

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 942**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2015 PCT/EP2015/053364**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15124594**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2015 E 15704809 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3107572**

54 Título: **Vacunas líquidas estables contra virus porcino**

30 Prioridad:

19.02.2014 US 201461941720 P

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

17.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**O'CONNELL, KEVIN;
QIAO, ZHISONG;
EDDY, BRAD y
STRAIT, ERIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 793 942 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

Vacunas líquidas estables contra virus porcino

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional n.º de serie No. 61/941,720 presentada el 19 de febrero de 2014.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una vacuna líquida estable que comprende virus vivo atenuado del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. La invención también se refiere a la fabricación de dicha vacuna.

15 Antecedentes

Existe un número significativo de virus que pueden infectar a los cerdos. Tales virus incluyen el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), el virus de gastroenteritis transmisible (TGE), el virus de la seudorrabia porcina (PPRV), el parvovirus porcino (VPP), el virus de la gripe porcina (SIV), el rotavirus porcino (PRV) y el virus de la diarrea epidémica porcina (PED). Además, hay una serie de bacterias que también pueden infectar a los cerdos, incluyendo *Pasteurella multocida* de múltiples serotipos, *Salmonella ssp.*, *Escherichia coli* de múltiples tipos de pillus, *Haemophilus parasuis*, *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma ssp.*, *Bordetella bronchiseptica*, *Erysipelas ssp.*, *Campylobacter ssp.*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*.

Actualmente está ampliamente aceptado que el mejor modo de prevenir una enfermedad debida a infecciones bacterianas o víricas en cerdos es vacunarlos contra estos organismos. Además, se pueden administrar de forma segura vacunas víricas o bacterianas atenuadas multivalentes vivas que limiten el número de inyecciones de vacunas requerido. Por consiguiente, existen muchas vacunas de virus vivos multivalentes disponibles comercialmente que protegen contra múltiples patógenos. Sin embargo, hasta ahora, los virus porcinos vivos atenuados han sido inestables cuando se almacenan en soluciones líquidas. Por lo tanto, la mayoría de las vacunas con virus porcinos vivos atenuados se liofilizan, es decir, se desecan por congelación o se congelan, antes de su almacenamiento a largo plazo. El virus porcino atenuado vivo se mezcla habitualmente como una suspensión en agua con un agente protector, se congela y luego se deshidrata mediante sublimación y se produce un secado secundario durante el proceso de liofilización. Las bajas temperaturas de congelación y secado por sublimación, junto con las bajas relaciones superficie/volumen implicadas, pueden requerir largos períodos de secado y, por lo tanto, aumentar significativamente el tiempo de fabricación y los costes.

Además, existen incoherencias inherentes en los grandes procesos comerciales de secado debido a: la incapacidad para ajustar la temperatura de almacenamiento en toda la carga del producto, las velocidades de congelación variables en la secadora, los efectos de borde y los efectos de energía radiante. A menudo, aumentar la temperatura de secado para reducir los tiempos de secado no es una opción, ya que la temperatura de secado tiene que permanecer significativamente por debajo de la temperatura de transición vítrea de la matriz proteica protectora. Además, los largos tiempos de secado inconsistentes y/o las altas temperaturas de secado a menudo conducen a daños estructurales a los virus vivos atenuados, junto con una pérdida significativa de su actividad biológica.

Por consiguiente, para dar cuenta de la pérdida inherente de eficacia, las vacunas porcinas liofilizadas que comprenden virus vivos atenuados se fabrican con títulos aumentados. Sin embargo, tales títulos aumentados pueden conducir a eventos adversos significativos si el proceso de liofilización en realidad lleva a una menor pérdida de actividad de lo previsto. Esto es particularmente problemático para el granjero porcino porque, como mínimo, tal evento adverso a menudo conduce a un menor aumento de peso diario para los cerdos, lo que se traduce en menores ganancias en la venta. Por lo tanto, se requiere un gran cuidado para formular una vacuna que contenga un título de virus que no solo sea seguro por debajo de la cantidad que conduce a eventos adversos, sino que también mantenga una eficacia suficiente en vista de la pérdida del título de virus debido a la liofilización y el almacenamiento posterior.

Además, existe una limitación en el tamaño de los viales de liofilización y/o el número de dosis contenidas en dichos viales debido a los tamaños de tapón estándar relativamente pequeños para la parte superior de estos viales. Por lo tanto, grandes volúmenes de líquido se vuelven difíciles de sublimar a través de las aberturas relativamente pequeñas. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas vacunas vivas atenuadas de virus porcino que puedan retener de manera confiable los títulos de virus a un nivel seguro y eficaz.

Adicionalmente, no es económico producir vacunas porcinas en viales de dosis única. Sin embargo, los viales de vacunas liofilizadas deben usarse en su totalidad después de la rehidratación de la torta liofilizada. Esto hace que sea difícil para el creciente número de pequeños criadores de cerdos que no pueden aprovechar la economía de una presentación de envase más grande con una mayor cantidad de dosis para vacunar solo a unos pocos cerdos. Por lo tanto, existe la necesidad de vacunas porcinas en las que se pueda usar un solo vial durante varios días, semanas

o incluso meses, reduciendo de este modo el coste y fomentando la vacunación de rebaños más pequeños.

Finalmente, debido a la naturaleza de los lioviales, existe una limitación en el tamaño del vial y la cantidad de líquido que puede liofilizarse. Esto significa que las grandes instalaciones de producción deben rehidratar varias botellas para vacunar cientos, si no miles, de cerdos a la vez. Una vez rehidratado en los viales de vidrio, de acuerdo con las regulaciones para organismos vivos vacunados, los propios viales de vidrio se convierten en desechos peligrosos y deben esterilizarse o desinfectarse, enterrarse o quemarse. La esterilización se vuelve difícil en la granja porcina y, a menudo, estos viales se desechan en la basura. Por otro lado, no sería necesario restringir el uso de una vacuna líquida estable introduciéndola en pequeños recipientes de vidrio, sino que la vacuna podría almacenarse en bolsas de plástico que podrían tener una gran variedad de tamaños. Además, después de la administración de la vacuna a los cerdos, las bolsas de plástico se pueden destruir fácilmente quemándolas en un pequeño fuego contenido. El documento US2012/0213810 se acerca a un nuevo aislado de virus PRRS. La vacuna se almacena después de liofilizar.

La cita de cualquier referencia en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que dicha referencia está disponible como "técnica anterior" para la presente solicitud.

Sumario de la invención

Para superar las deficiencias de las vacunas actuales, la presente invención proporciona una nueva vacuna del virus PRRS vivo atenuado estable en líquido. La vacuna de virus PRRS vivo atenuado estable en líquido de la presente invención puede permanecer eficaz durante períodos prolongados, tales como 6, 7, 9 meses o más (por ejemplo, de aproximadamente 1 a hasta 3 años). La presente divulgación también proporciona métodos para administrar dicha vacuna a un cerdo. La presente divulgación proporciona además métodos para prevenir una enfermedad en un animal, por ejemplo, un cerdo, mediante la administración de una vacuna de la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención proporciona vacunas líquidas estables, incluyendo vacunas multivalentes que comprenden un virus PRRS vivo atenuado. El virus vivo es un virus atenuado. En otras realizaciones, el virus vivo es un virus recombinante. En realizaciones particulares, el virus vivo es tanto atenuado como recombinante. Los virus recombinantes de la presente invención también pueden codificar una proteína heterogénea. En realizaciones particulares de este tipo, la proteína heterogénea es un virus, parásito o antígeno bacteriano.

La vacuna comprende un aditivo de azúcar que es un alcohol de azúcar y un aminoácido. La vacuna comprende del 10 al 30 % (p/v) del alcohol de azúcar sorbitol.

En realizaciones más particulares, la vacuna comprende del 12 al 18 % (p/v) del alcohol de azúcar. En realizaciones aún más particulares, la vacuna comprende aproximadamente el 15 % (p/v) del alcohol de azúcar. En realizaciones relacionadas, la vacuna comprende aproximadamente el 23 % (p/v) del alcohol de azúcar.

En las vacunas de virus estables en líquido de la presente invención, el alcohol de azúcar es sorbitol. En realizaciones relacionadas, las vacunas líquidas estables comprenden además un aditivo de azúcar que es un alcohol no de azúcar, en el que la cantidad total del alcohol de azúcar y el alcohol no de azúcar en la vacuna líquida estable es 15-40 % (p/v). En otras realizaciones, las vacunas líquidas estables comprenden además un aditivo de azúcar que es un alcohol no de azúcar en el que la cantidad total del alcohol de azúcar y el alcohol no de azúcar en la vacuna líquida estable es 25-40 % (p/v). En realizaciones particulares, el alcohol no de azúcar, el aditivo de azúcar es trehalosa. En otras realizaciones más, el alcohol no de azúcar, el aditivo de azúcar es dextrosa. En otras realizaciones más, el alcohol no de azúcar, el aditivo de azúcar es sacarosa. En realizaciones particulares de este tipo, el aditivo de azúcar es una combinación de sacarosa (alcohol no de azúcar) y sorbitol (alcohol de azúcar). En realizaciones más particulares de este tipo, el aditivo de azúcar es una combinación de 10-25 % de sorbitol y 5-20 % de sacarosa. En otras realizaciones de este tipo, el aditivo de azúcar es una combinación de 15-30 % de sorbitol y 10-25 % de sacarosa. En realizaciones aún más particulares de este tipo, el aditivo de azúcar es una combinación de 15 % de sorbitol y 10 % de sacarosa. En realizaciones particulares, el alcohol no de azúcar, el aditivo de azúcar es en realidad una combinación de dos o más alcohol no de azúcar, aditivos de azúcar.

Las vacunas líquidas estables de la presente invención pueden variar en un pH de pH 6,0 a pH 8,0. En ciertas realizaciones, el intervalo de pH es de pH 6,5 a pH 7,8. En realizaciones particulares, el intervalo de pH es de pH 6,8 a pH 7,5. En otras realizaciones particulares, el intervalo de pH es de pH 6,6 a pH 7,4. En realizaciones más particulares, el intervalo de pH es de pH 7,0 a pH 7,4. En una realización aún más particular, el pH es 7,2.

Las vacunas líquidas estables de la presente invención comprenden un tampón. El tampón comprende fosfato de 10 a 20 mM.

El tampón comprende fosfato de 10 a 20 mM y arginina de 0,3 a 0,5 M. En una realización relacionada, el tampón comprende Tris de 5 a 25 mM. En realizaciones particulares, el tampón comprende Tris de 10 a 20 mM. En realizaciones relacionadas, el tampón Tris comprende histidina.

Las vacunas líquidas estables de la presente invención comprenden un aminoácido. El aminoácido es arginina. En

realizaciones relacionadas, las vacunas líquidas estables comprenden tanto arginina como metionina. En otras realizaciones, las vacunas líquidas estables comprenden tanto arginina como glicina. En otras realizaciones más, las vacunas líquidas estables comprenden tanto ácido glutámico como arginina.

- 5 En realizaciones relacionadas, las vacunas líquidas estables comprenden arginina, ácido glutámico y metionina. En otras realizaciones, las vacunas líquidas estables comprenden arginina, ácido glutámico y glicina. En otras realizaciones más, las vacunas líquidas estables comprenden arginina, ácido glutámico y metionina. En otras realizaciones más, las vacunas líquidas estables comprenden arginina, glicina y metionina. En otras realizaciones más, las vacunas líquidas estables comprenden arginina, glicina y metionina. En realizaciones particulares, las vacunas líquidas estables comprenden arginina, glicina, metionina y ácido glutámico.

En realizaciones particulares, la concentración final de arginina en la vacuna líquida estable es de aproximadamente 0,45 M. En otras realizaciones particulares, la concentración final de arginina en la vacuna líquida estable es de aproximadamente 0,3 M.

- 15 En un aspecto, la concentración final combinada de arginina junto con ácido glutámico y/o glicina en la vacuna líquida estable es de 0,3 a 0,5 M. En otro aspecto más, la concentración final de arginina y ácido glutámico, o glicina en la vacuna líquida estable es de 0,25 a 0,45 M. En un aspecto aún más particular, la concentración final combinada de arginina junto con ácido glutámico y/o glicina en la vacuna líquida estable es de aproximadamente 0,45 M. En otros aspectos particulares, la concentración final de arginina junto con ácido glutámico y/o glicina en la vacuna líquida estable es de aproximadamente 0,3 M.

- 25 En un aspecto particular, la concentración final de metionina en la vacuna líquida estable es de 0,025 a 0,3 M. En aspectos relacionados, la concentración final de metionina en la vacuna líquida estable es de 0,04 a 0,15 M. En aspectos más particulares, la concentración final de metionina en la vacuna líquida estable es de 0,06 a 0,09 M. En aspectos aún más particulares, la concentración final de metionina en la vacuna líquida estable es de aproximadamente 0,07 M.

- 30 Las vacunas líquidas estables de la presente invención también pueden comprender una proteína estabilizadora. La proteína estabilizadora puede ser una proteína intacta y/o un hidrolizado de proteínas. En realizaciones particulares, la proteína estabilizadora es gelatina. En realizaciones más particulares, la proteína estabilizadora contenida en la vacuna líquida estable de la presente invención es del 0,4 al 1,6 % de gelatina. En realizaciones alternativas, la proteína estabilizadora es un hidrolizado de caseína completa. En realizaciones particulares de este tipo, la proteína estabilizadora contenida en la vacuna líquida estable de la presente invención es 0,5-2,0 % de un hidrolizado de caseína completa. En ciertas realizaciones, el hidrolizado de caseína completa es un hidrolizado proteolítico de caseína completa. En otras realizaciones más, la proteína estabilizadora contenida en la vacuna líquida estable de la presente invención es lactoglobulina o un hidrolizado de lactoalbúmina.

- 40 Además, las vacunas líquidas estables de la presente invención también pueden comprender además un agente quelante. Tales agentes quelantes pueden incluir, pero sin limitación: ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), ácido 1,2-bis (o-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-tetraacético (BAPTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), ácido dimercaptosuccínico (DM-SA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS). La concentración de tales agentes quelantes en las vacunas líquidas de la presente invención puede variar de aproximadamente 50 μ M a 10 mM.

- 45 En realizaciones particulares, el agente quelante es ácido etilendiaminetetraacético (EDTA). En ciertas realizaciones de este tipo, la vacuna líquida estable comprende EDTA de 0,050 a 1 mM. En realizaciones particulares, la vacuna líquida estable comprende EDTA de 0,25 a 0,75 mM. En realizaciones más particulares, la vacuna líquida estable comprende EDTA de aproximadamente 0,5 mM.

- 50 En ciertas realizaciones, las vacunas líquidas estables de la presente invención pueden comprender además uno o más secuestrantes de radicales libres y/o antioxidantes como componente. En una realización particular de este tipo, una vacuna de la presente invención comprende ácido ascórbico. En una realización particular de este tipo, la vacuna líquida estable comprende ácido ascórbico aproximadamente 0,5 mM. En una realización relacionada, la vacuna comprende alfa-tocoferol. En una realización particular de este tipo, la vacuna líquida estable comprende alfa-tocoferol aproximadamente 0,5 mM. En aún otra realización, la vacuna comprende glutatión. En una realización particular de este tipo, la vacuna líquida estable comprende aproximadamente 3 mM de glutatión. En otra realización más, la vacuna comprende tanto alfa-tocoferol como ácido ascórbico. En otra realización más, la vacuna comprende tanto alfa-tocoferol como glutatión. En otra realización más, la vacuna comprende tanto glutatión como ácido ascórbico. En otra realización más, la vacuna comprende ácido ascórbico, alfa-tocoferol y glutatión.

- 65 En realizaciones relacionadas, las vacunas líquidas estables de la presente invención se mantienen en envases sellados. En realizaciones particulares de este tipo, las vacunas líquidas estables de la presente invención se mantienen en recipientes sellados que tienen un gas inerte, tal como argón, nitrógeno o helio, por encima del líquido (por ejemplo, se ha llenado de nuevo con el gas inerte).

Las vacunas líquidas estables de la presente invención pueden comprender además un adyuvante. En realizaciones particulares de este tipo, el adyuvante es fosfato de aluminio. En otras realizaciones de este tipo, el adyuvante es hidróxido de aluminio. En otras realizaciones más, el adyuvante es un adyuvante de copolímero de bajo peso molecular que puede formar enlaces cruzados en solución para convertirse en un gel de alto peso molecular. En otras realizaciones más, el adyuvante está compuesto de partículas de gel de acrilato de sodio en agua. En otras realizaciones más, el adyuvante es una combinación de dos o más de tales adyuvantes.

En realizaciones particulares, las vacunas líquidas estables de la presente invención pueden comprender además un detergente y/o tensioactivo. En ciertas realizaciones de este tipo, el tensioactivo es un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno. En una realización particular de este tipo, la vacuna líquida estable comprende aproximadamente 0,01 % de copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno. En una realización específica de este tipo, el copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno es PLURONIC®F-68.

Por consiguiente, la presente invención proporciona vacunas líquidas estables que son vacunas multivalentes. Las vacunas multivalentes de la presente invención pueden contener cualquier combinación de virus PRRS vivo atenuado con virus porcinos. En ciertas realizaciones, las vacunas multivalentes de la presente invención comprenden tanto virus porcinos muertos como virus porcinos vivos atenuados. En realizaciones específicas, la vacuna multivalente comprende, junto al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) vivo, un virus de la diarrea epidémica porcina (PED) atenuado y/o un antígeno de circovirus porcino (PCV) muerto y/o una subunidad recombinante del PCV. En realizaciones particulares, la vacuna multivalente comprende SIV muerto, circovirus porcino (PCV) muerto y/o subunidad, junto con el virus de la gastroenteritis transmisible (TGE) vivo atenuado y el parvovirus porcino (VPP) vivo atenuado. En realizaciones relacionadas, la vacuna multivalente comprende antígeno de circovirus porcino (PCV) muerto y/o una subunidad recombinante del mismo, virus muerto de la gripe porcina de múltiples serotipos, virus de gastroenteritis transmisible (TGE) vivo atenuado y/o muerto, y rotavirus porcino (PRV) vivo atenuado.

Las vacunas líquidas estables de la presente invención pueden comprender además un virus muerto y/o una bacteria muerta (por ejemplo, una bacterina) y/o una subfracción de una bacterina. Por consiguiente, cualquiera de las vacunas líquidas estables de la presente invención que comprenden una o más vacunas de virus vivos puede comprender además un virus muerto y/o una bacteria muerta y/o una subfracción de una bacterina. En ciertas realizaciones de este tipo, estas vacunas pueden comprender además adyuvantes, por ejemplo, como se indica en el presente documento. En realizaciones particulares, la vacuna multivalente comprende uno o más toxoides inactivados de *Clostridium perfringens*, antígeno del pilus extraído de la bacteria *E. coli*, por ejemplo, de cualquiera de los siguientes serotipos: K99, K88, 987P o F41, junto con el virus de la gastroenteritis transmisible (TGE) vivo atenuado y el parvovirus porcino (VPP) vivo atenuado. En realizaciones alternativas, la vacuna multivalente comprende un virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) vivo y un *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) muerto, y/o una bacterina inactivada de *Lawsonia intracellularis*. En una realización relacionada, la vacuna multivalente comprende un antígeno de circovirus porcino (PCV) muerto y/o una subunidad recombinante de PCV, un *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) muerto, una bacterina inactivada de *Lawsonia intracellularis*, junto con un virus vivo del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS).

La presente divulgación proporciona además métodos para ayudar en la protección de los cerdos contra una enfermedad clínica que surge de una infección por virus porcino que comprende administrar una vacuna de la presente invención al animal. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos que comprenden administrar a un porcino cualquiera de las vacunas líquidas estables de la presente invención. En ciertas realizaciones, la administración se realiza por vía mucosa (por vía intranasal u oral). En otras realizaciones, la administración se realiza por vía parenteral. En otras realizaciones más, la administración se realiza por vía intradérmica. En otras realizaciones más, la administración se realiza por vía transdérmica. En otras realizaciones específicas, una vacuna de la presente invención se administra al cerdo por vía intramuscular. La presente invención también incluye el uso de vacunas primarias y/o de refuerzo.

En realizaciones particulares, el método comprende administrar al cerdo una vacuna líquida estable de la presente invención. En realizaciones particulares, la vacuna líquida estable comprende junto al PRRS vivo atenuado, TGE vivo atenuado, un PRV vivo, PED vivo atenuado y/o PPRV vivo atenuado. En otras realizaciones, la vacuna líquida estable comprende PRRS vivo atenuado, dos serotipos del PRV, TGE vivo atenuado y PPRV vivo atenuado como vector de expresión para otros antígenos de vacuna.

Además, antes, junto con, o después de administrar cualquiera de las vacunas líquidas estables de la presente invención, también se pueden administrar uno o más antígenos bacterianos atenuados o muertos tales como *P. multocida*, *Salmonella ssp.*, *E. coli*, incluidos los tipos de pilus K99, K88, 987P) P41, *A. pleuropneumoniae* B. *bronchiseptica*, *L. intracellularis*, *M. hyopneumoniae*, toxoides de los tipos A, C y/o D de *C. perfringens*. Se pueden encontrar ejemplos de vacunas porcinas (tanto monovalentes como multivalentes) que contienen antígenos y combinaciones de antígenos que se pueden incluir en las vacunas líquidas estables de la presente invención en las Tablas 1A-1C a continuación.

También se proporcionan métodos para preparar cualquiera y todas las vacunas líquidas estables de la presente

invención. En ciertas realizaciones, el método comprende combinar una cantidad terapéuticamente efectiva de un virus PRRS vivo atenuado con 10-40 % (p/v) de sorbitol y 0,3 a 0,5 M de arginina, en el que la vacuna líquida estable comprende un tampón fosfato de 10 a 20 mM y tiene un pH de 6,0 a 8,0 para formar una vacuna líquida estable.

- 5 En realizaciones específicas, la cantidad terapéuticamente efectiva del virus PRRS vivo atenuado incluye cantidades terapéuticamente efectivas del virus TGE vivo atenuado, PRV vivo atenuado, virus PED vivo atenuado, PPRV vivo atenuado y un virus SIV vivo atenuado, o un virus vivo atenuado que expresa proteínas del SIV.

10 Estos y otros aspectos de la presente invención se apreciarán mejor con referencia a la siguiente Descripción detallada y Ejemplo.

Descripción detallada de la invención

15 Debido a que las vacunas líquidas estables de virus porcino de la presente invención comprenden un virus PRRS vivo atenuado, hasta ahora, se habría necesitado un cuidado particular durante la formulación de la vacuna para mantener el título del virus atenuado a un nivel que sea seguro por debajo de lo que puede conducir a un evento adverso significativo. De hecho, la mayoría de las vacunas de virus porcino vivo atenuado están liofilizadas, y la liofilización puede conducir a una disminución sustancial de la eficacia de las vacunas con virus vivo atenuado debido al proceso de liofilización en sí, así como a lo largo del tiempo durante el almacenamiento a largo plazo.

20 La presente invención ha superado este problema proporcionando vacunas líquidas estables para cerdos que siguen siendo eficaces, incluso durante el almacenamiento, sin necesidad de aumentar el título inicial del antígeno viral vivo atenuado por encima de un nivel fiablemente seguro. Como un beneficio adicional, la presente invención proporciona un medio para reducir el coste de fabricación de las vacunas proporcionadas reduciendo significativamente la cantidad de virus porcinos atenuados vivos necesarios para hacer una vacuna tan segura y eficaz. Además, las vacunas de virus porcino vivo atenuado de la presente invención son más convenientes de usar que sus equivalentes liofilizados. Por consiguiente, la presente invención proporciona vacunas de virus vivo atenuado seguras y eficaces que pueden almacenarse como líquidos a temperaturas refrigeradas y aún permanecer estables durante de 5 a 7 meses, 6 a 9 meses, 9-12 meses, 12 a 18 meses, 18 a 24 meses y/o incluso más. A diferencia de su equivalente liofilizado, las vacunas líquidas estables de la presente invención no tienen que usarse tan pronto como se rehidratan, porque siempre están hidratadas. Dado que las vacunas porcinas a menudo vienen en viales de 100 dosis, como la presentación más grande, aquellos con granjas más grandes usarán cientos de viales de vidrio y tirarán a la basura los residuos peligrosos de las vacunas. Con la vacuna porcina estable en líquido, las granjas más grandes pueden comprar envases más grandes (por ejemplo, de plástico) de vacuna, que pueden usar durante 35 semanas o meses, siempre que la vacuna se maneje adecuadamente y no esté contaminada, y luego se queme el recipiente de plástico residual cuando la vacuna se use, descontaminando así el recipiente. Esto abre un nuevo mercado exclusivo de conveniencia para granjas más grandes.

40 Además, sorprendentemente, las vacunas líquidas estables de virus porcinos vivos de la presente invención pueden incluir adicionalmente virus porcinos de cualquier tipo. Por lo tanto, las vacunas líquidas estables de virus vivo de la presente invención pueden incluir virus porcinos tanto envueltos como no envueltos. Además, las vacunas líquidas estables de virus vivos de la presente invención pueden incluir virus porcinos vivos atenuados que tienen genomas de ARN monocatenario, genomas de ADN monocatenario o genomas de ADN bicatenario.

45 No está previsto que el uso de términos en singular por comodidad en la descripción sea limitante en forma alguna. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un "aditivo de azúcar" incluye la referencia a uno o más de dichos aditivos de azúcar, salvo que se especifique otra cosa. Tampoco se pretende que el uso de términos en plural que sea limitante, salvo que se especifique otra cosa. De manera similar, un compuesto químico que puede denominarse ácido o su base correspondiente, salvo que se especifique otra cosa, cuando se indica en el presente documento como cualquiera de los dos pretende significar cualquiera de las formas del compuesto. Por lo tanto, el uso del 50 término ácido glutámico incluye glutamato y al contrario.

Como se usa en el presente documento, una "vacuna" es una composición que es adecuada para la aplicación a un animal (incluidos, en ciertas realizaciones, seres humanos) que al administrarse al animal induce una respuesta inmune lo suficientemente fuerte como para ayudar mínimamente en la protección contra una enfermedad clínica que surge de una infección con un microorganismo de tipo silvestre, es decir, lo suficientemente intensa como para 55 ayudar en la prevención de la enfermedad clínica, y/o prevenir, mejorar, o curar la enfermedad clínica.

60 Salvo que se indique específicamente otra cosa, el uso del término vacuna incluye vacunas multivalentes.

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

65 Como se usa en el presente documento, una vacuna "estable en líquido" es una vacuna mantenida como un líquido (incluida una vacuna líquida multivalente) que sigue siendo eficaz durante al menos un año cuando se almacena a/o

por debajo de 7 °C (por ejemplo, en un refrigerador convencional, y/o a 0 °C - 7 °C). En realizaciones concretas, una vacuna líquida estable sigue siendo eficaz cuando se almacena a/o por debajo de 7 °C durante al menos 6 meses. En realizaciones más concretas, una vacuna líquida estable sigue siendo eficaz cuando se almacena a/o por debajo de 7 °C durante al menos 9 meses. En realizaciones más concretas, una vacuna líquida estable sigue siendo eficaz cuando se almacena a/o por debajo de 7 °C durante al menos 1 años. En realizaciones más concretas, una vacuna líquida estable sigue siendo eficaz cuando se almacena a/o por debajo de 7 °C durante al menos 1,5 años. En otras realizaciones más concretas una vacuna líquida estable sigue siendo eficaz cuando se almacena a/o por debajo de 7 °C durante al menos 2,0 a 3 años.

- 10 Los términos "cerdo" o "porcino" o "porcino" se usan indistintamente e incluyen todas las especies de porcino domesticadas, a menos que se indique otra cosa.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "proteger", "protegiendo", "proporcionar protección a", "proporcionando protección a", y "ayudas en la protección" no requiere una protección completa de cualquier indicación de infección. Por ejemplo, "ayudas en la protección" puede significar que la protección es suficiente para que, tras el estímulo, los síntomas de la infección subyacente son al menos reducidos, y/o al menos una o más de las causas o mecanismos celulares, fisiológicos, o bioquímicos subyacentes que hacen que los síntomas se reduzcan y/o eliminen. Se comprende que "reducido", tal como se usa en este contexto, significa en relación con el estado de la infección, incluido el estado molecular de la infección, no solo el estado fisiológico de la infección.

La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a la cantidad de una composición que, cuando se administra a un cerdo, reduce significativamente la probabilidad y/o la extensión de una infección/infestación debida a un patógeno dado.

- 25 "Metafilaxis" es la medicación masiva oportuna de un grupo completo de animales para eliminar o minimizar un brote esperado de enfermedad, por ejemplo, en uno o más animales en alto riesgo de infección/infestación.

El término "quimioprofilaxis" se refiere a la administración de una medicación/tratamiento, por ejemplo, una o más composiciones profilácticas, con el fin de prevenir o reducir el virus, infección/infestación bacteriana y/o parasitaria; y/o prevenir o reducir la enfermedad y/o los síntomas relacionados con esta infección/infestación.

La expresión "composición profiláctica" se refiere a cualquier agente usado individualmente o en combinación con otros agentes que reduce significativamente la probabilidad y/o la extensión de una infección/infestación debida a un patógeno dado en cerdos. En una de tales realizaciones, los cerdos tienen un alto riesgo de desarrollar enfermedad entérica porcina después de la mezcla, cambios en la climatología, cambios en la nutrición y/u otros factores estresantes que pueden iniciar un síntoma y/o una enfermedad relacionada con la presencia del virus, patógenos bacterianos o parasitarios comúnmente asociados a los cerdos, que suponen la diana del agente o la combinación de agentes.

- 40 Como se usa en el presente documento, la expresión " cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de un antígeno dado, por ejemplo, un virus porcino vivo atenuado, que es suficiente para proporcionar protección y/o ayuda en la protección del patógeno del que se está administrando el antígeno para protegerlo, cuando se proporciona en una administración individual y/o cuando se pretende, proporcionar como una administración inicial con una o más administraciones de refuerzo posteriores.

Como se usa en el presente documento, una vacuna "eficaz" comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno dado. Una vacuna "eficaz" retiene suficientes títulos de un antígeno dado para satisfacer los requisitos reguladores de dicho antígeno para la jurisdicción donde se administra la vacuna, por ejemplo, la administración de una vacuna en los Estados Unidos está controlada por el United States Department of Agriculture (USDA).

Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se usa adjetivamente para significar que el nombre modificado es adecuado para su uso en un producto farmacéutico. Cuando se usa, por ejemplo, para describir un excipiente en una vacuna farmacéutica, caracteriza al excipiente como compatible con los otros ingredientes de la composición y no desventajosamente perjudicial para el receptor deseado.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Los transportadores farmacéuticos aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y/o aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animales, vegetales o sintéticos, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Agua o soluciones acuosas, soluciones salinas y soluciones acuosas azucaradas, por ejemplo, dextrosa y/o glicerol, las soluciones pueden emplearse como portadores, particularmente para soluciones inyectables. Además, el transportador puede ser y/o comprender un hidrocoloide y/o una solución polimérica por ejemplo, para espesar las vacunas porcinas que se deben rociar sobre los cerdos.

- 65 Como se usa en el presente documento, un "adyuvante" es una sustancia que puede favorecer o amplificar la cascada de eventos inmunológicos, lo que lleva en última instancia a una mejor respuesta inmunitaria, es decir, la

respuesta corporal integrada a un antígeno. En general, no se requiere un adyuvante para que se produzca la respuesta inmunitaria, pero favorece o amplifica esta respuesta.

Como se usa en el presente documento, "administración sistémica" es la administración en el sistema circulatorio del cuerpo (que comprende el sistema cardiovascular y linfático), afectando así al cuerpo en su totalidad en lugar de a un locus específico como el tracto gastrointestinal (por ejemplo, mediante administración oral) y el sistema respiratorio (por ejemplo, mediante administración intranasal). La administración sistémica se puede realizar, por ejemplo, mediante la administración en el tejido muscular (intramuscular), en la dermis (intradérmica, transdérmica, o supradérmica), debajo de la piel (subcutánea), debajo de la mucosa (submucosa), en las venas (intravenosa), etc.

La "administración parenteral" incluye inyecciones subcutáneas, inyecciones submucosales, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, inyecciones intradérmicas e infusiones.

Como se usa en el presente documento, un "aditivo de azúcar" es un azúcar de 5 a 12 carbonos (por ejemplo, sacarosa, maltosa, trehalosa, dextrosa, lactosa, glucosa, fructosa, galactosa) o alcohol de azúcar/poliol (por ejemplo, sorbitol, manitol, arabitol, inositol, maltitol). A menos que se indique lo contrario específicamente, el porcentaje (%) del aditivo de azúcar se proporciona como un peso (w) del aditivo de azúcar al volumen (v) de la vacuna, (w/v) en la vacuna.

Como se usa en el presente documento, un "azúcar no reductor" es un aditivo de azúcar que en medio acuoso básico no genera ningún compuesto que contenga un grupo aldehído. Los ejemplos de azúcares no reductores de la presente invención incluyen sacarosa y trehalosa.

Como se usa en el presente documento, los términos "alcohol no de azúcar" y "azúcar sin alcohol" se usan indistintamente. Un aditivo de azúcar que es un "alcohol no de azúcar" (o "azúcar sin alcohol") como se usa en este documento, puede ser cualquier aditivo de azúcar que no sea un alcohol de azúcar, por ejemplo, un azúcar no reductor.

Como se usa en el presente documento, A menos que se indique lo contrario específicamente, el porcentaje (%) de un aditivo sólido, por ejemplo, aditivo de azúcar o gelatina, en una vacuna se basa en una solución al 1% que es 1 g de sólido/100 ml de volumen de vacuna (p/v).

Como se usa en el presente documento, A menos que se indique lo contrario específicamente, el porcentaje (%) de un aditivo líquido, por ejemplo, etanol, en una vacuna se basa en una solución al 1% que es 1 ml de aditivo líquido/100 ml de volumen de vacuna (v/v).

Como se usa en el presente documento, el término, "aproximadamente", se usa indistintamente con el término "alrededor de" y significa que un valor está dentro del veinticinco por ciento del valor indicado, a menos que se indique otra cosa, es decir, una concentración de "aproximadamente" EDTA 2 mM puede ser de EDTA 1,5 mM a 2,5 mM.

Como se usa en el presente documento, A menos que se indique lo contrario específicamente, El valor de pH proporcionado es el valor de pH determinado/medido a 25 °C.

Debido a que las vacunas líquidas estables de la presente invención varían idealmente en un pH de pH 6,0 a pH 8,0, Las vacunas líquidas estables de la presente invención pueden comprender un tampón. Los tampones para su uso en las vacunas líquidas estables de la presente invención incluyen, pero sin limitaciones: fosfato potásico, fosfato de sodio, Tris, Tris-histidina, BIS-tris, BIS-Tris-Propano, pirofosfato de sodio o potasio, imidazol, PIPES, ACES, MOPS, MOPSO, BES, TES, tricina, glicilglicina y HEPES. Los tampones se pueden llevar al pH deseado con el uso de cualquier contraión adecuado.

El hidrolizado de caseína completa que se puede usar en las vacunas líquidas estables de la presente invención se puede obtener mediante una serie de procedimientos que incluyen, por ejemplo, como un hidrolizado ácido o un hidrolizado enzimático. Tales hidrolizados contienen en forma de aminoácidos y péptidos mixtos que tienen todos los aminoácidos originalmente presentes en la caseína. MP Biomedicals vende un hidrolizado pancreático de caseína entera que puede usarse en las vacunas líquidas estables de la presente invención como CASEIN HYDROLYZATE ENZYMATIC®. Los productos comparables se venden bajo el nombre de NZ-AMINE®, NZ-AMINE® A, NZ-AMINE® AS, y NZ-AMINE® B, y Triptona de Sigma-Aldrich.

Los ejemplos de hidrocoloides que pueden estar comprendidos por las vacunas de la presente invención incluyen: gelatina, polímeros de almidón y gomas, tal como goma xantana, carragenina y goma arábica (goma arábica).

Vacunas multivalentes: La presente invención proporciona vacunas líquidas estables multivalentes. Una vacuna porcina multivalente líquida estable de la presente invención puede incluir dos o más antígenos que incluyen, junto al virus PRRS atenuado vivo, uno o más de los siguientes virus porcinos atenuados vivos: PEDV, PRV, TGEV, PPRV, SIV y/o un SIV recombinante que codifica uno o más antígenos heterólogos. Como se ha indicado anteriormente,

una vacuna porcina multivalente líquida estable de la presente invención también puede incluir uno o más de los siguientes virus vivos atenuados: PEDV, PRV, TGEV, PPRV, SIV, y/o un SIV recombinante que codifica uno o más antígenos heterólogos, junto con uno o más virus porcinos muertos.

- 5 Además, una vacuna líquida estable de la presente invención se puede combinar posteriormente con una o más vacunas bacterianas vivas atenuadas o muertas que comprenden un antígeno tal como *Pasteurella multocida*, *Salmonella ssp.*, *Escherichia coli* de múltiples tipos de pilus, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, *Erysipelas spp.*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* antes de la administración. Los ejemplos de vacunas monovalentes y multivalentes que se
- 10 pueden usar en vacunas líquidas estables de la presente invención. se proporcionan en las Tablas 1A-1C a continuación:

Tabla 1A

Vacunas de virus vivos	
Única	Combo
Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS)	Rotavirus porcino/E. coli/ C. perfringens de tipo C
Rotavirus porcino (PRV) de múltiples serotipos	TGE/PRV/ C. perfringens de tipo C/E. coli de tipo de múltiples pilus
Virus de la gastroenteritis transmisible (TGE)	

15

Tabla 1B

Bacterias vivas	
Única	Combo
Salmonella choleraesuis	M. haemolytica/P. multocida
Mannheimia haemolytica	Lawsonia/PCV/M. hyopneumoniae
Pasteurella multocida	
Lawsonia intracellularis	

Tabla 1C

Vacunas muertas	
Única	Combo
Toxoide de Clostridium Perfringens de tipo A	Toxoides de Clostridium perfringens de tipo C/D
Toxoide de Clostridium perfringens de tipo C	Parvovirus porcino, Erysipelas, Leptospira canicola, pomona, hardjo-icterhaemorrhagia, Grippotyphosa
Toxoide de Clostridium perfringens de tipo D	Virus de la gripe porcina (múltiples serotipos)
Mycoplasma hyopneumoniae	Toxoide de C. perfringens de tipo C/E. coli
Circovirus porcino	E. coli (múltiples tipos de pilus)
Parvovirus porcino	E. coli (múltiples tipos de pilus)/C. perfringens tipo C
Virus de la gripe porcina	B. bronchiseptica/P. multocida
Escherichia coli múltiples tipos de pilus incluyendo K99, K88, 987P, Tipo 1	
Lawsonia intracellularis	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	

- Adyuvantes: Las vacunas de la presente invención pueden contener un adyuvante o, alternativamente, no contener un adyuvante, a menudo dependiendo del antígeno o antígenos que contiene la vacuna. En realizaciones particulares, el adyuvante comprende una sal de aluminio. Se ha descrito el uso de sales de aluminio junto con vacunas virales vivas. En realizaciones particulares, la sal de aluminio se elige del grupo que consiste en fosfato de aluminio, fosfato de aluminio y potasio e hidróxido de aluminio. Un adyuvante de fosfato de aluminio es REHYDROPHOS® (General Chemical, Parsippany, New Jersey). Los ejemplos de adyuvantes de hidróxido de
- 20 aluminio incluyen: REHYDROGEL®, REHYDROGEL® HPA o REHYDROGEL® LV (General Chemical, Parsippany, New Jersey). Otros adyuvantes bien conocidos incluyen aceites de hidrocarburos, polímeros, saponinas y/o un adyuvante compuesto de partículas de gel de acrilato de sodio en agua, por ejemplo, MONTANIDE™ PET GEL A™ (Seppic, París, Francia). Un adyuvante de copolímero de bajo peso molecular puede formar enlaces cruzados en solución para convertirse en un gel de alto peso molecular, por ejemplo, POLYGEN™ (MVP Laboratories, Omaha).
- 25 Cuando se añade, la cantidad de adyuvante suele estar entre aproximadamente 1 % y 20 % (v/v) en la vacuna. En realizaciones particulares, la cantidad de adyuvante está entre aproximadamente 2 % a 10 % (v/v). En realizaciones más particulares, la cantidad de adyuvante está entre aproximadamente 3 % y 6 % (v/v).
- 30

Administración de vacunas: Las vacunas de virus líquidas estables de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier medio convencional, por ejemplo, mediante administración sistémica, incluyendo mediante administración parenteral tal como, sin limitación, administración subcutánea o intramuscular. Las vacunas de virus líquidas estables de la presente invención se pueden administrar también mediante administración en la mucosa, tal como mediante administración intranasal, administración oral y/u ocular. Como alternativa, las vacunas pueden administrarse mediante un parche en la piel, en un implante de liberación retardada, escarificación, o administración tópica. Se contempla que una vacuna de virus líquida estable de la presente invención también puede administrarse mediante el agua de bebida y/o alimentos del porcino receptor.

Las vacunas (incluyendo las vacunas multivalentes) de la presente invención se pueden administrar también como parte de un tratamiento combinado, es decir, una tratamiento que incluye, además de la propia vacuna, administrar uno o más agentes activos adicionales, tratamientos, etc. En este caso, debe reconocerse que la cantidad de vacuna que constituye una cantidad "terapéuticamente eficaz" puede ser más o menos que la cantidad de vacuna que constituiría una cantidad "terapéuticamente eficaz" si la vacuna fuera a administrarse sola. Otras terapias pueden incluir aquellas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, analgésicos, medicaciones reductoras de la fiebre, expectorantes, medicaciones antiinflamatorias, antihistaminas, y/o administración de fluidos.

El nivel de inmunogenicidad puede determinarse experimentalmente por la titulación de la dosis de vacuna, y por las técnicas de estudio del estímulo generalmente conocidas en la materia. Dichas técnicas incluyen normalmente la vacunación de numerosos sujetos animales con la vacuna en diferentes dosificaciones y a continuación estimular los sujetos animales con el virus virulento para determinar la dosis protectora mínima.

Los factores que afectan el régimen de dosificación preferido pueden incluir, por ejemplo, la raza (por ejemplo, de un cerdo), la edad, el peso, la dieta, la actividad, el tamaño del pulmón y la dolencia del sujeto; la ruta de administración; la eficacia, la seguridad, y los perfiles de duración de la inmunidad de la vacuna concreta utilizada; cualquiera que sea el sistema de administración utilizado; y cualquiera que sea la vacuna administrada como parte de una combinación de fármacos y/o vacunas. Por lo tanto, la dosificación realmente empleada puede variar para animales específicos, y, por lo tanto, puede desviarse de las dosificaciones típicas que se muestran anteriormente. Determinar dichos ajustes de la dosificación está generalmente comprendido en los conocimientos de los expertos en la técnica del desarrollo de vacunas usando medios convencionales.

De manera similar, el volumen con el que se puede administrar dicha dosis normalmente se encuentra entre 0,1 ml (aplicaciones intradérmicas) y 2,0 ml. Un intervalo típico para el volumen de administración es entre 0,2 y 1,0 ml, y aproximadamente 0,2 a 0,5 ml para administración intradérmica.

Se contempla que la vacuna puede administrarse a la vacuna receptora como en una única vez o, como alternativa, dos o más veces durante días, semanas, meses o años. En algunas realizaciones, la vacuna se administra al menos dos veces. En determinadas realizaciones similares, por ejemplo, la vacuna se administra dos veces, administrándose con la segunda dosis (por ejemplo, un refuerzo) al menos 2 semanas después de la primera dosis. En realizaciones particulares, la vacuna se administra dos veces, administrándose la segunda dosis de forma no superior a 8 semanas después de la primera dosis. En otras realizaciones, la segunda dosis se administra desde 1 semana a 2 años después de la primera dosis, desde 1,5 semanas a 8 semanas después de la primera dosis, o desde 2 a 4 semanas después de la primera dosis. En otras realizaciones, la segunda dosis se administra aproximadamente 3 semanas tras la primera dosis.

En las realizaciones anteriores, la primera y las posteriores dosificaciones pueden variar, tal como en una cantidad y/o forma. Con frecuencia, sin embargo, las dosificaciones son iguales en cantidad y forma. Cuando solo se administra una única dosis, la cantidad de vacuna en la dosis comprende generalmente solo una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna. Cuando, sin embargo, se administra más de una dosis, las cantidades de vacunas en aquellas dosis juntas pueden constituir una cantidad terapéuticamente eficaz. Además, se puede administrar una vacuna inicialmente, y a continuación se puede administrar un refuerzo de 2 a 12 semanas después, como se ha analizado anteriormente. Sin embargo, las administraciones posteriores de la vacuna pueden realizarse sobre una base anual (1 año) o bianual (2 años), con respecto a si se administró un refuerzo no.

Las vacunas de la presente invención también pueden contener un antibacteriano, tal como un antibiótico. Los ejemplos de tales antibióticos pueden incluir: 10-1000 µg/ml de gentamicina, 0,5-5,0 µg/ml de anfotericina B, 10-100 µg/ml de tetraciclina, 10-100 unidades/ml de nistatina (micostatina), 10-100 unidades/ml de penicilina, 10-100 µg de estreptomycin, 10-100 µg de polimixina B y 10-100 µg de neomicina.

La presente invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que se proporciona como ilustrativo de la presente invención. El siguiente ejemplo se presenta con el fin de ilustrar de manera más completa las realizaciones de la invención. No debe interpretarse de ningún modo, sin embargo, como limitante del amplio alcance de la invención.

Ejemplo

ESTABILIDAD DE LAS VACUNAS LÍQUIDAS DE VIRUS PORCINO**MATERIALES Y MÉTODOS**

5

Preparación de antígeno a granel: Se obtuvo el antígeno del virus PRRS a granel congelado y se mantuvo a -50°C hasta el momento de mezclar la vacuna. El antígeno a granel de PRRS tiene un título de aproximadamente 9 logs $\log_{10}(\text{DEI}_{50})$.

- 10 *Materiales:* La sacarosa de la farmacopea (USP) o sacarosa y sorbitol de calidad superior se adquieren de Fisher Scientific. El monohidrocloreto de L-arginina de calidad de biología molecular con una pureza superior al 98 % se compra a Sigma. Las soluciones de NZ Amina (bloom 250) se preparan a partir de los mejores reactivos comerciales disponibles. Las siguientes soluciones han sido preparadas y esterilizadas por autoclave o filtración de $0.2\ \mu\text{m}$: 80 % (p/v) de sacarosa, 70 % (p/v) de sorbitol, Monoclorhidrato de L-arginina 2,3 M (pH 7,2), solución de clorhidrato de metionina al 5 % (p/v), 45 % (p/v) de polivinilpirrolidona K-60, ácido etilendiaminotetraacético 0,5 M (EDTA), Pleuronic F-68, ácido glutámico 3 M, sal monosódica, tampón de fosfato de potasio 1,0 M (pH 7,2), solución de caldo de fosfato de triptosa (TPB) y 250 mg/ml de gentamicina. Las soluciones madre se resumen en la Tabla 2A.

- 20 *Solución estabilizadora y ajuste de pH de la mezcla de vacunas:* El pH de la mezcla final de la vacuna puede ser crítico para la estabilidad del virus en el líquido. El pH se mide usando una sonda de pH y un medidor muy sensibles. El medidor muestra el pH a 3 cifras significativas a la derecha del decimal. Hay una sonda de temperatura separada con medidor y ambos deben estar en la solución y ser estables. Este medidor de pH es capaz de una curva de calibración de 5 puntos, siendo 3 puntos un mínimo absoluto. Durante la preparación de la mezcla de vacuna, el pH de la solución estabilizadora se ajusta al pH objetivo antes de añadir el antígeno del virus, y el pH se mide nuevamente después de mezclar las soluciones estabilizadoras y los antígenos del virus.

- 30 *Preparación de las soluciones estabilizantes:* Una vez que se ha realizado el ajuste de pH inicial, todas las formulaciones se esterilizaron por filtración usando un filtro de $0,2\ \mu\text{m}$ (PES es la matriz de filtro preferida simplemente debido a la capacidad de filtro mejorada). Actualmente la filtración se realiza utilizando vacío. Un beneficio secundario del filtrado al vacío es la eliminación de gases adicional de la formulación. Después de que la formulación se haya esterilizado por filtración, se rocía con gas argón para aumentar el agotamiento de O_2 , lo que con suerte producirá una menor reactividad de la formulación con el tiempo. Una vez que se completa el rociado, se coloca una capa de argón antes del almacenamiento y se realiza un sellado hermético. Después de preparar la formulación, el pH se confirma/ajusta a pH 7,2 a la temperatura deseada (por ejemplo, 4°C , 15°C o 25°C), es decir, para muchos experimentos realizados en el presente documento, la temperatura deseada fue de 4°C . Si la formulación y los procedimientos anteriores se han realizado correctamente, el pH debe estar cerca del pH objetivo. Con una incubación durante la noche, el pH puede variar ligeramente debido a la finalización de las reacciones químicas asociadas al ajuste anterior del pH y la eliminación de gases.

- 40 *Descongelación del antígeno en masa del virus:* Los antígenos congelados se descongelan lentamente a temperatura ambiente ($15\text{--}30^{\circ}\text{C}$) o a temperatura refrigerada ($2\text{--}8^{\circ}\text{C}$). El antígeno descongelado debe mantenerse a $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ durante no más de 8 horas antes de su uso.

- 45 *Preparación de la mezcla de vacuna:* Para hacer una mezcla de 100 ml de vacuna, se calculó el volumen de cada solución madre requerida para alcanzar la concentración final para cada componente como se enumera en la Tabla 2B y luego se añadió a un recipiente esterilizado primero, y los estabilizadores y excipientes se mezclaron usando una barra de agitación. Después de que las soluciones estabilizadoras y todos los excipientes se mezclaron completamente, los antígenos del virus en el volumen indicado se añadieron al recipiente y se mezclaron completamente. Se evitó la generación de burbujas y espumas durante este paso de mezcla. Cuando el virus se añade en un período de tiempo muy corto (unos pocos minutos), entonces se puede añadir el virus sin más problemas. Cuando el virus no se añade de inmediato, se coloca una capa de argón para desplazar el O_2 residual. Una vez que se ha añadido el virus, se coloca una nueva capa de argón antes de mezclar. El gas argón se añade a la botella utilizando un caudal bajo. Después de completar la mezcla de la vacuna, la mezcla de la vacuna se mantiene a $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ hasta que se dispense en pequeñas alícuotas.

- 55 *Llenado de las vacunas:* La mezcla de la vacuna se dispensó en viales de ampolla de vidrio a 1,8 ml por vial. Cada vial se vuelve a llenar y se superpone con gas argón. Los viales de las ampollas se sellaron al fuego, se etiquetaron y luego se transfirieron a cajas, y se almacenaron en la incubadora a la temperatura designada.

- 60 *Pruebas de estabilidad a temperatura elevada y condiciones en tiempo real:* Las vacunas líquidas de PRRS en viales de ampolla se almacenaron a 27°C y 4°C respectivamente en las incubadoras correspondientes. En el punto de tiempo designado, se recuperaron 2 o más viales de cada formulación y se midió el título de cada antígeno mediante un ensayo de valoración de virus basado en cultivo de células de tejido.

MÉTODOS ANALÍTICOS

Ensayo de titulación de PRRSv: La infectividad de las muestras de prueba que contienen PRRSv se determina mediante valoración en células de cultivo de tejidos susceptibles, preferentemente líneas celulares de riñón de mono verde africano tales como MARC145 o MA104. Tres o cuatro días antes del ensayo, las células se siembran en placas o platos de cultivo adecuados, tales como placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos.

A continuación, el ensayo se describe para placas de cultivo de tejidos estándar de 96 pocillos: Las células en crecimiento activo se siembran a 5×10^4 células/pocillo en medio de ensayo (por ejemplo, Medio Esencial Mínimo de Dulbecco, suplementado con HEPES 10 mM, L glutamina 2 mM, 60 µg/ml de gentamicina y suero bovino fetal al 7 %), y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% en una incubadora humidificada hasta su uso en el ensayo. El día del ensayo, se preparan diluciones en serie apropiadas de las muestras de prueba se preparan en medios de ensayo en tubos de dilución, por ejemplo tubos de vidrio o tubos de polipropileno. Por ejemplo, se pueden preparar diluciones de 10 veces añadiendo 0.2 ml de muestra de prueba sin diluir a 1,8 ml de medio de ensayo, mezclando brevemente por medio de un mezclador vórtex, transfiriendo 0,2 ml de la mezcla a un tubo de ensayo separado que contiene 1,8 ml de medio de ensayo, y así sucesivamente.

Para cada muestra de ensayo, una placa de 96 pocillos se retira de la incubación y los medios se eliminan invirtiendo la placa y "vertiendo" asépticamente los medios en un recipiente adecuado. La muestra se prueba añadiendo 0,1 ml de cada dilución a cada uno de los 10 pocillos en la placa. Las diluciones se añaden desde la dilución más alta a la dilución más baja a analizar. A continuación, la incubación se continúa durante 7 días adicionales.

Tras la incubación, las placas pueden leerse observando visualmente los efectos citopáticos (CPE) usando un microscopio óptico con un aumento de 100-1000x, o macroscópicamente después de teñir con cristal violeta (CV). En el método de CV, se prepara una solución madre disolviendo 5 g de polvo CV por 100 ml de etanol al 95 %, seguido de la adición de un volumen igual de formaldehído (solución madre al 37 %) y la adición de agua desionizada o de mejor calidad a un volumen final de 1.000 ml por 100 ml de etanol. Los medios se eliminan de las placas de 96 pocillos mediante "vertido" y la solución madre de CV se añade cuidadosamente a 0,15 ml/pocillo sin alterar las monocapas restantes. La placa se deja a temperatura ambiente durante 15 minutos, después de lo cual la solución CV se elimina mediante "vertido". A continuación, los pocillos se enjuagan cuidadosamente con agua corriente. Finalmente, el agua se elimina por "vertido".

Se observa en cada pocillo la ausencia de monocapas intactas y la presencia de CPE característico indicativo de infección por PRRSv tanto para el método CPE como para el método CV. Los pocillos se califican como positivos o negativos para detectar signos de infección por PRRSv. Los títulos de virus se calculan de acuerdo con el método de Spearman y Kärber, y se expresan como Log₁₀ DICT₅₀/ml.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En la Tabla 2B a continuación, se enumeran 10 formulaciones estables en líquido para vacunas de virus porcino de la presente invención. La formulación 11 es una triptona, formulación de lactosa que fue diseñada en vista de la metodología de liofilización que se empleó hasta ahora para estabilizar las vacunas de virus porcino vivo. En pruebas aceleradas realizadas a 27 °C, la formulación estándar de liofilización (Formulación 11) comenzó a fallar inmediatamente, véase la Tabla 3 a continuación. En el estudio de estabilidad en tiempo real correspondiente a 2 °C -7 °C, el título de todas las formulaciones fue comparable a la formulación 2 (véase la Tabla 2B a continuación). El título de todas las 10 variaciones de esta formulación parece permanecer relativamente estable a 2 °C -7 °C durante al menos 6 meses, el punto de tiempo final medido. En contraste directo, el título de la formulación 11 está disminuyendo considerablemente en este punto de tiempo de 6 meses, habiendo perdido cerca de 1,5 logs en su título, véase, la Tabla 4 a continuación.

TABLA 2A

SOLUCIONES MADRE		
Componente	Concentración	pH
Sacarosa	80 % (p/v)	N/A
Sorbitol	70 % (p/v)	N/A
clorhidrato de L-arginina	2,3 M	pH 7,2
Clorhidrato de L-metionina	5 % (p/v)	pH 7,2
Polivinilpirrolidona K-60	45 % (p/v)	N/A
EDTA	0,5 M	pH 7,2
Pleuronic F-68	100 %	N/A
ácido L-glutámico, sal monosódica	3 M	pH 7,2
Tampón fosfato potásico	1 M	pH 7,2
Solución de sulfato de gentamicina	250 mg/ml	N/A
N/A indica que el pH no se ajustó.		

TABLA 2B
FORMULACIONES

	Sacr. (% p/v)	Sorb. (% p/v)	ARG (M)	MET (% p/v)	GLU (M)	EDTA (mM)	F-68 (µl/ml)	K-60 PVP (% w/v)
1	10	15	0,3					
2		15	0,3					
3		15	0,3	1,0		0,5	0,8	
4		15	0,3					0,5
5	20		0,3	1,0		0,5	0,8	
6		15	0,3			0,5	0,8	
7		15	0,3			2,0		
8		15	0,3		0,25			
9		15	0,25					
10		15	0,46					

Las 10 formulaciones se prepararon en tampón de fosfato de potasio pH 7,3; sacarosa (Sacr.), sorbitol (Sorb.), arginina (ARG), metionina (MET), ácido glutámico (GLU), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), tensioactivo no iónico Pluronic F-68 (F-68), polivinilpirrolidona K-60 (K-60 PVP) se incluyeron como se indica.

Tabla 3
PRUEBAS DE ESTABILIDAD a 27 °C

Formulcn.	0 Tiempo	2 semanas	4 semanas	6 semanas
1	6,2	4,4	3,6	0,7
2	5,6	4,6	3,6	1,0
3	6,3	4,8	3,5	0,7
4	6,0	5,0	3,4	1,0
5	6,3	4,9	2,8	0,6
6	5,9	5,1	3,6	1,3
7	5,8	4,7	3,6	1,1
8	5,9	3,9	0,5	0,5
9	6,1	5,0	3,1	0,7
10	5,8	4,5	0,6	0,6
11	6,2	1,4	0,5	0,5
Control	6,5	6,7	6,7	6,6

Los valores proporcionados son el virus Log DICT50. Los tiempos representan los tiempos de almacenamiento a 27 °C. Todas las formulaciones (Formulcn.) se describen en la Tabla 2B anterior, excepto una formulación comercial (Formulación 11). El control es una muestra de la Formulación 11 que se mantiene congelada antes del ensayo. La formulación 11 comprende: 3,75 % (p/v) de Bacto Triptona; 1,5 % (p/v) de dextrano; 0,1 % (p/v) de gelatina; 5,0 % (p/v) de lactosa; 0,1 % (p/v) de glutamato de sodio; 0,5 % (p/v) de la Fracción V de albúmina y tamponada con fosfato de potasio monobásico y dibásico.

TABLA 4
PRUEBAS DE ESTABILIDAD a 2° -7 °C

Formulcn.	0 Tiempo	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses
1	6,2	6,5	5,8	6,13	5,55
2	5,6	6,5	6,1	6,25	5,95
3	6,3	6,5	6,3	6,38	5,9
4	6,0	6,3	6,2	6,25	5,9
5	6,3	6,8	6,3	6,53	6,2
6	5,9	6,5	6,4	6,40	5,8
7	5,8	6,4	6,2	6,28	5,9
8	5,9	5,7	5,3	5,48	5,15
9	6,1	6,3	6,0	6,13	5,65
10	5,8	6,0	5,9	5,93	5,7
11	6,2	6,3	5,6	5,95	4,75
Control	6,5	6,7	6,7	6,7	6,7

Los valores proporcionados son el virus Log DICT50. Los tiempos representan los tiempos de almacenamiento a 2 °C -7 °C. El control es una muestra de la Formulación 11 que se mantiene congelada antes del ensayo. Las formulaciones (Formulcn.) se describen en la Tabla 2B anterior, excepto la formulación comercial (Formulación 11) que se describe en la Tabla 3 anterior.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna líquida estable que comprende un virus porcino vivo, el 10-30 % (p/v) del alcohol de azúcar sorbitol y de 0,3 a 0,5 M del aminoácido arginina; en donde la vacuna líquida estable comprende un tampón fosfato de 10 a 20 mM, y tiene un pH de 6,0 a 8,0; en donde el virus porcino vivo es el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino vivo atenuado.
2. La vacuna líquida estable de la reivindicación 1, que comprende además un aditivo de azúcar que es un alcohol no de azúcar, en donde la cantidad total del alcohol de azúcar y el alcohol no de azúcar en la vacuna líquida estable es del 15-40 % (p/v).
3. La vacuna líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el alcohol no de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa y trehalosa.
4. La vacuna líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un virus porcino muerto.
5. La vacuna líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una bacteria.
6. La vacuna líquida estable de la reivindicación 5, en la que la bacteria se selecciona del grupo que consiste en una *Pasteurella multocida* viva atenuada, una *Salmonella ssp.* viva atenuada, una *Mannheimia haemolytica* viva atenuada, una *Clostridium perfringens* viva atenuada, una *Lawsonia intracellularis* viva atenuada y cualquier combinación de las mismas.
7. La vacuna líquida estable de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende el 10-20 % (p/v) de sorbitol y el 5-15 % (p/v) de un alcohol no de azúcar.
8. El virus vivo atenuado del síndrome reproductivo y respiratorio (PRRS) en una vacuna líquida estable que comprende el 10-30 % (p/v) de sorbitol y de 0,3 a 0,5 M de arginina, en donde la vacuna líquida estable comprende un tampón fosfato de 10 a 20 mM y tiene un pH de 6,0 a 8,0 para su uso en un método para ayudar en la protección de los cerdos contra una enfermedad clínica que surge de una infección con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio Porcino, mediante la administración de la vacuna a un cerdo.
9. El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino vivo atenuado en una vacuna líquida estable que comprende el 10-30 % (p/v) de sorbitol y de 0,3 a 0,5 M de arginina, en donde la vacuna líquida estable comprende un tampón fosfato de 10 a 20 mM y tiene un pH de 6,0 a 8,0, para su uso en el método de la reivindicación 8, en donde dicha administración se realiza por vía oral, inyectable (subcutánea, intramuscular o intradérmica) o nasal.
10. Un método para preparar la vacuna líquida estable de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende combinar una cantidad terapéuticamente efectiva de virus PRRS vivo atenuado con el 10-30 % (p/v) de sorbitol y de 0,3 a 0,5 M de arginina; en donde la vacuna líquida estable comprende un tampón fosfato de 10 a 20 mM y tiene un pH de 6,0 a 8,0.