



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96754 (13) C2

(51) МПК (2011.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) КОМПОЗИЦІЇ У ВИГЛЯДІ СУХОГО ПОРОШКУ І СИСТЕМИ ДЛЯ ВАКЦИНАЦІЇ СВІЙСЬКОЇ ПТИЦІ

1

2

(21) a200812168

(22) 15.03.2007

(24) 12.12.2011

(86) РСТ/ЕР2007/002284, 15.03.2007

(31) 06005245.3

(32) 15.03.2006

(33) ЕР

(46) 12.12.2011, Бюл.№ 23, 2011 р.

(72) РЕМОН ЖАН ПОЛЬ, ВЕ, ВЕРВАТ КРІС, ВЕ,
КОРБАНИ ЕВІ, ВЕ, ВАН ЕК ЙОХАННЕС ХУБЕРТУС
ХЕНРІКУС, ВЕ, ЛАНДМАН ВІЛЬХЕЛЬМУС ЙО-
ХАННЕС МАТЕРНУС, ВЕ

(73) УНІВЕРСИТЕЙТ ГЕНТ, ВЕ

(56) WO 02/094852 A 28.11.2002

WO 00/40716 A 13.07.2000

WO 01/81417 A 01.11.2001

(57) 1. Суша порошкова композиція для вакцинації свійської птиці за допомогою інгаляції, яка включає ефективну кількість агента вакцини для свійської птиці, вибраного з групи, що складається з вірусів, бактерій, грибів, паразитів і їх частин, і підтримуючу кількість носіїв для вказаного агента вакцини для свійської птиці, причому вказані носії по суті складаються з комбінації відновного або невідновного цукру і біологічно сумісного полімеру, де вказана суша порошкова композиція представлена у формі частинок, що мають середній розмір від 2 до 30 мкм і полідисперсність розміру від 1,1 до 4,0, і де масове відношення вказаного біологічно сумісного полімеру до вказаного відновного або невідновного цукру у вказаній комбінації носіїв складає від 1/1 до 1/8.

2. Суша порошкова композиція для вакцинації свійської птиці за п. 1, де вірус вибраний з групи, яка складається з Paramyxoviridae, вірусу ньюкаслської хвороби, пневмовірусів, Orthomyxoviridae, вірусу грипу, Coronaviridae, вірусу інфекційного бронхіту, коронавірусу індичок, торовірусу індичок, Picornaviridae, вірусу пташиного енцефаломієліту, вірусу гепатиту качок, вірусу гепатиту індичок, Reoviridae, ротавірусу, Birnaviridae, вірусу інфекційного бурситу, Retroviridae, вірусу пташиного лейкозу/саркоми, Astroviridae, Parvoviridae, гусячо-

го парвовірусу, Adenoviridae, Herpesviridae, вірусу інфекційного ларинготрахеїту, вірусу хвороби Марека, Poxviridae, Hepadnaviridae, Circoviridae, Papovaviridae, вірусу гусячої геморагічної поліомі, Caliciviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Arenaviridae.

3. Суша порошкова композиція для вакцинації свійської птиці за п. 1 або за п. 2, де вказаний сухий порошок представлений у формі частинок, що мають середній розмір від 10 до 30 мкм.

4. Суша порошкова композиція для вакцинації свійської птиці за п. 1 або за п. 2, де вказаний сухий порошок представлений у формі частинок, що мають середній розмір від 3 до 9 мкм.

5. Суша порошкова композиція для вакцинації свійської птиці за будь-яким з пп. 1-4, де вказаний відновний цукор вибраний з групи, яка складається з глюкози, фруктози, манози, галактози, сорбози, ксилози, рибози, лактози, мальтози, целобіози, трегалози і їх сумішей.

6. Суша порошкова композиція для вакцинації свійської птиці за будь-яким з пп. 1-5, де вказаний біологічно сумісний полімер являє собою полівінілпіролідон.

7. Спосіб одержання сухої порошкової композиції для вакцинації за п. 1, де вказаний спосіб включає розпилювальне сушіння рідкої фази, яка включає суміш агента вакцини, вибраного з групи, що складається з вірусів, бактерій, грибів, паразитів і їх частин, рідкого носія і підтримуючої кількості твердих носіїв, що по суті складаються з комбінації відновного або невідновного цукру і біологічно сумісного полімеру, для надання вказаної сухої порошкової композиції для вакцинації у формі частинок, що мають середній розмір від 2 до 30 мкм.

8. Спосіб за п. 7, де вірус вибраний з групи, яка складається з Paramyxoviridae, вірусу ньюкаслської хвороби, пневмовірусів, Orthomyxoviridae, вірусу грипу, Coronaviridae, вірусу інфекційного бронхіту, коронавірусу індичок, торовірусу індичок, Picornaviridae, вірусу пташиного енцефаломієліту, вірусу гепатиту качок, вірусу гепатиту індичок,

(13) C2

(11) 96754

(19) UA

Reoviridae, ротавірусу, Birnaviridae, вірусу інфекційного бурситу, Retroviridae, вірусу пташиного лейкозу/саркоми, Astroviridae, Parvoviridae, гусячого парвовірусу, Adenoviridae, Herpesviridae, вірусу інфекційного ларинготрахеїту, вірусу хвороби Марека, Poxviridae, Hepadnaviridae, Circoviridae, Papovaviridae, вірусу гусячої геморагічної поліїмії, Caliciviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Arenaviridae.

9. Спосіб за п. 7 або 8, де розпилювальне сушіння здійснюють при температурі від 160 до 190 °C.

10. Система для вакцинації свійської птиці шляхом інгаляції, яка включає:

- камеру, що містить суху порошкову композицію для вакцинації за п. 1, і

- засіб для розпилення сухої порошкової композиції для вакцинації над вказаною свійською птицею.

11. Система для вакцинації свійської птиці за п. 10, де вірус агента вакцини сухої порошкової композиції для вакцинації свійської птиці вибраний з

групи, яка складається з Paramyxoviridae, вірусу ньюкаслської хвороби, пневмовірусів, Orthomyxoviridae, вірусу грипу, Coronaviridae, вірусу інфекційного бронхіту, коронавірусу індичок, торовірусу індичок, Picornaviridae, вірусу пташиного енцефаломієліту, вірусу гепатиту качок, вірусу гепатиту індичок, Reoviridae, ротавірусу, Birnaviridae, вірусу інфекційного бурситу, Retroviridae, вірусу пташиного лейкозу/саркоми, Astroviridae, Parvoviridae, гусячого парвовірусу, Adenoviridae, Herpesviridae, вірусу інфекційного ларинготрахеїту, вірусу хвороби Марека, Poxviridae, Hepadnaviridae, Circoviridae, Papovaviridae, вірусу гусячої геморагічної поліїмії, Caliciviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae і Arenaviridae.

12. Система для вакцинації свійської птиці за п. 10 або за п. 11, де вміст води у вказаній сухій порошковій композиції складає не більше 4 % по масі.

Даний винахід належить до композицій у вигляді сухого порошку для ветеринарної вакцинації, які використовуються для індукції захисних реакцій у свійської птиці проти пташиних захворювань, таких як, але без обмеження вказаними, ньюкаслська хвороба (NCD) і пташиний грип. Даний винахід також належить до систем для виконання вакцинації свійської птиці за допомогою інгаляції з використанням цих композицій.

Добре відомо, що пташині захворювання надають негативний економічний вплив на птахівництво і, можливо, на здоров'я інших тварин (зокрема ссавців) і людей, які можуть безпосередньо або опосередковано контактувати з інфікованими птахами.

Наприклад, від інфікованої свійської птиці можуть розповсюджуватися специфічні пташині патогени, такі як, але без обмеження вказаними, вірус ньюкаслської хвороби (далі скорочено NDV), вірус інфекційного бронхіту (IBV), вірус інфекційного бурситу (IBDV), вірус ринотрахеїту індичок (TRTV), вірус інфекційного ларинготрахеїту (ILT), вірус синдрому «кинутого» яйця (EDS), вірус пташиного енцефаломієліту, вірус ретикулоендотеліїту, пташині іоксвіруси, пташині аденовіруси, збудник інфекційного катару верхніх дихальних шляхів птахів, збудник тифоїдної лихоманки свійської птиці, збудник холери свійської птиці, вірус пташиного грипу, *Mycoplasma gallisepticum*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. і т. д.

Конкретніше, ньюкаслська хвороба являє собою вірусну інфекцію свійської птиці з широким географічним поширенням, яке може викликати великі економічні втрати промислового птахівництва. NDV являє собою етіологічний агент вказаного захворювання і представляє прототипний вірус роду Paramyxovirinae. Існують 9 серотипів пташиних параміксовірусів, позначуваних від APMV-1 до APMV-9. Ньюкаслська хвороба ускладнюється тим, що різні штами NDV можуть спричинити дуже суттєве варіювання тяжкості захворювання.

Інфікування може відбуватися або шляхом інгаляції, або при потраплянні патогену в травну систему, і інфекційна форма вірусу потім розповсюджується від одного птаха до іншого.

Пташиний грип являє собою заразне захворювання тварин, викликане вірусами грипу А, які звичайно інфікують тільки птахів, рідше свиней. Віруси пташиного грипу мають тенденцію бути видоспецифічними, але можуть переходити через видовий бар'єр і інфікувати ссавців і людей. Віруси грипу А мають 10 підтипів. Відомо, що тільки віруси підтипів H5 і H7 викликають високопатогенну форму захворювання. Вірус H5N1, відповідальний за поточну всесвітню епідемію пташиного грипу, виявився особливо стійким і в цей час викликає особливий неспокій відносно впливу на здоров'я людей.

Розпилювальна і аерозольна вакцинації, відповідно великими і дрібними крапельками рідини, являють собою методику масової вакцинації, що звичайно використовуються для захисту свійської птиці проти респіраторних вірусних інфекцій. Способи і пристрої для розпилення при розпилювальній і аерозольній вакцинаціях особливо важливі для вакцинації свійської птиці, оскільки вона має специфічні вимоги, наприклад, пристрої повинні працювати від зовнішнього джерела енергії.

Птиця звичайно вакцинується декілька разів протягом її життя відповідно до специфікацій виробника або складених на замовлення програм для оптимального запобігання спалахам захворювань. Так звана первинна вакцинація (примування) звичайно виконується відносно курчат у віці менше приблизно двох або трьох тижнів. За первинною вакцинацією звичайно йде одна або більше так званих вторинних вакцинацій (вторинних імунізацій).

Приблизно через 48 годин після вакцинації свійської птиці, при вакцинації проти інфекції деякими респіраторними вірусами, зокрема NDV, можуть з'явитися вакцинальні реакції. В ураженої

свійської птиці (наприклад, курей) можуть виявлятися респіраторні симптоми, анорексія, депресія, затримка росту і збільшена смертність. Вакцинальна реакція може додатково ускладнюватися повторним колибактеріозом (інфекцією *Escherichia coli*). Для запобігання цьому, через 36 годин після вакцинації птиці призначається лікування антибіотиками, яке часто виявляється ефективним. Проте, надмірне застосування або неналежне застосування антибіотиків може викликати бактеріальну стійкість, яка може перешкоджати адекватному лікуванню, будь якого разу, коли штами, резистентні до багатьох антибіотиків, посилюють вакцинальні реакції.

Живі віруси з низькою вірулентністю (лентогенні) або з помірною вірулентністю (мезогенні) звичайно використовуються для вакцинації свійської птиці проти ньюкаслської хвороби, залежно від ситуації, пов'язаної із захворюванням. Однак, вакцини проти ND з мезогенних вірусів придатні тільки для повторної вакцинації. Однак, в лентогенній групі також є суттєвий діапазон вірулентності. Звичайно використовувані живі вакцини включають лентогенні штами, такі як V4, Hitchner B1, F і La Sota, і мезогенні штами, такі як штам H, Mukteswar, Koinarov і Roakin.

Основна перевага живих вакцин NDV полягає в тому, що їх можна вводити, використовуючи недорогі методики для масового застосування, такі як застосування розпиленням, аерозолування і спаявання питної води. Однак, як зазначено вище, живі вакцини можуть викликати важкі вакцинальні реакції, зокрема, в нижніх дихальних шляхах після аерозольної вакцинації. Для мінімізації цього недоліку важливо використовувати дуже низьковірулентний вірус, особливо як агент для первинної вакцинації. Проте, навіть звичайно використовувані низьковірулентні штами живого NDV Hitchner B1 і La Sota все ж можуть викликати помірні респіраторні вакцинальні реакції. Тому, в даній галузі є невідкладна потреба в поліпшенні вакцинації NDV з тим, щоб уникнути вакцинальних реакцій у прищеплених тварин, але, проте, викликати надійний імунітет проти даного захворювання.

Відомо, що для забезпечення ефективності аерозольних частинок, частинки, що вдихаються, повинні осідати у визначених областях респіраторного тракту птиці при урахуванні параметрів, таких як, але без обмеження вказаними, вид птиці, її вік, розмір інгальованих частинок і сприйнятливості до поствакцинальних реакцій.

Наявні в цей час в продажу розпилювачі, використовувані для одержання великих розпилених частинок, генерують значну частку частинок, які осаджуються в глибокорозташованих дихальних шляхах, тобто розподіл розміру частинок навколо оптимального розміру є дуже широким. Хоч цей ефект бажаний для повторних вакцинацій, він може привести до побічних вакцинальних реакцій у більш молодій птиці.

Спочатку утворені завислі в повітрі крапельки будуть випаровуватися, досягаючи приблизно 10% від їх первинного розміру. При генеруванні наявними в цей час методиками розпилення, цей фе-

номен буде перешкоджати досягненню результатів адекватної вакцинації, оскільки:

- під час первинної вакцинації, значна процентна частка частинок вакцини буде осідати в глибокорозташованих дихальних шляхах птиці, тоді як це не повинно було б відбуватися, що пояснює високу частоту спостережуваних респіраторних поствакцинальних реакцій;

- в зв'язку з широким і неконтрольованим розподілом розміру частинок, під час другої вакцинації відбувається інгальовання в нижні дихальні шляхи лише малої частки частинок після випаровування крапельок.

Після неадекватного розподілу розміру крапельок, втрата вірусу вакцини внаслідок інактивації під час одержання, відновлення розчиненням і розпиленням, являє собою другу по значущості причину низької ефективності відомих розпилювальних і аерозольних вакцинацій. По-перше, вірус вакцини, який загалом розмножується в рідкому середовищі, наприклад, в алантоїсній порожнині позбавлених визначених патогенів (SPF) яєць, ліофілізують для зберігання. Хоч віруси менш сприйнятливі до інактивуючих факторів середовища у висушеному вигляді, і хоч перед сушінням можна додати стабілізуючі експіканти, під час одержання і зберігання вакцини, проте, відбувається втрата концентрації вірусу. Перед розпиленням необхідно розчинити суху вакцину, і концентрація вірусу може додатково знизитися, коли мікрокількості дезінфікуючого агента присутні у воді, використовуваній для відновлення розчинення, і в зв'язку з термочутливістю вірусу в рідкому середовищі. Ця інактивація додатково збільшується, коли крапельки вакцини випаровуються після дисперсії. Значне зниження концентрації вакцини під час розпилювальної і аерозольної вакцинації може порушити індукцію достатньої імунної відповіді. Крім того, сучасні вакцини в рідких суспензіях характеризуються значною втратою стійкості.

У документі Allan et al. в *Avian Pathology* (1980) 9: 153-162 йде мова про використання розчинів вірусу ньюкаслської хвороби, що містять сорбіт, розчинений у воді, для генерування з верхньої поверхні ротора, що обертається з дуже високою швидкістю, вологих аерозольних частинок, яким перед направленням в експозиційну камеру надається можливість сушіння шляхом проходження через ряд колонок для одержання майже монодисперсних аерозолів, які мають розміри частинок від 1 до 4 мкм, призначених для вакцинації курей.

У документі WO 97/36578 розкриті мікрочастинки, піддані розпилювальному сушінню, щонайменше 90% яких мають середньооб'ємний розмір частинок від 1 до 10 мкм, що містять по суті однорідну суміш агента для генної терапії і експіканти, такий як вуглеводень. Ці мікрочастинки можуть комбінуватися з носієм великого розміру, і одержаний склад можна вводити, використовуючи інгалатор сухого порошку. У документі WO 97/36578 не йде мова про вакцинацію, ветеринарні види застосування, а також про полідисперсність розміру мікрочастинок.

У документі WO 99/52550 розкрита система доставки вакцини у вигляді полімерних частинок

для включення нерозчинного у воді білкового антигену, причому вказана система одержана з емульсії біологічно розкладаного полі(лактід-ко-гліколідного) співполімеру, де кінцеві полімерні частинки мають середній діаметр від 0,05 до 20 мкм, відповідно до розподілу об'ємного розміру. На фіг. 2 показана варіація розміру ілюстративних частинок, що мають середній діаметр 10 мкм. У документі WO 99/52550 не йде мова про пташиний вірус і розпилення, і в ньому не йде мова про присутність цукрів в системі доставки вакцини.

У патенті США № 6651655 розкритий спосіб створення імунної відповіді у пацієнта з використанням інгалятора сухого порошку, позбавленого якого-небудь газу-витискувача, тобто, який запускається диханням. Склад вакцини, завантажуваний у вказаний інгалятор сухого порошку, включає частинки вакцини у вигляді сухого порошку, які мають аеродинамічний розмір частинок менше ніж 50 мкм, і на фіг. 1 показаний розподіл розміру частинок ілюстративного меленого порошку вакцини. Після того як дрібні частинки одержані для осадження в глибоких відділах легень, мікронізована речовина змішується з великими частинками лактози, тобто розміром 100 мкм або приблизно в 50 разів більшими, ніж мелені частинки вакцини. Через принципи своєї конструкції, інгалятор сухого порошку за патентом США № 6651655 очевидно не придатний для вакцинації свійської птиці.

У документі WO 2005/123131 розкриті склади для розпилювального сушіння антитіла або вакцини, які включають від 4% до 10% мас. антитіла або вакцини, від 0,1 мМ до 50 мМ однієї або більше амінокислот, від 0,5 до 4% мас. цукру і воду. Залежно від використовуваного обладнання для розпилювання під високим тиском, крапельки будуть утворювати частинки сухого порошку в діапазоні розміру від 0,5 до 100 мкм. У документі WO 2005/123131 не йде мова про полідисперсність розміру мікрочастинок і не розглядаються склади, відмінні від комбінації амінокислот і цукрів.

Meszaros et al. в Acta Veterinaria Hungaria (1992) 40:121-127 описують імунізацію 1-10-денних курчат проти ньюкаслської хвороби аерозольною вакцинацією з використанням апарата Masterdtop MD-2500, який забезпечує крапельки розміром менше ніж 10 мкм. У цій публікації доданий стабілізатор крапельок для запобігання випаровуванню крапельок до сухих частинок. І тому в ній не йде мова про середній розмір і полідисперсність крапельок.

Метою даного винаходу є подолання цих недоліків.

Представлений в цьому документі винахід дозволяє просто і недорого подолати недоліки сучасної технології вакцинації свійської птиці шляхом надання для ветеринарної вакцинації, зокрема для вакцинації свійської птиці, ефективних сухих твердих порошкових композицій, які можна використовувати і для первинної, і для повторної вакцинації.

По-перше, даний винахід належить до порошкової композиції для ветеринарної вакцинації, зокрема до сухої порошкової композиції для вакцинації свійської птиці за допомогою інгаляції, причому

вказана композиція включає ефективну кількість ветеринарної вакцини, зокрема вакцини для свійської птиці, яка містить один або декілька мікроорганізмів або їх частин і один або більше носіїв для вказаної ветеринарної (особливо для свійської птиці) вакцини, де вказаний порошок представлений у формі частинок, що мають середній розмір частинок від приблизно 2 до 30 мкм і/або полідисперсність розміру частинок від 1,1 до 4,0. Переважно, вказаний набір носіїв включає комбінацію відновного або невідновного цукру і біологічно сумісного полімеру, і, необов'язково, інших носіїв. По-друге, даний винахід належить до способу і системи для виконання вакцинації свійської птиці, причому вказаний спосіб включає розпилення сухої порошкової композиції для вакцинації над вказаною свійською птицею, зокрема, де вказана суха порошкова композиція для вакцинації представлена у формі частинок, що мають середній розмір частинок від приблизно 2 до 30 мкм і/або полідисперсність розміру частинок від 1,1 до 4,0. По-третє, даний винахід належить до способів і технологічних процесів одержання описаних вище сухих порошкових композицій для вакцинації свійської птиці зручним і недорогим чином, використовуючи стандартне виробниче обладнання, застосовуване при виготовленні сухих порошкових лікарських форм.

В одному аспекті, винахід надає сухі порошкові композиції для вакцинації свійської птиці, придатні для прямого розпилення над свійською птицею без відновлення розчину вакцини, внаслідок цього виключаючи втрату концентрації вакцини, властиву будь-якій стадії відновлення розчиненням, і виключаючи суттєвий ризик неконтрольованого висихання крапельок, які пов'язані з застосуванням в сучасній практиці птахівництва на промисловій основі відновлення композиції для вакцинації розчиненням перед розпиленням над свійською птицею. У цьому аспекті даного винаходу, розпилення сухої порошкової композиції для вакцинації без попереднього відновлення розчину вакцини забезпечує можливість легкого і ефективного розподілу і дозволяє уникнути значного ризику агрегації частинок, яка може зробити розмір частинок непридатним для інгаляції.

Короткий опис фігур

На фіг. 1 показаний розподіл розміру частинок (в мкм) ілюстративної сухої порошкової композиції для ветеринарної вакцинації відповідно до даного винаходу, в об'ємних процентних частках як для кожної фракції (ліва шкала), так і для кумулятивних фракцій (права шкала).

На фіг. 2 показаний кумулятивний розподіл розміру частинок розпилених сухих порошкових вакцин відповідно до винаходу, в порівнянні з кумулятивним розподілом розміру крапельок розпиленої рідкої вакцини рівня техніки, за даними вимірювання методикою лазерної дифракції.

На фіг. 3 показана концентрація вірусу, виражена у вигляді EID_{50} на m^3 повітря для розпиленої дрібної порошкової сухої вакцини відповідно до винаходу, в порівнянні з розпиленими рідкими вакцинами у вигляді дрібних крапельок рівня техніки.

На фіг. 4 показані сироваткові титри середнього інгібування гемаглютинації (HI), одержані через 2 і 4 тижні після вакцинації розпиленними сухими порошковими вакцинами. Розмахи помилок відображають стандартні відхилення.

Детальний опис винаходу

Найбільш релевантними ознаками першого аспекту даного винаходу є:

- присутність придатної кількості, переважно підтримуючої кількості, одного або більше носіїв для ветеринарної вакцини в порошковій композиції для ветеринарної вакцинації, переважно сухій порошковій композиції для вакцинації свійської птиці за допомогою інгаляції, причому один або більше носіїв переважно включають комбінацію відновного або невідновного цукру і біологічно сумісного полімеру, і, необов'язково, інших носіїв; і/або

- порошок для вакцинації представлений у формі частинок, переважно по суті висушених частинок, що мають середній розмір частинок від приблизно 2 до 30 мкм, і/або

- порошок для вакцинації має відносно вузьку полідисперсність розміру частинок, наприклад, від приблизно 1,1 до 4,0.

Коли використовується в цьому документі термін «полідисперсність» належить до розміру частинок сухого порошку для вакцинації, то, поки немає інших вказівок, він належить до співвідношення $d(84\%)/d(50\%)$, тобто діаметр, відповідний 84% на кумулятивній кривій основаного на об'ємі розподілу розміру частинок, ділений на діаметр, відповідний 50% на кумулятивній кривій основаного на об'ємі розподілу розміру частинок.

Для відповідності цілям даного винаходу, придатні до використання композиції для вакцинації можуть бути відповідним чином вибрані об'єднанням визначених субдіапазонів вказаних вище важливих параметрів, залежно від типу (виду) і віку свійської птиці, яка підлягає вакцинації. У цьому відношенні, тип (вид) свійської птиці не є вирішальним параметром винаходу і може включати не тільки курей, але також поголів'я такої птиці як індички, гуси, фазани, каченята і ним подібні, і кімнатні птахи. Наприклад, порошкова композиція з середнім розміром частинок від приблизно 10 до 30 мкм, переважно від приблизно 15 до 25 мкм, а ще краще близько 20 мкм, особливо бажана для першої вакцинації курчат у віці від одного дня до приблизно трьох тижнів. З іншого боку, порошкова композиція для вакцинації з середнім розміром частинок від приблизно 3 до 9 мкм, наприклад, від приблизно 3 до 6 мкм або близько 5 мкм, переважна для вторинної (повторної) вакцинації свійської птиці.

Якомога більш низька полідисперсність розміру частинок являє собою важливий параметр точного контролю сухих порошкових композицій для вакцинації і пристроїв за даним винаходом, і є визначальним параметром кінцевого успіху відповідних способів вакцинації. Придатну ефективність вакцинації можна вже одержати при використанні сухої порошкової композиції за винаходом, де полідисперсність розміру частинок складає менше 3,0, переважно менше 2,5, а ще переважніше ме-

нше 2,0. Оскільки регуляції по л і дисперсності важче досягнути, коли розмір частинок менше, і оскільки повинен бути відповідний баланс між ефективністю вакцинації і витратами на регуляцію полідисперсності, то в багатьох випадках може бути достатнім, щоб полідисперсність розміру частинок порошкових композицій для вакцинації складала щонайменше 1,3 або щонайменше 1,5 і навіть щонайменше 1,7, беручи до уваги суперечливі вимоги відтворюваності виготовлення і витрат і ефективності вакцинації. Тому придатні робочі діапазони полідисперсності розміру частинок порошкової композиції за даним винаходом складають від приблизно 1,3 до приблизно 3,0, переважно від 1,5 до 2,5.

Частка одного або більше носіїв, присутніх в сухій порошковій композиції, не є обмежувальною ознакою даного винаходу і звичайно не впливає на можливість виготовлення композиції. Цю частку фахівець в даній галузі може вибрати, використовуючи відомі в даній галузі стандарти, залежно від різних параметрів, таких як, але без обмеження вказаними, технічна функція (функції) і кількість носіїв, їх взаємна сумісність, тип і концентрація агента ветеринарної (зокрема призначеної для свійської птиці) вакцини, тобто тип мікроорганізмів (або їх частин), і, необов'язково, цільовий середній розмір частинок, якого потрібно досягнути (наприклад, залежно від типу і віку свійської птиці, що підлягає вакцинації). Частка вказаного одного або більше носіїв може варіюватися в широких діапазонах від 0,1% до 99,999%, наприклад від 0,1% до 99,9%, таких як від 0,5% до 99,5% мас. вказаної порошкової композиції або від 1% до 99%, або від 2% до 98%, наприклад від 90% до 99,999% мас. Частка агента вакцинації може, отже, знаходитися в діапазоні від 0,001% до 99,9% мас, наприклад від 0,001% до 10% мас, вказаної сухої порошкової композиції.

Вид і природа вказаного одного або більше носіїв, присутніх в сухій порошковій композиції, не є обмежувальною ознакою даного винаходу, за умови, що вони додають внесок в стійкість вакцини і легкість прямого розпилення порошкової форми, і можуть бути вибрані фахівцем в даній галузі з використанням стандарту, відомого в даній галузі, залежно від різних параметрів, таких як, але без обмеження вказаними, технічна функція, виконувана кожним окремим носієм, його сумісність з іншим носієм (носіями) (у випадку множинних носіїв) і облік витрат. Вказані один або більше носіїв переважно належать до ветеринарно прийнятного типу і можуть бути придатним чином вибрані, але без обмеження, з групи, яка складається з:

- відновних цукрів, таких як, але без обмеження, глюкоза, фруктоза, маноза, галактоза, сорбоза, ксилоза, рибоза, лактоза, мальтоза, целобіоза і ним подібні,

- поліолів, таких як, але без обмеження, маніт, сорбіт, мальтит, ксиліт, еритрит, інозит і ним подібні,

- біологічно сумісних полімерів, таких як, але без обмеження, полівінілпіролідон, полі вінілацетат, складні аліфатичні поліефіри, полі(лактид), полі(гліколід), полі(лактид-ко-гліколід), полікапро-

лактон, полі(лактид-ко-капролактон), поліакрилова кислота, карагенан, хітозан, похідні целюлози, декстран, хімічно модифікований декстран, інουλін, мальтодекстрин, поліетиленгліколь, поліетиленоксид, поліметакрилати, полівініловий спирт, крохмаль і ним подібні,

- білків, таких як, але без обмеження, альбумін, висушена молочна сироватка, казеїн і ним подібні, і

- ліпідів, таких як, але без обмеження, DPPC, DSPC і ним подібні.

Однак, до здивування було виявлено, що комбінація відновного або невідновного цукру і біологічно сумісного полімеру надає більш виражені ефекти з точки зору стійкості вакцини і легкості прямого розпилення порошкової форми, в порівнянні з іншими типами ветеринарно прийнятних носіїв, відомих в галузі вакцинації свійської птиці. Тому переважно, щоб така комбінація складала суттєву частку носіїв, присутніх в сухих порошкових композиціях за даним винаходом. У певних обставинах, може бути бажаним доповнення цієї визначеної комбінації носіїв іншими типами носіїв, визначених вище в цьому документі, таких як, але без обмеження, поліолі, ліпіди, білки і ним подібні.

Використання невідновного цукру як носія в сухих порошкових композиціях за даним винаходом звичайно переважніше, ніж відновних цукрів. Цієї переваги можна також досягти використанням їх суміші, де частка невідновних цукрів в суміші є переважною.

Ці один або більше переважних ветеринарно прийнятних носіїв можна використовувати окремо або, переважно, в комбінації в будь-яких придатних пропорціях для оптимізації властивостей порошку. Наприклад, придатні стабілізуючі носії мають тенденцію ставати аморфними після висихання і/або діяти як матеріали, що заміщують воду, і/або екранувати матеріал інкапсуляцією, і ця поведінка може допомогти збереженню первинної структури мікроорганізму (наприклад, вірусу), що міститься в сухій порошковій композиції, і додає внесок в стійкість порошку протягом часу.

Звичайні живі, ослаблені і інактивовані вакцини, а також рекомбінантні, субодичні, пептидні і ДНК вакцини можна відповідним чином використовувати як активний агент для ветеринарної вакцинації в порошкових композиціях для ветеринарної вакцинації (переважно вакцинації свійської птиці) за винаходом.

Агенти вакцини, такі як ослаблені віруси, які можна відповідним чином включити в порошкову композицію для ветеринарної вакцинації, зокрема в суху порошкову композицію для вакцинації свійської птиці за допомогою інгаляції відповідно до даного винаходу, можна одержати будь-якими відомими звичайними способами. Коротко, сприятливий субстрат може заражатися релевантним вірусом, і вірус може розмножуватися доти, поки не відбудеться реплікація вірусу до бажаної концентрації, після чого збирають матеріал, що містить вірус. Будь-який субстрат, здатний витримати реплікацію вірусу, можна відповідним чином використовувати для виконання даного винаходу, включаючи первинні культури (пташиних) клітин,

таких як фібробласти курячих ембріонів (CEF) або курячі ниркові клітинки (CK), або лінії клітин ссавців, таких як лінія клітин VERO або лінія ниркових клітин дитинчат хом'ячків (BHK). Переважно, вірус розмножується в позбавлених специфічних патогенів (SPF) курячих ембріонах.

Конкретніше, придатний субстрат, на якому може розмножуватися релевантний вірус, являє собою яйця SPF, що містять ембріон. Яйця, що містять ембріон, можна заражати, наприклад, 0,2 мл NDV, які містять алантоїсну рідину, що включає щонайменше 10^2 ембріональної інфекційної дози 50 (в цьому документі скорочено EID₅₀) на яйце. Переважно, 9-12-денні яйця, що містять ембріон, заражають приблизно 10 EID₅₀ і в подальшому поміщують в інкубатор при 37°C на 2-4 дні, після чого можна зібрати продукт вірусу ND, переважно, шляхом збирання алантоїсної рідини. Потім рідину можна центрифугувати протягом приблизно 10 хвилин при 2500 g з подальшою фільтрацією на досадової рідини через фільтр (100 мкм).

Даний винахід також належить до способу одержання описаної вище порошкової композиції для ветеринарної вакцинації, зокрема сухої порошкової композиції для вакцинації свійської птиці за допомогою інгаляції, причому спосіб включає ліофілізацію водного складу, який включає суміш ефективної кількості активного агента для ветеринарної вакцинації (переважно для вакцинації свійської птиці) і відповідну кількість, переважно підтримуючу кількість, одного або більше носіїв для вказаного активного агента вакцинації (переважно комбінації відновного або невідновного цукру і біологічно сумісного полімеру), і потім помел прямого продукту вказаної стадії ліофілізації з тим, щоб надати вказану порошкову композицію у формі сухих частинок, які мають середній розмір частинок від приблизно 2 до приблизно 30 мкм і, необов'язково, полідисперсність розміру частинок від приблизно 1,1 до 4,0. Субдіапазони останніх вказаних параметрів описані вище в цьому документі.

У ще одному аспекті, даний винахід належить до способу одержання описаної вище сухої порошкової композиції для ветеринарної вакцинації, зокрема сухої порошкової композиції для вакцинації свійської птиці за допомогою інгаляції, причому вказаний спосіб включає ліофілізацію рідкої фази, яка включає суміш ефективної кількості ветеринарної вакцини і підтримуючу кількість одного або більше носіїв для вказаної ветеринарної вакцини (переважно комбінації відновного або невідновного цукру і біологічно сумісного полімеру) з тим, щоб надати вказану порошкову композицію у формі сухих частинок, які мають середній розмір частинок від приблизно 2 мкм до приблизно 30 мкм і, необов'язково, полідисперсність розміру частинок від приблизно 1,1 до 4,0. Спосіб одержання за винаходом, переважно ліофілізація, може здійснюватися при температурі, тобто температурі на впуску, як пояснюється нижче, в діапазоні від приблизно 30°C до приблизно 170°C або навіть такої, що досягає 190°C. Фахівець в даній галузі розуміє, що залежно від типу обладнання для ліофілізації і використовуваної швидкості подачі, температура ліофілізації може бути абсолютно різною на впуску

і випуску з пристрою для ліофілізації. Температура ліофілізації не є обмежувальною ознакою даного аспекту винаходу, і звичайні діапазони температури знаходяться в діапазоні від приблизно 40°C до приблизно 160°C. Обладнання для ліофілізації, використовуване в даному аспекті винаходу, не є обмежувальною ознакою винаходу, і може належати до будь-якого типу, який є в продажу або є стандартним в даній галузі.

Порошкова композиція для ветеринарної вакцинації за даним винаходом є, в зв'язку з характеристиками середнього розміру частинок і/або полідисперсності розміру частинок, вдихуваною птицею, і тому може ефективно використовуватися або для профілактичної, або для терапевтичної імунізації свійської птиці, наприклад, будь-якого типу свійської птиці, що належить до виду курячих, і придатний шлях введення включає, але без обмеження, розпилення сухої порошкової композиції для вакцинації над вказаною свійською птицею.

У іншому аспекті, винахід надає сухі порошкові композиції для вакцинації свійської птиці, придатні для включення в пристрій для прямого розпилення над свійською птицею без відновлення розчину вакцини, уникаючи втрати концентрації вакцини, і уникаючи агломерації частинок. Цей аспект винаходу не обмежується сухою порошковою композицією попередніх аспектів винаходу, але може також використовуватися для будь-якої сухої порошкової композиції для вакцинації свійської птиці з такою ж сприятливою дією на виключення втрати концентрації вакцини і виключення агломерації частинок.

Ще один аспект винаходу належить до системи для вакцинації, такої як розпилювальне обладнання, що включає суху порошкову композицію для ветеринарної вакцинації, переважно вакцинації свійської птиці, відповідно до наведеного вище опису. Конкретніше, даний винахід належить до системи для виконання вакцинації свійської птиці за допомогою інгаляції, яка включає:

- камеру, яка містить суху порошкову композицію для вакцинації, що містить ефективну кількість вакцини для свійської птиці, яка включає одну або більше вакцин для свійської птиці і підтримуючу кількість одного або більше носіїв для вказаної вакцини для свійської птиці, причому вказана суха порошкова композиція представлена у формі частинок, що мають середній розмір частинок від 2 до 30 мкм і полі дисперсність розміру частинок від 1,1 до 4,0, і

- засіб для розпилення сухої порошкової композиції для вакцинації над вказаною свійською птицею.

Переважно, це обладнання включає засіб для пульсуючої подачі вказаної сухої порошкової композиції разом з газом в напрямі свійської птиці. Переважно, вказаний газ являє собою повітря. Для ефективного виконання винаходу немає необхідності у використанні спеціальних газів-вживитисувачів, які може вдихати птиця, і які можуть викликати проблеми, пов'язані з дихальними шляхами.

Ще один аспект винаходу належить до способу виконання вакцинації свійської птиці, причому

вказаний спосіб включає розпилення сухої порошкової композиції, такої як описана вище, над вказаною свійською птицею. Коли ця стадія вакцинації являє собою первинну вакцинацію (ревакцинацію) свійської птиці у віці від двох до трьох тижнів, то вказана суха порошкова композиція переважно представлена у формі частинок, що мають середній розмір частинок від приблизно 10 до 30 мкм, переважніше від приблизно 15 до 25 мкм або ще краще приблизно 20 мкм. Коли ця вакцинація являє собою вторинну вакцинацію (ревакцинацію) свійської птиці у віці старше 23 тижнів, то вказана суха порошкова композиція представлена переважно у формі частинок, що мають середній розмір частинок від приблизно 3 до 9 мкм, переважніше приблизно 5 мкм.

Використовуваний в цьому документі термін «композиція для вакцинації у ветеринарії (зокрема свійської птиці)» належить до композиції, яка включає щонайменше один білок або його фрагмент, який провокує імунну відповідь, яка захищає тварину, зокрема птицю, від захворювання, при введенні в ефективних кількостях вказаній тварині. Для використання в композиції для вакцинації відповідно до даного винаходу, ветеринарний активний агент може придатним чином включати живий ослаблений, інактивований або рекомбінантний мікроорганізм, такий як, але без обмеження, вірус, бактерія, мікоплазма або хламідіофіла.

Особливо придатні вакцини являють собою такі, як живі, ослаблені або інактивовані мікроорганізми, і рекомбінантні, субодичні, пептидні і ДНК вакцини з:

- вірусів, таких як, але без обмеження, Paramyxoviridae (наприклад, вірус ньюкаслської хвороби, пневмовіруси), Orthomyxoviridae (наприклад, вірус грипу), Coronaviridae (наприклад, вірус інфекційного бронхіту, коронавірус індичок, торо-вірус індичок), Picornaviridae (наприклад, вірус пташиного енцефаломієліту, вірус гепатиту качок, вірус гепатиту індичок), Reoviridae (наприклад, ротавірус), Birnaviridae (наприклад, вірус інфекційного бурситу), Retroviridae (наприклад, вірус пташиного лейкозу/саркоми), Astroviridae, Parvoviridae (наприклад, гусячий парвовірус), Adenoviridae, Herpesviridae (наприклад, вірус інфекційного ларинготрахеїту, вірус хвороби Марека), Pox viridae, Hepadnaviridae (наприклад, вірус гепатиту качок, вірус гепатиту індичок), Circoviridae, Papovaviridae (наприклад, вірус гусячої геморагічної поліоміи), Caliciviridae, Togaviridae, Arteriviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Arenaviridae,

- бактерій, таких як, але без обмеження, Salmonella, Campylobacter, Escherichia Coli, Pasteurella (холера свійської птиці), Rimerella anatipestifer, Ornithobacterium rhinotracheale, Hemophilus paragallinarum, Bordetella avium (катара верхніх дихальних шляхів індичок), Mycoplasma (зокрема Mycoplasma gallisepticum), клостридії, стафілококи, ентерококи, спірохети, мікобактерії і хламідії (пситаккоз, орнітоз),

- грибів, таких як, але без обмеження, Aspergillus і ним подібних, і

- паразитів, таких як, але без обмеження: *Nematodes*, *Acanthocephalans*, *Coccidia*, *Cryptosporidium* і *Cochlosoma anatis*.

Як ілюстрацію особливо корисного варіанта здійснення даного винаходу можна використовувати наступні штами вірусу ньюкаслської хвороби:

- лентогенні вакцини, такі як, але без обмеження, Hitchner-B1, La Sota, клон 30, V4, NDW, 12 і F, і

- мезогенні вакцини, такі як, але без обмеження, Roakin, Lukteswar і Komarov.

Як іншу ілюстрацію особливо корисного варіанта здійснення даного винаходу можна використовувати наступний штам вірусу пташиного грипу: штам H5N1 Asia.

Відповідно до даного винаходу, імунізацію виконують інгалюванням сухої порошкової композиції за винаходом свійської птиці. Наприклад, курчата піддаються впливу хмари сухої порошкової композиції, що має вибраний середній розмір частинок і/або вибрану комбінацію носіїв, і/або, необов'язково, вибрану полідисперсність розміру частинок. Тривалість імунітету може залежати від вибраної програми вакцинації. Одним з самих важливих факторів, що впливають на програми вакцинації, є рівень материнського імунітету у молодих курчат, який може значно варіюватися від ферми до ферми, від партії до партії і серед окремих курчат. З цієї причини, можна використовувати одну або більше з декількох наступних стратегій. Або птиця не вакцинується до віку 2-4 тижнів, коли більшість з них буде сприйнятлива, або однократна птиця вакцинується застосуванням розпалюваних вакцин з великим розміром частинок. Потім через 3-4 тижні проводиться ревакцинація.

Розпилювальне сушіння здатне безпосередньо забезпечити дисперговані частинки сухого порошку придатного середнього розміру частинок і/або придатної полідисперсності розміру частинок без необхідності їх подрібнення після стадії розпилювального сушіння. При цьому способі, рідка суспензія вірусу швидко трансформується у висушену форму у вигляді частинок придатного середнього розміру частинок і придатного розподілу розміру частинок шляхом розпилення в гарячому сушильному газоподібному середовищі, такому як, але без обмеження, повітря. Створюється велика площа поверхні розподілу між повітрям і водою. Вода швидко випаровується, і сушіння завершується в межах декількох секунд. Протягом ранньої стадії сушіння, коли поверхня крапельок залишається на рівні 100% відносної вологості, поверхнева температура підтримується на рівні температури мокрого термометра, яка значно нижче, ніж температура гарячого повітря. Сам вірус не буде схильний до впливу високих температур, таким чином, сприяючи бажаній стійкості одержаного порошкового складу. Коли вода випаровується, повітря навколо твердої частинки, що містить вірус, вже охолодилося внаслідок захоплення вологи. Денатурації вірусу можна також уникнути за допомогою використання носіїв, звичайно використовуваних для стабілізації лабільних матеріалів, таких як переважно комбінація відновних цукрів або невідновних цукрів і біологічно сумісних полі-

мерів, і, необов'язково, поліолів, білків або ліпідів або їх сумішей в будь-яких придатних пропорціях, як зазначено вище в цьому документі.

Фахівцям в даній галузі добре відомо, що повної сухості порошкової композиції не можна легко досягнути або підтримувати протягом часу, поки не забезпечуються спеціальні і звичайно дорогі умови виробництва і/або зберігання. Тому використовуваний в цьому документі термін «сухий» не належить до жорсткої умови повної відсутності вологи. При відповідному виконанні зі всіма стандартними промисловими обережностями і з використанням наявного у продажу обладнання, описані вище в цьому документі виробничі способи розпилювального сушіння і ліофілізації здатні відтворити досягнути під час виготовлення одержання порошкових композицій із вмістом води не вище приблизно 4% мас, переважно не вище приблизно 3% мас, а переважніше не вище приблизно 2% мас. Такі рівні вмісту залишкової вологи порошкової композиції для вакцинації цілком прийнятні для включення вказаного порошку в систему для вакцинації за винаходом і для виконання способу вакцинації за даним винаходом. При відповідному зберіганні перед практичним використанням (тобто уникаючи надмірної температури зберігання і/або надмірної вологості в приміщенні для зберігання), вміст води в таких сухих порошкових композиціях для вакцинації значно не збільшується з часом, зокрема, він не перевищує приблизно 6% мас. після 12 тижнів зберігання.

Звичайно, порошкову композицію ветеринарної вакцини відповідно до винаходу можна вводити в дозі від приблизно 10^3 до 10^8 EID₅₀ на тварину, переважно в дозі в діапазоні від приблизно 10^5 до 10^7 EID₅₀.

Даний винахід буде описаний в наступних прикладах відносно визначеного робочого варіанта здійснення, але винахід не обмежується ним, а тільки формулою винаходу.

Приклад 1 - Одержання сухої порошкової композиції для вакцинації розпилювальним сушінням

Водний розчин, що містить 5% мас. трегалози і 1% мас. полівінілпіролідону як носії і вірусу ньюкаслської хвороби ($2,10^{12}$ EID₅₀ на грам твердих речовин), сушили розпиленням, використовуючи розпилювальну сушарку Mobile Minor. Двоканальне сопло розміром 1 мм для двох рідин приводили в дію при тиску розпилювального повітря 1 бар. Температуру на впуску встановлювали на 160°C, що привело разом зі швидкістю подачі 26 мл/хвилину до температури на випуску 70°C.

Одержаний порошок оцінювали для визначення:

- вмісту води і поглинання води з використанням титратора Karl Fischer, термодинамічних властивостей диференціальною скануючою калориметрією, і

- розподілу розміру частинок з використанням лазерного розсіювання (див. фіг. 1), причому використовувалося обладнання являло собою довгу настільну лабораторну версію пристрою Mastersizer S (від компанії Malvern).

Відразу після одержання, вміст води в одержаному порошку становив 3,1% мас. і збільшував-

ся до 5,9% мас. після одного тижня зберігання в скляних флакончиках з ковпачками, що містять діоксид кремнію, при 22°C і відносній вологості 42%. Одержаний матеріал був повністю аморфним з температурою склування 65°C. Полідисперсність розміру частинок (визначена, як описано вище в цьому документі) сухого порошку становила 1,8, а середній розмір частинок становив 6 мкм, як показано на фіг. 1.

Відразу після сушіння, аліквотною кількістю порошку заражали яйця SPF, і після інкубації вміст вірусу в алантоїсних рідинках визначали тестом гемаглютинації. Він показав, що $2 \cdot 10^{11}$ EID₅₀ могло зберегтися на грам висушеного розпиленням порошку.

Приклад 2 - Порівняльна оцінка концентрації вірусу в повітрі після розпилення подрібненої сухої порошкової вакцини і рідкої вакцини

Подрібнений сухий порошок для вакцинації, що має вміст води 3,8% мас. і розмір частинок, придатний для вторинної вакцинації свійської птиці (тобто для осадження в нижніх дихальних шляхах), одержували відповідно до винаходу з водного розчину шляхом використання пілотної рослинної сушарки Mobile Minor з двоканальним соплом розміром 1 мм (температура на впуску 160°C, температура на випуску 70°C, швидкість подачі 25 мл/хвилину, швидкість сушильного газу 80 кг/год., тиск розпилювального повітря 2 бар). Розчин, що подається, який направляється в розпилювальну сушарку, містив 3% (мас/мас.) дигідрату трегалози, 1% (мас/мас.) полівінілпіролідону (PVP), 1% (мас/мас.) бичачого сироваткового альбуміну (BSA) в дистильованій воді, в який додавали 10^7 EID₅₀ вірусу вакцини Clone 30 на 1 мл розчину, що подається.

З метою порівняння, наявну в продажу вакцину Clone 30 відновлювали розчиненням в 5 мл дистильованої води і додатково розбавляли до 5 мл для розпилення розпилювальною головою Walter Pilot I, яку часто використовують для експериментального застосування вторинних аерозольних вакцин.

Розподіл розмірів частинок сухої порошкової вакцини за винаходом і розподіл розмірів крапельок (на рівні сопла) розпиленої порівняльної рідкої вакцини вимірювали лазерною дифракцією. Результати подані на фіг. 2, де крива (1) належить до подрібненої сухої порошкової вакцини, що містить трегалозу-PVP-BSA, за даним винаходом, а крива (2) належить до порівняльного аерозолю з дрібних крапельок рідини. Полідисперсність розміру частинок сухої порошкової композиції для вакцинації за даним винаходом становила 2,0, а середній розмір її частинок був 7 мкм. Середній розмір крапельок порівняльного аерозолю з дрібних крапельок рідини становив 24 мкм.

1 г порошкової вакцини і 5 мл розбавленої рідкої вакцини розпилювали в ізоляторах об'ємом 1,3 м³ (28°C і відносна вологість 40%) і відразу після розпилення проби повітря брали на желатинові фільтри для оцінки концентрації вірусу в повітрі (інкубація в 10-денних повернутих до зародкового стану яйця і подальший аналіз гемаглютинації).

Результати показані на фіг. 3, де термін «розпилена доза вірусу» представляє теоретичну дозу вірусу, яка повинна бути присутньою в повітрі, якщо не відбулося зникнення вірусу з повітря осадженням, або він був інактивований процесом розпилення, і де стовпчик (1) належить до подрібненої сухої порошкової вакцини, що містить трегалозу-PVP-BSA, а стовпчик (2) належить до порівняльної розпиленої вакцини з дрібних крапельок рідини. Ці результати показують, що високі концентрації вірусу в повітрі були одержані при використанні порошкової вакцини відразу після розпилення, і що концентрація була лише декілька нижче, ніж теоретична розпилена концентрація (зниження з $10^{6,5}$ до $10^{6,1}$). Однак, велике зниження титру вірусу відбулося після розпилення вакцини з дрібних крапельок рідини (з $10^{7,4}$ до менше ніж $10^{3,4}$), пов'язане з випаровуванням крапельок вакцини у вказаних вище кліматичних умовах.

Приклад 3 - Імунізація курчат сухої порошкової композицією для вакцинації, що має середній розмір частинок 7 мкм

Подрібнений сухий порошок для вакцинації, одержаний і охарактеризований в прикладі 2, вводили 4-тижневим позбавленим специфічних патогенів бройлерним курчатам (тобто без антитіл NCD), яких утримували в ізоляторах об'ємом 1,3 м³. Одна група одержувала подрібнену суху порошкову вакцину, і одна група служила як невакцинований «пустий» контроль.

Через 2 і 4 тижні після вакцинації брали зразки крові і оцінювали їх на наявність антитіл проти вірусу NCD аналізом інгібування гемаглютинації (HI). Результати подані на фіг. 4, де стовпчик (1) належить до подрібненого порошку, що містить трегалозу-PVP-BSA. Суха порошкова композиція за винаходом привела до достатньої імунної відповіді через 2 тижні після вакцинації при титрах Ш, які вище ніж регулярно одержувані титри від 2^4 до 2^6 після однократного застосування лентогенної вакцини проти NCD. Статистичний аналіз повторності показників ANOVA (варіаційного аналізу) показав значуще збільшення титру з 2 по 4 тиждень після вакцинації.

Приклад 4 - Імунізація курчат неподрібненою сухою порошковою композицією для вакцинації

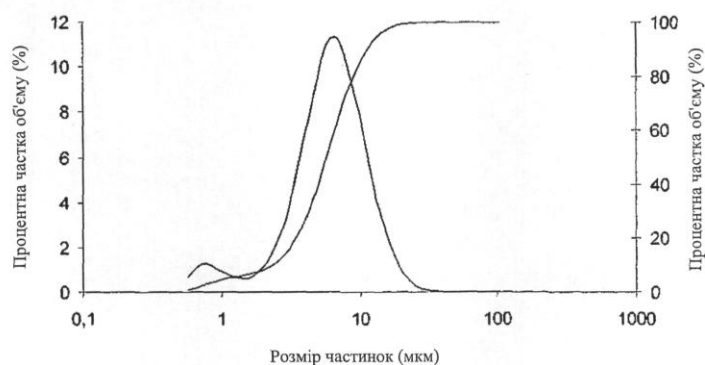
Неподрібнений сухий порошок для вакцинації, що має вміст води 3,3% по масі і з розміром частинок, придатним для первинної вакцинації (тобто для осадження у верхніх дихальних шляхах), одержували з того ж водного розчину, що подається, як в прикладі 2, але з використанням розпилювальної сушарки з п'єзо-активованим соплом 30 мкм (температура на впуску 90°C, температура на випуску 70°C, швидкість подачі 30 мл/хвилину, швидкість потоку сушильного газу 25 кг/год., частота генерування крапельок 50 кГц).

Розподіл розміру частинок оцінювали тим же способом і обладнанням, як в прикладі 2 (лазерною дифракцією), і результати подані на фіг. 2, де крива (3) належить до неподрібненої сухої порошкової вакцини, що містить трегалозу-PVP-BSA. Полідисперсність розміру частинок становила 1,2, а середній розмір частинок був 29 мкм.

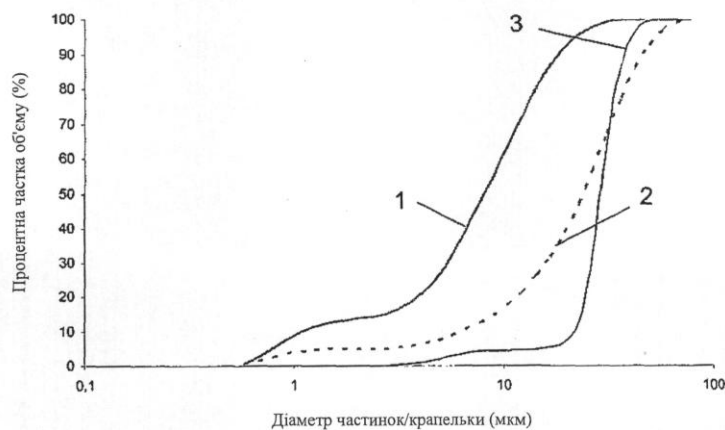
Вакцину вводили 4-тижневим позбавленим специфічних патогенів бройлерним курчатам (тобто без антитіл NCD), яких утримували в ізоляторах об'ємом 1,3 м³. Одна група одержувала подрібнену суху порошкову вакцину, і одна група служила як невакцинований «пустий» контроль.

Через 2 і 4 тижні після вакцинації брали зразки крові і оцінювали їх на наявність антитіл проти вірусу NCD аналізом інгібування гемаглютинації (HI). Результати подані на фіг. 4, де стовпчик (3) належить до подрібненого порошку, що містить трегалозу-PVP-BSA. Суха порошкова композиція за винаходом привела до достатньої імунної від-

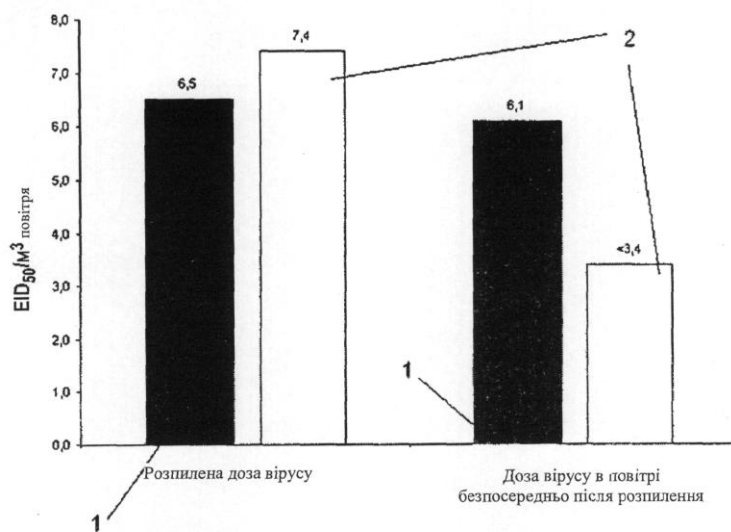
повіді через 2 тижні після вакцинації при титрах HI, які знаходяться в межах діапазону регулярно одержуваних титрів HI від 2⁴ до 2⁶ після однократного застосування лентогенної вакцини проти NCD. Статистичний аналіз повторності показників ANOVA показав значуще збільшення титру з 2 по 4 тижень після вакцинації. Значуще більш низька імунна відповідь, в порівнянні з подрібненим порошком, що містить трегалозу-PVP-BSA, прикладу 3, пов'язана з різними ділянками осадження вакцини (тобто верхні дихальні шляхи для подрібненого порошку, нижні дихальні шляхи для подрібненого порошку).



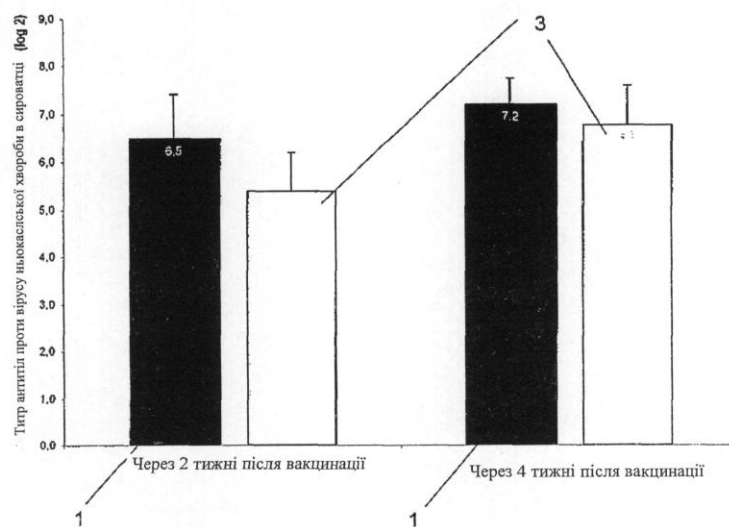
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4