(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 605 109**

(51) Int. CI.:

A61K 9/28 (2006.01)
A61K 9/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2000 PCT/US2000/22929**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2001 WO0113896**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2000 E 00955789 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 1212045**

(54) Título: **Composición de vacuna y procedimiento de uso de la misma**

(30) Prioridad:

24.08.1999 US 150514 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2017

(73) Titular/es:

ABIC BIOLOGICAL LABORATORIES LTD. (100.0%)
3 HAYETZIRA ST.
99100 BEIT SHEMESH, IL

(72) Inventor/es:

GALLILI, GILAD y
FRYDMAN, NORBERT

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Composición de vacuna y procedimiento de uso de la misma

A lo largo de esta solicitud, se identifican diversas referencias de autores y citas completas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición de vacuna estable compactada, comprimida o en forma de comprimido que tiene una forma sólida densa, que comprende uno o más componentes antigénicos criodesecados (liofilizados) y un adyuvante de disolución. Esta composición de vacuna densa estable retiene todas las propiedades ventajosas de sus componentes liofilizados, incluyendo una estabilidad y solubilidad de la concentración, proporcionando a la vez además una disolución completa y rápida en un diluyente. Además, la composición de vacuna de la presente invención evita las desventajas de las preparaciones liofilizadas de la técnica anterior. Se proporciona también el uso de la composición de vacuna estable para formar una solución de vacuna para el uso en la inmunización de un sujeto.

Antecedentes de la invención

Es bien conocido que los materiales biológicos en soluciones tales como vacunas son susceptibles a influencias variables que incluyen calor, reactivos de oxidación, sales, pH, luz, y enzimas proteolíticas.

Se conocen algunos procedimientos para reducir estos efectos perjudiciales en general y más específicamente para mejorar la estabilidad de una vacuna, especialmente durante el almacenamiento. Por ejemplo, el almacenamiento por debajo de 0 ºC, y a temperaturas tan bajas como -70 ºC, es un procedimiento bien conocido. A temperaturas incluso más bajas, por ejemplo, en nitrógeno líquido, muchos materiales biológicos incluyendo células vivas puede almacenarse satisfactoriamente durante muchos años. Sin embargo, dichos procedimientos no son siempre convenientes en aquellas situaciones, que implican, por ejemplo, la inoculación de ganado no estabulado.

El documento WO 00/48662 A se refiere a la administración de fármacos, y más concretamente a la disolución y administración de fármacos a partir de formulaciones secas. En particular, se refiere a un dispositivo de administración de monodosis para producir formas fluidas de un reactivo bioactivo a partir de formas secas del reactivo.

Johnston y col., Poultry Science Champaign, vol. 76, no. 1, 1997, p. 165-178 revisan alguna de las aplicaciones in ovo utilizadas en la industria avícola y en desarrollo o en investigación por Embrex.

Cardamone y col., Journal of Controlled Release, vol. 47, n.º 3, 8 de septiembre de 1997, p. 205-219 se refiere al ensayo in vitro de un sistema de administración pulsátil y su aplicación in vivo para la inmunización frente al toxoide del tétanos.

Jeurissen y col., Immunology, vol. 95, n.º 3, 1998, p. 495-500 describen el mecanismo de acción de una vacuna de un complejo inmunitario que protege a las gallinas frente a la bursitis infecciosa.

Haddad y col., Avian Diseases, vol. 41, n.º 4, octubre 1997, p. 882-889 se refiere a la eficacia de una novedosa vacuna de un complejo inmunitario frente al virus de la bursitis infecciosa en pollos de engorde.

El documento WO 97/333531 A1 divulga la potenciación de la biodisponibilidad de los principios activos peptídicos que se van a administrar oralmente por una composición farmacéutica que proporciona la liberación dirigida del péptido en el intestino.

El documento US 5.206.219 A se refiere a medicamentos proteínicos tales como eritropoyetina, insulina y calcitonina formulados en un medicamento que comprende un disolvente farmacéutico de poliol combinado como codisolvente con un disolvente farmacéutico lípido adaptado a la administración oral en forma de líquido o cápsulas.

El documento US 5.350.741 A se dirige a una formulación entérica de un fármaco proteínico que le protege de la degradación enzimática y promueve su captación por el tracto intestinal tras la administración oral.

El documento US 5.472.710 A divulga una preparación farmacéutica que se va administrar por vía oral con liberación controlada del principio activo y un procedimiento para su fabricación.

La liofilización o la criodesecación es otro medio conocido de conservar células y virus vivos para su uso como vacunas. Durante la criodesecación, la solución que contiene el material biológico se congela en primer lugar y a continuación se evapora el agua por sublimación, usualmente a vacío elevado y temperaturas por debajo de cero. Las soluciones previas han utilizado la criodesecación u otras técnicas para formular vacunas víricas, pero presentan otras dificultades adicionales relativas a la preparación y administración de una forma farmacéutica final estable.

Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 4.251.509 (Hanson y Abegunde) divulga una vacuna vírica particulada estable prevista para administrarse por vía oral a ganado no estabulado en un estado seco. Sin embargo, la forma farmacéutica divulgada no está criodesecada sino preparada concentrando y extrudiendo una pasta seca para formar aglomerados.

Se requieren antioxidantes, cuya selección dependerá del virus concreto, para promover la termoestabilidad. Dicha formulación puede ser más complicada de preparar y no resulta especialmente bien adecuada para aquellos casos en los que se desea disolver la vacuna antes de la inmunización.

Las patentes de Estados Unidos con números 3.458.621 y 3.608.030 (Tint) divulgan el uso de preparaciones víricas criodesecadas para preparar un comprimido de administración oral para la inmunización del tracto intestinal. Sin embargo, los comprimidos preparados son para la administración oral y están provistos de un revestimiento entérico para retrasar la disgregación. Durante el ensayo in vitro no se desintegran rápidamente y se encontró que se desintegraban solo "en 25 minutos" con fluido intestinal simulado. Además, se midió el tiempo de disgregación en fluido intestinal simulado descontando por tanto los efectos del revestimiento entérico. Además, Tint resalta adicionalmente que a no ser que los comprimidos se "revistan por presión", perderán su concentración como se muestra por una comparación entre los comprimidos revestidos por presión y los comprimidos no revestidos por presión. Tint indica que los comprimidos no revestidos por presión "no solo fracasaron en estimular una respuesta de anticuerpos en todos los individuos negativos a anticuerpos, sino que, además, la magnitud de aumento del título fue significativamente más pequeña". (Véase la columna 4, línea 40).

La publicación PCT N.º WO 99/21579 (Seager, y col.) asignada a R.P. Scherer Corp., divulga una composición dispersante "rápida" para una vacuna veterinaria tal como frente a la enfermedad de New Castle que se criodeseca y se "poco compactada". La forma farmacéutica se divulga como una "red de matriz abierta", tal como una "espuma sólida" a la que se hace referencia en la patente de Estados Unidos N.º 4.371.516 (análoga a la patente de Reino Unido N.º 1.548.022), en oposición a la forma comprimida de un comprimido duro. Además, las vacunas se dirigen a la administración oral y se dirige a la retención en el tejido mucosal. Los adyuvantes sirven para proporcionar suficiente tiempo de residencia para la absorción sobre el anterior. La formulación de vacuna divulgada no proporciona la preparación de una dosis líquida para inmunización posterior, ni un medio para formar fácilmente una solución de vacuna medida estable para la administración como una dosis líquida, ni para proporcionar un liofilizado comprimido estable o comprimido duro para facilitar su administración posterior.

La patente de Estados unidos N.º 5.587.180 (Allen, Jr. y col) describe un procedimiento para preparar una matriz de un soporte particulado para un comprimido de disolución rápida. El procedimiento se diferencia de la criodesecación y utiliza técnicas de secado por pulverización normalizadas. La matriz del soporte particulado es adecuada para la administración de la dosificación cuando se coloca en la cavidad oral. Además, no se proporciona una formulación de vacuna estable como solución de vacuna en una forma farmacéutica líquida.

La patente de Estados unidos N.º 5.336.666 (Neway y col.) divulga una vacuna líquida criodesecada que puede formar un comprimido que se va a reconstituir en forma líquida. Sin embargo, la vacuna está limitada a un glicopéptido polar de una bacteria concreta y no proporciona una disolución completa o rápida.

Aunque se puede llevar a cabo la criodesecación del material biológico de acuerdo con procedimientos de liofilización bien conocidos por un experto en la técnica para proporcionar una preparación de vacuna estable, el título de un virus vivo al final de la liofilización no es normalmente el mismo que era para la solución antes del procedimiento de liofilización. En general, no es posible llevar a cabo la titulación antes de la liofilización debido a que la solución no es estable hasta que está criodesecada. Además, el título cambiará de forma imprevisible durante la liofilización. Por consiguiente, una estimación del título inicial basada en la experiencia solo es validable mediante titulación después de criodesecación. Como resultado de todo lo anterior, es casi imposible conseguir una precisión definida del título diana. Si se ha llevado a cabo la liofilización con el liofilizado ya contenido en viales, volver a trabajar el lote no es normalmente posible, y en algunos casos debe descartarse un lote completo si no cumple las especificaciones.

La patente de Estados Unidos N.º 5.897.852 (Wilderbeek, y col.) intenta resolver dicho problema usando diferentes "cuerpos criodesecados" con "liosferas" para compensar el déficit en el título de una torta liofilizada. Sin embargo, cada liosfera tiene su propio título necesitando por tanto la titulación de múltiples cuerpos para llegar a un título deseado. Incluso en el mejor caso, este procedimiento no consigue el título requerido exacto ya que es solo una aproximación debido al uso de los cuerpos combinados para conseguir el título diana. Además, la producción de liosferas es relativamente difícil en comparación con la criodesecación, más sencilla, de las soluciones, para producir una torta o polvo. Adicionalmente, se requiere a menudo una matriz especial para evitar que se pulverice el material de la liosfera tras el secado. En general, el procedimiento requiere la preparación de soluciones separadas teniendo cada una un título, aditivos y adyuvantes diferentes. El procedimiento no resuelve el problema de que el título de un lote de virus vivo es raramente homogéneo, y varía de un vial al siguiente, particularmente alrededor de las zonas de las placas frías en el liofilizador. Por tanto, la determinación del número de liosferas necesarias por vial es siempre una aproximación.

La criodesecación puede ser también útil para vacunas que comprenden más de un componente inmunógeno. Por ejemplo, el documento EP 290197A divulga una vacuna tetravalente criodesecada. El procedimiento divulga la mezcla y la posterior criodesecación de cuatro componentes de vacuna de virus vivos.

Una desventaja de las actuales técnicas de criodesecación para la preparación de vacunas es que el procedimiento es muy complejo, teniendo muchas variables, volviéndolo notoriamente difícil de realizar de una manera reproducible para conseguir un producto aceptable y una uniformidad en la dosificación. Esto es especialmente problemático para las vacunas veterinarias donde se criodesecan un gran número de dosis en un vial. El problema es menos común para la preparación de vacunas humanas, aunque igualmente apreciable cuando es necesaria la inoculación masiva, por ejemplo, en escenarios militares, o en situaciones de infección pandémica. Por ejemplo, un vial de vacuna único típico para la vacunación de aves de corral comprende tanto 1000 como 2000 dosis, y se registra como tal. Antes de la criodesecación, se realiza una estimación grosera acerca del título del material, pero el título final puede solo determinarse después de la criodesecación, ya que el título suele disminuir de forma bastante impredecible durante la criodesecación. Además, la materia prima de virus o bacterias vivos no se puede mantener normalmente estable un lapso de tiempo suficiente para obtener resultados fiables de los títulos antes de la criodesecación.

En la práctica, un envase que comprende originalmente más de 2000 dosis puede resultar a menudo que comprende solo 1900 dosis tras la criodesecación. En este caso, el vial solo se puede comercializar como un vial de 1000 dosis, ya que normalmente es otra única dosificación registrable oficial posible. Para dicho escenario se podría producir un 47 % de material residual y un aumento correspondiente en los costes. Este problema se agrava con vacunas combinadas ya que debe utilizarse la dosificación del componente con el título más bajo para caracterizar el lote completo. Como desventaja adicional, cuando viales previstos para proporcionar 2000 dosis individuales se comercializan posteriormente como viales de 1000 dosis y se utilizan para inocular 1000 animales, los animales dosificados de esta manera se sobreexponen innecesariamente. Además, aumentar de forma deliberada el número de dosis antes de la criodesecación no es una alternativa satisfactoria cuando algún lote de la vacuna se seca más eficazmente. En esta situación, simplemente se termina por perder este material.

Estos problemas se volverán crecientemente importantes de resolver debido a que los organismos de registro trabajan actualmente hacia un sistema de registro donde el número de títulos de dosis de vacunas se configuren entre límites superiores e inferiores bien definidos. Dadas las muchas variables en el procedimiento de producción y el procedimiento de criodesecación, será difícil cumplir estos límites sobre la base de una producción a gran escala. Como se indica, este problema será incluso más pronunciado cuando se necesite una vacuna combinada.

Además, una desventaja adicional de las vacunas criodesecadas anteriores es que un gran número de combinaciones formuladas deben mantenerse en almacenamiento. Esto se debe a que los diversos componentes en una vacuna combinada se mezclan normalmente antes de la criodesecación. De esta manera, para la preparación de una gama completa de vacunas individuales/multicomponentes frente a, por ejemplo, dos enfermedades, deben mantenerse en almacenamiento tres productos diferentes; (1) el producto que comprende la vacuna anti-A, (2) el producto que comprende la vacuna anti-B; y (3) el producto que comprende vacuna anti-A y anti-B. En el caso de vacunas contra tres enfermedades, han de prepararse y almacenarse siete vacunas/combinaciones diferentes. Para cuatro enfermedades, este número se incrementa a quince vacunas/combinaciones diferentes. Por consiguiente, frecuentemente es necesario proporcionar y mantener una gran capacidad de almacenamiento.

Las patentes de Estados Unidos números 5.397.569 y 5.871.748 (Whitfill y col.) divulgan un procedimiento para producir inmunidad activa frente al virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) en sujetos aviares administrando, in ovo, un complejo de vacuna que comprende un virus de vacuna vivo y anticuerpos neutralizantes que se unen al anterior. Whitfill divulga que la relación de virus al anticuerpo neutralizante o uno de sus fragmentos determinará el éxito de la inmunización. Sin embargo, para que dicho procedimiento se aplique eficazmente contra el NDV, debe mantenerse un estrecho intervalo de valores para esta relación para que se produzca una inmunización satisfactoria sin matar a los pollos. Además, la imprevisibilidad en el título utilizando NDV liofilizado (como con otras preparaciones de virus) significa que los procedimientos tales como el de Whitfill no son fácilmente aplicables para el NDV. Por tanto, se desea un procedimiento que pudiera asegurar más títulos exactos de NDV y anticuerpos para la preparación de dicha vacuna.

Otra desventaja más de las formulaciones de vacuna anteriores y sus procedimientos de producción se basa en la necesidad importante de espacio del procedimiento de criodesecación real. Normalmente, liofilizar una vacuna requiere en primer lugar dispensar la vacuna solubilizada en viales de vidrio. Los viales a continuación se tapan con tapones de caucho sueltos y se colocan sobre bandejas en estanterías en una cámara de criodesecación o condensador. Es difícil concentrar dosis muy elevadas de material de vacuna solubilizado en un volumen muy pequeño.

Como resultado, los viales usados normalmente en la criodesecación de dosis de vacunas múltiples contienen siempre un volumen relativamente grande de fluido. La criodesecación eficaz requiere que el fluido que se va a liofilizar se exponga al vacío con un área superficial grande. Por tanto, como solamente la parte superior del aglomerado congelado está en contacto con el vacío, las vacunas se criodesecan en botellas o viales de vidrio relativamente grandes, con una parte inferior amplia. Estos viales tienen algunas veces 5 centímetros de altura, en los que se necesitan 2 cm de altura más para los tapones de caucho. Por consiguiente, la relación del material del

producto al espacio vacío en el equipo de criodesecación es extremadamente ineficaz, dando lugar a un procedimiento de producción menos económico.

Otra desventaja de las composiciones convencionales para las vacunas criodesecadas formuladas que se van a introducir en viales de vidrio es que los tapones de caucho pueden impedir la transferencia libre de moléculas de agua desde el vial al condensador durante la liofilización. Esto puede aumentar la presión parcial de los gases en sublimación en el interior del vial, disminuyendo por tanto la eficacia de la liofilización, así como un aumento en el riesgo de colapso del material liofilizado. El vidrio impide también la transferencia térmica que afecta adicionalmente la eficacia de la liofilización. Formular una vacuna que eliminara los viales y tapones de vidrio usando bandejas en la liofilización aumentaría la eficacia. Además, la criodesecación necesita mucho tiempo. Los componentes de vacuna se mantienen normalmente exactamente por debajo del punto de congelación para disminuir el tiempo de sublimación del agua. Sin embargo, un periodo de secado más largo conduce siempre de forma inevitable a una disminución del título. Los viales de vidrio con sus tapones y cubiertas de aluminio se consideran generalmente como un estorbo. En términos de producción pueden representar más del 50 por ciento del coste de la vacuna acabada. En situaciones de campo, el diluyente debe inyectarse en el vial y extraerse y diluirse la solución resultante, si se necesita para el uso. Esto es un inconveniente no siempre adecuado para situaciones de campo, tal como pollos en un cobertizo. No es infrecuente para el funcionamiento en estas situaciones la autoinyección accidental durante este procedimiento. Otra desventaja más del envasado y preparación de dicha vacuna es que algo de la solución concentrada permanecerá en el vial. Por consiguiente, se acepta generalmente que es necesario incluir un exceso en el contenido para compensar la falta de homogeneidad y las pérdidas de producción, así como las pérdidas en las que se incurren durante los periodos de almacenamiento. Los viales de vidrio deben también destruirse de manera segura y pueden dar como resultado posibles riesgos para la salud y ambientales.

Como resultado, el uso de formulaciones de vacunas criodesecadas convencionales implica complicadas técnicas de preparación que son costosas y difíciles de implementar en el campo. Por consiguiente, dichas formulaciones de vacunas convencionales no son muy adecuadas para vacunaciones en países subdesarrollados donde las condiciones económicas y de campo no permiten costosas campañas, o en el caso de inmunizaciones masivas que pueden ser necesarias, tal como en la protección contra el armamento biológico, u otras catástrofes o epidemias potenciales.

Lo que se desea, por tanto, es una formulación de vacuna que eliminen el uso de viales de vidrio para administración que proporcionan una alternativa de envasado menos costosa y voluminosa. Lo que se desea también es una formulación de vacuna y su uso que proporcione una precisión de la dosificación y una facilidad de uso mayores manteniendo la estabilidad, esterilidad, solubilidad y homogeneidad de las formulaciones de vacuna individuales y múltiples. Una formulación de vacuna y su uso mejorado para la inmunización que facilita que una administración más fiable, reproducible y eficaz pueda proporcionar las ventajas del mejor comportamiento en el campo, mayor seguridad, rentabilidad, menos residuos, y la mejora del cumplimiento de las normas ambientales.

Sumario de la invención

De acuerdo con ello, es un objeto de la invención proporcionar una composición de vacuna y uso de la misma realizado disolviendo simplemente una forma sólida estable densa de una vacuna liofilizada en un diluyente eliminando de esta forma la necesidad de viales de vidrio, permitiendo a la vez tener mucha mayor precisión de dosificación y facilidad de uso.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una vacuna viva o inactivada liofilizada que se compacte, comprima o forme comprimidos como un sólido estable denso que retenga su capacidad inmunizante potencial durante la preparación y para la duración requerida para una vida media suficiente de una vacuna comercial.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una vacuna viva o inactivada liofilizada que se compacte, comprima o forme comprimidos como un sólido estable denso que facilite la formulación de preparaciones de vacuna in-ovo y usos de las mismas.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una vacuna viva o inactivada liofilizada que se compacte, comprima o forme comprimidos como un sólido estable denso que facilite el envasado de las vacunas en envases sin vial y usos de las mismas.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición de vacuna y su uso para la inmunización con mayor flexibilidad en las vacunaciones que se pueden formular y usos de las mismas.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una composición de vacuna y su uso para inmunización que reduzca la necesidad de un material de vacuna en exceso para compensar las imprecisiones inherentes en el título de la vacuna envasada preparada de acuerdo con los procedimientos conocidos.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición de vacuna y su uso para inmunización que permita una mayor flexibilidad en los tipos de formulaciones de vacunas que se pueden administrar.

Otro objeto más de la invención es proporcionar una composición de vacuna y su uso para inmunización que facilite la formulación de una solución de vacuna multidosis y usos de las mismas.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición de vacuna y su uso para una inmunización que facilite la inmunización masiva de seres humanos.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición de vacuna y su uso para una inmunización que sea adecuada y rentable para vacunaciones en países subdesarrollados donde las condiciones de coste y campo no permiten una preparación complicada y campañas costosas.

Otro objeto más de la invención es proporcionar una composición de vacuna y su uso para una inmunización susceptible de usar en defensa de armamento biológico, cuando es imprescindible la inmunización masiva.

Estos y otros objetos pueden conseguirse mediante la presente invención, que se refiere a una composición de vacuna estable que comprende al menos un componente antigénico liofilizado pretitulado y un adyuvante de disolución, en el que la composición de vacuna está en la forma de un comprimido duro. Además, la presente invención proporciona también su uso para la inmunización de un sujeto frente a una enfermedad que comprende las etapas de: disolver una composición de vacuna con un diluyente para formar una solución, en el que la composición de vacuna comprende al menos un componente antigénico liofilizado y un adyuvante de disolución, en el que la composición de vacuna está en la forma de un comprimido duro, y en el que la composición de vacuna proporciona protección frente a dicha enfermedad; y administrar la solución resultante al sujeto en una cantidad eficaz para inmunizar al sujeto frente a la enfermedad.

La invención en sus características concretas será más evidente a partir de la siguiente descripción detallada considerada con referencia a los ejemplos acompañantes. La siguiente descripción continuará describiendo los problemas y soluciones ofrecidos por la presente invención que se refieran a aplicaciones veterinarias. Sin embargo, no debe interpretarse lo que sigue de manera que se limite a lo anterior o no sea aplicable a la vacunación humana.

En particular, la presente invención proporciona las composiciones de vacuna, el envase y el uso de las mismas como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 48.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición de vacuna comprimida estable que comprende al menos un componente antigénico liofilizado y un adyuvante de disolución.

En una realización preferida de la invención, la composición de vacuna está en la forma de un comprimido duro.

En otra realización preferida de la invención, la composición se disuelve completa y rápidamente en agua.

En una realización preferida de la invención, la composición es estéril.

En una realización preferida de la invención, el adyuvante de disolución es un agente o una pareja de agentes efervescentes, un desintegrante, un tensioactivo, o un solubilizante.

En otra realización preferida de la invención, la pareja efervescente comprende una sal y un ácido.

En otra realización preferida de la invención, la pareja efervescente es ácido cítrico y la sal es un bicarbonato.

En otra realización preferida de la invención, la composición de vacuna comprende un aglutinante y un lubricante.

En otra realización preferida de la invención más, la composición se desintegra completa y rápidamente en agua.

En otra realización de la invención, el material activo es un liofilizado pretitulado que se mantiene en atmósfera de nitrógeno seco por debajo de la temperatura de congelación antes del uso.

En otra realización de la invención, el componente liofilizado comprende hasta un 80 % en peso de la composición.

En otra realización preferida de la invención, la composición de vacuna se caracteriza por la completa disolución en menos de 80 segundos tras el contacto con un diluyente.

En otra realización preferida de la invención, se produce la disolución completa de la composición de vacuna a una relación diluyente a composición de entre 0,5 ml de diluyente por 200 mg de composición y 100 ml de diluyente por 400 mg de composición.

En otra realización preferida de la invención la estabilidad de la composición de vacuna se caracteriza por una pérdida de títulos no mayor que la diferencia entre $10^{9,7}$ DIE_{50}/ml y $10^{9,2}$ DIE_{50}/ml después de 5 días a 37 ºC.

En otra realización preferida de la invención, la estabilidad de la composición de vacuna de la composición se caracteriza por una pérdida de títulos no mayor que la diferencia entre $10^{9,7}DIE_{50}$/ml and $10^{9,3}DIE_{50}$/ml después de 9

meses a 4 ºC.

En otra realización preferida de la invención más, el componente antigénico de la composición de vacuna es un virus completo, una bacteria completa o un microorganismo completo.

En otra realización preferida de la invención, el componente antigénico de la composición de vacuna es una bacteria viva o un virus vivo.

En una realización preferida de la invención, la composición de vacuna comprende un indicador de la presencia del componente antigénico.

En una realización preferida de la invención, el indicador es un colorante.

La presente invención proporciona además una composición de vacuna estable que comprende al menos un componente antigénico liofilizado y un adyuvante de disolución, en el que la composición de vacuna está en forma de un comprimido duro y el componente antigénico comprende un lipopolisacárido o una proteína, que se produce tanto naturalmente como de forma recombinante o modificada.

En otra realización preferida de la invención, el componente antigénico es un virus vivo seleccionado entre el grupo que consiste en: el virus o la bacteria de la enfermedad de Newcastle, la cepa VH del virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de la bursitis infecciosa, el virus de la enfermedad de Gumboro, el virus de la viruela aviar, el virus de la laringotraqueítis, el virus de la bronquitis infecciosa de las aves de corral, el virus de Gumboro Winterfield, la bronquitis infecciosa (IB-H120), el virus de la viruela ovina, el virus de la peste bovina, esporas de carbunco, Salmonella SPP, E. coli, o una premezcla o uno o más de los anteriores que se producen tanto naturalmente, como de forma recombinante o modificada.

En otra realización más de la invención, el componente antigénico se selecciona entre el grupo que consiste en: esporas del carbunco, Salmonella SPP, E. coli, o una premezcla de uno o más de los anteriores, que se producen tanto naturalmente, como de forma recombinante o modificada.

En otra realización preferida de la invención más, el componente antigénico es un virus vivo y la composición comprende además anticuerpos neutralizantes contra el virus.

La presente invención proporciona además el uso de una solución de vacuna preparada añadiendo un diluyente a una composición de vacuna para formar una solución, en el que la composición de vacuna comprende al menos un componente antigénico liofilizado y un adyuvante de disolución, en el que la composición de vacuna está en forma de un comprimido duro, en la preparación de una composición para inmunizar un sujeto contra la enfermedad.

En una realización preferida de la invención, la etapa de disolución del uso se caracteriza además por la disolución completa de la composición de vacuna.

En otra realización preferida de la invención más, se produce la disolución completa durante el paso de disolución en una relación de diluyente a composición de entre 0,5 ml de diluyente por 200 mg de composición y 100 ml de diluyente por 400 mg de composición.

En otra realización preferida de la invención, la etapa de disolución se caracteriza además por la disolución completa en menos de 80 segundos tras el contacto con un diluyente.

En otra realización de la invención, la solución es para administrarse mediante inyección.

En otra realización de la invención, la solución es para administrarse pulverizando con un aerosol formado a partir de la solución.

En otra realización más de la invención, la solución es para administrarse en forma de colirios.

En otra realización más de la invención, la solución es para administrarse mediante ingestión oral.

En un uso preferido de la invención, el sujeto que se va a tratar es un animal aviar y la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en la enfermedad de Newcastle, bursitis infecciosa, viruela aviar, laringotraqueítis, bronquitis infecciosa de aves de corral.

En otra realización preferida de la invención, la solución es para administrarse al sujeto in-ovo.

La presente invención proporciona también un envase que comprende la composición de vacuna que tiene al menos un componente antigénico liofilizado y un adyuvante de disolución, en el que la composición de vacuna está en la forma de un comprimido duro o comprende además un indicador de la presencia del componente antigénico.

En una realización preferida de la invención, la composición es un envase de tipo blíster.

En otra realización preferida de la invención, el envase es una jeringuilla estéril.

La presente invención proporciona también una jeringuilla estéril que comprende una composición de vacuna compactada, en la que la composición de vacuna comprende al menos un componente antigénico liofilizado y un adyuvante de disolución.

En una realización de la invención, la composición de vacuna compactada de la jeringuilla estéril es una composición comprimida.

En una realización preferida de la invención, la composición de vacuna comprimida de la jeringuilla estéril está en forma de un comprimido duro.

La presente invención proporciona además el uso de una solución de vacuna preparada añadiendo un diluyente a una jeringuilla estéril que comprende una composición de vacuna compactada, en la que la composición de vacuna comprende al menos un componente antigénico liofilizado y un adyuvante de disolución, o en el que la composición de vacuna compactada de la jeringuilla estéril se caracteriza además como una composición comprimida, o en el que la composición de vacuna comprimida está en forma de un comprimido duro, para la preparación de una composición para inmunizar un sujeto contra una enfermedad.

Las soluciones resultantes de la disolución de la composición de vacuna de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier medio adecuado. El procedimiento de inmunización de un sujeto contra una enfermedad de acuerdo con la presente invención puede emplear numerosos procedimientos para administrar una solución líquida formada por la composición de vacuna. Los procedimientos ilustrativos de administración son la inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, gotas oculares, mediante agua corriente, aerosol, o pulverización nasal. Cuando el animal que se va a tratar es un ave, el ave puede ser un polluelo recién nacido (es decir, de aproximadamente un día de edad tras la eclosión), un ave adolescente o un ave adulta. La vacuna de la presente invención puede ser útil para la administración de aves in ovo, como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 4.453.630 de Sharma.

Se entiende que la composición de vacuna pretitulada criodesecada (liofilizada) de la presente invención es una preparación compuesta por al menos un componente de vacuna antigénico criodesecado pretitulado, excipientes y, opcionalmente diversos aditivos que se han compactado o comprimido en una forma densa.

Tal como se usa en el presente documento, "denso" se refiere a la composición de vacuna que tiene una densidad mayor de 1,0 g/cc. Normalmente, la densidad de la composición de vacuna será mayor de 1,5 g/cc. Típicamente, el intervalo de densidad para la composición de vacuna estará entre aproximadamente 1,5 g/cc a 2,5 g/cc.

La composición de vacuna puede compactarse, comprimirse, o estar en forma de un comprimido duro.

Tal como se usa en el presente documento, "compactada" se refiere a una composición de vacuna que tiene una densidad mayor de 1,0 g/cc, pero una dureza no medible, tal como se mide en unidades Strong-Cobb (SCU) y se ensayó la dureza en un analizador de fuerza de comprimidos ERWEKA Modelo TBH20.

Tal como se usa en el presente documento, "comprimida" se refiere a una composición de vacuna que tiene una dureza de al menos 2,0 SCU y " un "comprimido duro" se refiere a una composición de vacuna en la forma de comprimido u otra forma densa que tenga una dureza de al menos 3,0 SCU.

Los comprimidos compactados, comprimidos y duros de la composición de vacuna pueden prepararse en un equipo MANESTY F3 automatizado con un único punzón de 12 mm y bisel plano o con punzones cóncavos normalizados de 6 mm.

La composición de vacuna en la forma de comprimido duro se preparó a presiones de un máximo de 4 toneladas. Se ensayaron los comprimidos para la dureza en un analizador de fuerza de comprimidos ERWEKA Modelo TBH20 como se ha descrito anteriormente, y se encontró que todos tenían una dureza mayor de 3,0 SCU.

Se entiende que el comprimido clásico asociado normalmente con agentes terapéuticos es lo que se entiende por un "comprimido". Sin embargo, se entiende que está prevista cualquier forma densa compactada o comprimida, incluyendo aquellas que tienen uso menos frecuente en el campo farmacéutico. Por ejemplo, las "briquetas" grandes que serían convenientes, así como la aplicación final requieren un gran volumen de material.

Se entiende que una preparación que se disgrega o disuelve "completa" y "rápidamente" en un diluyente es una que puede hacerlo en agua pura incluso si el uso previsto no es agua pura, sino más bien con una solución, por ejemplo, salina o para esta materia un vehículo no acuoso.

Por "completamente disuelto" se entiende que un componente no soluble se deja sin disolver. Por "disgregado o disuelto rápidamente" se entiende que la disgregación o disolución se completa en aproximadamente unos pocos minutos o menos cuando se emplea un gran volumen de agua para un volumen pequeño de composición de vacuna liofilizada comprimida, por ejemplo, 100 ml de agua para un comprimido efervescente de 400 mg. Se aumenta el tiempo cuando los volúmenes de diluyente se disminuyen de forma comparable. De esta manera, el mismo comprimido puede requerir 70 segundos con un volumen de agua de 10 ml y 80 segundos en 2 ml de agua.

El tiempo de disgregación o disolución citado anteriormente es el tiempo que tarda la disolución o disgregación de un comprimido cuando se introduce en una cantidad medida de agua a temperatura ambiente sin agitación.

Por "estable" se entiende que las composiciones de la presente invención mantendrán su capacidad inmunizante (potencial) durante la preparación y para la duración requerida durante la vida media de una vacuna comercial.

Como se demostrará por referencia a los siguientes ejemplos, una composición de vacuna y un procedimiento de inmunización de acuerdo con la presente invención tienen numerosas ventajas como se describe en el presente documento.

El uso de acuerdo con la presente invención se ilustra generalmente como sigue para la preparación de una composición de vacuna que contiene 1000 dosis de componente de vacuna. La solución del componente de vacuna se liofiliza en bandejas. Se pulveriza el material seco. Se determina el título de una muestra mezclada homogéneamente tras criodesecación mientras que el liofilizado se mantiene bajo atmósfera de nitrógeno en un envase hermético a -20 ºC. Si se determina que el título del material liofilizado es de 625 dosis por 100 mg, es suficiente pesar 160 mg de este material por preparación de vacuna comprimida para llegar exactamente al título requerido. El material se mezcla a continuación con aditivos opcionales y/o funcionales y la preparación se comprime o se forman comprimidos. Las preparaciones de vacunas criodesecadas comprimidas pueden envasarse mediante cualquiera de los procedimientos conocidos por las personas expertas en la materia y/o se describen en el presente documento.

El término excipiente un término que abarca todos los diluyentes o vehículos utilizados en la formulación de la composición de vacuna. Los excipientes pueden incluir: diluyentes o cargas, aglutinantes o adhesivos, adyuvantes de la disolución, lubricantes, antiadherentes, agentes deslizantes o promotores de flujo, colorantes, aromas, edulcorantes y adsorbentes.

Específicamente, las cargas de comprimidos son sustancias que comprometen el volumen del comprimido y actúan principalmente como un transportador. Las cargas de comprimido típicas incluyen, pero no de forma limitativa, sulfato de calcio, fosfato de calcio, carbonato de calcio, almidón, almidones modificados (carboximetil almidón, etc.), celulosa microcristalina, lactosa, sacarosa, dextrosa-manitol y sorbitol.

Los niveles de carga del comprimido son de aproximadamente 0 % a 90 % en peso del comprimido.

Los aglutinantes actúan como el "pegamento" que mantiene los polvos juntos para formar gránulos. Los aglutinantes incluyen, pero no de forma limitativa, polímeros naturales tales como almidones o gomas acacia, tragacanto y gelatina o polímeros sintéticos tales como PVP y metilo, etilo e hidroxipropilcelulosa.

Los niveles de aglutinantes son de aproximadamente 0 % a 20 % de la composición.

Los adyuvantes de la disolución promueven la disolución de la composición de vacuna. Los ejemplos típicos incluyen, pero no de forma limitativa, agentes efervescentes, disgregantes, tensioactivos y solubilizantes.

Los disgregantes producen que los comprimidos preparados por compresión se resquebrajen. Los ejemplos típicos incluyen, pero no de forma limitativa, almidón, celulosa microcristalina, almidón de lana purificado, ácido algínico, almidón glicolato de sodio, goma guar, polivinilpirrolidona reticulada (PVP), resina de intercambio iónico y celulosas tal como metilcroscarmelosa de sodio, carboximetilsodio e hidroxipropilmetilsodio.

Los niveles de adyuvantes de disolución son de aproximadamente 1 % a 95 % en peso de la composición.

Los lubricantes reducen la fricción entre el material que se va a comprimir y la pared de la matriz durante la compresión y la eyección. La mayoría de lubricantes son insolubles en agua e incluyen estearatos (magnesio, calcio y sodio), ácido esteárico, talco y ceras. Los lubricantes solubles en agua incluyen PEG, benzoato de sodio, oleato de sodio, acetato de sodio, lauril sulfato de sodio y lauril sulfato de magnesio.

Los niveles de lubricantes son de aproximadamente 0 % a 5 % en peso de la composición.

Se añaden colorantes para ayudar a identificar los tipos de formulaciones de vacunas tales como en la forma de comprimidos con fines estéticos y funcionales, por ejemplo y no como limitación a la presente invención, los colorantes divulgados en los Ejemplos A a D tomados de la patente de Israel N.º 46189.

Los niveles de colorantes son aproximadamente<1 % de la formulación.

Las composiciones de vacunas de la presente invención pueden comprimirse de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia, tal como se describe en las Pharmaceutical Dosage Forms, Tablets, 2ª. Ed. 1989, Vols 1, 2, 3, Editores H. A. Lieberman, L. Lachman, J. B. Schwartz.

En una realización preferida, la composición de la presente invención es un comprimido duro preparado que contiene un agente efervescente como adyuvante de disolución. Como apreciarán los expertos en la materia, el comprimido efervescente debe contener un componente básico y un componente ácido tal como una pareja

efervescente, de tal manera que, tras la disolución, se producen las reacciones adecuadas para generar dióxido de carbono y ácido carbónico. Los componentes efervescentes adecuados incluyen la familia de carbonatos de compuestos básicos y compuestos ácidos inorgánicos u orgánicos.

Entre la familia de carbonatos de compuestos básicos, los agentes efervescentes preferidos para el uso en las composiciones de la presente invención son carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de glicina, carbonato de potasio, bicarbonato de potasio, dihidrogenocitrato de potasio, y carbonato de calcio. Un compuesto básico más preferido es bicarbonato de sodio.

Los componentes ácidos preferidos para uso en las composiciones de la presente invención son ácido cítrico, ácido adípico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido bórico, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, ácido metoxibenzoico, ácido mandélico, ácido malónico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido glutárico, ácido aspártico, ácido clorhídrico, ácido oxálico, ácido salicílico, ácido succínico, y ácido acético. Un componente ácido efervescente más preferido es ácido cítrico.

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

Las composiciones de comprimidos de la presente invención se obtienen utilizando procedimientos de empastillado conocidos en la materia. Generalmente, los procedimientos de empastillado utilizados para la presente invención pueden resumirse como sigue: los ingredientes se tamizan, se mezclan y se comprimen directamente en comprimidos del peso, tamaño y dureza requeridos en una prensa de comprimidos MANESTY F3.

Las composiciones de comprimidos efervescentes de la presente invención pueden disolverse en agua corriente o en una solución salina simple.

Los componentes de vacuna antigénica son aquellos componentes que estimulan específicamente la respuesta inmunitaria contra el antígeno o antígenos a partir de los cuales se derivaron los componentes de la vacuna. Dichos componentes pueden originarse a partir de un virus o microorganismo incluyen productos recombinantes, por ejemplo, un lipopolisacárido antigénico y una proteína antigénica, o, por ejemplo, dos proteínas antigénicas diferentes. Pueden comprender también partes antigénicas de la proteína o polisacárido. Estos componentes se denominan generalmente componentes de la subunidad. En algunos casos, el componente de vacuna comprende el virus o microorganismo completo incluyendo los productos recombinantes. El componente de vacuna puede ser por ejemplo una bacterina, o una bacteria o virus atenuado vivo, una bacteria o virus inactivo, o una bacteria o virus muerto incluyendo los productos recombinantes y modificados de otra forma. Preferentemente, un componente de vacuna es una bacteria o virus vivo (que incluye el producto recombinante modificado no virulento o parcialmente virulento). Los ejemplos incluyen, pero no de forma limitativa, bacterias Salmonella, virus de la enfermedad de New Castle, virus de la bursitis infecciosa (Gumboro), virus de la bronquitis infecciosa, el virus de la pseudorrabia o la vacuna de esporas de carbunco.

Las vacunas combinadas son vacunas que comprenden diversos componentes de vacuna. Las vacunas combinadas pueden comprender también componentes antigénicos derivados de dos o más virus o microorganismos diferentes.

Son posibles también combinaciones más complejas. De esta manera, las vacunas de uno de los tipos descritos anteriormente, así como sus mezclas, se denominan vacunas combinadas. Estas pueden contener también cualesquiera de los adyuvantes conocidos.

Se entiende que un "envase" es cualquier envase útil para el almacenamiento de una preparación de vacuna comprimida estable.

El envase puede ser, por ejemplo, y no de manera limitativa, un recipiente de vidrio o plástico (por ejemplo, un polietileno de alta densidad) utilizado generalmente para envasar y almacenar comprimidos. La adición de la preparación de vacuna criodesecada comprimida estable a un diluyente para disolver homogéneamente la preparación sería suficiente para hacer que la vacuna esté lista para el uso. Otra forma de envasar las preparaciones de vacunas criodesecadas comprimidas de la invención sujeto es un envase de tipo blíster. Un ejemplo de un envase de tipo blíster son láminas de plástico, con hileras de vanos (bandejas) que contienen las preparaciones y se precintan térmicamente con una cubierta de hoja de aluminio en atmósfera de nitrógeno seco. Otra variedad de envase de tipo blíster útil para los productos sensibles son los denominados blísteres de aluminio/aluminio donde tanto la bandeja como la cubierta se basan en aluminio o estratificados de aluminio con diversos plásticos. Esto evitaría el uso de viales de vidrio caros y que requieren espacio, utilizados generalmente para el envasado y almacenamiento de vacunas para las cuales, el usuario eventual no tiene generalmente uso.

La presente invención posibilita añadir una o más composiciones de vacuna criodesecadas comprimidas directamente a partir de un envase de tipo blíster a, por ejemplo, un cubo que se vaya a usar para el agua de bebida o a un sistema de pulverización en aerosol para asegurar la vacunación satisfactoria. Esto se lleva a cabo usualmente en la instalación, por ejemplo, en un gallinero. Podría conseguirse también la vacunación veterinaria por nebulización, cepillo con venteo, perforación, pulverización corporal completa o como gotas oculares. La solución de

vacuna obtenida de manera similar puede usarse alternativamente para la inmunización in-ovo de embriones como se describe en las patentes de Estados Unidos números 5.397.569 y 5.871.748.

Resulta evidente que cualquier dispositivo que se pueda usar para contener sólidos comprimidos se puede usar en la invención. Un diluyente puede ser solo agua, o por otra parte puede ser una mezcla compleja de tampones y adyuvantes. Esto dependerá principalmente de qué aditivos se han añadido a la solución antes de la liofilización o la preparación antes de la compresión.

Los procedimientos de criodesecación conocidos dan como resultado una torta que comprende el componente o componentes de vacuna en un vial. Como se ha mencionado, este procedimiento requiere mucho espacio y es laborioso. Si el componente o componentes de vacunas antigénicas se criodesecan en bandejas de solución, entonces, se utiliza durante el procedimiento toda la superficie de las placas frías de la máquina de criodesecación. Adicionalmente, si se produce el colapso, o se produce cualquier otro problema para esta materia durante el procedimiento de criodesecación, el material puede recuperarse fácilmente. Este no es el caso si el material se precarga en viales de vidrio antes de la liofilización. Adicionalmente, debido a que no están implicados viales que requieren altura en esta parte del procedimiento, las placas frías pueden apilarse a una densidad elevada. Como resultado, la capacidad de los criodesecadores aumenta sustancialmente, quedando limitada prácticamente solo por la capacidad del condensador. Como corolario, podrían utilizarse muchos criodesecadores más pequeños en la presente invención para conseguir el mismo resultado que cuando se usan los viales en secadores mucho más grandes.

Por tanto, en una realización preferida, la composición de vacuna se comprime a partir de un material antigénico liofilizado estéril que se ha secado en bandejas, y a continuación se desmenuza a polvo y se premezcla con aditivos estériles para ayudar en la compresión del comprimido y eventual disolución. La composición de vacuna estéril se envasa a continuación bajo atmósfera de nitrógeno seco en un envase estéril de tiras de blíster con una barrera fuerte a la humedad y el gas.

En una realización preferida, el material liofilizado es un virus atenuado vivo.

En otra realización preferida, una premezcla que comprende una combinación de componentes de virus secos anteriormente se comprime en una única preparación junto con aditivos para ayudar a la disolución y opcionalmente aquellos adyuvantes deseados para la inoculación.

Si se requiere una vacuna combinada, las ventajas ofrecidas por la presente invención son incluso más pronunciadas. Basta añadir simplemente suficiente liofilizado pretitulado de cada tipo de componente de vacuna antigénico a la preparación antes de la compresión para conseguir una vacuna combinada con cada componente en una dosis muy precisa.

Al mismo tiempo, la presente invención ofrece una solución al problema de la gran capacidad de almacenamiento necesaria para almacenar todas las posibles variantes de, por ejemplo, una vacuna de tres o cuatro componentes.

En vez de mezclar los diversos componentes antes de la criodesecación como puede requerirse para la criodesecación de las vacunas combinadas, cada componente se criodeseca por separado. De esta manera los diversos componentes se pueden almacenar por separado. Cuando sea necesario, cada combinación deseada se prepara fácilmente premezclando la cantidad adecuada de material liofilizado de cada componente deseado en una preparación como se describe en el presente documento, y a continuación comprimiendo y envasando la mezcla como se describe.

Esto permite por ejemplo, en el caso de una vacuna combinada de 4 componentes, almacenar solo cuatro recipientes, conteniendo cada uno solo el material liofilizado de un tipo específico de vacuna para componer cualquier preparación de vacuna individual o combinada que se requiera. Los procedimientos previos requerían 15 recipientes diferentes, comprendiendo cada uno un componente o mezcla prefabricado.

En otra realización preferida más, el recipiente de vacuna comprende una tira de blíster estéril que contiene formas sólidas, tales como comprimidos estériles preparados por compresión procedentes de material liofilizado de uno o más componentes de vacuna premezclados con un adyuvante de disolución estéril en una pareja efervescentes (por ejemplo, bicarbonato de sodio y ácido cítrico) un aglutinante estéril (por ejemplo, polivinilpirrolidona) y un lubricante estéril (por ejemplo, estearilfumarato de sodio, estearato de magnesio). Estas preparaciones de componentes individuales o múltiples pueden utilizarse a continuación para preparar fácilmente in situ una solución de vacuna de título conocido. Lo anterior son ejemplos para el adyuvante de disolución, el aglutinante y el lubricante, y no son para tomarse como una limitación para la composición de vacuna de la presente invención.

En otra realización más, la composición de vacuna y su uso para la inmunización comprende una composición de vacuna con componentes derivados de dos o más componentes antigénicos. Una vacuna basada en componentes de múltiples componentes antigénicos tiene la ventaja que una administración de dicha vacuna basta para inducir la protección frente a múltiples enfermedades. Debe entenderse que para cada virus o microorganismo, se pueden incluir cualquiera de varios componentes de vacuna antigénicos diferentes.

En una reacción más adicional, los componentes antigénicos de cada vacuna pueden mezclarse en relaciones exactas para formar un complejo requerido para la inmunización in-ovo tales como tales como la enfermedad de Marek in vivo, vacunas de NVD y Gumboro. Son por tanto también posibles preparaciones de vacunas multicomponentes in-ovo. La forma farmacéutica para dicha combinación puede conseguirse mediante la presente invención comprimiendo una premezcla de los componentes antigénicos criodesecados para cada enfermedad, y los anticuerpos con los adyuvantes de formación de comprimidos. Dicha preparación podría utilizarse a continuación para conseguir el complejo del factor de inmunización del virus deseado in situ mediante disolución de la preparación en el vehículo requerido y bajo las condiciones estipuladas directamente antes de la inoculación in-ovo.

Usualmente, el recipiente de vacuna puede contener entre 1 y 10.000 dosis o más de vacuna. Son comunes los recipientes de dosis individuales para la vacunación individual, para uso humano y veterinario.

La vacuna de poliovirus humano, la vacuna tifoide criodesecada viva humana o la vacuna de parvovirus canino se formulan normalmente como vacunas de dosis individuales. Deben entenderse, que para una dosis individual de vacuna, se aplicarían completamente procedimientos de formulación similares a los descritos para las vacunas multidosis.

Para la vacunación de galpones de pollos recién salidos, es una práctica común utilizar un recipiente de vacuna de 10.000 dosis para una vacunación masiva frente al virus de la bronquitis infecciosa o NDV. Para la vacunación de animales de una granja grande tales como ganado, frente, por ejemplo, la rinotraqueítis bovina infecciosa, o el virus paragripal, se usan normalmente recipientes de vacuna con 10 dosis.

Una de las ventajas de las composiciones de vacuna preparadas de acuerdo con la presente invención es que los adyuvantes de disolución que pueden haber sido incompatibles en la solución criodesecada, pueden incluirse tras la liofilización. Esto acelera el procedimiento de administración. Se ha encontrado de forma inesperada que el uso de ácido cítrico como parte de una pareja efervescente, que se esperaba que fuera perjudicial para los virus atenuados vivos, no tenía impacto significativo sobre los títulos.

Debe ser también evidente que la integridad de la barrera de humedad para que el recipiente tenga un efecto significativo con formulaciones de este tipo y deben tenerse en cuenta las etapas para asegurar que se forma una barrera de humedad eficaz en el envasado. Esto es particularmente verdadero cuando se emplea un envase de tiras de blíster y cuando los aditivos seleccionados son potencialmente desestabilizantes cuando están húmedos, como es el caso con ácido cítrico.

La presente invención proporciona también el uso de una composición de vacuna en la forma de un comprimido duro, en el que la composición de vacuna comprende al menos un componente antigénico liofilizado y un adyuvante de disolución, que se ha disuelto con un diluyente para formar una solución para inmunizar un sujeto frente a una enfermedad.

De forma alternativa, los liofilizados pueden comprender componentes de vacuna antigénicos que se derivan de dos o más virus o microorganismos.

Además, la presente invención proporciona una composición de vacuna en la que la composición de vacuna y un diluyente están contenidos juntos en un envase. Dicha realización permite un procedimiento de inmunización donde se puede producir una etapa de disolución para formar una vacuna líquida para la administración in situ en el campo.

Debe entenderse que un envase de vacuna o envase que contiene la composición de vacuna estable criodesecada puede ser cualquier envase útil de una vacuna. En una forma simple, el envase de vacuna comprende un recipiente de vacuna que comprende los componentes de vacuna, envasados juntos con las instrucciones en una caja. En una forma más compleja de un envase de vacuna, el recipiente de la vacuna comprendería adicionalmente un diluyente y una jeringuilla. En una realización adicional, la vacuna liofilizada comprimida se envasa en condiciones estériles en una jeringuilla precintada, donde se puede producir de esta manera la disolución de la vacuna en el interior de la jeringuilla estéril. De esta manera, el tamaño del lote de las jeringuillas precargadas no es dependiente del espacio ocupado por las jeringuillas en el liofilizador.

Los siguientes ejemplos ilustran la preparación y la potencia de la composición de vacuna de la presente invención cuando se usa para inmunizar un sujeto frente a diversas enfermedades infecciosas. Se presentan también las evaluaciones de la estabilidad con un análisis del título de una forma de comprimido criodesecado comprimido para diversas formulaciones de vacuna.

Los ejemplos se presentan para ilustrar y explicar adicionalmente la presente invención y no deben considerarse como limitantes de ninguna forma. Salvo que se indique otra cosa en los ejemplos y en otra parte en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, todas las partes y porcentajes son en peso. Las temperaturas están en grados centígrados.

Ejemplo 1

1.1 Preparación de comprimidos que comprenden la cepa VH del virus de la enfermedad de Newcastle atenuado vivo (denominado a partir de ahora NDV-VH)

Se inocularon huevos exentos de patógenos específicos (SPF) fértiles con NDV y se incubaron de acuerdo con procedimientos conocidos para la propagación de virus NDV en huevos.

Se recogió fluido amniótico alantoide (AAF) y se purificó mediante centrifugación a 4000 g durante 20 min.

Se llevó a cabo la liofilización en viales completamente de acuerdo con los procedimientos normalizados conocidos.

Se prepararon los comprimidos de la siguiente manera:

A 13,2 g de liofilizado pulverizado se añadieron:

60 g de bicarbonato de sodio
42 g de ácido cítrico anhidro
4,2 g de polivinilpirrolidona K-30
0,3 g de estearato de magnesio

A continuación se mezclaron los ingredientes y se perforaron los comprimidos cada uno con un peso de 400 mg.

Cada comprimido resultante preparado de esta manera contenía 44 mg del liofilizado.

1.2 Análisis de comprimidos

Se evaluó el título en huevos SPF de un muestreo aleatorio de los comprimidos y se comparó con la cantidad ajustada del liofilizado en los viales.

NDV-VH/comprimido	$10^{9,7}$ DIE_{50}*
NDV-VH/vial	$10^{9,6}$ DIE_{50}
*Unidades de 50 dosis por huevo infeccioso.	

Cuando se añadió un comprimido a 100 ml de agua, se completó la disolución en menos de un minuto, es decir, no había trazas visibles de sólidos a simple vista.

Cuando se añadió un comprimido a 10 ml de agua, se completó la disolución en 70 segundos.

Cuando se añadió un comprimido a 2 ml de agua, se completó la disolución después de 80 segundos.

En 1 ml de agua, aunque se consiguió una disolución completa, no se encontró que la naturaleza efervescente de este comprimido estuviera implicada en la disolución completa, que tardó tardado aproximadamente 4 minutos.

1.3 Envasado y estabilidad

Los comprimidos se envasaron en tiras de blíster de cloruro de polivinilo (PVC) y se ensayó la estabilidad a 37 ºC y se encontró que era relativamente estable en periodos de 5, 7 y 9 días.

Días a 37 ºC	cero	5	7	9
comprimido de NDV-VH	$10^{9,7}$	$10^{9,2}$	$10^{9,3}$	$10^{9,4}$

El almacenamiento a 4 ºC no produjo cambios apreciables en el título y el color de los comprimidos después de nueve meses.

Meses a 4 ºC	cero	3	9
comprimido de NDV-VH	$10^{9,7}$	$10^{10,1}$	$10^{9,3}$
Vial de NDV-VH	$10^{9,6}$	$10^{9,6}$	$10^{9,3}$

Los títulos proporcionados son en unidades de EID_{50} por comprimido o vial calculados para la misma cantidad de material activo.

1.4 Ensayo de potencia del NDV-VH comprimido en pollos

Grupo	NDV-VH	DIE_{50}/ Dosis	HI a las 3 semanas después de la vacunación	Mortalidad tras el estímulo
A	comprimido 1	$10^{6,6}$	9,3	2/18
B	comprimido 2	$10^{6,3}$	9,2	1/20
C	vial	$10^{6,6}$	9,2	2/19
D	no vacunados	--	1,2	10/10

HI = Unidades de inhibición de hemaglutinación.
A: Se disolvió un comprimido de NDV-VH en 20 ml de agua destilada estéril y se utilizaron 0,02 ml para vacunar cada uno de los 18 pollos (4 semanas de edad, mantenidos en aisladores) con colirios.
B: Se vacunó de manera similar otro grupo de pollos con la vacuna VH comprimida disuelta en 40 ml de agua destilada estéril.
C: Se disolvió un vial de NDV-VH en agua destilada estéril para dar la misma concentración de virus que en A.
D: Control sin vacunar.

En las tres semanas después de la vacunación se extrajo sangre de las aves para la titulación de los anticuerpos mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) y se estimularon todos los grupos con NDV velogénico viscerotrópico proporcionado por vía i.m. Inyección a $10^{5,3}$ DIE_{50} /ave en el Kimron Veterinary Institute (The Israeli Veterinary Services).

Los resultados de los ensayos indican que se está proporcionado una buena protección a los pollos por todas las preparaciones de vacuna ensayadas.

Ejemplo 2

2.1 Preparación de comprimidos que comprenden NDV-VH

Se inocularon huevos SPF fértiles con NDV y se incubaron de acuerdo con procedimientos conocidos para la propagación de virus NDV en huevos.

Se recogió el AAF que se purificó mediante centrifugación a 4000 g durante 20 min. Se llevó a cabo la liofilización completamente de acuerdo con los procedimientos normalizados conocidos.

El virus NDV-VH se liofilizó en una bandeja. El polvo seco se precintó en una bolsa de polipropileno doble estériles en condiciones de humedad baja y se mantuvo a -20 ºC. Se produjeron comprimidos efervescentes que contenían cantidades crecientes de polvo seco. Se prepararon comprimidos de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

Composición	p (g)	p (g)	p (g)	p (g)
VH liofilizado en bandejas	1,25 (2,7 %)	2,5 (5,3 %)	5,0 (10,1 %)	10,0 (20,3 %)
Bicarbonato de sodio	25,0	25,0	25,0	22,0
Ácido cítrico anhidro	17,5	17,5	17,5	15,4
Polivinilpirrolidona K-30	1,75	1,75	1,75	1,75
Estearato de magnesio	0,12	0,12	0,12	0,12
Peso del comprimido	0,5	0,45	0,38	0,36

2.2 Análisis de los comprimidos

Se obtuvieron títulos de NDV-VH (DIE_{50}) en los comprimidos mediante titulaciones en huevos SPF.

Porcentaje de comprimido liofilizado	2,7	5,3	10,5	20,3
NDV-VH/comprimido	$10^{8,00}$	$10^{8,25}$	$10^{8,75}$	$10^{9,00}$

Se obtuvo una relación lineal satisfactoria entre las concentraciones de material activo y los títulos de virus.

Cuando se añadió un comprimido a 100 ml de agua, se completó la disolución en menos de un minuto, es decir, no había trazas visibles de sólidos a simple vista.

2.3 Envasado y estabilidad

Se introdujeron los comprimidos en jeringuillas que se envasaron en bolsitas de aluminio estratificado. Se preparó una solución inyectable succionando el diluyente para la inyección en la jeringuilla, seguido por una disolución completa del comprimido. Se utilizaron las soluciones inyectables resultantes directamente para la vacunación individual, o de forma alternativa para la vacunación múltiple tras la dilución adicional en un recipiente más grande. A continuación se aplicó una jeringuilla automática.

EJEMPLO 3

3.1 Preparación de comprimidos que contienen NDV-VH que comprenden anticuerpos dirigidos contra el virus de Newcastle (NDA) para la vacunación in-ovo

Se inocularon huevos SPF fértiles con NDV y se incubaron de acuerdo con procedimientos conocidos para la propagación de virus NDV en huevos.

Se recogió el AAF y que se centrifugó a 4000 g durante 20 min. Se llevó a cabo la liofilización completamente de acuerdo con los procedimientos normalizados conocidos y se tituló el material liofilizado. Se determinaron las cantidades deseadas de NDV y NDA.

Se prepararon los comprimidos de la siguiente manera:

A 7,0 g de liofilizado pulverizado se añadieron:

0,36 g de suero de pollo hiperinmunizado liofilizado para NDV (NDA)
13 g de bicarbonato de sodio 9,1 g de ácido cítrico anhidro
0,9 g de polivinilpirrolidona K-30
0,07 g de estearato de magnesio

A continuación se mezclaron los ingredientes y se perforaron los comprimidos con un peso de 500 mg. Cada comprimido preparado de esta manera contenía 115 mg de la preparación de virus liofilizado.

3.2 Análisis de los comprimidos

Cuando se añadió un comprimido a 100 ml de agua, se completó la disolución en menos de 2,5 minutos, es decir, no había trazas visibles de sólidos a simple vista.

3.3 Envasado

Los comprimidos se envasaron en tiras de blíster de PVC.

3.4 Ensayo de potencia del NDV-VH comprimido con NDA in-ovo

Vacunación in-ovo de pollos de engorde comerciales con NDV-VH + NDA. Se llevó a cabo el estímulo de pollos vacunados in-ovo a las 2 y 4 semanas después de la eclosión. Se inyectaron los embriones en una granja comercial por un equipo Inovoject (Embrex EE.UU.) a los 18 días de incubación. Se disolvió un comprimido en 200 ml de diluyente de la vacuna de Marek y se inyectaron 0,05 ml en cada huevo. Se mantuvieron pollos vacunados y no vacunados en aisladores para evitar la contaminación no específica por virus NDV.

	HI a las 2 semanas	% de mortalidad a las 2 semanas del estímulo	HI a las 4 semanas	% de mortalidad a las 4 semanas del estímulo
Vacunado	5,7	40	4,4	10
No vacunado	3,4	53	2,5	80

A las 2 y 4 semanas, los pollos se sometieron a sangrado para la detección de anticuerpos mediante el ensayo HI y ambos grupos se estimularon con NDV velogénico viscerotrópico mediante inyección I.M. de $10^{5,3}$ DIE_{50}/ave en el Kimron Veterinary Institute (The Israeli Veterinary Services). Los resultados indican que se proporcionó una buena protección a los pollos a las 4 semanas después de la eclosión.

Ejemplo 4

4.1 Preparación de comprimidos que comprenden el virus de la enfermedad de Gumboro atenuado vivo (denominado a partir de ahora "MB")

Se inocularon huevos SPF con el virus de la enfermedad de Gumboro (MB) de acuerdo con procedimientos conocidos para la propagación de virus NDV en huevos. Se recogieron embriones y membranas corioalantoides y se extrajo el virus mediante homogeneización. Se llevó a cabo la liofilización completamente de acuerdo con los procedimientos normalizados conocidos.

Se prepararon los comprimidos de la siguiente manera:

A 10,0 g de liofilizado pulverizado se añadieron:

22,4 g de bicarbonato de sodio
15,7 g de ácido cítrico anhidro
1,7 g de polivinilpirrolidona K-30
0,1 g de estearato de magnesio

A continuación se mezclaron los ingredientes y se perforaron los comprimidos cada uno con un peso de 350 mg.

Cada comprimido resultante preparado de esta manera contenía 70 mg del liofilizado.

4.2 Análisis de los comprimidos

Se evaluó el título de un muestreo aleatorio de los comprimidos como $10^{5,6}$ DIE_{50}/comprimido. (Se consideró que $10^{2,5}$ DIE_{50} era una dosis de vacunación).

Cuando se añadió un comprimido a 100 ml de agua, se completó la disolución en menos de un minuto, es decir, no había trazas visibles de sólidos a simple vista.

Títulos de virus en comprimidos y viales efervescentes

MB/comprimidos	$10^{5,6}$ DIE_{50}
MB/viales*	$10^{5,5}$ DIE_{50}
* Ajustado a la misma cantidad de material inmunizante.	

4.3 Envasado y estabilidad

Los comprimidos se envasaron en tiras de blíster de PVC y se ensayó la estabilidad a 37 ºC.

Días a 37 ºC	cero	5
MB	$10^{5,6}$	$10^{4,9}$

Ejemplo 5

5.1 Preparación de comprimidos efervescentes que contienen el virus de la vacuna viva de la viruela aviar

Se inocularon huevos SPF con el virus de la viruela aviar y se incubaron de acuerdo con procedimientos conocidos para la propagación del virus en huevos.

Se recogieron embriones y membranas corioalantoides y se extrajo el virus mediante homogeneización.

Se llevó a cabo la liofilización completamente de acuerdo con los procedimientos conocidos.

Se prepararon 700 mg de comprimidos sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1.

Cada comprimido contenía 140 mg de liofilizado.

5.2 Análisis de los comprimidos

Se evaluó el título de cada comprimido en huevos SPF y se encontró que era de $10^{6,25}DIE_{50}$/comprimido. Cuando se añadió un comprimido a 100 ml de agua, se completó la disolución en menos de dos minutos, es decir, no había trazas visibles de sólidos a simple vista.

EJEMPLO 6

6.1 Preparación de comprimidos efervescentes que contienen el virus vivo de la laringotraqueítis (aviar)

Se inocularon huevos SPF con el virus de la vacuna de la laringotraqueítis y se incubaron de acuerdo con procedimientos conocidos para el crecimiento de los virus en huevos. Se recogieron embriones y membranas corioalantoides y se extrajo el virus mediante homogeneización.

Se llevó a cabo la liofilización completamente de acuerdo con los procedimientos conocidos. Se prepararon 700 mg de comprimidos sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1.

Cada comprimido contenía 140 mg de liofilizado. Se evaluó el título de cada comprimido en huevos SPF y se encontró que era de $10^{5,53}$ DIE_{50}.

Ejemplo 7

7.1 Preparación de comprimidos efervescentes que contienen el virus vivo de la bronquitis infecciosa de aves de corral

Se inocularon huevos SPF con el virus de la bronquitis infecciosa de aves de corral y se incubaron de acuerdo con procedimientos conocidos para hacer crecer virus en huevos. Se recogieron embriones y membranas corioalantoides y se extrajo el virus mediante homogeneización.

Se llevó a cabo la liofilización completamente de acuerdo con los procedimientos conocidos.

Se prepararon 700 mg de comprimidos sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1.

Cada comprimido contenía 140 mg de liofilizado.

7.2 Análisis de los comprimidos

Se evaluó el título de cada comprimido en huevos SPF y se encontró que era $10^{6,15}$ DIE_{50}/comprimido.

Ejemplo 8

8.1 Preparación de comprimidos efervescentes que contienen el virus vivo de Gumboro Winterfield (aviar)

Se inocularon huevos SPF con el virus de la enfermedad de Gumboro Winterfield (aviar) y se incubaron de acuerdo con procedimientos conocidos para propagar los virus en huevos.

Se recogieron embriones y membranas corioalantoides y se extrajo el virus mediante homogeneización.

Se llevó a cabo la liofilización completamente de acuerdo con los procedimientos conocidos.

Se prepararon 700 mg de comprimidos sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1.

Cada comprimido contenía 140 mg de liofilizado.

8.2 Análisis de los comprimidos

Se evaluó el título de cada comprimido en huevos SPF y se encontró que era $10^{6,28}$ DIE_{50}/comprimido.

Ejemplo 9

9.1 Preparación de comprimidos efervescentes que contienen el virus vivo de la bronquitis infecciosa (IB-HI20) + NDV-VH (aviar)

Se inocularon huevos SPF con IB-HI20 o con virus NDV-VH y se incubaron de acuerdo con procedimientos conocidos para la propagación de virus NDV en huevos.

Se recogieron AAF y se centrifugaron a 4000 g durante 20 min. Se llevó a cabo la liofilización completamente de acuerdo con los procedimientos normalizados conocidos.

Se prepararon 700 mg de comprimidos sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1.

Cada comprimido contenía 140 mg de liofilizado.

9.2 Análisis de los comprimidos

Cuando se añadió un comprimido a 100 ml de agua, se completó la disolución en menos de 2 minutos, es decir, no había trazas visibles de sólidos a simple vista.

Se evaluó el título de cada comprimido en huevos SPF y se encontró que era $10^{5,80}$ y $10^{9,60}DIE_{50}$/comprimido para IB-HI20 y NDV-VH (aviar) respectivamente.

Ejemplo 10

10.1 Preparación de comprimidos efervescentes que contienen el virus vivo de la viruela ovina

Se llevó a cabo la propagación del virus en células Vero que crecían en cilindros de plástico.

Se llevó a cabo la liofilización completamente de acuerdo con los procedimientos conocidos.

Se prepararon 700 mg de comprimidos sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1. Cada comprimido contenía 140 mg de liofilizado

10.2 Análisis de los comprimidos

Se evaluó el título de cada comprimido como $10^{5,85}$ $DICT_{50}$/comprimido. Se tituló el virus de la vacuna de la viruela ovina en células Vero.

Ejemplo 11

11.1 Preparación de comprimidos efervescentes que contienen el virus de la vacuna viva de la peste bovina (ganado)

Se llevó a cabo la propagación del virus en células Vero que crecían en cilindros de plástico.

Se llevó a cabo la liofilización completamente de acuerdo con los procedimientos conocidos.

Se prepararon 700 mg de comprimidos sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1.

Cada comprimido contenía 140 mg de liofilizado.

11.2 Análisis de los comprimidos

Se evaluó el título de cada comprimido como $10^{4,1}$ $DICT_{50}$/comprimido. Se tituló el virus de la vacuna de la peste bovina en células vero.

11.3 Codificación por colores de las composiciones de vacuna

La patente de Israel N.º 46189 divulga vacunas de virus de aves de corral codificadas por color teñidas con un colorante distintivo, que es seguro en tejidos vivos y que no perjudica la viabilidad de los virus. Las diferentes vacunas están codificadas por colores por medio de un colorante distintivo diferente. Los colorantes adecuados son, por ejemplo, colorante rojo amaranto, amarillo de tartrazina, azul carmín índigo o las mezclas de cualquiera de estos, que dan como resultado matices distintos.

Un procedimiento de coloración de varios tipos diferentes de vacunas (o codificación por colores) de vacunas en diferentes colores de contraste es útil frente a los errores realizados por los granjeros que han vacunado a sus aves de corral con un tipo diferente de vacuna que la prevista, exponiendo por tanto a su población de aves de corral contra la enfermedad que habían previsto realmente inmunizar. Dichos errores se descubren normalmente demasiado tarde, si llega a descubrirse, y en varios casos han provocado quejas contra la vacuna, además de pérdidas y daños financieros graves al granjero. Los colorantes químicos, sin embargo, seguros como pueden ser por sí mismos, poseen algunos problemas y peligros cuando se combinan con un virus de vacuna.

La vacunación de aves de corral implica el uso de vacunas de virus vivos en las que un cultivo de virus vivos está contenido en el producto final, y debido a que los virus vivos son muy delicados y pueden deteriorarse fácilmente, el problema técnico es un poco complicado. Se conocen diferentes agentes colorantes y colorantes por ser químicamente activo, concretamente, pueden oxigenarse o reducirse químicamente. Los virus vivos son muy sensibles a los cambios ambientales tales como las condiciones del pH, la temperatura, radiación diferentes iones metálicos pueden verse afectados por agentes químicos con los cuales pueden entrar en contacto. Dichos agentes colorantes como azul de metileno, o rojo fucsina o colorantes de anilina pueden ser tóxicos para los virus y posiblemente poseen problemas con los pollos o pavos en los que se inyectarían. Era por tanto necesario seleccionar dichos colorantes que serán seguros para el uso en tejidos vivos y no serán perjudiciales para la viabilidad de los virus con los que están en contacto. Se han seleccionado cuatro sombras de color para identificar las cuatro vacunas más populares e importantes utilizadas en la industria de aves de corral actualmente, concretamente un color rojo para identificar la vacuna de la enfermedad de Newcastle de la cepa lentogénica, o como se denomina en Israel, la cepa Komarov en "polluelos"; un color amarillo para identificar la vacuna de la enfermedad de Newcastle de la cepa Komarov-Haifa o de "pollitas"; un color azul para identificar la vacuna de la laringotraqueítis; y una sombra verde para identificar la vacuna de la viruela aviar.

Como se divulga en la patente de Israel N.º 46189, se sometieron a evaluación diferentes concentraciones de estos colorantes y se mezclaron directamente con la vacuna húmeda antes de que se dispensara en los recipientes finales y antes de que se desecara (liofilizada). Se llevaron a cabo algunos ensayos para discernir que estos colorantes no fueran perjudiciales para la vacuna.

Se sometieron diferentes lotes de vacunas secas a condiciones de almacenamiento en refrigeración y de otras maneras y se titularon repetidamente para verificar la concentración del virus. Se llevaron a cabo en paralelo amplios controles de la vacuna sin la adición de los colorantes para llevar a cabo cada ensayo sobre la vacuna coloreada. Se han ensayado también vacunas coloreada directamente en aves vivas para observar que efecto pueden tener. Los ensayos de repetición con cuatro tipos de vacunas y cuatro colorantes utilizados en estos experimentos no han mostrado efectos perjudiciales sobre los resultados de titulación del virus. Los ensayos de inyección en aves vivas y la aplicación de las vacunas de virus por otras rutas tales como a través del agua de bebida; mediante el procedimiento del palillo a través de la piel (viruela aviar); y mediante el procedimiento de cepillo con venteo (para la vacuna de la laringotraqueítis) han mostrado que el colorante no tenía un efecto perjudicial sobre las aves y cuando se inyectó intramuscularmente se reabsorbió a partir de tejido y desapareció completamente en 36 horas. La patente de Israel N.º 46189 divulga vacunas ensayadas en el campo de varias poblaciones que se vacunaron desde un día de edad y hasta la edad de comercialización con estas vacunas coloreadas. Estas aves se comercializaron satisfactoriamente y no hubo evidencia alguna de los colorantes.

Los detalles adicionales de la invención divulgados en la patente de Israel N.º 46189 pueden entenderse fácilmente junto con la descripción proporcionada en los siguientes ejemplos tomados de la anterior, y que se han seleccionado solo a fines ilustrativos a fin de permitir a un experto en la técnica utilizar las formulaciones codificadas por color para las vacunas, y de esta manera no son limitaciones de la invención.

Ejemplo A

Se preparó colorante rojo amaranto para la combinación con la vacuna Vineland Newcastle en "pollitos", preparando una solución de colorante concentrado. Este concentrado contenía 145 gramos de colorante seco en polvo disuelto en 4 litros de agua destilada. La solución de colorante concentrado se autoclavó a 20 psi (137,9 kPa) durante 20 minutos, poco después de la preparación y se almacenó en botellas de vidrio precintadas en un lugar oscuro. La solución concentrada de colorante se añadió a 1,33 % a la vacuna final Vineland Newcastle en pollitos.

Se encontraron los siguientes resultados de las titulaciones con vacunas coloreadas en comparación con vacunas sin colorear:

Titulaciones 2 semanas después de la liofilización:

sin colorante	$10^{9,0}$ DIE_{50}/ml
con colorante	$10^{9,3}$ "

Titulación acelerada:

sin colorante	$10^{9,1}$ "
con colorante	$10^{9,3}$ "

Titulación 30 días después de la liofilización:

sin colorante	$10^{9,16}$ "
con colorante	$10^{9,3}$ "

Titulación 3 meses tras la liofilización:

sin colorante	$10^{8,86}$ "
con colorante	$10^{9,3}$ "

Titulación llevada a cabo 6 meses después de la liofilización en una única muestra

con colorante	$10^{9,16}$ "

Ejemplo B

Se preparó colorante amarillo de tartrazina para la combinación con la vacuna de la cepa Vineland Newcastle en pollita (la cepa Haifa-Komorav mesogénica), preparando una solución concentrada de colorante. Este concentrado contenía 200 gramos de colorante seco en polvo disuelto en 3 litros de agua destilada. La solución de colorante concentrado se autoclavó a 20 psi (137,9 kPa) durante 20 minutos, poco después de la preparación y se almacenó en botellas de vidrio precintadas e un lugar oscuro. La solución concentrada de colorante se añadió a un 3 % de la

vacuna final Vineland Newcastle en pollitas.

Se ha encontrado que los resultados de las titulaciones con vacunas coloreadas en comparación con los controles sin colorear son como sigue: Resultados de la titulación de vacunas regulares:

$10^{9,4}$ DIE_{50} por mililitro
Resultados de la muestra titulada con colorante: $10^{8,8}$

Titulación después de 7 días de incubación a 37 ºC:

	sin colorante	$10^{8,3}$ DIE_{50}/ml
	con colorante	$10^{8,8}$ "

Titulación 39 días después de la liofilización:

	sin colorante	$10^{8,66}$ "
	con colorante	$10^{8,9}$ "

Titulación 93 días después de la liofilización:

	sin colorante	$10^{8,66}$ "
	con colorante	$10^{8,66}$ "

7 meses 1/2 después de la liofilización:

	sin colorante	$10^{8,53}$ "
	con colorante	$10^{8,76}$ "

Ejemplo C

Se preparó colorante azul índigo-carmín para la combinación con inyecciones de la vacuna de la laringotraqueítis Vineland, preparando una solución concentrada de colorante.

Este concentrado contenía 200 gramos de colorante seco en polvo disuelto en 3 litros de agua destilada. La solución concentrada de colorante se autoclavó a 20 psi (137,9 kPa) durante 20 minutos, poco después de la preparación y se almacenó en botellas de vidrio precintadas en un lugar oscuro. La solución concentrada de colorante se añadió a un 3 % a las inyecciones de la vacuna de la laringotraqueítis Vineland.

Se ha encontrado que los resultados de las titulaciones con vacunas coloreadas en comparación con los controles sin colorear son como sigue:

Titulación 3 semanas después de la liofilización:

	sin colorante	$10^{6,3}$ DIE_{50}/ml"
	con colorante	$10^{6,16}$ "

Titulación acelerada:

	sin colorante	$10^{5,0}$ "
	con colorante	$10^{4,8}$ "

Titulación 30 días después de la liofilización:

	sin colorante	$10^{6,0}$ "
	con colorante	$10^{5,8}$ "

Titulación 3 meses tras la liofilización:

	sin colorante	$10^{5,66}$ "
	con colorante	$10^{5,5}$ "

Titulación 7 meses tras la liofilización:

	sin colorante	$10^{5,5}$ "
	con colorante	$10^{5,6}$ "

(Esta disminución en el título es algo inusual para muestras coloreadas y sin colorear y mostró lotes acelerados en más de una disminución logarítmica de 1 sobre una indicación posible de aceleración con un contenido de humedad elevada en este lote).

Ejemplo D

Se obtuvo un colorante de sombra verde codificado "P" (para viruela) mezclando los colorantes índigo-carmín con tartrazina y se utilizó para la combinación con la vacuna de la viruela aviar Vineland. Se disolvieron 100 gramos de mezcla de colorante en polvo en 3 litros de agua destilada.

Se utilizó el mismo procedimiento que en los ejemplos N.º 2 y N.º 3 y se añadió la solución a un 3 % a la vacuna final de la viruela aviar.

Se ha encontrado que los resultados de las titulaciones con vacunas coloreadas en comparación con los controles sin colorear son como sigue:

7 días después de la liofilización

control sin colorear	$10^{5,5}$ DIE_{50}/ml	"
vacuna con colorante:	$10^{5,5}$ "	"

3 meses después

control sin colorear	$10^{5,4}$ DIE_{50}/ml	"
vacuna con colorante:	$10^{5,5}$ "	"

6 meses después

control sin colorear	$10^{5,35}$ "	"
vacuna con colorante:	$10^{5,4}$ "	"

9 meses después de la producción

	$10^{3,1}$"	"
	$10^{5,3}$"	"

La anterior descripción tiene el fin de enseñar a las personas normalmente expertas en la materia cómo practicar la invención y no se pretende detallar todas las modificaciones y variaciones obvias de esta, que serán evidentes para el trabajador experto tras la lectura de la descripción. Se pretende, sin embargo, que las mencionadas modificaciones y variaciones obvias se encuentren incluidas en el alcance de la presente invención, que se define por las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna comprimida estable que comprende al menos un componente antigénico liofilizado y un adyuvante de disolución.

2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que el adyuvante de disolución es un agente o una pareja de agentes efervescentes, un disgregante, un tensioactivo o un solubilizante.

3. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que la composición de vacuna comprimida está en la forma de un comprimido duro.

4. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que la composición se disuelve completa y rápidamente en agua.

5. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que la composición es estéril.

6. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en la que el adyuvante de disolución comprende una pareja de agentes efervescentes.

7. La composición de vacuna de la reivindicación 6, en la que la pareja efervescente comprende una sal y un ácido.

8. La composición de vacuna de la reivindicación 7, en la que el ácido es ácido cítrico y la sal es un bicarbonato.

9. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que el componente liofilizado comprende hasta un 80 % en peso de la composición.

10. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que la composición está **caracterizada por** la completa disolución en menos de 80 segundos tras el contacto con un diluyente.

11. La composición de vacuna de la reivindicación 10, en la que se produce la disolución completa en una relación de diluyente a composición de entre 0,5 ml de diluyente por 200 mg de composición y 100 ml de diluyente por 400 mg de composición.

12. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que la estabilidad de la composición está **caracterizada por** una pérdida de título no mayor que la diferencia entre $10^{9,7}$ DIE_{50}/ml y $10^{9,2}$ DIE_{50}/ml después de 5 días a 37 ºC.

13. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que la estabilidad de la composición está **caracterizada por** una pérdida de título no mayor que la diferencia entre $10^{9,7}$ DIE_{50}/ml y $10^{9,3}$ DIE_{50}/ml después de 9 meses a 4 ºC.

14. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, que comprende además un aglutinante y un lubricante.

15. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que la composición se disgrega completa y rápidamente en agua.

16. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que el material activo es un liofilizado pretitulado que se mantiene en atmósfera de nitrógeno seco por debajo de la temperatura de congelación antes del uso.

17. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que el componente antigénico es un virus completo o un microorganismo completo.

18. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que el componente antigénico es una bacteria viva o un virus vivo.

19. La composición de vacuna de la reivindicación 18 que comprende además un indicador de la presencia del componente antigénico.

20. La composición de vacuna de la reivindicación 19, en la que el indicador es un colorante.

21. La composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, en la que el componente antigénico comprende un lipopolisacárido o una proteína.

22. La composición de vacuna de la reivindicación 18, en la que el componente antigénico es un virus vivo seleccionado entre el grupo que consiste en: el virus de la enfermedad de Newcastle, la cepa VH del virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, el virus de la viruela aviar, el virus de la laringotraqueítis, el virus de la bronquitis infecciosa de las aves de corral, el virus de Gumboro Winterfield, la bronquitis infecciosa (IB-H120), el virus de la viruela ovina, el virus de la peste bovina o una premezcla de o uno o más de los anteriores, que se producen tanto naturalmente, como de forma recombinante o modificada.

23. La composición de vacuna de la reivindicación 18, en la que el componente antigénico se selecciona entre el grupo que consiste en esporas de carbunco, Salmonella SPP, E. coli o una premezcla de uno o más de los anteriores, que se producen tanto naturalmente, como de forma recombinante o modificada.

24. La composición de vacuna de la reivindicación 18, en la que el componente antigénico es un virus vivo y la composición comprende además anticuerpos neutralizantes contra el virus.

25. Uso de una composición de vacuna de la reivindicación 1 o 2, que proporciona protección frente a una enfermedad, que se ha disuelto con un diluyente para formar una solución para la preparación de una composición para inmunizar un sujeto frente a dicha enfermedad.

26. El uso de la reivindicación 25, en el que la etapa de disolución adicionalmente está **caracterizada por** la disolución completa de la composición de vacuna.

27. El uso de la reivindicación 26, en el que se produce la disolución completa en una relación de diluyente a composición de entre 0,5 ml de diluyente por 200 mg de composición y 100 ml de diluyente por 400 mg de composición.

28. El uso de la reivindicación 26, en el que se produce la disolución completa en menos de 80 segundos tras el contacto con un diluyente.

29. El uso de la reivindicación 25, en el que la solución es para administrarse mediante inyección.

30. El uso de la reivindicación 25, en el que la solución es para administrarse mediante un aerosol formado a partir de la solución.

31. El uso de la reivindicación 25, en el que la solución es para administrarse en la forma de colirio.

32. El uso de la reivindicación 25, en el que la solución es para administrarse mediante ingestión oral.

33. El uso de la reivindicación 25, en el que el sujeto que se va a tratar es un animal aviar y la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en la enfermedad de Newcastle, enfermedad de bursitis infecciosa, viruela aviar, laringotraqueítis, bronquitis infecciosa de aves de corral, Gumboro Winterfield y bronquitis infecciosa (IB-H120).

34. El uso de la reivindicación 33, en el que la solución es para administrarse al sujeto in-ovo.

35. Un envase que comprende la composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 19.

36. El envase de la reivindicación 35, en el que el envase es un envase de tipo blíster.

37. El envase de la reivindicación 35, en el que el envase es una jeringuilla estéril.

38. Una jeringuilla estéril que comprende una composición de vacuna compactada, en la que la composición de vacuna comprende al menos un componente antigénico liofilizado y un adyuvante de disolución.

39. La jeringuilla de la reivindicación 38, en la que la composición de vacuna compactada es una composición comprimida.

40. La jeringuilla de la reivindicación 39, en la que la composición de vacuna comprimida está en forma de un comprimido duro.

41. Uso de una solución de vacuna preparada añadiendo un diluyente a la jeringuilla de la reivindicación 38, 39 o 40 para la preparación de una composición para inmunizar a un sujeto frente a una enfermedad.

42. Un envase que comprende la composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 19.

43. Un envase que contiene una composición de vacuna comprimida estable que tiene al menos un componente antigénico liofilizado y un adyuvante de disolución.

44. El envase de la reivindicación 43, en el que el envase es un vial en el que se ha practicado un vacío o se ha rellenado con un gas inerte.

45. El envase de la reivindicación 44, en el que el vial es vidrio.

46. El envase de la reivindicación 43, en el que el envase es una bolsita.

47. Uso de una composición de vacuna comprimida estable que proporciona protección frente a una enfermedad que tiene al menos un componente antigénico liofilizado y un adyuvante de disolución que se ha disuelto con un diluyente para formar una solución para la preparación de una composición para inmunizar a un mamífero frente a la

enfermedad.

48. El uso de la reivindicación 47, en el que el mamífero se selecciona entre el grupo que consiste en un sujeto humano, un sujeto bovino y un sujeto ovino.