



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11) Número de publicación: **2 286 045**

51) Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86) Número de solicitud europea: **00991649 .5**

86) Fecha de presentación : **29.12.2000**

87) Número de publicación de la solicitud: **1411977**

87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2004**

54

Título: **Composición para prevención y tratamiento de enfermedades alérgicas.**

30

Prioridad: **30.12.1999 DE 199 63 840**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

73

Titular/es: **Albrecht Bufe**
Ottersbekallee 21
20255 Hamburg, DE
Forschungszentrum Borstel

72

Inventor/es: **Nowak, Dennis;**
Riedler, Josef;
Braun-Fahrländer, Charlotte y
Von Mutius, Erika

74

Agente: **Arpe Fernández, Manuel**

ES 2 286 045 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

Composición para prevención y tratamiento de enfermedades alérgicas.

5 La presente invención se refiere a la utilización de una composición que comprende al menos un antígeno microbiano transmisible a través del aire, y que se encuentra normalmente en el aire ambiente de establos, para prevenir y tratar reacciones alérgicas, y a un procedimiento para la preparación de esta composición.

10 Se denominan alergias, las reacciones desproporcionadas del cuerpo a sustancias extrañas no perjudiciales. Estas reacciones se desarrollan igual que la respuesta inmunitaria normal contra un agente patógeno. Dado que en el caso de una alergia el alérgeno en sí es inofensivo, los síntomas se deben exclusivamente a la respuesta inmunitaria. Se distingue entre varios tipos de reacción alérgica. Las reacciones alérgicas de tipo I, entre las que se incluyen el asma bronquial, la dermatitis atópica y la fiebre del heno, son las más extendidas. Aunque estas enfermedades presentan diferentes síntomas, se basan en mecanismos inmunológicos similares.

15 Los responsables de los síntomas de las alergias de tipo I son anticuerpos del tipo IgE. Las causas y riesgos del desarrollo de una enfermedad alérgica aún no se han esclarecido por completo. Sin embargo, lo que sí es seguro es que un paso esencial en el origen de una enfermedad de este tipo es la impronta del sistema inmunitario, especialmente la maduración de células Th1 y Th2. Para la formación de los anticuerpos IgE se requieren células Th2 productoras de interleucina 4 (IL-4), mientras que las células Th1 productoras de interferón- γ (INF- γ) tienen un efecto inhibitorio en la formación de anticuerpos IgE. Ambos tipos de células son necesarios en una relación equilibrada para la defensa inmunitaria. Las células Th1 son responsables de la respuesta inmunitaria contra las más diversas enfermedades infecciosas, mientras que las células Th2 se requieren para la defensa contra determinadas infecciones por nemátodos. Sin embargo, en el caso de una enfermedad alérgica, dicha relación Th1/Th2 equilibrada está desplazada en dirección a una respuesta inmunitaria dominada por las células Th2.

20 La expresión del sistema inmunitario está determinada por la estimulación externa, además de la predisposición genética individual. La maduración de las células Th1 está iniciada por la presencia de antígenos (por ejemplo endotoxinas), provocando éstos a través de células que presentan antígeno, tales como monocitos y células dendríticas, una segregación de IL-12, que tiene como consecuencia una diferenciación de células T "naive" en células Th1.

25 Se supone que sobre todo la impronta del sistema inmunitario en los primeros años de vida es de una importancia decisiva para la propensión a las alergias. En estudios experimentales con animales se ha comprobado que la respuesta inmunitaria en recién nacidos se debe principalmente a células Th2, es decir que requiere la expresión de la respuesta inmunitaria sana dominada por células Th1 de la impronta externa por antígenos. Así pues, puede suponerse a la inversa que con una impronta insuficiente de las células Th "naive" en células Th1 se crea una condición previa importante para las enfermedades alérgicas de tipo I. Los estudios efectuados con animales prueban que los iniciadores esenciales del proceso de maduración de las células Th1 son de naturaleza microbiana y que con la exclusión de tales estímulos debido a un entorno aséptico se deja el sistema inmunitario en un estado dominado por células Th2.

30 En diversos estudios se ha comprobado que el entorno de vida inmediato durante la primera infancia tiene una influencia esencial en la posterior propensión a las enfermedades alérgicas. Se sabe que el estilo de vida occidental industrializado está relacionado con el aumento de enfermedades alérgicas. Por el contrario, parece que condiciones higiénicas peores previenen la aparición de alergias. Distintos estudios epidemiológicos han demostrado que las enfermedades alérgicas se presentan con menor frecuencia en grupos de población rurales que en grupos de población urbanos. Se comprobó que los niños que se habían criado directamente en una granja eran mucho menos propensos a las alergias que los niños del mismo pueblo que no vivían en una granja. Otros factores, como el número de hermanos, la técnica de calefacción o la presencia de animales domésticos, presentaban una menor correlación con la aparición de enfermedades alérgicas que el entorno rural. Otros estudios han mostrado que la protección frente a enfermedades alérgicas creada por el crecimiento en un entorno rural se conserva hasta la edad de adulto. Hasta la fecha no ha sido posible esclarecer de un modo satisfactorio las causas de este efecto protector. Sin embargo, no parece muy probable que la causa sean factores generales como una carga polínica elevada o una carga de contaminantes comparativamente pequeña en el aire.

35 Las opciones para la terapia y la prevención de enfermedades alérgicas son limitadas. En las enfermedades alérgicas ya manifestadas (como por ejemplo fiebre del heno) se aplican en la mayoría de los casos terapias medicamentosas y terapias de desensibilización. Los resultados de estas terapias son sumamente diferentes. Sobre todo en las enfermedades crónicas de las vías respiratorias no hay prácticamente ninguna posibilidad de curación, y por ello los pacientes han de someterse a una terapia continua. Además, los tratamientos convencionales tienen frecuentemente efectos secundarios considerables.

40 Debido al gran aumento de las enfermedades alérgicas en los últimos años y el número limitado de terapias eficaces, existe una gran necesidad de nuevas y eficaces estrategias de prevención y tratamiento. En estudios con animales se ha comprobado que la infección intranasal con partículas de mycobacterium reduce la eosinofilia inducida por alergia, pero va acompañada de una enfermedad infecciosa masiva en los animales. Otro planteamiento es la desensibilización preventiva contra determinados alérgenos. Sin embargo, hasta la fecha no existe posibilidad alguna de reducir el riesgo total de alergias.

ES 2 286 045 T3

El objetivo de la presente invención es poner a disposición un medio para prevenir y para tratar afecciones alérgicas.

Según la invención, este objetivo se logra mediante la utilización de una composición según la reivindicación 1. La invención comprende además un procedimiento para la preparación de esta composición.

La utilización según la invención de la composición es adecuada para estimular el sistema inmunitario de los niños de tal modo que puede reducirse el riesgo de que desarrollen una enfermedad alérgica. La invención se basa en el conocimiento de que el arriba descrito efecto protector inmunológico de un entorno rural contra las enfermedades alérgicas se debe al contacto intenso de los niños con animales de establo. Se ha dado a conocer además que la carga microbiana elevada del entorno rural es responsable de estimular el sistema inmunitario de los niños de tal modo que se induce una relación de células Th2 con respecto a células Th1 favorable para la reducción de las enfermedades alérgicas.

En relación con el área doméstica, los establos presentan una concentración muy elevada de antígenos bacterianos, especialmente de endotoxinas. Los valores elevados de endotoxinas se hallan también en los colchones de los niños que se crían en una granja con explotación de ganado, así como de los niños que tienen un contacto regular con animales de establo, pero que no viven en una granja, si se comparan sus colchones con los colchones de los niños del grupo de control del mismo pueblo que no tienen contacto alguno con animales de establo. Esto significa que, en estos dos grupos, la gran carga de endotoxinas, que puede equipararse a una carga de antígeno microbiano elevada, prosigue en el área doméstica y garantiza con ello una estimulación continua del sistema inmunitario. Los niños que tienen un contacto regular con animales de establo muestran una propensión significativamente menor a las enfermedades alérgicas que el grupo de control, que no tiene contacto alguno con animales de establo.

La presente invención permite simular este contacto intenso con animales de establo y conseguir con ello una impronta favorable del sistema inmunitario de los niños con la que se logra una propensión reducida a las enfermedades alérgicas.

La composición que se ha de utilizar según la invención contiene uno o varios antígenos bacterianos. La composición está caracterizada además porque contiene antígenos adicionales elegidos del grupo de los hongos, virus y protozoos o fragmentos de los mismos.

Las bacterias pueden elegirse solas o combinadas del grupo siguiente: *Bordetella* spp, preferentemente *Bordetella broncheseptica*; *Brucella* spp, preferentemente *Brucella suis*, *Corynebacterium* spp, preferentemente *Corynebacterium egui*, *Erysipelothrix* spp, preferentemente *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia* spp, preferentemente *Escherichia coli*, *Haemophilus* spp, preferentemente *Haemophilus gallinarum*, *Haemophilus parasuis*, *Haemophilus pleuropneumoniae*, *Listeria* spp, preferentemente *Listeria monocytogenes*, *Leptospira* spp, preferentemente *Leptospira pomona*, *Mycobacterium* spp, preferentemente *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma* spp, preferentemente *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma hyorhinus*, *Mycoplasma suis*, *Pasteurella* spp, preferentemente *Pasteurella multocida*, *Pasteurella pseudotuberculosis*, *Salmonella* spp, preferentemente *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus* spp, preferentemente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp, preferentemente *Streptococcus suis* type II y *Coxiella* spp, preferentemente *Coxiella burnetii*.

La composición puede contener especialmente las siguientes combinaciones de antígenos bacterianos: *Mycobacterium* spp y *Staphylococcus* spp, *Escherichia* spp y *Salmonella* spp, *Mycobacterium* spp y *Salmonella* spp, *Mycobacterium* spp y *Escherichia* spp, *Staphylococcus* spp y *Escherichia* spp, *Staphylococcus* spp y *Salmonella* spp, *Listeria* spp y *Mycobacterium* spp, *Listeria* spp y *Staphylococcus* spp, *Listeria* spp y *Escherichia* spp, *Listeria* spp y *Salmonella* spp. Los antígenos bacterianos pueden estar contenidos como fragmentos de las bacterias, como proteínas aisladas o como péptidos.

La composición puede además estar compuesta sólo de micobacterias atípicas o fragmentos de micobacterias atípicas, preferentemente de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium*.

La composición puede además estar compuesta sólo de *Listeriae* spp o fragmentos de *Listeriae* spp, preferentemente de *Listeria monocytogenes*.

La composición puede comprender además hongos y/o sus esporas, solos(as) o en combinación, eligiéndose los hongos del grupo formado por: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma farcinorum*.

Los microorganismos utilizados para preparar la composición según la invención pueden presentarse en estado vivo o muerto. Los microorganismos pueden destruirse en su totalidad o de forma selectiva mediante procedimientos ya conocidos, por ejemplo mediante la adición de sustancias fungicidas o fungistáticas, viricidas o virustáticas, bactericidas o bacteriostáticas, mediante radiación ultravioleta o radiactiva, mediante calor, liofilización o esterilización en frío.

Según la invención, la composición se compone principalmente de fragmentos aislados de los microorganismos. Los fragmentos aislados de los microorganismos pueden comprender detritus celular, trozos de membrana, organelas, proteínas individuales o péptidos de estas proteínas o lípidos de membrana. Los fragmentos pueden obtenerse me-

ES 2 286 045 T3

5 diante procedimientos de disgregación y procedimientos de depuración por todos conocidos, por ejemplo mediante procedimientos de lisis química, ultrasonidos o presión. Los fragmentos pueden además depurarse total o parcialmente mediante procedimientos bioquímicos ya conocidos, es decir que los ácidos nucleicos y otros componentes no deseados pueden separarse total o parcialmente por ejemplo mediante centrifugación, métodos de cromatografía, filtración en gel y/o salificación.

10 En una forma de realización preferida, la composición según la invención comprende especialmente micobacterias atípicas, fragmentos de las mismas o proteínas aisladas o péptidos, que corresponden a antígenos micobacterianos, cuya preparación puede ser según se explica más arriba.

15 En una forma de realización preferida, la composición según la invención comprende en particular *Listeria spp.*, fragmentos de la misma o proteínas aisladas o péptidos, que corresponden a antígenos de esta familia, cuya preparación puede ser según se explica más arriba.

20 Los antígenos contenidos en la composición según la invención pueden ser por ejemplo proteínas y/o péptidos producidos mediante técnicas de ADN recombinante. Las proteínas o sus péptidos pueden haberse preparado también mediante síntesis. La composición puede contener además mutantes y variantes de los antígenos originales.

25 Los antígenos preferidos son por ejemplo proteínas aisladas o complejos con contenido en proteínas, elegidas del grupo de las endotoxinas, proteínas de envuelta de virus, proteínas de pared celular y proteínas citosólicas y glucoproteínas. Una endotoxina preferida es el lipopolisacárido (LPS), que se encuentra en la membrana exterior de bacterias gramnegativas. Otra endotoxina preferida es la endotoxina B de estafilococo (SEB). También se prefiere el ácido lipoteicoico (LTA) de bacterias grampositivas. También se prefiere el lipoarabinomanano (LAM) de micobacterias.

30 Los microorganismos o fragmentos de los mismos utilizados para la preparación de la composición pueden ser menores o iguales que 100 μm , pero preferentemente menores que 50 μm y con aun mayor preferencia menores que 22 μm . Dependiendo de la forma de administración, los microorganismos o sus fragmentos pueden también ser menores que 5 μm .

35 La composición puede presentarse en forma de solución acuosa. La solución puede ser preferentemente isotónica, es decir contener una concentración de sal fisiológica. La solución puede contener además aditivos o agentes auxiliares naturales o sintéticos inofensivos o admisibles, como por ejemplo conservantes, agentes de estabilidad, correctores de aroma y de sabor, excipientes inofensivos desde el punto de vista farmacológico, emulsionantes, diluyentes. Además, la solución puede contener principios activos fungicidas o fungistáticos, bactericidas o bacteriostáticos, viricidas o virustáticos.

40 La composición puede presentarse en forma de concentrado seco, es decir que pueden haberse eliminado de la misma, componentes volátiles y/o líquidos, especialmente agua.

45 La composición que se ha de utilizar según la invención puede presentarse en forma de liofilizado.

50 La composición que se ha de utilizar según la invención puede presentarse además en forma de aerosol. El aerosol está compuesto de pequeñas partículas sólidas o líquidas que se producen mediante un inhalador, un nebulizador o un respirador. Las partículas del aerosol pueden estar compuestas sólo de la composición o de la composición combinada con un material de soporte adecuado. Al mismo tiempo, el aerosol puede tener un tamaño de partículas de hasta 100 μm para la administración por instilación en la nariz. Además, el aerosol puede contener partículas con un tamaño de hasta 10 μm , preferentemente menor que 5 μm , para la administración por inhalación.

55 La presente invención se refiere a la utilización de la composición en sus distintas formas de realización arriba descritas para prevención o tratamiento de afecciones alérgicas. En particular, la composición puede utilizarse para prevención o tratamiento de fiebre del heno, dermatitis atópica, asma bronquial o alergias alimenticias.

60 La presente invención es especialmente adecuada para dar impronta al sistema inmunitario "naive". Por lo tanto, según la invención, la composición puede administrarse repetidas veces a lactantes y niños en los primeros años de edad que, debido a una anamnesis familiar positiva, presenten un riesgo claramente elevado de desarrollar una enfermedad alérgica. Como anamnesis familiar positiva se entiende que uno de los padres o ambos padres y/o uno o varios hermanos y/o familiares en segundo grado padezcan ya una enfermedad alérgica o hayan mostrado síntomas alérgicos, especialmente fiebre del heno, asma, dermatitis atópica o alergias alimenticias.

65 La composición es además adecuada para ser administrada a lactantes o niños que presenten ya primeros síntomas de alergia, especialmente primeros síntomas de fiebre del heno, asma, dermatitis atópica, reacción de IgE positiva a alimentos, alergias alimenticias, especialmente alergias alimenticias a leche de vaca y clara de huevo. Además es posible identificar niños y lactantes que presenten un riesgo elevado de enfermar de una alergia a través de marcadores genéticos mediante técnicas RFLP y PCR. Dichos niños pueden identificarse además por una producción de INF- γ reducida tras una estimulación de los leucocitos.

La composición es adecuada para ser administrada a niños y adultos para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas.

ES 2 286 045 T3

En particular, la composición es adecuada para ser administrada a niños y lactantes de hasta cinco años de edad, preferentemente de hasta dos años de edad, para la prevención de enfermedades alérgicas.

La composición según la invención puede administrarse por vía intranasal, por instilación o por inhalación. Para ello, la composición puede administrarse con un inhalador, nebulizador o respirador comercial. El aerosol puede administrarse frío o calentado a temperatura corporal. El aerosol puede administrarse de modo que presente un contenido en antígeno de 0,5 a 20.000 partículas de antígeno por litro de aire, preferentemente de 3 a 10.000 partículas de antígeno por litro de aire; como partículas de antígeno se consideran aquí microorganismos intactos o bien fragmentos, en caso dado combinados con partículas de material de soporte, por ejemplo polvo o partículas de paja.

La composición puede administrarse a intervalos regulares o durante un período prolongado, para lograr así una estimulación continua del sistema inmunitario. La composición puede administrarse por ejemplo durante más de 10 años, 1 a 21 veces a la semana, preferentemente 7 a 14 veces a la semana. La duración del tratamiento puede estar comprendida preferentemente entre 5 y 120 minutos, preferentemente entre 15 y 60 minutos.

La presente invención comprende además un procedimiento para preparar la composición arriba descrita. Para preparar la composición puede utilizarse un filtro de aire, a través del cual se filtra el aire del establo. El filtro puede estar compuesto de un material con una gran superficie, por ejemplo un filtro de membrana o un granulado, en el que se adsorban de forma reversible las partículas de antígeno. Para preparar la composición según la invención puede utilizarse también un aparato de incidencia; las partículas de antígeno aerógenas pueden recogerse directamente en una solución acuosa, preferentemente en una solución isotónica. Para preparar la composición puede utilizarse según la invención también un impactor, preferentemente un impactor de cascada, con el que se tomen las partículas de antígeno del aire del establo. En este caso se recogen las partículas de antígeno mediante una precipitación selectiva. La recogida puede realizarse en varias etapas, preferentemente 6 a 9 etapas, en placas, que pueden estar revestidas de agar, en función del tamaño de las partículas, estando el tamaño entre 20 nm y 22 μm , preferentemente entre 60 nm y 16 μm . Para la composición que se ha de utilizar según la invención pueden elegirse de una a todas las fracciones, preferentemente las fracciones (placas) con partículas de antígeno menores que 10 μm y con mayor preferencia menores que 5 μm para la administración por inhalación o preferentemente las fracciones (placas) con partículas de antígeno menores que 22 μm para la administración por instilación. A continuación se rascan las partículas de antígeno de las placas, se absorben en una suspensión acuosa y se disgregan. La suspensión se somete a un tratamiento con ultrasonidos, para impedir la coagulación de las partículas contenidas.

La suspensión acuosa que contiene la composición según la invención puede administrarse directamente con un nebulizador, inhalador o respirador.

El procedimiento para preparar la composición que se ha de utilizar según la invención puede incluir medidas para separar la composición de componentes volátiles y/o líquidos, especialmente agua, y obtener un concentrado seco. La separación puede realizarse por ejemplo mediante un secado por aire, especialmente por aire presecado, un secado mediante CO_2 supercrítico, un secado por pulverización o una concentración en vacío.

El procedimiento para preparar la composición según la invención puede incluir además etapas de esterilización. La composición puede tratarse opcionalmente con agentes fungicidas o fungistáticos, bactericidas o bacteriostáticos, viricidas o virustáticos, por ejemplo mediante la adición de sustancias fungicidas o fungistáticas, bactericidas o bacteriostáticas, viricidas o virustáticas, mediante radiación ultravioleta o radiactiva o mediante calor.

El ejemplo siguiente explica la invención, pero no la limita.

Ejemplo 1

Preparación de una composición de antígeno microbiano para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas

Se recogen partículas del aire de una vaquería con un impactor (Andersen instrument Incorporated's Six Stage Viable Impactor), con un caudal de 28,3 litros por minuto durante un tiempo de 4 horas, 3 veces a la semana durante un mes. Después de cada medición se determinó la carga microbiana del aire de la vaquería incubando las placas de agar del impactor. Se averiguó el número y la especie de los gérmenes formadores de colonias de todas las muestras tomadas durante este período y de este modo se determinó la composición media del aire de la vaquería. Esta composición determinada se reconstruyó a partir de cultivos líquidos de los microorganismos, juntando los cultivos según sus proporciones medidas en cada caso. La suspensión así obtenida se centrifugó y la pella con los microorganismos se lavó varias veces con PBS y se esterilizó mediante un tratamiento por frío.

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de una composición que comprende antígenos microbianos transmisibles por vía aérea, en la que los antígenos microbianos comprenden uno o varios antígenos bacterianos del grupo formado por *Bordetella* spp, *Brucella* spp, *Corynebacterium* spp, *Erysipelothrix* spp, *Escherichia* spp, *Haemophilus* spp, *Listeria* spp, *Leptospira* spp, *Mycobacterium* spp, *Mycoplasma* spp, *Pasteurella* spp, *Salmonella* spp, *Streptococcus* spp y *Coxiella* spp o una combinación de los mismos, y comprendiendo además uno o varios antígenos elegidos del grupo formado por hongos, virus y protozoos y fragmentos de los mismos, **caracterizada** porque contiene principalmente fragmentos aislados para preparar un medicamento destinado a prevención o tratamiento de enfermedades alérgicas.

10 2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque los fragmentos se eligen, solos o en combinación, entre detritus celular, trozos de membrana, organelas, proteínas, péptidos, lípidos de membrana o endotoxinas.

15 3. Utilización según la reivindicación 2, **caracterizada** porque las proteínas se han elegido entre proteínas de envuelta de virus, proteínas de pared celular, proteínas citosólicas y glucoproteínas y/o siendo elegidas las endotoxinas entre lipopolisacárido, endotoxina de estafilococo, ácido lipoteicoico y lipoarabinomano.

20 4. Utilización según la reivindicación 1 a 3, **caracterizada** porque la composición se presenta en forma de solución acuosa, liofilizado o aerosol.

25 5. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque el medicamento es adecuado para prevención o tratamiento de fiebre del heno, dermatitis atópica o asma.

30 6. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque el medicamento es adecuado para la prevención de enfermedades alérgicas en lactantes que, debido a una anamnesis familiar positiva, presenten un riesgo claramente elevado de desarrollar una enfermedad alérgica.

35 7. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque el medicamento es adecuado para prevención o tratamiento de enfermedades alérgicas en lactantes que presenten primeras manifestaciones de una alergia.

40 8. Procedimiento para preparar una composición según se define en una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque los microorganismos se recogen de aire ambiente de establo y se disgregan.

45 9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque para recoger los microorganismos se utiliza un impactor, un aparato de incidencia o un filtro de aire.

50 10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque se utiliza un impactor de cascada o un filtro de membrana.

55 11. Procedimiento según la reivindicación 8 a 10, **caracterizado** porque comprende adicionalmente un procedimiento de esterilización.

60 12. Procedimiento según la reivindicación 8 a 11, **caracterizado** porque la composición se trata con un agente fungicida o fungistático.

65 13. Procedimiento según la reivindicación 8 a 12, **caracterizado** porque la composición se trata con un agente viricida o virustático.

70 14. Procedimiento según la reivindicación 8 a 13, **caracterizado** porque la composición se trata con un agente bactericida o bacteriostático.