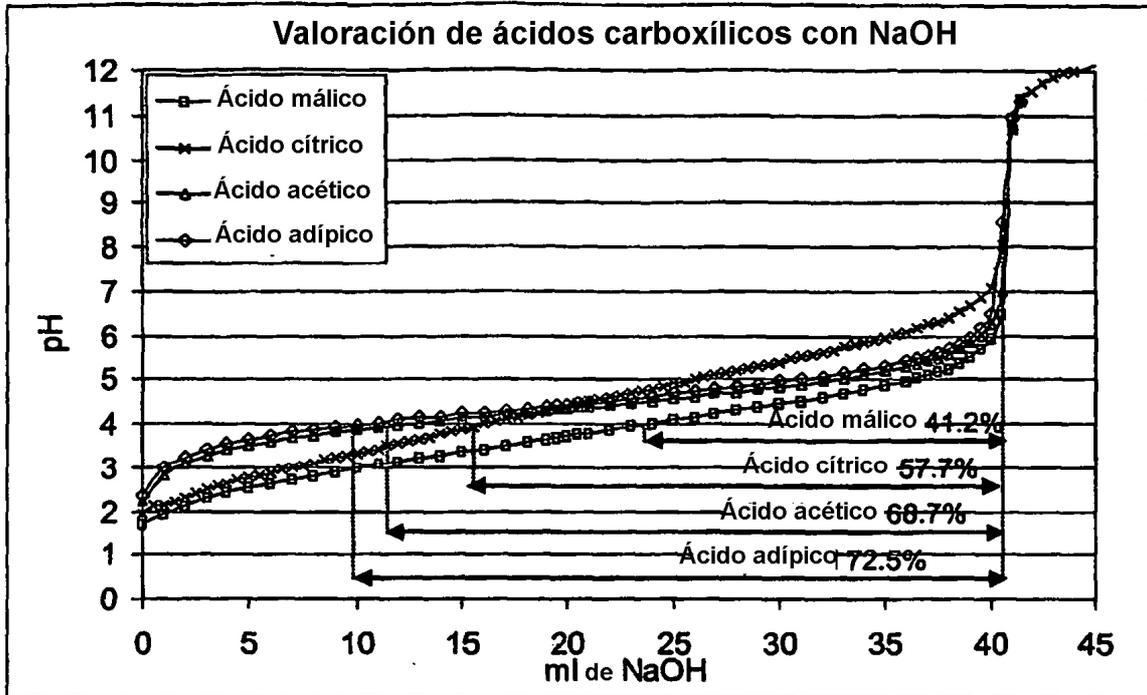


FIG. 2A Capacidad antiácido de diversas formulaciones de adipato

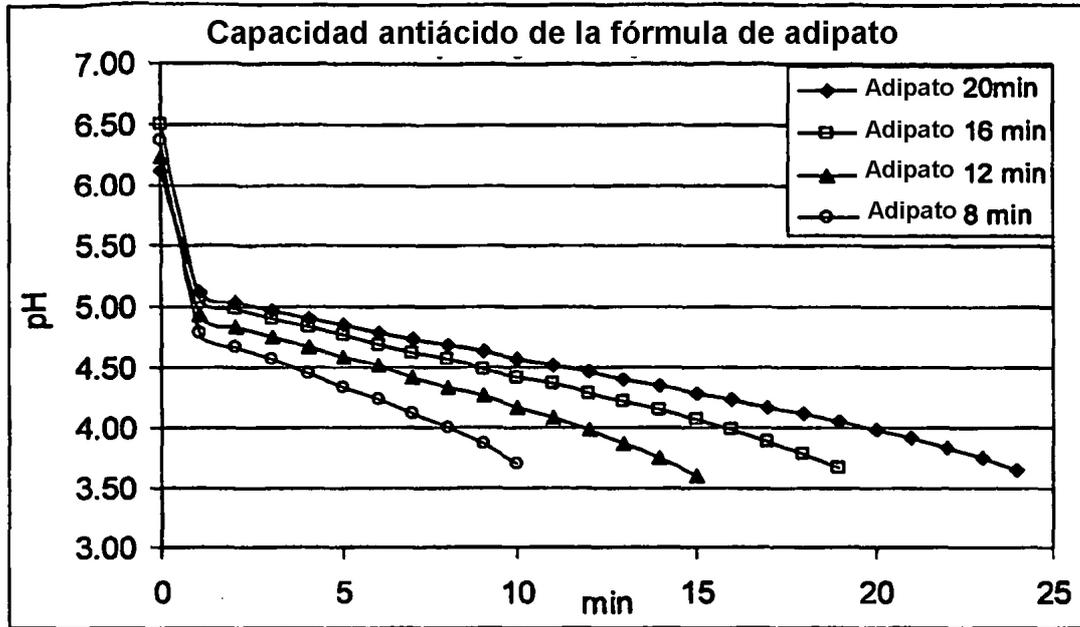


FIG. 2B Disposición experimental de la prueba de Baby Rossett-Rice

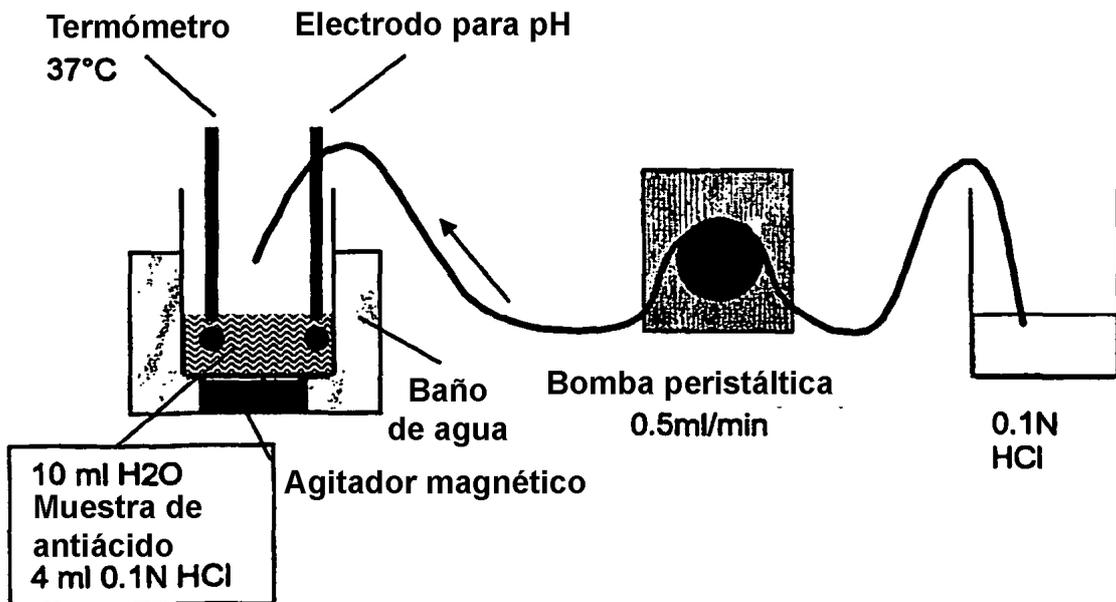


FIG. 3A Índice de refracción de las formulaciones que contienen adipato

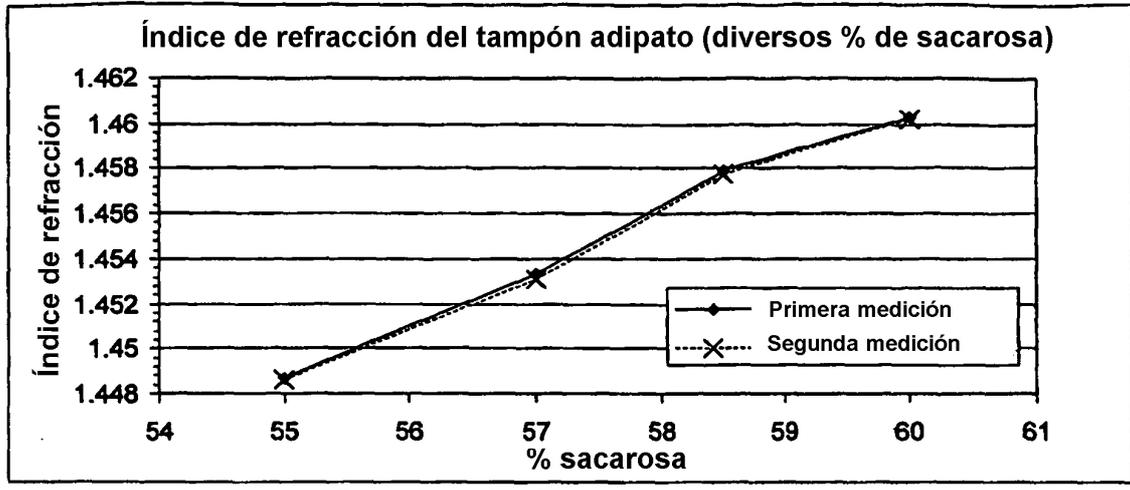


FIG. 3B

Índice de refracción de las formulaciones que contienen adipato
(Rotavirus placebo)

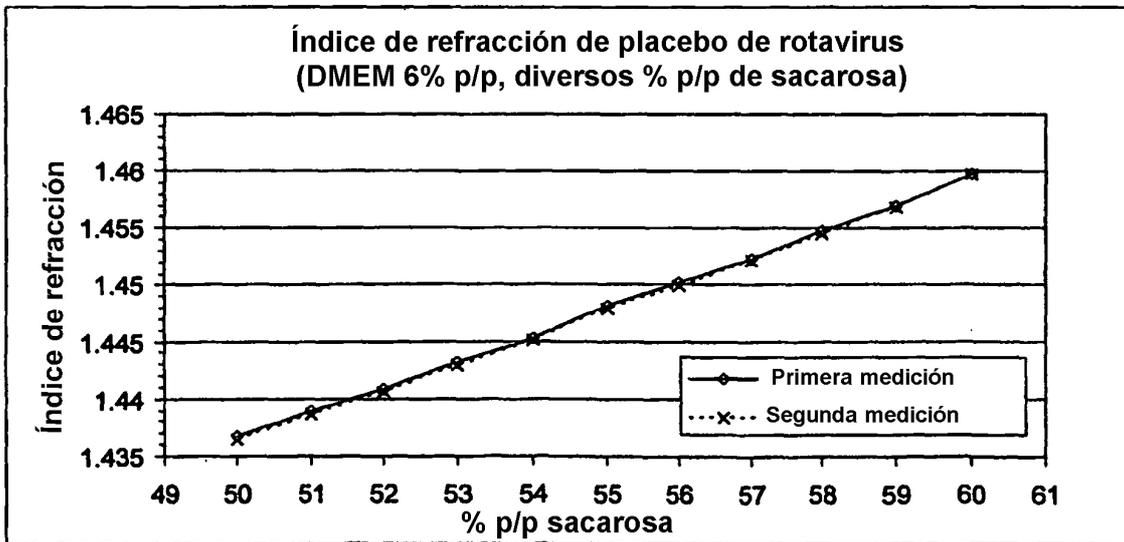
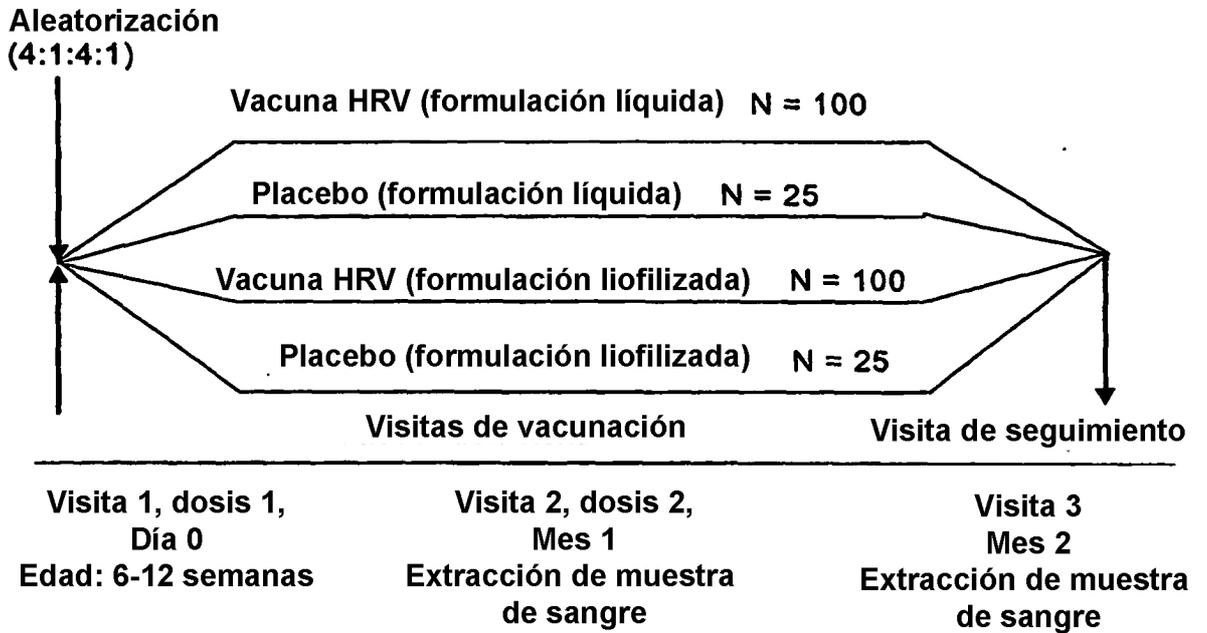


FIG. 4 Visión general del diseño del estudio



N = número de sujetos planificado para ser reclutados