



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0614601-5 A2**

(22) Data de Depósito: 31/07/2006
(43) Data da Publicação: 31/01/2012
(RPI 2143)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 47/18
A61K 47/42

(54) **Título:** FORMULAÇÃO DE VACINA ANIMAL;
COMPONENTE ESTABILIZADOR; VACINA ANIMAL;
PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UMA
FORMULAÇÃO DE VACINA ANIMAL; ESTABILIZADOR
DE VACINA; E COMPONENTE ESTABILIZADOR DE
VACINA

(30) **Prioridade Unionista:** 04/08/2005 US 60/705,508

(73) **Titular(es):** WYETH

(72) **Inventor(es):** ANDREW D. CHU, JASON M. HANSEN, JEFF
H. RODENBERG, MAHESH KUMAR

(74) **Procurador(es):** Trench, Rossi e Watanabe

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006029849 de
31/07/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/019128de
15/02/2007

(57) **Resumo:** FORMULAÇÃO DE VACINA ANIMAL;
COMPONENTE ESTABILIZADOR; VACINA ANIMAL; PROCESSO DE
PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE VACINA ANIMAL;
ESTABILIZADOR DE VACINA; E COMPONENTE ESTABILIZADOR
DE VACINA. Uma formulação para uma vacina animal é
proporcionado. A formulação de vacina contém um componente
estabilizador e um imunógeno viral. O componente estabilizador inclui
uma proteína de base animal substancialmente isenta de BSE/TSE e
uma proteína de base vegetal. O componente estabilizador
proporciona a solubilização de uma vacina durante os seus períodos
de armazenamento e administração.



"FORMULAÇÃO DE VACINA ANIMAL; COMPONENTE ESTABILIZADOR; VACINA ANIMAL; PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE VACINA ANIMAL; ESTABILIZADOR DE VACINA; E COMPONENTE ESTABILIZADOR DE VACINA".

5

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a estabilizadores de vacinas e, mais particularmente, a estabilizadores à base de proteínas para vacinas de vírus vivas e vivas atenuadas, que são substancialmente isentas de encefalopatia espongiforme bovina (BSE) e encefalopatia espongiforme transmissível (TSE). A presente invenção também se refere a formulações de vacinas veterinárias contendo estabilizadores de fontes vegetais e de fontes animais, que são substancialmente isentas de BSE e TSE.

15

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os organismos virais vivos e vivos atenuados usados em vacinas são sensíveis a variações nos seus meios físico e degradam, quando expostos a condições subótimas. Desse modo, estabilizadores de vacinas são usados como agentes adicionados a vacinas líquidas, congeladas ou liofilizadas, para manter as potência e eficiência das vacinas. Frequentemente, esses estabilizadores são incorporados à vacina durante preparação delas e as estabilizam durante todo o período de manufatura, armazenamento e administração delas. Os estabilizadores conferem um maior tempo de vida útil à vacina, até que essa esteja pronta para administração. Ainda que os estabilizadores de vacinas sejam efetivos ao estender a potência delas pelos processos de

manufatura e armazenamento, novas preocupações de saúde devem ser consideradas quando da seleção do tipo de estabilizador e da sua fonte.

Vários processos são conhecidos para a produção de vacinas virais vivas e vivas atenuadas contendo estabilizadores. Os estabilizadores de vírus de vacinas tradicionais são freqüentemente compreendidos de proteínas animais, juntamente com açúcares, para estabilizar o vírus. As proteínas derivadas de ruminantes, tais como as proteínas do leite, os estabilizadores Pharmatone® e Peptone®, são comumente usadas no processo de estabilização. Pharmatone® (American Labs, Inc., Omaha, NE) é obtido por hidrólise térmica e digestão peptídica de tecidos de carne de vaca. Bacto Peptone® (Difco Laboratories, Inc., Tucker, GA) é um material digerido enzimático de proteínas animais.

Além disso, o pedido de patente U.S. 2003/0215455 (20 de novembro de 2003) (B. Reynolds et al.) descreve um estabilizador de vacinas, que compreende um agente redutor, um tampão, um estabilizador térmico, um açúcar e água. Essa referência também descreve como utilizar um agente colorante, para servir como uma referência visual a um cuidador de animal, para identificar positivamente a presença da vacina, na sua próprio fonte de água integral, para disseminação em um rebanho de animais.

A patente U.S. 5.733.555 (31 de março de 1998) (H. J. Chu) descreve uma formulação, que compreende um vírus modificado combinado com um estabilizador, um veículo ou diluente. Além disso, a formulação compreende ainda um

adjuvante, que está presente em uma concentração final de cerca de 1-25% (v/v) e, de preferência, 5% (v/v).

A patente U.S. 6.258.362 (10 de julho de 2001) (P. T. Loudon et al.) se refere a uma composição farmacêutica
5 seca, dispersível em um líquido aquoso ou em um injeção, contendo um vírus, um polissacarídeo ou uma fonte de aminoácidos mistos, um tampão e um mono- ou oligossacarídeo ou derivados deles. No entanto, a fonte do aminoácido é necessariamente de origem vegetal ou bacteriana. Substanci-
10 almente, as fontes de proteínas ou de tecidos de aminoácidos isentas de TBE/BSE, tal como leite de vaca, não são descritas. As composições incluem exemplos livres de proteínas animais e hidrolisados delas ou de outros materiais de origem animal.

15 Como consequência direta da TSE e das ameaças relacionadas (isto é, BSE) em fontes ruminantes, fontes de proteínas alternativas estão sendo atualmente consideradas para uso como estabilizadores de vacinas. De uma maneira geral, acredita-se que os graus mais altos de infectuosidade
20 de TSE/BSE sejam encontrados no cérebro e no cordão espinhal de animais ruminantes, nos estágios finais de doença clínica. Os cientistas verificaram que diferentes tecidos de ruminantes contêm diferentes proporções do agente BSE. Alguns tecidos, tais como do músculo esquelético e do leite,
25 nunca foram mostrados como tendo muita, se alguma infectuosidade. No entanto, outras proteínas e gelatinas, que podem ser igualmente usadas como estabilizadores em vacinas, são originárias de outros tecidos, incluindo ossos bovinos. Em

virtude de que os métodos de matança e de abateimento usados para obter os tecidos e preparar os materiais pode afeta o grau de infectuosidade, que pode estar presente, parece que apenas as proteínas e açúcares originários do leite de vaca
5 podem apresentar pouco ou nenhum risco de TSE/BSE. Além disso, as fontes de não ruminantes, tais como plantas e vegetais, apresentam potencialmente uma das únicas fontes livre de risco de TSE/BSE de proteínas estabilizadoras.

Desse modo, as deficiências associadas com os
10 estabilizadores de vacinas de animais conhecidos são duplas. A primeira é o uso de proteínas base de animais de fontes que possuem uma ameaça potencial de TSE/BSE. A segunda é o uso de proteínas de base vegetal isentas de BSE/TSE apenas em vacinas que vão incluir proteínas de base animal
15 benéficas de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE.

À luz dessas observações, há uma necessidade na técnica para desenvolver um estabilizador de vacina compreendendo proteínas de fontes substancialmente isentas de BSE/TSE, que incluem ambas as fontes vegetais e animais. Há
20 também uma necessidade para desenvolver uma formulação de vacina para uso veterinário, que contenha um componente solubilizador derivado tanto de fontes vegetais quanto de fontes de base animal, que sejam substancialmente isentas de BSE ou TSE.

25

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, proporciona-se uma formulação de vacina animal, que consiste essencialmente de um imunógeno viral, e um componente estabilizador,

contendo uma proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE e uma proteína de base vegetal. Além disso, de acordo com a presente invenção, uma fonte de proteína substancialmente isenta de BSE/TSE vai ser, de preferência, leite de ruminante. As proteínas de base vegetal podem ser originárias de vegetais ou de uma espécie de planta, como já descrito acima.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma vacina animal, que inclui um componente estabilizador, como apresentado acima, e inclui ainda um tampão e açúcar. Embora os fosfatos, carboxilatos e bicarbonatos sejam os preferidos, outros agentes de tamponamento adequados podem ser usados. A fonte de açúcar inclui, tipicamente, sacarídeos, mas outros agentes de retenção de umidade, tais como carboidratos e álcoois de açúcar também possam ser incluídos.

Em mais um outro aspecto, a presente invenção proporciona um método para a preparação de uma formulação de vacina animal. A preparação inclui a formação de um componente estabilizador, que inclui uma proteína de base vegetal em um diluente. Uma proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE é adicionada como parte do componente estabilizador. Adicionalmente, um tampão e um açúcar podem ser adicionados. O componente estabilizador pode ser também, se desejado, esterilizado. Subseqüente à esterilização do componente estabilizador, uma formulação de vacina é obtida pela adição de um imunógeno viral ao componente estabilizador. A liofilização da formulação de

vacina produz uma vacina estabilizada, adequada para longos períodos de armazenamento.

Como uma outra parte da invenção, proporciona-se também um estabilizador de vacina, que consiste essencialmente de um estabilizador de proteína vegetal e um estabilizador de proteína animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE.

Outros objetos e aspectos da invenção vão ficar evidentes da descrição detalhada e das reivindicações apresentadas a seguir.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Há uma necessidade para uma formulação de vacina animal contendo um imunógeno viral, juntamente com um estabilizador contendo uma proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE e uma proteína de base vegetal. A presente invenção é dirigida a outras soluções para satisfazer essa necessidade.

Como aqui usado, "imunógeno viral" vai tipicamente denotar um vírus vivo ou vivo atenuado, ou uma parte dele. Um vírus atenuado é um vírus que foi alterado, tipicamente por passagem em células de cultura de tecido, para atenuar essa capacidade de provocar doença, mas que mantém a sua capacidade de proteção contra doença ou infecção, quando administrado a animais. Os exemplos incluem, mas não são limitados a, imunógenos vivos e vivos atenuados desses animais, tais como vacas, cavalos, porcos, carneiros, aves comestíveis, incluindo frangos, patos e pombos, cães, gatos e outras espécies veterinárias, em particular, mamíferos. Os

imunógenos ilustrativos incluem, mas não são limitados a, Bordetella bronchiseptica, adenovírus canino tipo 2 (CAV-2), indisposição canina, vírus da parainfluenza canina, parvovírus canina (CPv), calicivírus felino (FCV), rinotraqueíte
5 felina, penleucopenia, vírus pseudoráveis porcos (PRV), arterite eqüina (EAV), vírus rinotraqueíte bovino, vírus da parainfluenza bovina (PI3), vírus sincitial respiratório bovino (ERSV), doença viral bovina do Tipo I e do Tipo II (BCT Tipo I e Tipo II). Os imunógenos de aves comestíveis
10 ilustrativos incluem, mas não são limitados a, vírus de bronquite infecciosa aviária (IBV), vírus da doença Newcastle (NDV), Vírus de Doença Bursal Infecciosa (IBDV), vírus Laringotraqueíte Infeccioso (ILT), vírus encéfalo-mielite aviário (AE), poxvírus aviário ou reovírus aviário.
15 O uso das formulações da presente invenção para imunógenos de aves comestíveis é particularmente vantajoso, pelo fato de que esses imunógenos são tipicamente fornecidos ao usuário final como produto liofilizado, de modo que os estabilizadores são necessários para garantir potência
20 integral, por reconstituição antes da administração da vacina ao animal alvo.

O lago de imunógenos vivos ou vivos atenuados pode ser puro ou em solução, dependendo da concentração da carga de imunógenos. Se o título for alto, pode precisar ser
25 diluído para obter a concentração alvo.

O imunógeno viral é incluído como parte da formulação de vacina, como aqui apresentado. Tipicamente, o imunógeno viral pode ser adicionado como parte de uma

solução padrão para o imunógeno de interesse. A carga do imunógeno viral pode variar, mas vai estar, freqüentemente, dentro da faixa de cerca de 0,001 a 50% (peso/volume), de preferência, dentro da faixa de cerca de 0,01 a 10%. Uma
5 pessoa versada na técnica pode otimizar a proporção de imunógeno, com base nos atributos particulares da formulação de vacina final desejada. Por exemplo, um imunógeno de vacina mais potente ou mais forte pode requerer, por exemplo, menos concentração na formulação de vacina final. A proporção de
10 imunógeno de vacina apresentada acima na formulação de vacina não é inclusiva de qualquer diluente (tal como água), ou outro meio de suspensão ou veículo (tal como óleo).

Um outro componente da formulação de vacina da invenção é um componente estabilizador. "Componente estabi-
15 lizador" denota uma combinação de uma proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE e uma proteína de base vegetal, que estabiliza a formulação de vacina durante armazenamento e administração dela. O componente estabilizador pode compreender cerca de 0,01 - 30%
20 (peso/volume) da formulação de vacina animal, particularmente, cerca de 0,05-15% (peso/volume) e, especialmente, cerca de 1-10% (peso/volume).

Como parte do componente estabilizador, há uma proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta
25 de BSE/TSE. Uma "proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE" se refere a proteínas que são originárias de leite de ruminantes, e de outras fontes, por exemplo, a carne de músculo, de um animal,

particularmente, um mamífero, que são provavelmente isentas de contaminação de BSE e TSE. As proteínas de base animal adequadas incluem, mas não são limitadas a, extratos de proteínas digeridos, tais como N-Z-Amine[®], N-Z-Amine AS[®] e
5 N-Z-Amine YT[®] (Sheffield Product Co., Norwich, N.Y.), que são materiais hidrolisados enzimáticos de caseína de leite bovino. A N-Z-Amine YT[®] é a proteína de base animal preferida para uso na presente invenção.

A proteína de base animal pode compreender cerca
10 de 0,001-15% (peso/volume) do componente estabilizador, particularmente, cerca de 0,01-10% (peso/volume) dele. A proteína de base animal vai compreender ainda cerca de 0,0001-3% (peso/volume), particularmente, cerca de 0,001-2% (peso/volume) da formulação de vacina.

15 Uma outra parte do componente estabilizador é a proteína de base vegetal. As proteínas de base vegetal podem incluir, sem limitação, proteína de soja, proteína de trigo, glúten de milho, proteína de arroz e proteína de cânhamo, entre outros. As proteínas de base vegetal preferidas são as
20 proteínas de soja e glúten de milho. O glúten de milho é uma mistura de várias proteínas derivadas de milho. As proteínas de soja podem incluir 100% de proteína de soja (disponível como VegeFuel[®] pela Twinlab), proteína de soja texturizada e material digerido enzimático de soja. A proteína de soja
25 texturizada é uma proteína de soja, que é produzida de farinha de soja, que é comprimida e processada em grânulos ou nacos. O material digerido enzimático de soja inclui

peptonas, que resultam da hidrólise parcial de proteínas de soja.

A proteína de base vegetal pode compreender cerca de 0,001-30% (peso/volume) do componente estabilizador, particularmente, cerca de 0,01-10% (peso/volume) dele. A
5 proteína de base vegetal vai compreender ainda cerca de 0,0001-6% (peso/volume), particularmente, cerca de 0,001-4% (peso/volume) da formulação de vacina final. A razão de proteína de base vegetal para proteína de base animal pode
10 variar, de preferência, de cerca de 1:1 a cerca de 3:1 e, particularmente, vai ser na faixa de cerca de 2:1.

Um diluente, de preferência, água, vai compreender tipicamente o restante do componente estabilizador, até 100%.

15 A formulação de vacina da invenção pode incluir, adicionalmente, um açúcar biologicamente aceitável para retenção de umidade, durante o processo de liofilização, já descrito acima. O açúcar é selecionado do grupo incluindo, mas não limitado a, glicose, dextrose, lactose, sacarose,
20 manose e frutose, e assemelhados. A sacarose é o açúcar preferido na formulação da presente invenção. O açúcar pode compreender cerca de 0,001-6% (peso/volume) da formulação de vacina, particularmente, cerca de 0,001-4% (peso/volume). Se desejado, o componente açúcar pode ser incluído como parte
25 do componente estabilizador, durante a sua preparação. Uma pessoa versada na técnica pode reconhecer que uma razão aproximada de 1:1 de componente açúcar para proteína de base vegetal na formulação final pode ser desejável.

A formulação de vacina pode incluir, adicionalmente, um tampão biologicamente aceitável, para manter um pH próximo do neutro (7,0-7,3). Esses tampões preferivelmente usados são, tipicamente, fosfatos, carboxilatos e bicarbonatos. Os agentes de tamponamento particularmente preferidos são fosfato de sódio, fosfato de potássio, citrato de sódio, lactato de cálcio, succinato de sódio, glutamato de sódio, bicarbonato de sódio e bicarbonato de potássio. O tampão pode compreender cerca de cerca de 0,001-5% (peso/volume) da formulação de vacina, particularmente, cerca de 0,001-1% (peso/volume). O ou os tampões podem ser adicionados como parte do componente estabilizador, durante a sua preparação, se desejado.

Outros excipientes, se desejados, podem ser incluídos como parte da formulação de vacina final.

O restante da formulação de vacina é um diluente aceitável, a 100%, incluindo água. A formulação de vacina pode ser também formulada como parte de uma emulsão de água-em-óleo ou de óleo-em-água. Uma pessoa versada na técnica vai ainda reconhecer que os compostos até agora descritos, compreendendo a formulação de vacina, são uma parte integral deles, e não são facilmente analisáveis deles.

Também se proporciona como parte da invenção um processo de preparação da formulação de vacina aqui descrita. A preparação da formulação de vacina ocorre, de preferência, em duas fases. A primeira fase envolve, tipicamente, a preparação do componente estabilizador. Uma solução padrão de proteína de base vegetal é preparada por disso-

lução da proteína de base vegetal em um diluente. O diluente preferido é água, de preferência, destilada e/ou purificada, de modo a remover as impurezas a nível de traços (tal como aquela vendida como Super Q[®] purificada). Em um recipiente separado, uma proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE, é dissolvida em um diluente, adicionalmente com o componente açúcar e aditivos de tampões. N-Z Amine YT[®], uma fonte de alta qualidade de peptídios produzida por hidrólise enzimática de caseína, é uma proteína de base animal preferido, enquanto que água é o diluente preferido. De preferência, um volume igual da solução padrão de proteína de base vegetal é adicionado à solução de proteína de base animal. É desejável que, após ajuste com HCl / KOH para obter um pH de aproximadamente $7,2 \pm 0,1$, o componente estabilizador seja esterilizado por autoclave. A solução estabilizadora pode ser refrigerada por um longo período, antes da introdução do imunógeno.

A segunda fase de preparação da formulação de vacina inclui a introdução do imunógeno vivo ou vivo atenuado com o componente estabilizador, produzindo, desse modo, a formulação de vacina. De preferência, o imunógeno é diluído com uma solução tampão, antes da sua introdução no componente estabilizador.

Uma vez que essa solução de formulação de vacina tenha sido obtida, a formulação é separada em pequenos frascos ou outros recipientes adequados.

A formulação de vacina aqui descrita pode ser depois embalada em ampolas individuais ou multidose, ou ser

subseqüentemente liofilizada (seca por congelamento), antes da embalagem em ampolas individuais ou multidose. A formulação de vacina aqui considerada também inclui a versão liofilizada. A formulação de vacina liofilizada pode ser armazenada por longos períodos de tempo, sem perda de viabilidade em temperaturas ambientes.

A vacina liofilizada pode ser reconstituída pelo usuário final, e administrada a um animal, tipicamente em uma ou duas doses, na faixa de cerca de 1-5 mL de formulação /dose de vacina. Os animais menores, tais como aves comestíveis, podem receber uma dosagem preferida de cerca de 0,01-1 mL, particularmente, cerca de 0,03-0,5 mL.

Os exemplos apresentados a seguir ilustram os aspectos preferidos da invenção, mas não devem ser considerados como limitantes do seu âmbito.

EXEMPLO 1

ETAPA 1: PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO PADRÃO DE PROTEÍNA DE BASE VEGETAL

5,0 g de glúten de milho foram misturados com 50 mL de água purificada. A mistura foi depois moída em um misturador. A mistura foi decantada e o sobrenadante coletado. A solução foi armazenada a 4°C.

ETAPA 2: PREPARAÇÃO DO COMPONENTE ESTABILIZADOR

N-Z Amine YT[®] (2,5 g), sacarose (5,0 g) (Sigma, St. Louis, Mo.) e glutamato monossódico (0,5 g) (Sigma, St. Louis, Mo.) foram adicionados a 50 mL de água (Super Q[®] purificada) e dissolvidos. Calor foi adicionado para aumentar a taxa de dissolução. Essa solução foi adicionada

aos 50 mL da solução de glúten de milho a 10% da etapa 1. O pH foi ajustado a $7,2 \pm 0,1$ com KOH e/ou HCl. A solução foi depois dispensada em recipientes adequados e submetida a uma autoclave a $> 121^{\circ}\text{C}$ ou > 30 minutos. (Essa solução pode ser
5 armazenada a $2-7^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 1 mês.)

ETAPA 3: PREPARAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE VACINA

Preparação do lago de vírus: Um vírus de bronquite infecciosa aviária (IBV), vírus da doença Newcastle (NDV), Vírus de Doença Bursal Infecciosa (IBDV), vírus
10 Laringotraqueíte Infeccioso (ILT), vírus encefalomielite aviário (AE), poxvírus aviário ou reovírus aviário congelado foi ou é descongelado a 37°C . 50 mL do vírus descongelado foram ou são adicionados a um frasco estéril, diluídos com 400 mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato) e o
15 título viral registrado ($\text{EID}_{50}/\text{mL}$).

Preparação da formulação de vacina: 15 mL do componente estabilizador (consultar a etapa 2 acima) foram ou são adicionados a um frasco estéril e diluídos com 85 mL do imunógeno viral diluído da etapa 3a. Essa formulação de
20 vacina foi ou é misturada por 5 - 10 minutos, e o título do imunógeno teórico registrado ($\text{EID}_{50}/\text{mL}$).

Dispensação de alíquotas dos lagos de imunógeno/estabilizador: A formulação de vacina da etapa 3b foi ou é dispensada em alíquotas de 6 mL em frascos de liofilização
25 com paredes salgadas estéreis e agulhas grossas e curtas estéreis. Tampões estéreis foram ou são adicionados a cada pequeno frasco, e os pequenos frascos adicionados ao liofilizador. Após liofilização, os pequenos frascos são reenchidos.

dos com 10-15% de nitrogênio, tampados, vedados por pregas, e armazenados a 4°C.

EXEMPLO 2

ETAPA 1: PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO PADRÃO DE PROTEÍNA DE BASE VEGETAL

5 5,0 g de proteína de soja (VegeFuel® da Twinlab) foram misturados com 50 mL de água purificada. A mistura foi depois moída em um misturador. A mistura foi decantada e o sobrenadante coletado. A solução foi armazenada a 4°C.

ETAPA 2: PREPARAÇÃO DO COMPONENTE ESTABILIZADOR

10 N-Z Amine tipo YT® (2,5 g) (Sheffield Products Co. Norwich, N.Y.), sacarose (5,0 g) (Sigma, St. Louis, Mo.) e glutamato monossódico (0,5 g) (Sigma, St. Louis, Mo.) foram adicionados a 50 mL de água (Super Q® purificada) e
15 dissolvidos. Calor foi adicionado para aumentar a taxa de dissolução. Essa solução foi adicionada aos 50 mL da solução de proteína de soja (VegeFuel® da Twinlab) a 10% da etapa 1. O pH foi ajustado a $7,2 \pm 0,1$ com KOH e/ou HCl. A solução foi depois dispensada em recipientes adequados e submetida a
20 uma autoclave a $> 121^{\circ}\text{C}$ ou > 30 minutos. (Essa solução pode ser armazenada a $2-7^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 1 mês.)

ETAPA 3: PREPARAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE VACINA

Preparação do lago de vírus: Um vírus de bronquite infecciosa aviária (IBV), vírus da doença Newcastle (NDV),
25 Vírus de Doença Bursal Infecciosa (IBDV), vírus Laringotraqueíte Infecciosa (ILT), vírus encefalomielite aviário (AE), poxvírus aviário ou reovírus aviário congelado foi ou é descongelado a 37°C . 50 mL do vírus descongelado foram ou

são adicionados a um frasco estéril, diluídos com 400 mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato) e o título viral registrado (EID_{50}/mL).

Preparação da formulação de vacina: 15 mL do componente estabilizador (consultar o Exemplo 2 acima) foram ou são adicionados a um frasco estéril e diluídos com 85 mL do imunógeno viral diluído da etapa 3a. Essa formulação de vacina foi ou é misturada por 5 - 10 minutos, e o título do imunógeno teórico registrado (EID_{50}/mL).

Dispensação de alíquotas dos lagos de imunógeno/estabilizador: A formulação de vacina da etapa 3b foi ou é dispensada em alíquotas de 6 mL em frascos de liofilização com paredes salgadas estéreis e agulhas grossas e curtas estéreis. Tampões estéreis foram ou são adicionados a cada pequeno frasco, e os pequenos frascos adicionados ao liofilizador. Após liofilização, os pequenos frascos são reenchidos com 10-15% de nitrogênio, tampados, vedados por pregas, e armazenados a 4°C.

EXEMPLO 3

20 ETAPA 1: PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO PADRÃO DE PROTEÍNA DE BASE VEGETAL

5,0 g de proteína de soja texturizada foram misturados com 50 mL de água purificada. A mistura foi depois moída em um misturador. A mistura foi decantada e o sobrenadante coletado. A solução foi armazenada a 4°C.

ETAPA 2: PREPARAÇÃO DO COMPONENTE ESTABILIZADOR

N-Z Amine tipo YT[®] (2,5 g) (Sheffield Products Co. Norwich, N.Y.), sacarose (5,0 g) (Sigma, St. Louis, Mo.) e

glutamato monossódico (0,5 g) (Sigma, St. Louis, Mo.) foram adicionados a 50 mL de água (Super Q[®] purificada) e dissolvidos. Calor foi adicionado para aumentar a taxa de dissolução. Essa solução foi adicionada aos 50 mL da solução de proteína de soja texturizada a 10% da etapa 1. O pH foi ajustado a $7,2 \pm 0,1$ com KOH e/ou HCl. A solução foi depois dispensada em recipientes adequados e submetida a uma autoclave a $> 121^{\circ}\text{C}$ ou > 30 minutos. (Essa solução pode ser armazenada a $2-7^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 1 mês.)

10 ETAPA 3: PREPARAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE VACINA

Preparação do lago de vírus: Um vírus de bronquite infecciosa aviária (IBV), vírus da doença Newcastle (NDV), Vírus de Doença Bursal Infecciosa (IBDV), vírus Laringotraqueíte Infecciosa (ILT), vírus encefalomielite aviário (AE), poxvírus aviário ou reovírus aviário congelado foi ou é descongelado a 37°C . 50 mL do vírus descongelado foram ou são adicionados a um frasco estéril, diluídos com 400 mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato) e o título viral registrado ($\text{EID}_{50}/\text{mL}$).

20 Preparação da formulação de vacina: 15 mL do componente estabilizador (consultar o Exemplo 2 acima) foram ou são adicionados a um frasco estéril e diluídos com 85 mL do imunógeno viral diluído da etapa 3a. Essa formulação de vacina foi ou é misturada por 5-10 minutos, e o título do imunógeno teórico registrado ($\text{EID}_{50}/\text{mL}$).

25 Dispensação de alíquotas dos lagos de imunógeno/estabilizador: A formulação de vacina da etapa 3b foi ou é dispensada em alíquotas de 6 mL em frascos de liofilização

com paredes salgadas estéreis e agulhas grossas e curtas estéreis. Tampões estéreis foram ou são adicionados a cada pequeno frasco, e os pequenos frascos adicionados ao liofilizador. Após liofilização, os pequenos frascos são reenchidos com 10-15% de nitrogênio, tampados, vedados por pregas, e armazenados a 4°C.

EXEMPLO 4

ETAPA 1: PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO PADRÃO DE PROTEÍNA DE BASE

VEGETAL

10 5,0 g de material de digestão enzimática de soja foram misturados com 50 mL de água purificada. A mistura foi depois moída em um misturador. A mistura foi decantada e o sobrenadante coletado. A solução foi armazenada a 4°C.

ETAPA 2: PREPARAÇÃO DO COMPONENTE ESTABILIZADOR

15 N-Z Amine tipo YT[®] (2,5 g) (Sheffield Products Co. Norwich, N.Y.), sacarose (5,0 g) (Sigma, St. Louis, Mo.) e glutamato monossódico (0,5 g) (Sigma, St. Louis, Mo.) foram adicionados a 50 mL de água (Super Q[®] purificada) e dissolvidos. Calor foi adicionado para aumentar a taxa de dissolução. Essa solução foi adicionada aos 50 mL da solução de digestão enzimática de soja a 10% da etapa 1. O pH foi ajustado a $7,2 \pm 0,1$ com KOH e/ou HCl. A solução foi depois dispensada em recipientes adequados e submetida a uma autoclave a $> 121^{\circ}\text{C}$ ou > 30 minutos. (Essa solução pode ser armazenada a $2-7^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 1 mês.)

ETAPA 3: PREPARAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE VACINA

Preparação do lago de vírus: Um vírus de bronquite infecciosa aviária (IBV), vírus da doença Newcastle (NDV),

Vírus de Doença Bursal Infecciosa (IBDV), vírus Laringotraqueíte Infecciosa (ILT), vírus encefalomielite aviário (AE), poxvírus aviário ou reovírus aviário congelado foi ou é descongelado a 37°C. 50 mL do vírus descongelado foram ou
5 são adicionados a um frasco estéril, diluídos com 400 mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato) e o título viral registrado (EID_{50}/mL).

Preparação da formulação de vacina: 15 mL do componente estabilizador (consultar o Exemplo 2 acima) foram
10 ou são adicionados a um frasco estéril e diluídos com 85 mL do imunógeno viral diluído da etapa 3a. Essa formulação de vacina foi ou é misturada por 5-10 minutos, e o título do imunógeno teórico registrado (EID_{50}/mL).

Dispensação de alíquotas dos lagos de imunógeno/
15 estabilizador: A formulação de vacina da etapa 3b foi ou é dispensada em alíquotas de 6 mL em frascos de liofilização com paredes salgadas estéreis e agulhas grossas e curtas estéreis. Tampões estéreis foram ou são adicionados a cada pequeno frasco, e os pequenos frascos adicionados ao liofi-
20 lizador. Após liofilização, os pequenos frascos são reenchidos com 10-15% de nitrogênio, tampados, vedados por pregas, e armazenados a 4°C.

EXEMPLO 5

TESTE COMPARATIVO COM ESTABILIZADOR DE BASE ANIMAL

25 Fluidos de coleta de cepa de vacina IBV foram formulados a um título equivalente em estabilizadores, como descrito acima nos Exemplos 1-4, e comparados a vírus estabilizados em proteína animal da maneira de Poulvac® IB

(Massachusetts, M-41 - VS Code 1231.11), comercialmente disponível da Fort Dodge Animal Health Division de Wieth. Amostras foram obtidas após o vírus ser misturado com o estabilizador e de novo após o ciclo de liofilização, foram
 5 tituladas em triplicata, e os títulos das médias geométricas pós-liofilização foram comparados para determinar a perda durante a secagem por congelamento.

Os resultados são os seguintes:

Amostra	Título da média geométrica pré-liofilização (log/mL)	Título da média geométrica pós-liofilização (log/mL)	Perda de título (log/mL)
IBV + estabilizador do Exemplo 1	6,20	5,54	0,66
IBV + estabilizador do Exemplo 2	5,40	4,66	0,74
IBV + estabilizador do Exemplo 3	5,80	4,61	1,19
IBV + estabilizador do Exemplo 4	5,80	4,78	1,02
IBV + estabilizador de proteína animal	5,70	3,65	2,05

O uso dos estabilizadores de origem vegetal dos
 10 Exemplos 1-4 acima resultou em uma menor perda de título, durante o ciclo de liofilização, do que o uso do estabilizador de proteína animal (linha 5 na tabela acima).

Várias modificações e modalidades alternativas da presente invenção vão ser evidentes para aqueles versados na
 15 técnica, em vista da descrição acima, Conseqüentemente, essa descrição deve ser considerada apenas como ilustrativa e foi feita com o intuito de ensinar àqueles versados na técnica o melhor modo para conduzir a presente invenção. Os detalhes

estruturais podem variar substancialmente, sem que se afaste do espírito da presente invenção, e o uso exclusivo de todas as modificações que estiverem dentro do âmbito das reivindicações em anexo é reservado. Intenciona-se que a presente
5 invenção seja apenas limitada ao ponto requerido pelas reivindicações em anexo e pelas regras aplicáveis legais.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação de vacina animal, **CARACTERIZADA** pelo fato de que consiste essencialmente de:

um imunógeno viral; e

5 um componente estabilizador, contendo uma proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE e uma proteína de base vegetal.

2. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito
10 imunógeno viral vivo é atenuado.

3. Componente estabilizador, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita proteína de base vegetal é selecionada de um grupo compreendendo glúten de milho, proteína de soja, proteína de arroz,
15 proteína de trigo e proteína de cânhamo.

4. Componente estabilizador, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE é N-Z-Amine®.

20 5. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que contém ainda um diluente.

6. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito
25 diluente é água purificada.

7. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que contém ainda um açúcar.

8. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito açúcar é selecionado do grupo consistindo de mono-, di-, tri- e oligossacarídeos, tais como glicose, dextrose, lactose, sacarose, manose e frutose.

9. Vacina animal, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito açúcar é sacarose.

10. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que contém ainda um tampão.

11. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito tampão é selecionado de um grupo incluindo fosfato de sódio, fosfato de potássio, citrato de sódio, lactato de cálcio, succinato de sódio, glutamato de sódio, bicarbonato de sódio e bicarbonato de potássio.

12. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito tampão é glutamato monossódico.

13. Formulação de vacina animal, **CARACTERIZADA** pelo fato de que consiste essencialmente de:

um imunógeno viral vivo;

um componente estabilizador, contendo uma proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE e uma proteína de base vegetal;

um diluente;

um açúcar; e

um tampão.

14. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o imunógeno viral vivo é atenuado.

15. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito diluente é água purificada.

16. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito açúcar é selecionado do grupo consistindo de mono-, di-, tri- e oligossacarídeos, tais como glicose, dextrose, lactose, sacarose, manose e frutose.

17. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito açúcar é sacarose.

18. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito tampão é selecionado de um grupo incluindo fosfato de sódio, fosfato de potássio, citrato de sódio, lactato de cálcio, succinato de sódio, glutamato de sódio, bicarbonato de sódio e bicarbonato de potássio.

19. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito tampão é glutamato monossódico.

20. Componente estabilizador, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE é N-Z-Amine®.

21. Componente estabilizador, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita proteína de base vegetal é selecionada de um grupo compreendendo glúten de milho, proteína de soja, proteína de arroz, proteína de trigo e proteína de cânhamo.

22. Formulação de vacina animal, **CARACTERIZADA** pelo fato de que consiste essencialmente de:

um imunógeno viral vivo;

um componente estabilizador, contendo uma proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE e uma proteína de base vegetal, em que a dita proteína animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE é N-Z-Amine do tipo YT[®], e a dita proteína de base vegetal é selecionada de um grupo compreendendo glúten de milho, proteína de soja, proteína de arroz, proteína de trigo e proteína de cânhamo;

um diluente, em que o dito diluente é água purificada;

um açúcar, em que o dito açúcar é selecionado do grupo consistindo de mono-, di-, tri- e oligossacarídeos, tais como glicose, dextrose, lactose, sacarose, manose e frutose; e

um tampão, em que o dito tampão é selecionado do grupo consistindo de fosfato de sódio, fosfato de potássio, citrato de sódio, lactato de cálcio, succinato de sódio, glutamato de sódio, bicarbonato de sódio e bicarbonato de potássio.

23. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito açúcar é sacarose.

24. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito tampão é glutamato monossódico.

25. Formulação de vacina animal, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito imunógeno viral vivo é atenuado.

26. Processo de preparação de uma formulação de vacina animal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

formar um componente estabilizador, consistindo essencialmente de uma proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE e uma proteína de base vegetal; e

adicionar o dito componente estabilizador a um componente imunógeno, para formar uma formulação de vacina.

27. Processo, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita proteína de base vegetal compreende cerca de 0,0001-6% (peso/volume), particularmente, cerca de 0,001-4% (peso/volume) da dita formulação de vacina.

28. Processo, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita proteína de base animal compreende cerca de 0,0001-3% (peso/volume), particularmente, cerca de 0,001-2% (peso/volume) da dita formulação de vacina.

29. Processo, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita formulação de vacina é liofilizada após a dita adição do dito componente imunógeno.

30. Processo, de acordo com a reivindicação 26, **5 CARACTERIZADO** pelo fato de que a preparação do dito componente estabilizador da dita formulação de vacina compreende:

dissolver a dita proteína de base vegetal em água purificada, para formar uma primeira solução;

adicionar a dita proteína de base animal de uma
10 fonte substancialmente isenta de BSE/TSE, o dito tampão e o dito açúcar à dita primeira solução;

ajustar o pH da dita solução estabilizadora;

filtrar o dito componente estabilizador; e

esterilizar o dito componente estabilizador.

15 31. Processo, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE é N-Z-Amine®, o dito tampão é glutamato monossódico e o dito açúcar é sacarose.

20 32. Processo, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita proteína de base vegetal é selecionada do grupo consistindo de glúten de milho, proteína de soja, proteína de arroz, proteína de trigo e proteína de cânhamo.

25 33. Processo, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita proteína de base vegetal do dito componente estabilizador compreende cerca de

0,0001-30% (peso/volume) do componente estabilizador, particularmente, cerca de 0,01-10% (peso/volume).

34. Processo, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita proteína de base animal do dito componente estabilizador compreende cerca de 0,0001-15% (peso/volume) do componente estabilizador, particularmente, cerca de 0,01-10% (peso/volume) dele.

35. Processo, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito açúcar compreende cerca de 0,001-6% (peso/volume) da formulação de vacina final, particularmente, cerca de 0,001-4% (peso/volume).

36. Processo, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito tampão compreende cerca de 0,001-5% (peso/volume) da formulação de vacina final, particularmente, cerca de 0,001-1% (peso/volume).

37. Processo, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita dissolução compreende ainda aquecer a dita primeira solução.

38. Processo, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita esterilização compreende submeter a dita solução a uma autoclave.

39. Estabilizador de vacina, **CARACTERIZADO** pelo fato de que consiste essencialmente de:

uma proteína de base animal de uma fonte substancialmente isenta de BSE/TSE; e

uma proteína de base vegetal.

40. Componente estabilizador de vacina, de acordo com a reivindicação 39, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a

razão da dita proteína de base vegetal para a dita proteína de base animal está dentro da faixa de cerca de 1:1 a cerca de 3:1.

RESUMO

"FORMULAÇÃO DE VACINA ANIMAL; COMPONENTE ESTABILIZADOR; VACINA ANIMAL; PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE VACINA ANIMAL; ESTABILIZADOR DE VACINA; E
5 COMPONENTE ESTABILIZADOR DE VACINA".

Uma formulação para uma vacina animal é proporcionado. A formulação de vacina contém um componente estabilizador e um imunógeno viral. O componente estabilizador inclui uma proteína de base animal substancialmente isenta
10 de BSE/TSE e uma proteína de base vegetal. O componente estabilizador proporciona a solubilização de uma vacina durante os seus períodos de armazenamento e administração.