

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 864**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 35/76** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07711957 .6**

96 Fecha de presentación: **15.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1993605**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

54 Título: **Composiciones de polvo seco y sistemas para la vacunación de aves de corral**

30 Prioridad:  
**15.03.2006 EP 06005245**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITEIT GENT (100.0%)  
SINT-PIETERSNIEUWSTRAAT 25  
9000 GENT, BE**

72 Inventor/es:  
**REMON, JEAN, PAUL;  
VERVAET, CHRIS;  
CORBANIE, EVY;  
VAN ECK, JOHANNES HUBERTUS HENRICUS y  
LANDMAN, WILHELMUS JOHANNES  
MATHERNUS**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 389 864 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones de polvo seco y sistemas para la vacunación de aves de corral

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones de polvo seco para vacunación veterinaria útiles para inducir respuestas protectoras en las aves de corral frente a enfermedades aviares tales como la enfermedad de Newcastle y la gripe aviar, pero sin limitarse a ellas. La presente invención se refiere también a sistemas para realizar la vacunación de las aves de corral mediante inhalación haciendo uso de estas composiciones de polvo seco.

**Antecedentes de la invención**

10 Las enfermedades infecciosas aviares son bien conocidas por su negativo impacto económico sobre la producción de aves de corral y, posiblemente, sobre la salud de otros animales (en particular mamíferos) y de los seres humanos que pueden estar directa o indirectamente en contacto con las aves infectadas.

15 A partir de las aves de corral infectadas se pueden propagar por ejemplo, patógenos aviares específicos tales como el virus de la enfermedad de Newcastle (de aquí en adelante abreviado como NDV), el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la enfermedad bursal infecciosa (IBDV), virus de la rinotraqueitis del pavo (TRTV), virus de la laringotraqueitis infecciosa (LTV), virus del síndrome de caída de la puesta de huevos (EDS), virus de la encefalomielititis aviar, virus de la reticuloendoteliosis, virus de la viruela aviar, adenovirus aviares, coriza infecciosa, fiebre tifoidea de las aves de corral, cólera de las aves de corral, gripe aviar, *Mycoplasma gallisepticum*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, etc., pero sin limitarse a ellos.

20 Más específicamente, la enfermedad de Newcastle es una infección vírica de las aves de corral con una amplia distribución geográfica que puede causar grandes pérdidas económicas a la industria de las aves de corral. El NDV es el agente etiológico de dicha enfermedad y representa el virus prototipo del género Paramyxovirus. Hay nueve serotipos de paramixovirus aviares designados desde APMV-1 hasta APMV-9. La enfermedad de Newcastle se complica porque diferentes cepas de NDV pueden inducir una variación muy importante en la gravedad de la enfermedad. La infección puede tener lugar o por inhalación o por ingestión y la forma infecciosa del virus se propaga entonces de un ave a otra.

25 La gripe aviar, o "influenza aviar", es una enfermedad contagiosa de los animales causada por los virus de Influenza A que normalmente infectan solamente a las aves y, menos comúnmente, a los cerdos. Los virus de la gripe aviar suelen ser específicos de una especie, pero pueden atravesar la barrera de la especie para infectar a mamíferos y seres humanos. Los virus de Influenza A tienen 16 subtipos H. Solamente los virus de los subtipos H5 y H7 son conocidos por causar la forma más altamente patógena de la enfermedad. El virus H5N1, responsable de la actual epidemia mundial de gripe aviar ha demostrado ser especialmente tenaz, y actualmente es de particular preocupación para la salud humana.

30 La vacunación por pulverización y en aerosol, con gotitas líquidas gruesas y finas respectivamente, son técnicas de vacunación en masa comúnmente utilizadas para la protección de las aves de corral frente a infecciones víricas respiratorias. Los métodos y dispositivos para la nebulización en la vacunación por pulverización y en aerosol son particularmente importantes para la vacunación de las aves de corral puesto que esta nebulización tiene requisitos específicos, por ejemplo, los dispositivos tienen que ser manejados con una fuente de energía externa

35 Normalmente se vacuna a las aves muchas veces durante su vida siguiendo las especificaciones de los programas hechos por el fabricante o preparador con el fin de prevenir óptimamente los brotes de la enfermedad. Normalmente se realiza una vacunación llamada primaria (vacuna de sensibilización) en los pollos de menos de aproximadamente dos a tres semanas. Esta vacunación primaria usualmente va seguida de una o más vacunaciones llamadas secundarias (vacunas de refuerzo).

40 Aproximadamente 48 horas después de la vacunación de las aves de corral, pueden aparecer reacciones a la vacunación con algunos virus respiratorios, particularmente con el NDV. Las aves de corral afectadas (por ejemplo, los pollos) pueden presentar síntomas respiratorios, anorexia, depresión, retraso del crecimiento y aumento de la mortalidad. La reacción a la vacunación se puede complicar además por colibacilosis secundaria (infección por *Escherichia coli*). Con el fin de evitar esto, se dan tratamientos de antibióticos a las aves 36 horas después de la vacunación, los cuales demuestran a menudo ser eficaces. Sin embargo, el uso excesivo o el mal uso de los antibióticos pueden inducir resistencia bacteriana, lo que puede dificultar el tratamiento adecuado cuando las cepas multi-resistentes agravan las reacciones de la vacunación.

45 Los virus vivos de baja virulencia (lentogénicos) o de virulencia moderada (mesogénicos) se utilizan comúnmente para la vacunación de las aves de corral frente a la enfermedad de Newcastle dependiendo de la situación de la enfermedad. Sin embargo, los virus mesogénicos de la vacuna de ND solamente son adecuados para la vacunación

de refuerzo. No obstante, también en el grupo lentogénico hay una considerable variedad de virulencia. Las vacunas vivas usadas comúnmente incluyen cepas lentogénicas tales como V4, Hitchner B1, F y La Sota, y cepas mesogénicas tales como cepa H, Mukteswar, Koinarov y Roakin.

5 La principal ventaja de las vacunas de NDV vivos es que se pueden administrar por técnicas baratas de aplicación en masa, tales como la aplicación en pulverización, en aerosol y en el agua de bebida. Sin embargo, como se ha mencionado previamente, las vacunas vivas pueden causar graves reacciones a la vacunación, en particular en el tracto respiratorio inferior después de la vacunación por aerosol. Con el fin de minimizar este inconveniente, es importante utilizar virus extremadamente suaves, especialmente como agentes de la vacunación primaria. No obstante, incluso las cepas de NDV vivos suaves comúnmente usadas, Hitchner B1 y La Sota todavía pueden causar reacciones respiratorias moderadas a la vacunación. Por lo tanto, existe la necesidad urgente en la técnica de mejorar la vacunación de NDV para evitar las reacciones a la vacunación en los animales inoculados, pero sin dejar de producir una sólida inmunidad frente a la enfermedad.

10 Para que las partículas en aerosol sean eficaces, se sabe que las partículas inhaladas se deben depositar en áreas específicas del tracto respiratorio de las aves teniendo en cuenta, pero sin limitarse a ellos, parámetros tales como la especie del ave, su edad, el tamaño de las partículas inhaladas, y la susceptibilidad a las reacciones post-vacunación.

15 Los nebulizadores actualmente disponibles comercialmente utilizados para la producción de pulverizaciones gruesas generan una proporción significativa de partículas que se depositarán en las vías respiratorias más profundas, esto es, las distribuciones del tamaño de partícula alrededor del tamaño óptimo son demasiado amplias. Aunque se desea este efecto para las vacunaciones de refuerzo, puede dar reacciones adversas de la vacunación en las aves más jóvenes.

Las gotitas transportadas por el aire nuevamente producidas se evaporarán hasta aproximadamente un 10 % de su tamaño original. Cuando se generan con las técnicas de pulverización actualmente disponibles, este fenómeno dificultará los resultados adecuados de la vacunación por lo siguiente:

25 - durante la vacunación primaria, un porcentaje importante de las partículas de la vacuna se depositarán en las vías respiratorias más profundas de las aves lo que no debería ocurrir, explicando de este modo la alta incidencia observada de las reacciones respiratorias post-vacunación;

30 - debido a una amplia e incontrolada distribución del tamaño de partícula, solamente un bajo porcentaje de las partículas evaporadas desde las gotitas, es inhalada en las vías respiratorias inferiores durante la segunda vacunación.

Después de una distribución inapropiada del tamaño de las gotitas, la pérdida de virus de vacuna debida a la inactivación durante la producción, reconstitución y nebulización es una segunda razón importante para la baja eficacia de conocidas vacunaciones en pulverización y en aerosol. En primer lugar, el virus de la vacuna, que generalmente se reproduce en un entorno líquido, por ejemplo la cavidad alantoidea de huevos exentos de patógenos específicos (SPF) se liofiliza para conservación. Aunque los virus son menos susceptibles a los factores ambientales inactivantes en forma desecada y aunque se pueden añadir excipientes estabilizantes antes de la desecación, todavía hay algo de pérdida de concentración del virus durante la producción y conservación de la vacuna viva. Antes de la nebulización, la pastilla de vacuna tiene que ser reconstituida y la concentración del virus se puede reducir adicionalmente cuando están presentes trazas de desinfectante en el agua utilizada para reconstitución y debido a la sensibilidad a la temperatura del virus en un entorno líquido. Esta inactivación aumenta después cuando las gotitas de vacuna se evaporan después de la dispersión. La gran reducción en la concentración de la vacuna durante la vacunación en pulverización y en aerosol puede poner en peligro la inducción de una respuesta inmunitaria suficiente. Además, las vacunas actuales en suspensiones líquidas adolecen de una importante falta de estabilidad.

45 Allan *et al.* en *Avian Pathology* (1980) 9: 153-162 enseña el uso de soluciones de virus de la enfermedad de Newcastle que contienen sorbitol disuelto en agua para generar, a partir de la superficie de una peonza a muy altas velocidades, partículas húmedas en aerosol que se dejan secar antes de la cámara de exposición mediante el paso a través de una serie de columnas para producir aerosoles casi monodispersos que tienen tamaños de partícula de 1 a 4  $\mu\text{m}$  para la vacunación de los pollos.

50 El documento WO 97/36578 describe micropartículas secadas por pulverización, y al menos el 90 % de ellas tienen un tamaño de partícula medio en volumen de 1 a 10  $\mu\text{m}$ , comprendiendo una mezcla sustancialmente uniforme de un agente para terapia génica y un excipiente tal como un carbohidrato. Estas micropartículas se pueden formular con un soporte de gran tamaño y la formulación resultante se puede administrar utilizando un inhalador de polvo seco. El documento WO 97/36578 no se pronuncia sobre la vacunación, aplicaciones veterinarias, así como acerca de la polidispersidad del tamaño de micropartícula.

55

El documento WO 99/52550 describe un sistema de administración de una vacuna de partículas poliméricas para incorporar un antígeno proteínico insoluble en agua, siendo producido dicho sistema a partir de una emulsión de un copolímero biodegradable de poli(lactida-co-glicolida), en la que las partículas poliméricas resultantes tienen un diámetro medio de 0,05 a 20  $\mu\text{m}$  según la distribución del tamaño en volumen. La Figura 2 presenta la dispersidad de tamaño de ejemplos de partículas que tienen un diámetro medio de 10  $\mu\text{m}$ . El documento WO 99/52550 no se pronuncia sobre el virus aviar y la nebulización, y no indica la presencia de azúcares en el sistema de administración de la vacuna.

La Patente U.S. No. 6.651.655 describe un método para crear una respuesta inmunitaria en un paciente utilizando un inhalador de polvo seco exento de cualquier gas propelente, esto es accionado por la respiración. La formulación de vacuna cargada en dicho inhalador de polvo seco incluye las partículas de vacuna en polvo seco con un tamaño de partícula aerodinámico de menos de 50  $\mu\text{m}$ , y la figura 1 presenta la distribución del tamaño de partícula de un ejemplo de polvo de vacuna molido. Una vez que se han producido tales partículas pequeñas para deposición profunda en los pulmones, la sustancia micronizada se mezcla con partículas grandes de lactosa, esto es de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 50 veces más grandes que las partículas de vacuna molidas. Debido a sus principios de construcción, el inhalador de polvo seco de la Patente U.S. No. 6.651.655 obviamente no es adecuado para la vacunación de las aves de corral.

El documento WO 2005/123131 describe formulaciones para secado por pulverización de un anticuerpo o de una vacuna, que comprenden 4 % a 10 % en peso del anticuerpo o de un antígeno de vacuna, 0,1 mM a 50 mM de uno o más aminoácidos, 0,5 a 4 % en peso de un azúcar, y agua. Dependiendo del equipo de pulverización a alta presión utilizado, las gotitas producirán partículas de polvo seco que varían de tamaño de 0,5 a 100  $\mu\text{m}$ . El documento WO 2005/123131 no se pronuncia acerca de la polidispersidad del tamaño de micropartícula y no considera otras formulaciones aparte de una combinación de aminoácidos y azúcares.

Meszáros *et al.* en *Acta Veterinaria Hungaria* (1992) 40: 121-127 describe la inmunización de pollos de 1 a 10 días frente a la enfermedad de Newcastle mediante la vacunación en aerosol utilizando un aparato Masterdrop MD-2500 que proporciona gotitas de menos de 10  $\mu\text{m}$  de tamaño de la gotita. Esta publicación añade un estabilizante de las gotitas para evitar la evaporación de las gotitas a partículas secas y no se pronuncia tampoco acerca del tamaño medio y la polidispersidad de las gotitas.

El objetivo de la presente invención es eliminar estas desventajas.

### Sumario de la invención

La invención presentada en esta memoria hace posible resolver los inconvenientes de la actual tecnología de vacunación de las aves de corral de una manera sencilla y barata proporcionando composiciones eficaces de polvo sólido seco para vacunación veterinaria, en particular para la vacunación de las aves de corral, que se pueden utilizar tanto para la vacunación de sensibilización como para las vacunaciones de refuerzo.

En primer lugar, esta invención se refiere a una composición de polvo seco para la vacunación de aves de corral mediante inhalación, que comprende una cantidad eficaz de un agente vacunal de aves de corral seleccionado del grupo que consiste en virus, bacterias, hongos, parásitos y partes de los mismos, y una cantidad de excipientes soportes para dicho agente vacunal de aves de corral, consistiendo esencialmente dichos excipientes en una combinación de un azúcar reductor o no reductor y un polímero biocompatible, en la que dicha composición en polvo está en la forma de partículas que tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 2 a 30  $\mu\text{m}$  y una polidispersidad del tamaño de partícula de 1,1 a 4,0, y en la que la relación en peso de dicho polímero biocompatible a dicho azúcar reductor o no reductor en dicha combinación de excipientes es de 1/1 a 1/8. En segundo lugar, la presente invención se refiere a un sistema para realizar vacunaciones en aves de corral mediante inhalación, que comprende una cámara que contiene una composición de vacunación en polvo seco como se ha definido antes, y medios para nebulizar la composición de vacunación en polvo seco sobre dichas aves de corral. En tercer lugar, la presente invención se refiere a métodos y procedimientos para producir las composiciones de vacunación de aves de corral en polvo seco descritas antes, que comprenden el secado por pulverización de una fase líquida que comprende una mezcla de un agente vacunal seleccionado del grupo que consiste en virus, bacterias, hongos, parásitos y partes de los mismos, un excipiente líquido y una cantidad de excipientes sólidos soportes que consisten esencialmente en una combinación de un azúcar reductor o no reductor y un polímero biocompatible, para proporcionar dicha composición de vacunación en polvo seco en la forma de partículas que tienen un tamaño medio de partícula de 2 a 30  $\mu\text{m}$ .

En un aspecto, la invención proporciona composiciones de polvo seco para la vacunación de aves de corral adecuadas para nebulización directa sobre las aves de corral sin reconstitución de una solución de vacuna, evitando por lo tanto la pérdida de concentración de la vacuna inherente a cualquier etapa de reconstitución, y evitando el riesgo significativo del secado incontrolado de las gotitas, que se asocian con la práctica actual en la industria de las aves de corral de disolver la composición de vacunación antes de la nebulización sobre las aves de corral. En este

aspecto de la presente invención, la nebulización de una composición de vacunación de polvo seco, sin reconstitución previa de una solución de vacuna, permite una distribución fácil y eficiente y evita el riesgo significativo de la aglomeración de partículas que puede hacer que el tamaño de partícula sea inadecuado para inhalación.

**5 Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 presenta la distribución del tamaño de partícula (en micras) de un ejemplo de composición en polvo seco para vacunación veterinaria según esta invención, en porcentaje en volumen tanto para cada fracción (escala izquierda) como para las fracciones acumulativas (escala derecha).

10 La Figura 2 presenta la distribución acumulativa del tamaño de partícula de vacunas nebulizadas en polvo seco según la invención, en comparación con la distribución acumulativa del tamaño de las gotitas de una vacuna líquida nebulizada de la técnica anterior, medida por la técnica de difracción de láser.

La Figura 3 presenta la concentración de virus expresada como EID<sub>50</sub> por m<sup>3</sup> de aire para una vacuna nebulizada en polvo seco fino según la invención, en comparación con una vacuna líquida fina nebulizada de la técnica anterior.

15 La Figura 4 presenta los títulos séricos de inhibición media de la hemaglutinación (HI) obtenidos a las 2 y 4 semanas post- vacunación con vacunas en polvo seco nebulizadas. Las barras de error representan las desviaciones típicas.

**Descripción detallada de la invención**

Las características más relevantes del primer aspecto de la presente invención son:

- la presencia de una cantidad de excipientes soportes que consisten esencialmente en una combinación de un azúcar reductor o no reductor y un polímero biocompatible, y
- 20 - la composición en polvo para vacunación está en la forma de partículas que tienen un tamaño medio de partícula de 2 a 30 µm, y
- una polidispersidad del tamaño de partícula de 1,1 a 4,0, y
- la relación en peso de dicho polímero biocompatible a dicho azúcar reductor o no reductor en dicha combinación de excipientes es de 1/1 a 1/8.

25 Cuando se refiere al tamaño de partícula de un polvo seco de vacunación, el término "polidispersidad" como se usa aquí, a menos que se indique otra cosa, se refiere a la relación  $d(84\%) / d(50\%)$ , esto es el diámetro correspondiente al 84 % en la curva acumulativa de la distribución del tamaño de partícula basado en volumen dividido por el diámetro correspondiente al 50 % en la curva acumulativa de la distribución del tamaño de partícula basado en volumen.

30 En tanto que cumplan los objetivos de la presente invención, se pueden seleccionar adecuadamente composiciones útiles de vacunación combinando sub-intervalos particulares de los parámetros importantes indicados antes, dependiendo del tipo (especie) y edad de las aves de corral a vacunar. A este respecto, el tipo (especie) de aves de corral no es un parámetro crítico de la invención, y puede incluir no solamente pollos, sino también aves de granja tales como pavos, gansos, faisanes, patos y similares, y aves de compañía. Por ejemplo una composición en polvo con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 10 a 30 µm, preferiblemente de aproximadamente 15 a 25 µm, o aún mejor alrededor de 20 µm, es especialmente deseada para la primera vacunación de los pollos desde un día de edad hasta aproximadamente tres semanas. Por otro lado se prefiere una composición de vacunación en polvo con un tamaño medio de partícula desde aproximadamente 3 a 9 µm, por ejemplo desde aproximadamente 3 a 6 µm, o alrededor de 5 µm, para la vacunación secundaria (de refuerzo) de las aves de corral.

40 Una polidispersidad del tamaño de partícula tan baja como sea posible es un parámetro importante en el control seguro de las composiciones y sistemas de vacunación de polvo seco de esta invención, y es un parámetro determinante en el resultado satisfactorio final de los correspondientes métodos de vacunación. Se puede obtener ya una eficiencia de vacunación adecuada cuando se utiliza una composición en polvo seco de la invención en la que la polidispersidad del tamaño de partícula es inferior a 3,0, preferiblemente inferior a 2,5, y aún más preferiblemente inferior a 2,0. Puesto que el control de la polidispersidad es más difícil de alcanzar cuando el tamaño de partícula es más pequeño, y puesto que podría haber un buen equilibrio entre la eficacia de la vacunación y los costes del control de la polidispersidad, en muchos casos puede ser suficiente que la polidispersidad del tamaño de partícula de las composiciones de vacunación en polvo seco sea al menos 1,3, o al menos 1,5, e incluso al menos 1,7 teniendo en cuenta los requisitos contradictorios de reproducibilidad y costes de fabricación, y la eficacia de la vacunación. Los intervalos de trabajo adecuados para la polidispersidad del tamaño de partícula de la composición en polvo de esta invención van por tanto desde aproximadamente 1,3 hasta aproximadamente 3,0, preferiblemente de 1,5 a 2,5.

La proporción de los excipientes presentes en la composición de vacunación en polvo seco no es una característica limitante de esta invención, y usualmente no influye en la viabilidad de fabricación de la composición. Esta proporción se puede seleccionar por los expertos, utilizando los conocimientos convencionales de la técnica, dependiendo de diferentes parámetros tales como, pero sin limitarse a ellos, la función o funciones técnicas y el número de excipientes, su mutua compatibilidad, el tipo y concentración del agente vacunal de las aves de corral y, opcionalmente, el tamaño medio de partícula que se desea alcanzar (por ejemplo dependiendo del tipo y edad de las aves de corral a ser vacunadas). La proporción de dichos uno o más excipientes puede variar ampliamente de 0,1 % a 99,999 %, por ejemplo de 0,1 % a 99,9 % tal como de 0,5 % a 99,5 % en peso de dicha composición de vacunación en polvo seco, o de 1 % a 99 %, o de 2 % a 98 %, por ejemplo de 90 % a 99,999 % en peso. La proporción del agente de vacunación puede variar por consiguiente de 0,001 % a 99,9 % en peso, por ejemplo, de 0,001 % a 10 % en peso de dicha composición de vacunación en polvo seco.

La clase y naturaleza de dichos uno o más excipientes presentes en la composición de vacunación en polvo seco no es una característica limitante de esta invención, siempre que participen en la estabilidad de la vacuna y en la facilidad de nebulización directa en forma de polvo, y se pueden seleccionar por los expertos, utilizando los conocimientos convencionales de la técnica, dependiendo de diferentes parámetros tales como, pero sin limitarse a ellos, la función técnica a realizar por cada excipiente individual, su compatibilidad con los otros excipientes, y consideraciones de coste. Dichos uno o más excipientes son preferiblemente de un grado veterinariamente aceptable y se pueden seleccionar adecuadamente, pero sin limitación, del grupo que consiste en:

- azúcares reductores tales como, pero sin limitarse a ellos, glucosa, fructosa, manosa, galactosa, sorbosa, xilosa, ribosa, lactosa, maltosa, celobiosa y similares,

- azúcares no reductores tales como, pero sin limitarse a ellos, trehalosa, sacarosa, y similares,

- polioles tales como, pero sin limitarse a ellos, manitol, sorbitol, maltitol, xilitol, eritritol, inositol y similares,

- polímeros biocompatibles tales como, pero sin limitarse a ellos, polivinilpirrolidona, acetato de polivinilo, poliésteres alifáticos, poli(lactida), poli(glicolida), poli(lactida-co-glicolida), policaprolactona, poli(lactida-co-caprolactona), ácido poliacrílico, carragenina, chitosán, derivados de celulosa, dextrano, dextrano modificado químicamente, inulina, maltodextrina, polietilenglicol, óxido de polietileno, polimetacrilatos, alcohol polivinílico, almidón y similares,

- proteínas tales como, pero sin limitarse a ellas, albúmina, lactosuero desecado, caseína y similares, y

- lípidos tales como, pero sin limitarse a ellos, DPPC, DSPC y similares.

Se ha encontrado sorprendentemente que una combinación de un azúcar reductor o no reductor y un polímero biocompatible tiene efectos superiores en términos de estabilidad de la vacuna y facilidad de nebulización directa en forma de polvo, sobre otros tipos de excipientes veterinariamente aceptables conocidos en la técnica de vacunación de las aves de corral. Por lo tanto dicha combinación constituye la porción esencial de los excipientes presentes en las composiciones de vacunación en polvo seco de esta invención. En circunstancias particulares, puede ser deseable complementar esta combinación específica de excipientes con otros tipos de excipientes especificados anteriormente en esta memoria tales como, pero sin limitarse a ellos, polioles, lípidos, proteínas y similares.

Normalmente se prefiere el uso de un azúcar no reductor como un excipiente en las composiciones de vacunación en polvo seco de esta invención sobre los azúcares reductores. Esta preferencia se puede alcanzar también por el uso de una mezcla de los mismos, en la que es predominante la proporción de azúcares no reductores en la mezcla.

Por ejemplo, los excipientes estabilizantes adecuados suelen ser amorfos después de desecación, y/o actúan como materiales que reemplazan al agua y/o protegen al material mediante encapsulación, cuyo comportamiento puede ayudar a preservar la estructura original del microorganismo (por ejemplo, un virus) contenido en la composición de polvo seco y a contribuir a la estabilidad del polvo a lo largo del tiempo.

Las vacunas convencionales vivas, atenuadas e inactivadas así como las vacunas recombinantes, de subunidades, de péptidos, y de DNA se pueden usar adecuadamente como agente activo de vacunación veterinaria en las composiciones de polvo para la vacunación de las aves de corral de la invención.

Los agentes vacunales tales como los virus atenuados que se pueden incorporar adecuadamente a una composición en polvo seco para vacunación de las aves de corral mediante inhalación, según la presente invención se pueden obtener por cualquier método convencional conocido. En resumen, se puede inocular un sustrato susceptible con el virus relevante y propagar hasta que el virus se replica hasta una concentración deseada, y después de este tiempo se recoge el material que contiene el virus. Cualquier sustrato que sea capaz de mantener la replicación del virus se puede usar adecuadamente para realizar la presente invención, incluyendo los cultivos celulares primarios (aviares), tales como células fibroblastos de embrión de pollo (CEF) o células de riñón de pollo

(CK), o líneas celulares de mamífero tales como la línea celular VERO o la línea celular de riñón de cría de hámster (BHK). Preferiblemente, el virus se propaga en embriones de pollo exentos de patógenos específicos (SPF).

Más particularmente, un sustrato adecuado sobre el que se puede propagar el virus relevante son los huevos embrionados SPF. Los huevos embrionados pueden ser inoculados, por ejemplo con 0,2 ml de fluido alantoideo que contiene NDV que comprende al menos  $10^2$  dosis infecciosas  $_{50}$  para embriones (abreviada aquí como EID $_{50}$ ) por huevo. Preferiblemente, se inoculan huevos embrionados de 9-12 días con aproximadamente  $10^5$  EID $_{50}$  y se incuban a continuación a 37 °C durante 2 a 4 días, tras lo cual se puede recoger el producto del virus de ND, preferiblemente recogiendo el fluido alantoideo. Después se puede centrifugar el fluido durante aproximadamente 10 minutos a 2500 g, seguido por la filtración del sobrenadante a través de un filtro (100  $\mu$ m).

La presente invención se refiere también a un método para producir la composición de polvo seco descrita anteriormente para vacunación de las aves de corral mediante inhalación, comprendiendo dicho método la liofilización de una formulación acuosa que comprende una mezcla de una cantidad eficaz de un agente activo de vacunación de las aves de corral y una cantidad soporte de una combinación de un azúcar reductor o no reductor y un polímero biocompatible, y después la molienda del producto directo de dicha etapa de liofilización de tal forma que se proporciona dicha composición de vacunación en polvo en la forma de partículas secas que tienen un tamaño medio de partícula de 2 a 30  $\mu$ m y, opcionalmente, una polidispersidad del tamaño de partícula de 1,1 a 4,0. Los sub-intervalos de los últimos parámetros son como se han descrito anteriormente.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para producir la composición de polvo seco descrita anteriormente para vacunación de las aves de corral mediante inhalación, comprendiendo dicho método el secado por pulverización de una fase líquida que comprende una mezcla de una cantidad eficaz de una vacuna veterinaria y una cantidad soporte de una combinación de un azúcar reductor o no reductor y un polímero biocompatible, de tal forma que se proporciona dicha composición en polvo en la forma de partículas secas que tienen un tamaño medio de partícula de 2  $\mu$ m a 30  $\mu$ m y, opcionalmente, una polidispersidad del tamaño de partícula de aproximadamente 1,1 a 4,0. El método de producción de la invención, preferiblemente secado por pulverización se puede efectuar a una temperatura, es decir una temperatura de entrada como se explica más adelante, que varía de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 170 °C, o incluso tan alta como 190 °C. Los expertos entienden que dependiendo del tipo del equipo de secado por pulverización y de la velocidad de alimentación usada, la temperatura de secado por pulverización puede ser bastante diferente a la entrada y a la salida del dispositivo de secado por pulverización. La temperatura de secado por pulverización no es un factor limitante de este aspecto de la invención, y los límites de la temperatura convencional son de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 160 °C. El equipo de secado por pulverización utilizado en este aspecto de la invención no es un factor crítico de la invención y puede ser de cualquier tipo comercialmente disponible o convencional en la técnica.

La composición de polvo seco para vacunación veterinaria de la presente invención, a la vista de sus características de tamaño medio de partícula y/o de polidispersidad del tamaño de partícula, es inhalable por las aves y por lo tanto puede ser utilizada eficazmente tanto para la inmunización profiláctica como terapéutica de las aves de corral, por ejemplo para cualquier tipo de aves de corral gallináceas, y una vía de administración adecuada incluye, pero sin limitarse a ella, la nebulización de la composición de vacunación en polvo seco sobre dichas aves de corral.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones de polvo seco para la vacunación de las aves de corral adecuadas para inclusión en un sistema para nebulización directa sobre las aves de corral sin reconstitución de una solución de vacuna, evitando las pérdidas de concentración de la vacuna y evitando la aglomeración de las partículas.

Otro aspecto más de la invención se refiere así a un sistema de vacunación tal como un equipo de nebulización que incluye una composición de polvo seco para vacunación de aves de corral, según la descripción anterior. Más específicamente, esta invención se refiere a un sistema para realizar la vacunación de las aves de corral mediante inhalación que comprende:

- una cámara que contiene una composición de vacunación en polvo seco como se ha definido anteriormente en esta memoria, y
- medios para nebulizar la composición de vacunación en polvo seco sobre dichas aves de corral.

Preferiblemente este equipo incluye medios para impulsar dicha composición de polvo seco junto con un gas hacia las aves de corral. Preferiblemente dicho gas es aire. No es necesario para una realización eficiente de la invención utilizar gases propelentes especiales que podrían ser inhalados por las aves y causar problemas en el tracto respiratorio.

El último aspecto de la invención es útil para realizar la vacunación de las aves de corral nebulizando una composición de polvo seco tal como se ha descrito antes sobre dichas aves de corral. Cuando esta etapa de vacunación es una vacunación primaria (de sensibilización) en aves de corral con una edad inferior a dos o tres

semanas, dicha composición de polvo seco está preferiblemente en la forma de partículas que tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 10 a 30 µm, más preferiblemente de aproximadamente 15 a 25 µm, o aún mejor alrededor de 20 µm. Cuando esta vacunación es una vacunación secundaria (de refuerzo) en aves de corral con una edad superior a 2 a 3 semanas, dicha composición de polvo seco está preferiblemente en la forma de partículas que tienen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 3 a 9 µm, más preferiblemente alrededor de 5 µm.

5 Una "composición de vacunación de las aves de corral" como se usa aquí se refiere a una composición que comprende al menos una proteína, o fragmento de la misma, que provoca una respuesta inmunitaria que protege a un ave de la enfermedad cuando se administra en cantidades efectivas a dicho animal. Para uso en una  
10 composición de vacunación según la presente invención, el agente activo veterinario puede comprender adecuadamente un microorganismo vivo atenuado, inactivado o recombinante tal como, pero sin limitarse a ellos, virus, bacterias, micoplasmas o chlamidophyla.

Las vacunas particularmente adecuadas son tales como las vacunas de microorganismos vivos atenuados, inactivados y recombinantes, de subunidades, de péptidos, y de DNA a partir de:

15 - virus tales como, pero sin limitarse a ellos, Paramyxoviridae (por ejemplo, el virus de la enfermedad de Newcastle, Pneumovirus), Orthomyxoviridae (por ejemplo, el virus de la gripe), Coronaviridae (por ejemplo, el virus de la bronquitis infecciosa, Coronavirus de pavo, Torovirus de pavo), Picornaviridae (por ejemplo, virus de la encefalomiелitis aviar, virus de la hepatitis de pato, virus de la hepatitis de pavo), Reoviridae (por ejemplo Rotavirus), Birnaviridae (por ejemplo virus de la enfermedad bursal infecciosa), Retroviridae (por ejemplo virus de leucosis/sarcoma aviar), Astroviridae, Parvoviridae (por ejemplo Parvovirus de ganso), Adenoviridae, Herpesviridae  
20 (por ejemplo virus de laringotraqueitis infecciosa, virus de la enfermedad de Marek), Pox viridae, Hepadnaviridae (por ejemplo virus de la hepatitis de pato, virus de la hepatitis de pavo), Circoviridae, Papovaviridae (por ejemplo Polyomavirus hemorrágico de ganso), Caliciviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Arenaviridae,

25 - bacterias tales como, pero sin limitarse a ellas, Salmonella, Campylobacter, Escherichia Coli, Pasteurella (cólera de aves de corral), Rimerella anatipestifer, Ornithobacterium rhinotracheale, Hemophilus paragallinarum, Bordetella avium (Coriza de pavo), Mycoplasma (en particular *Mycoplasma gallisepticum*), Clostridia, Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus, Spirochaetes, Mycobacterium y Chlamydophila (psitacosis, ornitosis),

- hongos tales como, pero sin limitarse a ellos, Aspergillus y similares, y

30 - parásitos tales como, pero sin limitarse a ellos: Nematodos, Acanthocephalans, Coccidia, Cryptosporidium y Cochlosoma anatis.

Como una ilustración de una realización particularmente útil de esta invención, se pueden utilizar las siguientes cepas del virus de la enfermedad de Newcastle:

- vacunas lentogénicas tales como, pero sin limitarse a ellas, Hitchner-B<sub>L</sub> La Sota, Clone 30, V4, NDW, 12 y F, y

35 - vacunas mesogénicas tales como, pero sin limitarse a ellas, Roakin, Lukteswar y Komarov.

Como otra ilustración de una realización particularmente útil de esta invención, se puede utilizar la siguiente cepa del virus de la gripe aviar: cepa H5N1 Asia.

40 Según la presente invención, la inmunización se obtiene por inhalación de la composición de polvo seco de la invención por las aves de corral. Por ejemplo, se exponen los pollos a una nube de la composición de polvo seco que tiene el tamaño medio de partícula seleccionado y la combinación seleccionada de excipientes, y la polidispersidad del tamaño de partícula seleccionada. La duración de la inmunidad puede depender del programa de vacunación elegido. Una de las consideraciones más importantes que afectan a los programas de vacunación es el nivel de inmunidad materna en los pollos jóvenes, que puede variar considerablemente de granja a granja, de lote a lote, y entre pollos individuales. Por esta razón, se pueden emplear una o más de varias estrategias como sigue. O  
45 bien las aves no son vacunadas hasta las 2-4 semanas de edad cuando la mayor parte de ellas serán susceptibles, o bien se vacunan las aves de 1 día de edad mediante la aplicación de una pulverización gruesa. Se realiza entonces la revacunación 3-4 semanas más tarde.

50 El secado por pulverización es capaz de liberar directamente partículas de polvo seco dispersable de un tamaño medio de partícula adecuado y una polidispersidad del tamaño de partícula adecuada sin necesidad de molerlas después de la etapa de secado por pulverización. En este proceso, una suspensión líquida de virus se transforma rápidamente en una forma particulada desecada de tamaño medio de partícula adecuado y de distribución adecuada del tamaño de partícula por atomización en un medio gaseoso de secado caliente tal como, pero sin limitarse a él, el aire. Se crea una gran área interfacial aire-agua, el agua se evapora rápidamente y el secado se completa en unos

segundos. Durante la primera etapa de secado, en la que la superficie de las gotitas permanece al 100 % de humedad relativa, la temperatura de la superficie se mantiene en la temperatura del bulbo húmedo que es significativamente inferior a la temperatura del aire caliente. El propio virus no será expuesto a temperaturas altas, contribuyendo de este modo a la estabilidad deseada de la formulación de polvo resultante. Cuando se evapora el agua, el aire que rodea la partícula que contiene el virus sólido ha sido ya enfriado debido a la captación de humedad. También se puede evitar la desnaturalización del virus mediante el uso de excipientes que se utilizan comúnmente para la estabilización de materiales lábiles, tal como preferiblemente una combinación de azúcares reductores o azúcares no reductores y polímeros biocompatibles, y opcionalmente polioles, proteínas o lípidos, o mezclas de los mismos en cualquier proporción adecuada, como se ha mencionado anteriormente.

Es bien conocido por los expertos que la desecación completa de una composición en polvo no se puede conseguir ni mantener fácilmente a lo largo del tiempo a menos que se proporcionen condiciones especiales y usualmente costosas de producción y/o almacenaje. El término "seco" como se usa aquí no se refiere por tanto a la condición estricta de una ausencia completa de humedad. Si se realiza adecuadamente con todas las precauciones industriales convencionales y utilizando equipo comercialmente disponible, los métodos de producción por secado por pulverización y por liofilización descritos anteriormente son capaces de producir de forma consistente composiciones en polvo con un contenido en agua no superior a aproximadamente 4 % en peso, preferiblemente no por encima de aproximadamente 3 % en peso, y más preferiblemente no superior a aproximadamente 2 % en peso en el momento de la producción. Tales niveles de contenido de humedad residual de la composición de vacunación en polvo son aceptables para incluir dicho polvo en el sistema de vacunación de la invención, y para realizar la vacunación. Si se almacenan convenientemente antes de su uso real (esto es, evitando una temperatura de almacenamiento excesiva y/o una humedad excesiva en el sitio de almacenaje, el contenido en agua de tales composiciones de vacunación en polvo seco no aumenta significativamente con el tiempo, en particular no excede de aproximadamente 6 % en peso después de 12 semanas de almacenaje.

Típicamente, la composición en polvo de la vacuna veterinaria según la invención se puede administrar en una dosis de aproximadamente  $10^3$  a  $10^8$  EID<sub>50</sub> por animal, preferiblemente en una dosis que varía de aproximadamente  $10^5$  a  $10^7$  EID<sub>50</sub>.

La presente invención será descrita en los siguientes ejemplos con respecto a una realización particular de trabajo, pero la invención no está limitada por ellos, sino solamente por las reivindicaciones.

#### **Ejemplo 1 - preparación de una composición de vacunación en polvo seco mediante secado por pulverización**

Una solución acuosa que contiene 4 % en peso de trehalosa y 1 % en peso de polivinilpirrolidona como excipientes y el virus de la enfermedad de Newcastle ( $2,10^{12}$  EID<sub>50</sub> por gramo sólido) se secó por pulverización haciendo uso de un desecador de pulverización Mobile Minor. Un boquilla de dos fluidos de 1 mm se operó a una presión de aire de atomización de 1 bar. La temperatura de entrada se fijó a 160 °C, lo que dio como resultado junto con una velocidad de alimentación de 26 ml/minuto, una temperatura de salida de 70 °C.

Se evaluó el polvo resultante:

- en cuanto al contenido en agua y la absorción de agua utilizando la titulación por Karl Fischer,
- en cuanto a las propiedades termodinámicas con calorimetría diferencial de barrido, y
- en cuanto a la distribución del tamaño de partícula utilizando dispersión de láser (véase la Figura 1 ), siendo el equipo utilizado una versión de laboratorio de Mastersizer S largo (de Malvern).

Inmediatamente después de la producción, el contenido en agua del polvo resultante fue 3,1 % en peso, y aumentó a 5,9 % en peso después de una semana de almacenaje en viales de vidrio cerrados con cápsulas que contienen sílice a 22 °C y 42 % de humedad relativa. El material obtenido era completamente amorfo con una temperatura de transición vítrea de 65 °C. La polidispersidad del tamaño de partícula (como se ha definido anteriormente en esta memoria) del polvo seco fue 1,8, y el tamaño medio de partícula fue 6 µm, como se muestra como la Figura 1.

Inmediatamente después del secado, se inoculó una alícuota de polvo en huevos SPF y después de incubación, se determinó el contenido de virus en los fluidos alantoideos con un ensayo de hemaglutinación. Este demostró que se pudo retener  $2,10^{11}$  EID<sub>50</sub> por gramo de polvo desecado por pulverización.

#### **Ejemplo 2 - evaluación comparativa de concentraciones de virus en el aire después de nebulización de una vacuna de polvo seco fino y una vacuna líquida.**

Se preparó según la invención un polvo de vacunación seco fino con un contenido en agua de 3,8 % en peso, y con un tamaño de partícula adecuado para la vacunación secundaria de las aves de corral (esto es para deposición en

las vías respiratorias inferiores), a partir de una solución acuosa haciendo uso de un secador de planta piloto Mobile Minor con una boquilla de dos fluidos de 1 mm (temperatura de entrada 160 °C, temperatura de salida 70 °C, velocidad de alimentación 25 ml/minuto, velocidad de gas de secado 80 kg/hora, presión del aire de atomización 2 bares). La solución de alimentación sometida a secado por pulverización contenía 3 % (p/p) de trehalosa dihidrato, 1 % (p/p) de polivinilpirrolidona (PVP), 1 % (p/p) de seroalbúmina bovina (BSA) en agua destilada, a la que se añadió  $10^7$  EID<sub>50</sub> de virus de vacuna Clone 30 por ml de solución de alimentación.

Con fines de comparación, se reconstituyó una vacuna comercial Clone 30 en 5 ml de agua destilada, de los cuales se diluyeron después 30 µl hasta 5 ml para nebulización con un cabezal de pulverización Walther Pilot I que se utiliza a menudo para la aplicación experimental de las vacunas secundarias en aerosol finas.

La distribución del tamaño de partícula de la vacuna de polvo seco de la invención y la distribución del tamaño de las gotitas (a nivel de la boquilla) de la vacuna líquida comparativa nebulizada se han medido por difracción de láser. Los resultados se presentan en la Figura 2, en la que la curva (1) se refiere a la vacuna de polvo seco fino con trehalosa-PVP-BSA de esta invención y la curva (2) se refiere al aerosol líquido fino comparativo. La polidispersidad del tamaño de partícula de la composición de vacunación en polvo seco de esta invención fue 2,0 y su tamaño medio de partícula fue 7. El tamaño medio de las gotitas del aerosol líquido comparativo fue 24 µm.

Se nebulizaron 1 g de la vacuna en polvo y 5 ml de la vacuna líquida diluida en aisladores de 1,3 m<sup>3</sup> (28 °C y 40 % de humedad relativa) e inmediatamente después de la nebulización, se tomaron muestras de aire sobre filtros de gelatina para evaluar la concentración de virus en el aire (incubación en huevos embrionados de 10 días y posterior ensayo de hemaglutinación).

Los resultados se presentan en la Figura 3, en la que el término "dosis nebulizada de virus" representa la dosis teórica de virus que debería estar presente en el aire si no ha desaparecido ningún virus del aire por sedimentación o no se ha inactivado por el proceso de nebulización, y en la que la columna (1) se refiere a la vacuna de polvo seco fino con trehalosa-PVP-BSA y la columna (2) se refiere a la vacuna líquida fina comparativa nebulizada. Estos resultados demuestran que se obtuvieron altas concentraciones de virus en el aire con la vacuna en polvo inmediatamente después de la nebulización, y que la concentración fue solamente ligeramente inferior que la concentración teórica nebulizada (reducción de  $10^{6,5}$  a  $10^{6,1}$ ). Sin embargo, tuvo lugar una gran reducción del título de virus después de la nebulización de la vacuna líquida fina (de  $10^{7,4}$  a menos de  $10^{3,4}$ ), atribuida a la evaporación de las gotitas de vacuna en las condiciones climáticas mencionadas antes.

### **Ejemplo 3 - Inmunización de pollos con una composición de vacunación en polvo seco que tiene un tamaño medio de partícula de 7 µm**

El polvo de vacunación seco fino producido y caracterizado en el ejemplo 2 se administró a pollos broilers de 4 semanas exentos de patógenos especificados (esto es sin anticuerpos NCD), que se pusieron en aisladores con un volumen de 1,3 m<sup>3</sup>. Un grupo recibió vacuna en polvo seco fino, y otro grupo sirvió como un control blanco no vacunado.

Dos y cuatro semanas post-vacunación se tomaron muestras de sangre y se evaluaron en cuanto a los anticuerpos frente al virus de NCD mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). Los resultados se presentan en la Figura 4, en la que la columna (1) se refiere al polvo fino con trehalosa-PVP-BSA. La composición de polvo seco de la invención lleva a una respuesta inmunitaria suficiente a las 2 semanas post-vacunación, con títulos de HI que son más altos que los títulos de HI obtenidos regularmente de 2<sup>4</sup> a 2<sup>5</sup> después de una única aplicación de una vacuna de NCD lentogénica. El análisis estadístico por medidas repetidas con diseño ANOVA, demostró un aumento significativo del título de 2 a 4 semanas post-vacunación.

### **Ejemplo 4 - Inmunización de pollos con una composición de vacunación en polvo seco grueso**

Se preparó un polvo de vacunación seco grueso con un contenido en agua de 3,3 % en peso, y con un tamaño de partícula adecuado para vacunación primaria (esto es para deposición en las vías respiratorias superiores) a partir de la misma solución de alimentación acuosa como en el ejemplo 2 pero utilizando un secador de pulverización con una boquilla de 30 µm piezo-actuada (temperatura de entrada 190 °C, temperatura de salida 70 °C, velocidad de alimentación 30 ml/minuto, velocidad de gas de secado 25 kg/hora, frecuencia de generación de gotitas 50 kHz).

La distribución del tamaño de partícula se evaluó por el mismo método y equipo que en el ejemplo 2 (difracción de láser) y los resultados se presentan en la Figura 2, en la que la curva (3) se refiere a la vacuna de polvo seco grueso con trehalosa-PVP-BSA. La polidispersidad del tamaño de partícula fue 1,2 y el tamaño medio de partícula fue 29 µm.

Se administró la vacuna a pollos broilers de 4 semanas exentos de patógenos especificados (esto es sin anticuerpos NCD), que se pusieron en aisladores con un volumen de 1,3 m<sup>3</sup>. Un grupo recibió vacuna en polvo seco grueso, y otro grupo sirvió como un control blanco no vacunado.

5 Dos y cuatro semanas post-vacunación se tomaron muestras de sangre y se evaluaron en cuanto a los anticuerpos frente al virus de NCD mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). Los resultados se presentan en la Figura 4, en la que la columna (3) se refiere al polvo grueso con trehalosa-PVP-BSA. La composición de polvo seco de la invención lleva a una respuesta inmunitaria suficiente a las 2 semanas post-vacunación, con títulos de HI que están dentro del intervalo de los títulos de HI obtenidos regularmente de  $2^4$  a  $2^6$  después de una única aplicación de una vacuna de NCD lentogénica. El análisis estadístico por medidas repetidas con diseño ANOVA, demostró un aumento significativo del título de 2 a 4 semanas post-vacunación. La respuesta inmunitaria significativamente inferior comparada con el polvo fino con trehalosa-PVP-BSA del ejemplo 3 se refiere a los diferentes sitios de deposición de la vacuna (esto es vías respiratorias superiores para el polvo grueso, vías respiratorias inferiores para el polvo fino).

10

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de polvo seco para vacunación de las aves de corral mediante inhalación que comprende una cantidad eficaz de un agente vacunal de aves de corral seleccionado del grupo que consiste en virus, bacterias, hongos, parásitos y partes de los mismos, y una cantidad de excipientes soportes para dicho agente vacunal de aves de corral, consistiendo esencialmente dichos excipientes en una combinación de un azúcar reductor o no reductor y un polímero biocompatible, estando dicha composición de polvo seco en la forma de partículas que tienen un tamaño medio de partícula de 2 a 30 µm y una polidispersidad del tamaño de partícula de 1,1 a 4,0, y en la que la relación en peso de dicho polímero biocompatible a dicho azúcar reductor o no reductor en dicha combinación de excipientes es de 1/1 a 1/8.
2. Una composición de polvo seco para vacunación de las aves de corral según la reivindicación 1, en la que el virus se selecciona del grupo que consiste en Paramyxoviridae, virus de la enfermedad de Newcastle, Pneumovirus, Orthomyxoviridae, virus de la gripe, Coronaviridae, virus de la bronquitis infecciosa, Coronavirus de pavo, Torovirus de pavo, Picornaviridae, virus de la encefalomiелitis aviar, virus de la hepatitis de pato, virus de la hepatitis de pavo, Reoviridae, Rotavirus, Birnaviridae, virus de la enfermedad bursal infecciosa, Retroviridae, virus de leucosis/sarcoma aviar, Astroviridae, Parvoviridae, Parvovirus de ganso, Adenoviridae, Herpesviridae, virus de laringotraqueitis infecciosa, virus de la enfermedad de Marek, Pox viridae, Hepadnaviridae, virus de la hepatitis de pato, virus de la hepatitis de pavo, Circoviridae, Papovaviridae, Polyomavirus hemorrágico de ganso, Caliciviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Arenaviridae.
3. Una composición de polvo seco para vacunación de las aves de corral según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho polvo seco está en la forma de partículas que tienen un tamaño medio de partícula de 10 a 30 µm.
4. Una composición de polvo seco para vacunación de las aves de corral según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho polvo seco está en la forma de partículas que tienen un tamaño medio de partícula de 3 a 9 µm.
5. Una composición de polvo seco para vacunación de las aves de corral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho azúcar reductor se selecciona del grupo que consiste en glucosa, fructosa, manosa, galactosa, sorbosa, xilosa, ribosa, lactosa, maltosa, celobiosa, y mezclas de los mismos.
6. Una composición de polvo seco para vacunación de las aves de corral según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho azúcar no reductor se selecciona del grupo que consiste en trehalosa y sacarosa.
7. Una composición de polvo seco para vacunación de las aves de corral según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho polímero biocompatible se selecciona del grupo que consiste en polivinilpirrolidona, acetato de polivinilo, poliésteres alifáticos, poli(lactida), poli(glicolida), poli(lactida-co-glicolida), policaprolactona, poli(lactida-co-caprolactona), ácido poliacrílico, carragenina, chitosán, derivados de celulosa, dextrano, dextrano modificado químicamente, inulina, maltodextrina, polietilenglicol, óxido de polietileno, polimetacrilatos, alcohol polivinílico y almidón.
8. Un método para producir una composición de vacunación en polvo seco según la reivindicación 1, comprendiendo dicho método el secado por pulverización de una fase líquida que comprende una mezcla de un agente vacunal seleccionado del grupo que consiste en virus, bacterias, hongos, parásitos y partes de los mismos, un excipiente líquido y una cantidad de excipientes sólidos soportes que consisten esencialmente en una combinación de un azúcar reductor o no reductor y un polímero biocompatible, para proporcionar dicha composición de vacunación en polvo seco en la forma de partículas que tienen un tamaño medio de partícula de 2 a 30 µm.
9. Un método según la reivindicación 8, en el que el virus se selecciona del grupo que consiste en Paramyxoviridae, virus de la enfermedad de Newcastle, Pneumovirus, Orthomyxoviridae, virus de la gripe, Coronaviridae, virus de la bronquitis infecciosa, Coronavirus de pavo, Torovirus de pavo, Picornaviridae, virus de la encefalomiелitis aviar, virus de la hepatitis de pato, virus de la hepatitis de pavo, Reoviridae, Rotavirus, Birnaviridae, virus de la enfermedad bursal infecciosa, Retroviridae, virus de leucosis/sarcoma aviar, Astroviridae, Parvoviridae, Parvovirus de ganso, Adenoviridae, Herpesviridae, virus de laringotraqueitis infecciosa, virus de la enfermedad de Marek, Pox viridae, Hepadnaviridae, virus de la hepatitis de pato, virus de la hepatitis de pavo, Circoviridae, Papovaviridae, Polyomavirus hemorrágico de ganso, Caliciviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Arenaviridae.
10. Un método según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que el secado por pulverización se efectúa a una temperatura que varía de 160 °C a 190 °C.
11. Un sistema para realizar la vacunación de las aves de corral mediante inhalación que comprende:

- una cámara que contiene una composición de vacunación en polvo seco según la reivindicación 1, y
- medios para nebulizar la composición de vacunación en polvo seco sobre dichas aves de corral.

5 12. Un sistema para realizar la vacunación de las aves de corral según la reivindicación 11, en el que el virus se selecciona del grupo que consiste en Paramyxoviridae, virus de la enfermedad de Newcastle, Pneumovirus, Orthomyxoviridae, virus de la gripe, Coronaviridae, virus de la bronquitis infecciosa, Coronavirus de pavo, Torovirus de pavo, Picornaviridae, virus de la encefalomiелitis aviar, virus de la hepatitis de pato, virus de la hepatitis de pavo, Reoviridae, Rotavirus, Birnaviridae, virus de la enfermedad bursal infecciosa, Retroviridae, virus de leucosis/sarcoma aviar, Astroviridae, Parvoviridae, Parvovirus de ganso, Adenoviridae, Herpesviridae, virus de laringotraqueitis infecciosa, virus de la enfermedad de Marek, Pox viridae, Hepadnaviridae, virus de la hepatitis de pato, virus de la hepatitis de pavo, Circoviridae, Papovaviridae, Polyomavirus hemorrágico de ganso, Caliciviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Arenaviridae.

10 13. Un sistema para realizar la vacunación de las aves de corral según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que el contenido en agua de dicha composición de polvo seco no es superior al 4 % en peso.

15 14. Un sistema para realizar la vacunación de las aves de corral según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el azúcar no reductor de la composición de vacunación de polvo seco contenida en dicha cámara se selecciona del grupo que consiste en trehalosa y sacarosa.

20 15. Un sistema para realizar la vacunación de las aves de corral según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el dicho polímero biocompatible de la composición de vacunación de polvo seco contenida en dicha cámara se selecciona del grupo que consiste en polivinilpirrolidona, acetato de polivinilo, poliésteres alifáticos, poli(lactida), poli(glicolida), poli(lactida-co-glicolida), policaprolactona, poli(lactida-co-caprolactona), ácido poliacrílico, carragenina, chitosán, derivados de celulosa, dextrano, dextrano modificado químicamente, inulina, maltodextrina, polietilenglicol, óxido de polietileno, polimetacrilatos, alcohol polivinílico y almidón.

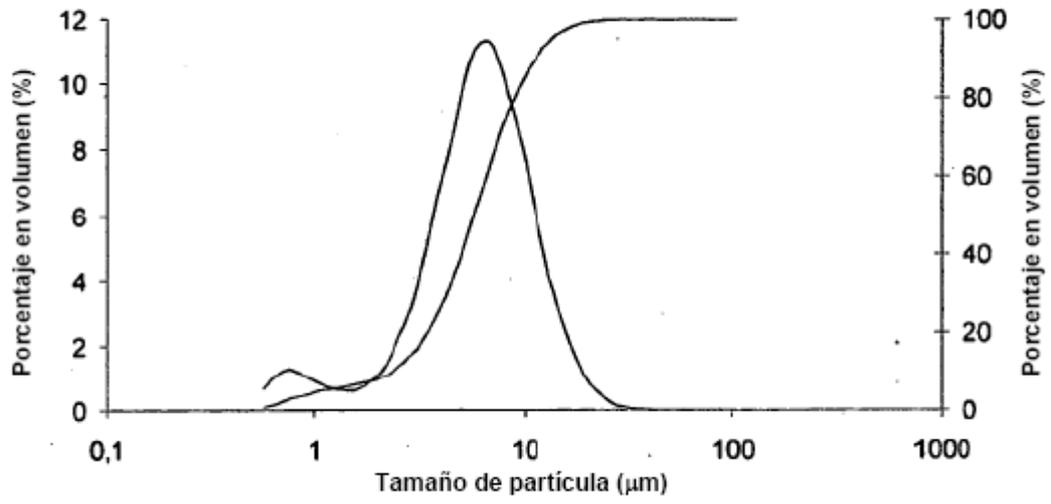


Figura 1

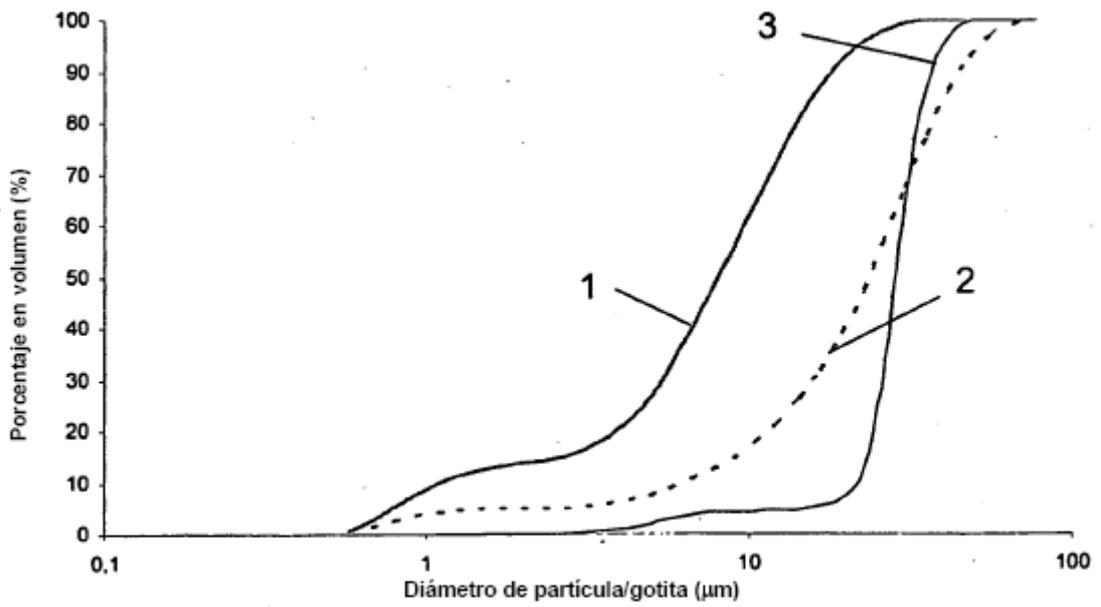


Figura 2

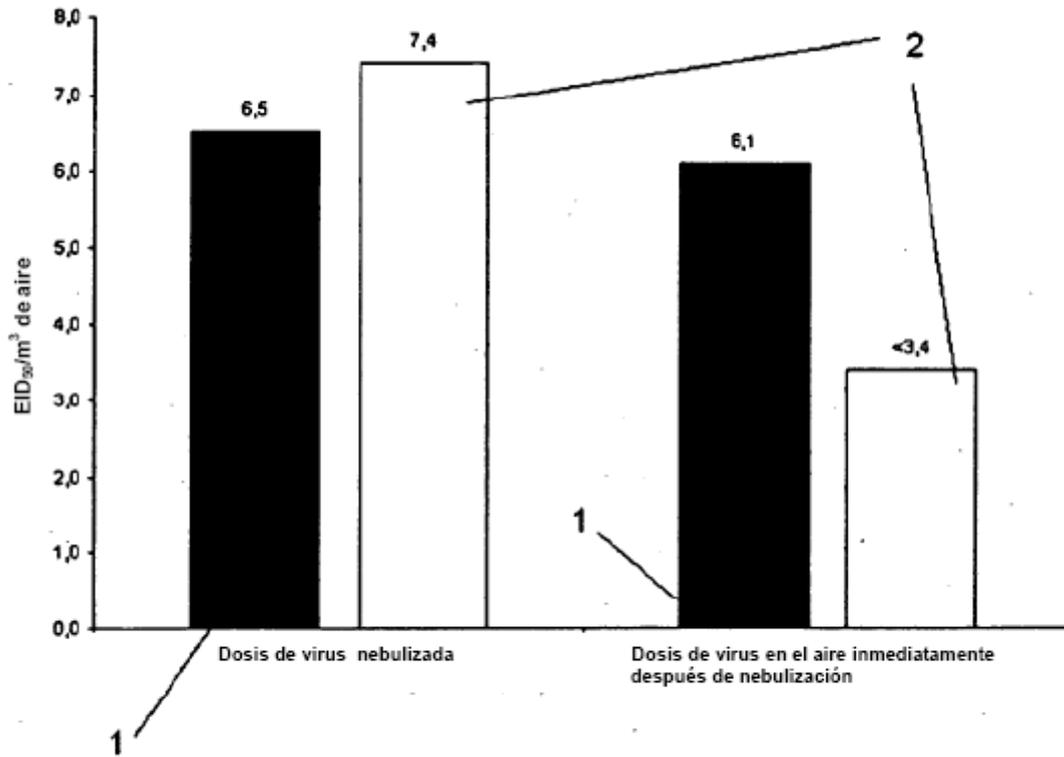


Figura 3

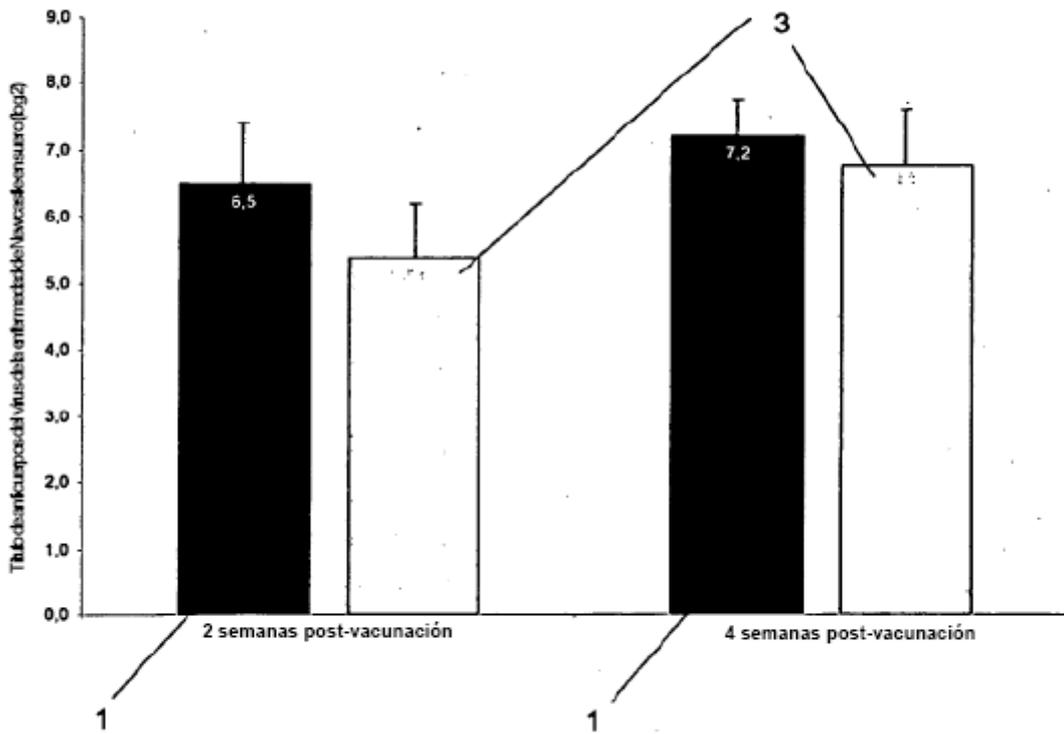


Figura 4