



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121200** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)

A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/08 (2006.01)
A61K 39/118 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01)
A61K 47/44 (2017.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2016 02745	(72) Винахідник(и): Доміновські Пол Джозеф (US), Уілмес Лорен (US), Фосс Денніс Л. (US), Мор Каорі (US), Галло Гуїллермо (US), Хардхам Джон Морган (US), Кребс Річард Лі (US), Лайтл Сандра Енн Марі (US), Махан Суман (US), Медіратта Сангіта (US), Мвангі Дункан (US), Раї Шарат К. (US), Салмон Сара А. (US), Вора Шонак (US), Фонтеїн Майкл Крістофер (GB), Сміт Девід Джордж Емслі (GB), Фітцпатрік Жюлі Лідія (GB), Доначі Уільям (GB), Джагларц Аніта Дорота (GB)
(22) Дата подання заявки:	19.09.2014	(73) Власник(и): ЗООТИС СЕРВІСІЗ ЛЛС, 10 Sylvan Way, Parsippany, New Jersey 07054, USA (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	27.04.2020	(74) Представник: Пахаренко Олександр Володимирович, реєстр. №136
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/879,959	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2004009897 A1, 15.01.2004 Raman Vanitha s et al, "Applying TLR synergy in immunotherapy: implications in cutaneous leishmaniasis.", Journal of immunology (Baltimore, MD. : 1950) 01.08.2010, vol. 185, no. 3, P. 1701 – 1710 McCluskie M J et al, "Novel adjuvant systems", Current drug targets. Infectious disorders, Bentham science publishers, Hilversum, NL, 01.11.2001, vol. 1, no. 3, P. 263 – 271 Freytag L C et al, "Mucosal adjuvants", Vaccine, Elsevier LTD, GB, 07.03.2005, vol. 23, no. 15, P. 1804 - 1813 Tagliabue Aldo et al, "Vaccine adjuvants: the dream becomes real", Human vaccines 09.2008, vol. 4, no. 5, P. 347 - 349 Jeong Sook-Hyang et al, "Immunization with hepatitis C virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in nonhuman primates", Journal of virology, The American Society for Microbiology, US, 01.07.2004, vol. 78, no. 13, P. 6995 - 7003 Baldwin Susan L et al, "The importance of adjuvant formulation in the development of a tuberculosis vaccine.", Journal of immunology (Baltimore, MD.1950), 01.03.2012, vol. 188, no. 5, P. 2189 - 2197
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	19.09.2013	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US	
(41) Публікація відомостей про заявку:	24.06.2016, Бюл.№ 12	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	27.04.2020, Бюл.№ 8	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2014/056512, 19.09.2014	

(54) АД'ЮВАНТ НА ОСНОВІ ОЛІЇ

(57) Реферат:

UA 121200 C2

Винахід належить до вакцинної композиції, яка містить ефективну кількість антигену та ад'ювантну композицію, яка містить олійну фазу та водну фазу. Причому заявлена вакцинна композиція являє собою емульсію вода-в-олії, де олійна фаза складає щонайменше 36 % об./об. композиції і де вказана композиція містить монофосфорильний ліпід A (MPL-A) або його аналог та імуностимулюючий олігонуклеотид, а також антиген вибирають з групи, яка складається з антигену *Eimeria maxima*, антигену *Clostridium perfringens*, антигену *Neospora*, та антигену *Chlamydophila abortis*.

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

[0001] Даний винахід, в цілому, стосується нових препаратів ад'ювантів для посилення імунної відповіді на антигени для застосування в імуногенних та вакцинних композиціях. Даний винахід також стосується способів отримання та застосування композицій ад'юванту,

Передумови створення винаходу

[0002] Бактеріальні, вірусні та паразитарні інфекції є широко поширеними в організмі людини та тварин. Захворювання, викликані даними інфекційними агентами, часто є резистентними до протимікробної фармацевтичної терапії, не залишаючи ніяких ефективних засобів лікування. Як наслідок, вакцинологічний підхід все більше і більше застосовують для контролю за інфекційним захворюванням. Цілісний інфекційний збудник може бути прийнятним для застосування в вакцинному препараті після хімічної інактивації або відповідної генетичної маніпуляції. Альтернативно, протеїнова субодиниця збудника може бути експресована в рекомбінантній експресійній системі та очищена для застосування в вакцинному препараті. Вакцини можуть бути зроблені більш ефективними за рахунок включення відповідного ад'юванта в композицію.

[0003] Термін "ад'ювант", в цілому, стосується будь-якої речовини, що підвищує гуморальну або клітинну імунну відповідь на антиген. Ад'юванти використовують для досягнення двох цілей: Вони сповільнюють вивільнення антигенів з місця ін'єкції, та вони посилюють стимуляцію імунної системи. Традиційні вакцини, в цілому, складаються з неочищеного препарату інактивованих, або вбитих, або модифікованих живих патогенних мікроорганізмів. Домішки, пов'язані з даними культурами патологічних мікроорганізмів, можуть діяти як ад'ювант для посилення імунної відповіді. Однак, імунітет, який викликається вакцинами, які використовують гомогенні препарати патологічних мікроорганізмів або очищені протеїнові субодиниці, як антигени, часто є слабким. Тому, додавання деяких екзогенних речовин, таких як ад'ювант, стає необхідним. Крім того, в деяких випадках, синтетичні та субодиничні вакцини можуть бути дорогими у виробництві. Крім того, в деяких випадках, збудник може не бути вирощеним в промисловому масштабі, та, таким чином, синтетичні/субодиничні вакцини представляють собою єдиний прийнятний варіант. Додавання ад'юванта може дозволити застосування менших доз антигену, щоб стимулювати подібну імунну відповідь, тим самим, знижуючи вартість виробництва вакцини. Таким чином, ефективність деяких ін'єкційних лікарських засобів може бути значно збільшена, коли агент поєднують з ад'ювантом.

[0004] Багато чинників повинні бути прийняті до уваги при виборі ад'юванта. Ад'ювант повинен спричиняти відносно низьку швидкість вивільнення та абсорбцію антигену ефективним способом з мінімальним токсичним, алергенним, подразливим та іншими небажаними ефектами для господаря. Для того, щоб бути прийнятним, ад'ювант повинен бути невіруліцидним, здатним до біорозкладання, здатним послідовно створювати високий рівень імунітету, здатним стимулювати перехресний захист, сумісним з багатьма антигенами, ефективним в багатьох видах, нетоксичним та безпечним для господаря (наприклад, не викликати ніяких реакцій в місці ін'єкції). Іншими бажаними характеристиками ад'юванта є те, що він є здатним до мікродозування, є помірною дозою, має чудову стабільність при зберіганні, піддається сушінню, може бути зробленим без олії, може існувати або у вигляді твердої, або рідкої речовини, є ізотонічним, легким у виробництві, та є недорогим в отриманні. Нарешті, дуже необхідним для ад'юванта є те, щоб він є здатним до налаштування, таким чином, індукуючи або гуморальну, або клітинну імунну відповідь або обидві, в залежності від вимог сценарію вакцинації. Однак, кількість ад'ювантів, які можуть задовольнити вказані вище вимоги є обмеженою.

[0005] Вибір ад'юванта залежить від потреб для вакцини, будь то збільшення величини або функції відповіді антитіла, збільшення клітинно-опосередкованої імунної відповіді, індукування мукозального імунітету, або зменшення дози антигену. Запропоновано було ряд ад'ювантів, однак, жоден, як показано, не є ідеально прийнятним для всіх вакцин. Першим ад'ювантом, про який повідомлялось в літературі, був повний ад'ювант Фрейнда (FCA), який містить емульсію вода-в-олії та екстракти мікобактерії. На жаль, FCA погано переноситься та це може спричинити неконтрольоване запалення. Оскільки з моменту відкриття FCA минуло понад 80 років були зроблені зусилля зменшити небажані побічні ефекти ад'ювантів.

[0006] Деякі інші матеріали, які використовуються як ад'юванти, включають оксиди металів (наприклад, гідроксид алюмінію), алюмокалієвий галун, неорганічні хелати солей, желатини, різні парафінового типу олії, синтезовані смоли, альгірати, мукоїдні та полісахаридні сполуки, казеїнати, та речовини, похідні крові, такі як фібринові згустки. В той час як, дані матеріали, в цілому, є ефективними щодо стимулювання імунної системи, жоден, як було виявлено, не був повністю задовільняючим через побічні ефекти в господаря (наприклад, виникнення

стерильного абсцесу, пошкодження органів, канцерогенність або алергічні реакції) або небажані фармацевтичні властивості (наприклад, швидка розсмоктування або поганий контроль за розсмоктуванням з місця ін'єкції, або набряк матеріалу).

Суть винаходу

5 [0007] Представлений винахід передбачає нові вакцинні композиції та композиції ад'юванта корисні для вакцин.

[0008] В першому аспекті, винахід передбачає композицію ад'юванта яка містить олійну фазу та водну фазу, де олійна фаза містить, щонайменше, 50 % препарату об./об., де зазначений препарат містить, щонайменше, один монофосфорильний ліпід А (MPL-A) або його аналог та імуностимулюючий олігонуклеотид, за умови, що а) якщо зазначений імуностимулюючий олігонуклеотид відсутній, то препарат містить полі І:С, гліколіпід, та, не обов'язково, четвертинний амін; або полікатіонний носій; та б) якщо зазначений монофосфорильний ліпід А (MPL-A), або його аналог, відсутній, то препарат містить джерело алюмінію, та, не обов'язково, полікатіонний носій.

15 [0009] В різних варіантах здійснення, олійна фаза може містити олію та, не обов'язково, розчинний в олії емульгатор.

[0010] В деяких варіантах здійснення, також зазначений монофосфорильний ліпід А (MPL-A) або його аналог є присутнім в композиції ад'юванта. В даних варіантах здійснення, композиція додатково містить стерин (наприклад, холестерин), полі І:С, або їх комбінацію.

20 [0011] В певному наборі варіантів здійснення, на додаток до олії та не обов'язкового(их) емульгатора(ів), композиції ад'юванта включають комбінацію монофосфорильного ліпиду А (MPL-A) або його аналога, стерину та імуностимулюючого олігонуклеотида ("ТСМО"). Композиція ад'юванта також може не обов'язково містити полі І:С ("ТСМЮ") та/або сапонін ("QТСМО" або "QТСМЮ", відповідно).

25 [0012] В ще наступних альтернативних варіантах здійснення, на додаток до олії та не обов'язкового(их) емульгатора(ів), композиції ад'юванта також включають комбінацію четвертинного аміну, гліколіпиду, MPL-A або його аналога, та полі І:С ("ODYRM").

[0013] В ще наступному наборі варіантів здійснення, на додаток до олії та не обов'язкового(их) емульгатора(ів), композиції ад'юванта також включають комбінацію сапоніну, стерину, четвертинного аміну, полікатіонного носія, за умови, що, якщо зазначений полікатіонний носій представляє собою декстран DEAE, то антиген не є бактеринном E coli J-5 ("QCDXO").

[0014] В наступних варіантах здійснення, на додаток до олії та не обов'язкового(их) емульгатора(ів), ад'ювант може включати імуностимулюючий олігонуклеотид, джерело алюмінію, та, не обов'язково, полікатіонний носій ("ТОА" та "ТХО-А", відповідно).

[0015] В другому аспекті, композиція ад'юванта відповідно до будь-якого з варіантів здійснення, зазначена вище, може включати антигенний компонент, таким чином, утворюючи вакцинну композицію, за умови, що антиген не є протеїном E. Coli J-5, якщо композиція ад'юванта складається з (або в основному складається з) DEAE декстрану, Quil A, холестерину та DDA, або якщо композиція ад'юванта складається з (або в основному складається з) DEAE декстрану та імуностимулюючого олігонуклеотиду. В деяких варіантах здійснення, вакцини даного аспекту містять антиген(и), які походять від збудників, що діють на велику рогату худобу, овець, коней, або свиней. В інших варіантах здійснення, вакцини даного аспекту містять антиген(и), які походять від збудників, що діють на птицю або котячих тварин.

45 [0016] В додаткових аспектах винаходу, передбаченими є різні комбінації антигенної сполуки та композиції ад'юванта.

[0017] Більш конкретно, в третьому аспекті, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить Eimeria maxima та/або Clostridium perfringens антиген та композицію ад'юванта. В різних варіантах здійснення третього аспекту, композиція ад'юванта може включати олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції; полікатіонний носій, та, не обов'язково, імуностимулюючий олігонуклеотид. В інших варіантах здійснення даного аспекту винаходу, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить ад'ювантний компонент, який містить олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції; імуностимулюючий олігонуклеотид, стерин, та монофосфорильний ліпід А (MPL-A) або його аналог.

50 [0018] В четвертому аспекті, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить Neospora антиген та композицію ад'юванта. В різних варіантах здійснення винаходу відповідно до даного аспекту, композиція ад'юванта містить олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції; та монофосфорильний ліпід А (MPL-A) або його аналог. В інших варіантах здійснення, композиція ад'юванта містить олійну фазу, де зазначена

олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції, імуностимулюючий олігонуклеотид та полікатіонний носій.

[0019] В п'ятому аспекті, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить *Chlamydophila abortis* антиген та композицію ад'юванта, яка містить олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції; стерин; імуностимулюючий олігонуклеотид; монофосфорильний ліпід A (MPL-A) або його аналог; та полі I:C.

[0020] В шостому аспекті, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) антиген та композицію ад'юванта, яка містить олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше 50 % об./об. композиції; та полікатіонний носій. В різних варіантах здійснення даного шостого аспекту винаходу, композиція ад'юванта також включає імуностимулюючий олігонуклеотид. Альтернативно, або додатково, композиції ад'юванта можуть включати сапонін, стерин, та четвертинний амін.

[0021] В сьомому аспекті, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить міостатин як антигенний компонент, та композицію ад'юванта, де зазначена композиція ад'юванта містить олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції; імуностимулюючий олігонуклеотид та або: полікатіонний носій; або MPL-A або його аналог. В наборі варіантів здійснення відповідно до даного аспекту винаходу, композиція ад'юванта містить MPL-A або його аналог. В деяких варіантах здійснення даного набору, композиція ад'юванта містить менше, ніж 0,5 мкг стерину на 50 мкл зазначеної вакцинної композиції, та переважно не містить холестерин. Вибір міостатину залежить від виду суб'єкта. В одному вибраному варіанті здійснення, вибраним видом є курка, та джерелом міостатину є курячий міостатин.

[0022] У восьмому аспекті, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить *A. pyogenes* (раніше відомий як *Arcanobacterium pyogenes*, *Actinomyces pyogenes* або *Corynebacterium pyogenes*; зараз відомий як *Trueperella pyogenes*) антиген та композицію ад'юванта, де композиція ад'юванта містить олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції; імуностимулюючий олігонуклеотид та полікатіонний носій.

[0023] В дев'ятому аспекті, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить *E. coli* антиген, BRV антиген або BCV антиген, та композицію ад'юванта, де зазначена композиція ад'юванта містить олійну фазу, присутню в кількості, щонайменше, 50 % об./об. зазначеної вакцинної композиції, імуностимулюючий олігонуклеотид та, щонайменше, один з полікатіонного носій та джерело алюмінію.

[0024] В десятому аспекті, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить *Rhipicephalus microplus* антиген та ад'ювант, де зазначений ад'ювант вибирають з групи, яка складається з: а) водного ад'юванта, який містить імуностимулюючий олігонуклеотид, сапонін, стерин, четвертинний амін, поліакриловий полімер, та гліколіпід; та b) на олійній основі ад'ювант, який містить олійну фазу, присутню в кількості, щонайменше, 50 % об./об. вакцинної композиції, та який містить імуностимулюючий олігонуклеотид та полікатіонний носій.

[0025] В одинадцятому аспекті, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить антиген вірусу ящура (FMDV) та композицію ад'юванта, де зазначена композиція ад'юванта містить олійну фазу, присутню в кількості, щонайменше, 50 % об./об. зазначеної вакцинної композиції, імуностимулюючий олігонуклеотид та полікатіонний носій. В різних варіантах здійснення, антиген вірусу ящура може представляти собою або немутантний тип FMDV, генетично модифіковані та/або ослаблені штами FMDV, або рекомбінантно експресовані структурні протеїни FMDV, такі як вірусоподібні частинки (VLP) серотипів A, C, O, Asia1, SAT1, SAT2 або SAT3.

[0026] В дванадцятому аспекті, винахід передбачає спосіб генерування діагностичних або терапевтичних антитіл, де спосіб включає імунізацію тварини-джерела композицією ад'юванта, відповідно до будь-якого з варіантів здійснення, відповідно до першого аспекту винаходу, та антигеном, з подальшим екстрагуванням джерела антитіл з тварини-джерела, та, якщо необхідно, очищення антитіл.

[0027] В деяких варіантах здійснення, тварина-джерело є щуром, мишею, морською свинкою, хом'яком, великою рогатою худобою, козою, кроликом, конем, свинею або бараном. В деяких інших варіантах здійснення, тварина-джерело є кішкою або собакою.

[0028] В деяких варіантах здійснення, особливо прийнятним для поліклональних антитіл, джерелом антитіл є сироватка або молоко. В варіантах здійснення прийнятним для моноклональних антитіл, придатним джерелом антитіл є клітина селезінки.

[0029] В деяких варіантах здійснення, композиція ад'юванта містить імуностимулюючий олігонуклеотид та полікатіонний носій. Ад'ювант необов'язково може містити джерело алюмінію, що включає джерело алюмінію, яке може представляти собою гель гідроксиду алюмінію. В деяких варіантах здійснення, імуностимулюючий олігонуклеотид представляє собою CpG, та полікатіонний носій представляє собою DEAE декстран.

[0030] В деяких варіантах здійснення, антиген може бути вибраний з FeLVgp70, Бичачого парагриповірусу-3 BPI-3 (HN протеїн), Histophilus somni p31, Bordetella FHA, Parapox, BVDV1 gp53, BVDV2 gp53, токсинів клостридії, собачого цирковірусу, антигенів Brachyspira hyodysenteriae (види свиней); інактивованих цільних клітин та інактивованого пепсинового гідролізату.

[0031] Винахід, крім того, передбачає способи застосування вакцин відповідно до від третього до дванадцятого аспектів представленого винаходу.

Детальний опис вибраних варіантів здійснення

[0032] "Близько" або "приблизно", коли використовується в зв'язку з вимірюваною числовою змінною, стосується зазначеного значення змінної та всіх значень змінної, які знаходяться в межах експериментальної похибки зазначеного значення (наприклад, в межах 95 % довірчого інтервалу для середнього значення) або в межах 10 відсотків від зазначеного значення, в залежності від того, що є більшим, крім тих випадків, коли приблизно використовується для посилення на часові інтервали в тижнях, де "приблизно 3 тижні", становить від 17 до 25 днів, та від приблизно 2 до приблизно 4 тижнів становить від 10 до 40 днів.

[0033] "Ад'ювант" означає будь-яку речовину, яка підсилює гуморальну або клітинну імунну відповідь на антиген. Ад'юванти в цілому використовують для досягнення двох цілей: контрольоване вивільнення антигенів з місця ін'єкції, та стимулювання імунної системи.

[0034] "Композиція ад'юванта" стосується композицій, які мають властивості підвищуючі антигенність антитіл.

[0035] "Алкіл" стосується як лінійних, так і розгалужених насичених вуглеводневих фрагментів.

[0036] "Амін" стосується хімічної сполуки, яка містить азот. Аміни представляють собою групу сполук, які походять з аміаку за рахунок заміщення атомів водню на вуглеводневі групи. "Четвертинний амін" стосується сполуки на основі амонію з чотирма вуглеводневими групами.

[0037] "Антитіло" стосується молекули імуноглобуліну, що може зв'язуватися зі специфічним антигеном в результаті імунної відповіді на даний антиген. Імуноглобуліни представляють собою сироваткові протеїни, які складаються з "легких" та "важких" поліпептидних ланцюгів, які мають "константну" та "варіабельну" ділянки та діляться на класи (наприклад, IgA, IgD, IgE, IgG та IgM) ґрунтуючись на складі константних ділянок.

[0038] "Антиген" або "імуноген" стосується будь-якої речовини, яка розпізнається імунною системою тварини та генерує імунну відповідь. Термін включає вбиті, інактивовані, ослаблені або модифіковані живі бактерії, віруси або паразити. Термін "антиген" також включає полінуклеотиди, поліпептиди, рекомбінантні протеїни, синтетичні пептиди, протеїнові екстракти, клітини (включаючи клітини пухлини), тканини, полісахариди або ліпіди, або їх фрагменти, індивідуально або в будь-якій їх комбінації. Термін антиген також включає антитіла, такі як антидіопатичні антитіла або їх фрагменти, та синтетичні пептидні міме отопи, які можуть імітувати антиген або антигенний детермінант (епітоп).

[0039] "Бактерин" означає суспензію з одного або декількох вбитий бактерій, яка може бути використана як компонент вакцини або імуногенної композиції.

[0040] "Буфер" означає хімічну систему, яка запобігає зміні концентрації іншої хімічної речовини, наприклад, системи донора та акцептора протона служать як буфери, які запобігають помітним змінам в концентрації іонів водню (pH). Додатковий приклад буферу представляє собою розчин, який містить суміш слабкої кислоти та її солі (кон'югатна основа) або слабкої основи та її солі (кон'югатна кислота).

[0041] "Клітинна імунна відповідь" або "клітинно-опосередкована імунна відповідь" є відповіддю, опосередкованою Т-лімфоцитами або іншими білими клітинами крові або обома, та включає продукування цитокінів, хемокінів та подібних молекул, які продукуються активованими Т-клітинами, білими клітинами крові, або обома; або Т лімфоцитом, або іншою імунною клітинною відповіддю, що вбиває інфіковану клітину.

[0042] "Домашні тварини" стосуються собак, котів та коней.

[0043] "Що фактично складається", як застосовується до композицій ад'юванта, стосується композиції, яка не містить неописаних додаткових агентів, що підвищують імуногенність антитіл, або імуномодулюючих агентів в кількостях, при яких зазначений агент здійснює значні підвищуючі імуногенність антитіл або імуномодулюючі ефекти.

[0044] "Гіперчутливість уповільненого типу (DTH)" стосується запальної відповіді, яка розвивається через від 24 до 72 годин після дії на антиген, який імунна система розпізнає як чужерідний. Даний тип імунної відповіді включає, головним чином, Т клітини, а не антитіла (які продукуються В-клітинами).

5 [0045] "Доза" стосується вакцинної або імуногенної композиції, яка надається суб'єкту. "Перша доза" або "примірування вакцинні" стосується дози такої композиція, яка надається в день 0. "Друга доза" або "третя доза", або "щорічна доза" стосується кількості такої композиції, яка надається після першої дози, яка може або не може бути такою самою вакцинною або імуногенною композицією, як перша доза.

10 [0046] Термін "емульгатор" використовується в широкому сенсі в представленному розкритті. Він включає речовини, в цілому, загальноприйняті як емульгатори, наприклад, різні продукти TWEEN® або SPAN® лінії продуктів (складні ефіри жирних кислот поліетоксильованого сорбіту та поверхнево-активні речовини заміщеного жирними кислотами сорбітану, відповідно), та різні підвищуючі розчинність речовини, такі як ПЕГ-40 рицинова олія

15 або інша ПЕГильована гідрогенізована олія.
[0047] "Гуморальна імунна відповідь" стосується відповіді, яка опосередковується антитілами.

[0048] "Імунна відповідь" у суб'єкта стосується розвитку гуморальної імунної відповіді, клітинної імунної відповіді, або гуморальної та клітинної імунної відповіді на антиген. Імунні

20 відповіді, як правило, можуть бути визначені з використанням стандартних імунологічних аналізів та аналізів на нейтралізацію, які є відомими в даній галузі з рівня техніки.
[0049] "Імунологічно захисна кількість" або "імунологічно ефективна кількість" або "ефективна кількість щодо продукування імунної відповіді" антигена є кількістю ефективною для індукування імуногенної відповіді у реципієнта. Імуногенна відповідь може бути достатньою для

25 діагностичних цілей або іншого дослідження, або може бути достатньою для попередження проявів або симптомів захворювання, в тому числі несприятливі наслідки для здоров'я або їх ускладнення, викликані інфекцією патогенного чинника захворювання. Індукованими можуть бути або гуморальний імунітет, або клітинно-опосередкований імунітет, або обидва. Імуногенна

30 відповідь тварини на імуногенну композиція може бути оцінена, наприклад, опосередковано через вимірювання титрів антитіл, за аналізами проліферації лімфоцитів, або безпосередньо шляхом моніторингу проявів та симптомів після зараження штамом дикого типу, в той час як захисний імунітет, який надається вакциною, може бути оцінений вимірюванням, наприклад,

35 зменшення клінічних ознак, таких як смертність, захворюваність, температурний показник, загальний фізичний стан, та загальний стан здоров'я та активність суб'єкта. Імунна відповідь може містити, без обмеження, індукування клітинного та/або гуморального імунітету.
[0050] "Імуногенні" означає такі, які викликають імунну або антигенну відповідь. Таким чином, імуногенна композиція буде будь-якою композицією, що викликає імунну відповідь.

[0051] "Імуностимулююча молекула" стосується молекули, яка стимулює неантиген-специфічну імунну відповідь.
40 [0052] "Ліпіди" стосуються будь-якої з груп органічних сполук, яка включає жири, олії, воски, стерини та тригліцериди, які є нерозчинними у воді, але розчинними в неполярних органічних розчинниках, є маслянистими на дотик, та разом з вуглеводами та протеїнами становлять основний структурний матеріал живих клітин.

[0053] "Фармацевтично прийнятний" стосується речовин, які знаходяться в межах обсягу, з

45 медичної точки зору, прийнятних для застосування в контакт з тканинами суб'єктів без надмірної токсичності, подразнення, алергічної реакції, тощо, що відповідають раціональному співвідношенню вигоду-до-ризик, та ефективна для їх використання за призначенням.

[0054] Термін "Полі І:С" стосується полімерів, які зустрічаються в природі, поліінозінової:поліцитадилової кислот, а також їх синтетичні форми, наприклад, зі

50 стабілізованим скелетом та переважно, які мають TLR-3 агоністичну активність.
[0055] "Реактогенність" стосується побічних ефектів, які викликають у суб'єкта відповідь на введення ад'юванта, імуногенної або вакцинної композиції. Це може відбуватися в місці введення, та, як правило, оцінюється з точки зору розвитку цілого ряду симптомів. Дані симптоми можуть включати запалення, почервоніння та абсцес. Крім того, вона оцінюється з

55 точки зору виникнення, тривалості та тяжкості. "Низька" реакція буде, наприклад, включати набряк, який можна виявити тільки при пальпації та не на око, або повинен бути короткотривалим. Більш тяжка реакція була б, наприклад, реакцією, яка є видимою оком або є довготривалою.
[0056] "Кімнатна температура" означає температуру від 18 до 25 °C.

[0057] "Сапонін" стосується групи поверхнево-активних глікозидів рослинного походження, яка складається з гідрофільної ділянки (як правило, декілька цукрових ланцюгів) в поєднанні з гідрофобною ділянкою, або стероїдної, або тритерпеноїдної структури.

5 [0058] "Стероїди" стосується будь-якої групи органічних сполук, які відносяться до біохімічного класу ліпідів, які легко розчиняються в органічних розчинниках та в незначній мірі у воді. Стероїди містять чотирьохкільцеву анельовану систему з трьох анельованих циклогексанових (шестивуглецевих) кілець плюс четверте циклопентанове (п'ятивуглецеве) кільце.

10 [0059] "Стерини" стосуються сполук в тварин, які біологічно продукуються з терпеноїдних попередників. Вони містять стероїдну кільцеву структуру, яка має гідроксильну (ОН) групу, як правило, приєднану до вуглецю-3. Вуглеводневий ланцюг жирнокислотного замісника варіює за довжиною, як правило, від 16 до 20 атомів вуглецю, та може бути насиченим або ненасиченим. Стерини, як правило, містять одну або більше подвійних зв'язків в кільцевій структурі та також різноманітні замісники, приєднані до кілець. Стерини та їх складні ефіри з жирними кислотами є фактично нерозчинними у воді.

15 [0060] "Суб'єкт" стосується будь-якої тварини, для якої введення ад'ювантної композиції є бажаним. Вона включає ссавців та не ссавців, включаючи приматів, свійських тварин, домашніх тварин, лабораторних піддослідних тварин, диких тварин, які живуть у неволі, пернатих (в тому числі в яйцях), рептилій та риб. Таким чином, даний термін включає, але не обмежується цим 20 мавп, людей, свиней; велику рогату худобу, вівців, кіз, коней, мишей, щурів, морських свинок, хом'яків, кроликів, кішок, собак, курей, індичок, качок, інших птахів, жаб та ящірок.

[0061] "TCID₅₀" стосується "інфекційної дози для тканинної культури" та визначається як таке розбавлення вірусу, яке необхідне для інфікування 50 % даної партії інокульованих клітинних культур. Різні способи можуть бути використані для розрахунку TCID₅₀, в тому числі спосіб 25 Спірмена-Карбера, який використовується по всьому даному описі. Для опису способу Спірмена-Карбера, дивись B. W. Mahy & H. O. Kangro, Virology Methods Manual, p. 25-46 (1996).

[0062] "Терапевтично ефективна кількість" стосується кількості антигена або вакцини, яка буде індукувати імунну відповідь у суб'єкта, який отримує антиген або вакцину, яка є достатньою для попередження або зниження проявів або симптомів захворювань, включаючи 30 несприятливі наслідки для здоров'я або їх ускладнення, викликаних інфекцією з патогеном, таким як вірус або бактерії. Індукованим може бути гуморальний імунітет або клітинно-опосередкований імунітет, або як гуморальний, так і клітинно-опосередкований імунітет. Імуногенна відповідь тварини на вакцину може бути оцінена, наприклад, опосередковано шляхом вимірювання титрів антитіл, за аналізами проліферації лімфоцитів, або безпосередньо 35 шляхом моніторингу проявів та симптомів після зараження штамом дикого типу. Захисний імунітет, який надається вакциною, може бути оцінений вимірюванням, наприклад, зменшення клінічних ознак, таких як смертність, захворюваність, температурний показник, загальний фізичний стан, та загальний стан здоров'я та активність суб'єкта. Кількість вакцини, яка є терапевтично ефективною, може варіювати в залежності від конкретного ад'юванта, що застосовується, конкретного антигена, що застосовується, або стану суб'єкта, та може бути 40 визначена кваліфікованим фахівцем в даній галузі.

[0063] "Лікування" стосується попередження розладу, стану або захворювання, до якого цей термін застосовується, або для попередження або зменшення одного або більше симптомів такого розладу, стану або захворювання.

45 [0064] "Лікування" стосується дія "лікування" як це визначено вище.

[0065] "Тритерпеноїди" стосується великого та різноманітного класу органічних молекул, які зустрічаються в природі, що отримують з шести п'ятивуглецевих ізопренових (2-метил-1,3- 50 бутадієнових) одиниць, які можуть бути зібрані та модифіковані тисячами способів. Більшість з них є багатоциклічними структурами, які відрізняються одна від одної функціональними групами, та своїми основними вуглецевими скелетами. Дані молекули можуть бути знайдені в усіх класах живих істот.

[0066] "Вакцина" стосується композиції, яка включає антиген, як визначено в даному документі. Введення вакцини суб'єкту в результаті призводить до імунної відповіді, як правило, проти одного або декількох конкретних захворювань. Кількість вакцини, яка є терапевтично 55 ефективною, може варіювати в залежності від конкретного антигена, який застосовують, або стану суб'єкта, та може бути визначеною кваліфікованим фахівцем в даній галузі.

Композиції ад'ювантів та способи отримання

[0067] Заявка, яка розглядається, розкриває декілька композицій ад'ювантів, прийнятних для представленого винаходу. Загальною ознакою даних ад'ювантів є присутність олії та одного або

більше емульгаторів, де олійна фаза містить більше, ніж 50 % вакцинної композиції, що включає композиції ад'ювантів, розкриті в даному документі.

[0068] Різноманітні олії та їх комбінації є прийнятними для застосування за представленим винаходом. Дані олії включають, без обмеження, тваринні жири, рослинні олії, а також олії, які не метаболізуються. Необмежуваними прикладами рослинних олій, прийнятих в представленому винаході є кукурудзяна олія, арахісова олія, соєва олія, кокосова олія та оливкова олія. Необмежуваним прикладом тваринних жирів є сквален. Прийнятні необмежувачі приклади олій, які не метаболізуються, включають легку мінеральну олію, насичені олії з лінійним або розгалуженим ланцюгом, тощо.

[0069] В наборі варіантів здійснення, олія, яку використовують в композиціях ад'ювантів за представленим винаходом представляє собою легку мінеральну олію. Як використовується в даному документі, термін "мінеральна олія" стосується суміші рідких вуглеводнів, отриманих з вазеліну, застосовуючи методики дистиляції. Термін є синонімом "рідкому парафіну", "рідкому вазеліну" та "білій мінеральній олії." Термін також передбачає включення "легкої мінеральної олії," тобто, олії, яку отримують аналогічним чином шляхом дистиляції вазеліну, але який має трохи нижчу питому густину, ніж біла мінеральна олія. Дивись, наприклад, Remington's Pharmaceuticals Sciences, 18th Edition (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1990, сторінки 788 та 1323). Мінеральну олію можуть отримувати з різних комерційних джерел, наприклад, J. T. Baker (Phillipsburg, Pa.), USB Corporation (Cleveland, Ohio). Переважна мінеральна олія представляє собою легку мінеральну олію, комерційно доступну під назвою DRAKEOL®.

[0070] Як правило, олійна фаза є присутньою в кількостях від 50 % до 95 % за об'ємом; переважно, в кількостях від більше, ніж 50 % до 85 %; більш переважно, в кількостях від більше, ніж 50 % до 60 %, та більш переважно в кількості більше, ніж 50-52 % об./об. вакцинної композиції. Олійна фаза включає олію та емульгатори (наприклад, SPAN® 80, TWEEN® 80, тощо), якщо будь-які такі емульгатори є присутніми. Об'єм олійної фази розраховують як суму об'ємів олії та емульгатора(ів). Таким чином, наприклад, якщо об'єм олії становить 40 % та об'єм емульгатора(ів) становить 12 % композиції, то олійна фаза повинна бути присутньою в кількості 52 % об./об. композиції. Аналогічним чином, якщо олія присутня в кількості приблизно 45 % та емульгатор(и) присутній(і) в кількості приблизно 6 % композиції, то олійна фаза є присутньою в кількості приблизно 51 % об./об. композиції.

[0071] До того ж, слід розуміти, що оскільки ад'юванти за представленим винаходом утворюють тільки частину вакцини за представленим винаходом, олійна фаза є присутньою в кількостях від 50 % до 95 % за об'ємом; переважно, в кількостях від більше, ніж 50 % до 85 %; більш переважно, в кількостях від 50 % до 60 %, та більш переважно в кількості 50-52 % об./об. кожного з ад'ювантів за представленим винаходом.

[0072] В підгрупі варіантів здійснення, які застосовуються до всіх ад'ювантів/вакцин за представленим винаходом, об'ємний відсоток олії та розчинного в олії емульгатора разом становить щонайменше 50 %, наприклад, від 50 % до 95 % за об'ємом; переважно, в кількостях від більше, ніж 50 % до 85 %; більш переважно, в кількостях від 50 % до 60 %, та більш переважно в кількості 50-52 % об./об. вакцинної композиції. Таким чином, наприклад, та без обмеження, олія може бути присутньою в кількості 45 %, та розчинний в ліпідах емульгатор має бути присутнім в кількості більше, ніж 5 % об./об. Таким чином, об'ємний відсоток олії та розчинного в олії емульгатора разом повинен становити, щонайменше, 50 %.

[0073] В ще іншій підгрупі, яка застосовується до всіх вакцин винаходу, об'ємний відсоток олії становить понад 40 %, наприклад, від 40 % до 90 % за об'ємом; від 40 % до 85 %; від 43 % до 60 %, 44-50 % об./об. вакцинної композиції.

[0074] Емульгатори, прийнятні для застосування в представлених емульсіях, включають природні біологічно сумісні емульгатори та неприродні синтетичні поверхнево-активні речовини. Біологічно сумісні емульгатори включають фосфоліпідні сполуки або суміш фосфоліпідів. Переважні фосфоліпіди представляють собою фосфатидилхоліни (лецитин), такий як соєвий або яєчний лецитин. Лецитин можуть отримувати як суміш фосфатидів та тригліцеридів шляхом промивання водою сирих рослинних олій, та розділення та сушки одержаних в результаті гідратованих смол. Очищений продукт можуть отримувати шляхом фракціонування суміші на нерозчинні в ацетоні фосфоліпіди та гліколіпіди, які залишаються після видалення тригліцеридів та рослинної олія за рахунок промивання ацетоном. Альтернативно, лецитин можуть отримувати з різних комерційних джерел. Інші прийнятні фосфоліпіди включають фосфотидилгліцерин, фосфотидилінозитол, фосфотидилсерин, фосфатидну кислоту, кардіоліпін, та фосфотидилетаноламін. Фосфоліпіди можуть бути виділені з природних джерел або синтезовані за традиційним способом.

[0075] В додаткових варіантах здійснення, емульгатори, які використовують в даному документі, не включають лецитин, або використовують лецитин в кількостях, які не є імунологічно ефективними.

[0076] Неприродні, синтетичні емульгатори, прийнятні для застосування в композиціях ад'ювантів за представленим винаходом включають на основі сорбітану неіонні поверхнево-активні речовини, наприклад, заміщені жирними кислотами на основі сорбітану поверхнево-активні речовини (комерційно доступну під назвою SPAN® або ARLACEL®), складні ефіри жирних кислот з поліетоксильованим сорбітом (TWEEN®), складні ефіри поліетиленгліколю та жирних кислот з джерел, таких як рицинова олія (EMULFOR®); поліетоксильованої жирної кислоти (наприклад, стеаринової кислоти, доступної під назвою SIMULSOL® M-53), поліетоксильований ізооктилфенол/формальдегідний полімер (TYLOXAPOL®), прості ефіри поліоксіетилен жирного спирту (BRIJ®); поліоксіетилен-нефенільні прості ефіри (TRITON® N), поліоксіетилен ізооктилфенілові прості ефіри (TRITON® X). Переважні синтетичні поверхнево-активні речовини представляють собою поверхнево-активні речовини доступні під назвою SPAN® та TWEEN®, такі як TWEEN®-80 (поліоксіетилен (20) сорбітану моноолеат) та SPAN®-80 (сорбітану моноолеат).

[0077] Загалом кажучи, емульгатор(и) можуть бути присутніми в вакцинній композиції в кількостях від 0,01 % до 40 % за об'ємом, переважно, від 0,1 % до 15 %, більш переважно від 2 % до 10 %.

[0078] Додаткові інгредієнти, присутні в представлених композиціях ад'ювантів включають катіонні носії, імуностимулюючі олігонуклеотиди, монофосфоліпід А та їх аналоги (MPL-A), поліінозинову:поліцитидилову кислоту (полі I:C), сапоніни, четвертинний амоній, стерини, гліколіпіди, джерело алюмінію (наприклад, REHYDRAGEL® або VAC 20® вологий гель) та їх комбінації.

[0079] Прийнятні катіонні носії включають, без обмеження, декстран, декстран DEAE (та їх похідні), ПЕГ, гуарові смоли, похідні хітозану, похідні полі целюлози, такі як гідроксіетилцелюлоза (HEC) поліетиленімін, поліаміни, такі як полілізин, тощо.

[0080] Прийнятні імуностимулюючі олігонуклеотиди включають ODN (на основі ДНК), ORN (на основі РНК) олігонуклеотиди або химерні ODN-ORN структури, які можуть мати модифікований скелет, включаючи, без обмеження, фосфоротіоатні модифікації, галогенування, алкілування (наприклад, етил- або метил- модифікації), та фосфодискладноефірні модифікації. В деяких варіантах здійснення, використаною може бути полі-інозинова -цитидилова кислота або її похідна (полі I:C).

[0081] CpG олігонуклеотиди представляє собою недавно описаний клас фармакотерапевтичних агентів, які характеризуються присутністю неметильованого CG динуклеотиду в специфічних контекстах базової послідовності (CpG мотив). (Hansel TT, Barnes PJ (eds): New Drugs for Asthma, Allergy та COPD. Prog Respir Res. Basel, Karger, 2001, vol 31, pp 229-232, яка включена в даний документ у вигляді посилання). Дані CpG мотиви не виявлені в еукаріотичній ДНК, в якій супресуються CG динуклеотиди, та, коли присутні, як правило, метильовані, але присутні в бактеріальній ДНК, яким вони надають імуностимулюючі властивості.

[0082] В вибраних варіантах здійснення, ад'юванти за представленим винаходом використовують так званий імуностимулюючий олігонуклеотид Р-класу, більш переважно, модифіковані імуностимулюючі олігонуклеотиди Р-класу, ще більш переважно, Е-модифіковані олігонуклеотиди Р-класу. Імуностимулюючі олігонуклеотиди Р-класу є CpG олігонуклеотидами, які характеризуються присутністю паліндромів, в цілому довжиною в 6-20 нуклеотидів. Олігонуклеотиди Р-класу мають здатність спонтанно самоорганізуються в конкатемери або *in vitro* та/або *in vivo*. Дані олігонуклеотиди є, в вузькому розумінні, одноланцюговими, але присутність паліндромів дозволяє утворення конкатемерів або, можливо, стовбурових-тапетельних структур. Загальна довжина імуностимулюючих олігонуклеотидів Р-класу становить від 19 до 100 нуклеотидів, наприклад, 19-30 нуклеотидів, 30-40 нуклеотидів, 40-50 нуклеотидів, 50-60 нуклеотидів, 60-70 нуклеотидів, 70-80 нуклеотидів, 80-90 нуклеотидів, 90-100 нуклеотидів.

[0083] В одному аспекті винаходу імуностимулюючий олігонуклеотид містить 5' TLR активаційний домен та, щонайменше, два паліндромних ділянок, де одна паліндромна ділянка є 5' паліндромною ділянкою з, щонайменше, 6 нуклеотидів в довжину та приєднаною до 3' паліндромної ділянки з, щонайменше, 8 нуклеотидів в довжину або безпосередньо або через спейсер.

[0084] Імуностимулюючі олігонуклеотиди Р-класу можуть бути модифіковані відповідно до способів, відомих в даній галузі з рівня техніки. Наприклад, J-модифікація стосується йод-модифікованих нуклеотидів. Е-модифікація стосується етил-модифікованого(их) нуклеотиду(ів).

Таким чином, Е-модифіковані імуностимулюючі олігонуклеотиди Р-класу представляють собою імуностимулюючі олігонуклеотиди Р-класу, в яких, щонайменше, один нуклеотид (переважно 5' нуклеотид) є етильованим. Додаткові модифікації включають приєднання 6-нітро-бензімідазолу, О-метилування, модифікацію з проїнін-dU, інозинову модифікацію, 2-бромвінілове приєднання (переважно до уридину).

[0085] Імуностимулюючі олігонуклеотиди Р-класу, крім того, можуть містити модифікований міжнуклеотидний зв'язок, включаючи, без обмеження, фосфодискладноефірні зв'язки та фосфоротіоатні зв'язки. Олігонуклеотиди за представленим винаходом можуть бути синтезовані або отримані з комерційних джерел.

[0086] Олігонуклеотиди Р-класу та модифіковані олігонуклеотиди Р-класу додатково розкриті в опублікованій заявці РСТ № WO2008/068638, опублікована 12 червня 2008. Прийнятні необмежуючі приклади модифікованих імуностимулюючих олігонуклеотидів Р-класу представлені нижче (в SEQ ID NO 1-10, "*" стосується фосфоротіоатного зв'язку та "_" стосується фосфодискладноефірного зв'язку). В SEQ ID NO 11-14, всі зв'язки представляють собою фосфодискладноефірні зв'язки.

SEQ ID NO: 1 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'

SEQ ID NO: 2 5' T*C_G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G 3'

SEQ ID NO: 3 5' T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T 3'

SEQ ID NO: 4 5' JU*C_G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G 3'

SEQ ID NO: 5 5' JU*C_G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T 3'

SEQ ID NO: 6 5' JU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T 3'

SEQ ID NO: 7 5' EU*C_G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G 3'

SEQ ID NO: 8 5' JU*C_G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T 3'

SEQ ID NO: 9 5' JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T 3'

SEQ ID NO: 10 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3'

SEQ ID NO: 11 5'-UUGUUGUUGUUGUUGUUGUUU-3'

SEQ ID NO: 12 5'-UUAUUUAUUUAUUUAUUUAUU-3'

SEQ ID NO: 13 5'-AAACGCUCAGCCAAAGCAG-3'

SEQ ID NO: 14 5'-dTdCdGdTdCdGdTdTdTTrGrUrUrGrUrGrUdTdTdTdT-3'

[0087] Кількість імуностимулюючого олігонуклеотиду Р-класу для застосування в композиціях ад'ювантів залежить від природи імуностимулюючого олігонуклеотиду Р-класу, який використовується, та передбачуваних видів.

[0088] Прийнятні аналоги MPL-A включають, без обмеження, природні LPS, які можуть бути бактеріального походження, зміненої або незміненої структури, або синтетичні, глікопіранозильний ліпідний ад'ювант (GLA), пертактин, варіюючи замісниками в 3-О-положенні відновлюючого цукру, синтетичні форми аналога ліпіду А з низькою ендотоксичності.

[0089] Стерини мають спільне загальне хімічне ядро, яке представляє собою стероїдну кільцеву структуру[и], які мають гідроксильну (ОН) групу, як правило, приєднана до вуглецю-3. Вуглеводневий ланцюг жирнокислотного замісника варіює в довжину, як правило, від 16 до 20 атомів вуглецю, та може бути насиченим або ненасиченим. Стерини, як правило, містять один або більше подвійних зв'язків в кільцевій структурі та також ряд замісників, приєднаних до кілець. Стерини та їх складні ефіри з жирними кислотами є фактично нерозчинними у воді. З точки зору даних хімічних подібностей, таким чином, є можливим, що стерини, які мають спільне дане хімічне ядро, будуть мати подібні властивості, коли їх застосовують в вакцинних композиціях за представленим винаходом. Стерини є добре відомими в даній галузі з рівня техніки та можуть бути придбані на комерційній основі. Наприклад, холестерин розкритий в Merck Index, 12th Ed., p. 369. Прийнятні стерини включають, без обмеження, β-ситостерин, стигмастерин, ергостерин, ергокальциферол та холестерин.

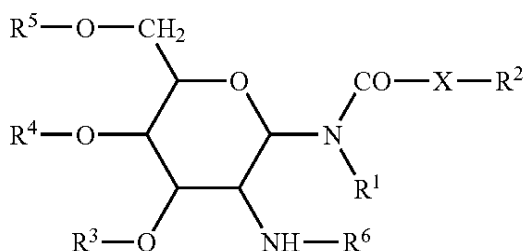
[0090] Прийнятні сапоніни включають тритерпеноїдні сапоніни. Дані тритерпеноїди представляють собою групу поверхнево-активних глікозидів рослинного походження та мають спільне загальне хімічне ядро, яке складається з гідрофільної ділянки (як правило декілька цукрових ланцюгів) в поєднанні з гідрофобною ділянкою або стероїдною, або тритерпеноїдною структури. Через це подібності, сапоніни, які мають спільне дане хімічне ядро, є ймовірно такими, що мають аналогічні підвищуючі імуногенність антитіл властивості. Тритерпеноїди, прийнятні для застосування в ад'ювантній композиції, можуть надходити з різних джерел, або рослинного походження або синтетичні еквіваленти, включаючи, але не обмежуючись цим, екстракт кори панама дерева, томатин, екстракти женьшені, гриби та алкалоїдний глікозид структурно подібний до стероїдних сапонінів.

[0091] Якщо використовується сапонін, ад'ювантні композиції в цілому містять фракцію імунологічно активного сапоніну з кори панама дерева. Сапонін може бути, наприклад, Quil A

або інший очищений або частково очищений препарат сапоніну, який може бути отриманий на комерційній основі. Таким чином, екстракти сапоніну можуть використовуватись як суміші або очищені індивідуальні компоненти, такі як QS-7, QS-17, QS-18, та QS-21. В одному варіанті здійснення Quil A має, щонайменше, 85 % чистоти. В інших варіантах здійснення, Quil A має, щонайменше, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % чистоти.

[0092] Четвертинні аміні сполуки представляють собою сполуки на основі амонію з чотирма вуглеводневими групами. На практиці, вуглеводневі групи в цілому обмежуються алкільними або арильними групами. В наборі варіантів здійснення, четвертинні аміні сполуки складаються з чотирьох алкільних ланцюгів, два з яких є C10-C20 алкілами, та останні два є C1-C4 алкілами. В одному наборі варіантів здійснення, четвертинний амін є диметилдіоктадециламонію бромідом, хлоридом або фармацевтично прийнятним протиіоном (DDA).

[0093] Прийнятні гліколіпіди, в цілому, є такими, які активують Th2 відповідь. Гліколіпіди включають, без обмеження, ті, які охоплюються формулою I та та які, в цілому, є описаними в публікації US 20070196384 (Ramasamy et al).



Формула I

[0094] В структурі формули I, R¹ та R² незалежно є воднем або насиченим алкільним радикалом, який має аж до 20 атомів вуглецю; X є -CH₂-, -O- або -NH-; R² є воднем, або насиченим або ненасиченим алкільним радикалом, який має аж до 20 атомів вуглецю; R³, R⁴, та R⁵ незалежно є воднем, -SO₄²⁻, -PO₄²⁻, -COC₁₋₁₀ алкілом; R⁶ є L-аланіном, L-альфа-амінобутилом, L-аргініном, L-аспаргініном, L-аспартилом, L-цистеїніном, L-глутаміном, L-гліцином, L-гістидіном, L-гідроксипропіном, L-ізолейцином, L-лейцином, L-лізином, L-метіоніном, L-орнітином, L-фенілаланіном, L-проліном, L-серилом, L-треоніном, L-тирозином, L-триптофаніном та L-валіном або їх D-ізомерами.

[0095] В наборі варіантів здійснення, прийнятний гліколіпід представляє собою N-(2-дезоксид-2-лейциламіно-b-D-глюкопіранозил)-N-октадецилдодеканоїламід або його ацетат.

[0096] Алюміній є відомим ад'ювантом або компонентом композиції ад'ювантів та є комерційно доступним в таких формах як Reheis, Inc, Brentag алюмогідрогель REHYDRAGEL® або VAC 20® вологий гель. REHYDRAGEL® є кристалічним оксигідроксидом алюмінію, відомим з мінералогії як беміт. Він є ефективним в вакцинах, коли існує необхідність пов'язувати негативно заряджені протеїни. Вміст Al₂O₃ знаходиться в діапазоні від 2 % до 10 % в залежності від сорту, та його в'язкість становить 1000-1300 сП. В цілому, він може бути описаний як адсорбент гелідрат оксиду алюмінію. VAC® 20 вологий гель представляє собою білий або майже білий, прозорий, в'язкий колоїдний гель. В деяких варіантах здійснення, вміст Al₂O₃ становить приблизно 2 % мас./об.

[0097] В інших варіантах здійснення, джерело алюмінію також може бути отримане за рахунок процесів осажденного гідроксиду алюмінію.

[0098] В певному наборі варіантів здійснення, на додаток до олії та необов'язкового одного або більше емульгаторів, композиції ад'ювантів також містять (або фактично складаються, або складаються) комбінацію з монофосфорильного ліпиду A (MPL-A) або його аналога, стерину та імуностимулюючого олігонуклеотида. Ад'юванти, які містять дані інгредієнти згадуються як "ТСМО". ТСМО композиція ад'юванта, крім того, може необов'язково включати полі I:C ("ТСМО") та/або сапонін. Таким чином, композиції ад'ювантів, які містять, або що фактично складаються з, або складаються з комбінації монофосфорильного ліпиду A (MPL-A) або його аналога, стерину та імуностимулюючого олігонуклеотиду та сапоніну називаються як "QТСМО". Крім того, композиції ад'ювантів також можуть включати полі I:C. Такі ад'юванти називаються як "QТСМО".

[0099] В наборі варіантів здійснення, ТСМО ад'юванти містять легку мінеральну олію в кількості від 40 % до 50 % об./об. від загального об'єму вакцинної композиції. Емульгатори включають TWEEN-80 та SPAN-80, загальною кількістю від 0,1 % до 40 % об./об. від загального об'єму вакцинної композиції, за умови, що сорбітану моноолеат та олія разом складають від приблизно 50,5 % до 52 % об./об. композиції. Імуностимулюючий олігонуклеотид представляє

собою ODN, переважно, паліндром, який містить ODN, необов'язково, з модифікованим скелетом.

5 [00100] В деяких варіантах здійснення, одна доза TCMO містить від приблизно 1 мкг до приблизно 400 мкг імуностимулюючого олігонуклеотида, від приблизно 1 мкг до приблизно 1000 мкг стерину, від приблизно 0,1 мкг до 500 мкг MPL-A або його аналога.

[00101] Кількості інших сполук на дозу вибирають на основі видів суб'єктів.

10 [00102] Наприклад, в деяких варіантах здійснення прийнятна для великої рогатої худоби, овець, або дорослих свиней одна доза TCMO буде містити від приблизно 50 до 400 мкг (наприклад, 50-300, або 100-250 мкг, або від приблизно 50 до приблизно 100 мкг для дорослих свиней та від приблизно 100 до приблизно 250 мкг для великої рогатої худоби) імуностимулюючого олігонуклеотида, від приблизно 100 до приблизно 1000 мкг (наприклад, 200-1000, 250-700 мкг, або приблизно 400-500 мкг) стерину, такого як холестерин, та від приблизно 5 до приблизно 500 мкг (наприклад, 5-100 мкг, або 5-50 мкг, або 10-25 мкг) MPL-A або його аналога.

15 [00103] В деяких варіантах здійснення прийнятна для домашніх тварин або поросят одна доза TCMO буде містити від приблизно 5 до 100 мкг (наприклад, 10-80, або 20-50 мкг) імуностимулюючого олігонуклеотида, від приблизно 5 до 100 мкг (наприклад, 10-80, або 20-50 мкг) стерину, такого як холестерин, та від приблизно 0,5 до приблизно 200 мкг (наприклад, 1-100 мкг, або 5-50 мкг, або 5-20 мкг) MPL-A або його аналога.

20 [00104] В деяких варіантах здійснення прийнятна для домашньої птиці одна доза TCMO ад'юванта буде містити від приблизно 0,1 до приблизно 5 мкг (наприклад, 0,5-3 мкг, або 0,9-1,1 мкг) імуностимулюючого олігонуклеотида, від приблизно 0,5 до приблизно 50 мкг (наприклад, 1-20 мкг, або 1-10 мкг) стерину, такого як холестерин, та від приблизно 0,1 до 10 мкг (наприклад, 0,5 - 5 мкг, або 1-5 мкг) MPLA або його аналога.). MPL-A є присутнім в кількості від 0,1 мкг/доза до 2 000 мкг/доза.

[00105] В деяких варіантах здійснення, TCMO ад'юванти одержують за наступним способом:

а) Сорбітану моноолеат, MPL-A та холестерин розчиняють в легкій мінеральній олії. Отриманий в результаті розчин олії піддають стерильній фільтрації;

30 б) імуностимулюючий олігонуклеотид та поліоксіетилен (20) сорбітану моноолеат розчиняють у водній фазі, таким чином, утворюючи водний розчин;

с) Водний розчин додають до розчину олії при безперервній гомогенізації, таким чином, утворюючи композицію ад'юванта TCMO.

35 [00106] В TCMYO ад'ювантах холестерин, олія, необов'язкові емульгатори, MPL-A та імуностимулюючі олігонуклеотиди присутні як в TCMO композиції ад'юванта для відповідних видів. Полі І:С можуть бути присутніми, в цілому, в кількості від приблизно 1 мкг до приблизно 100 мкг на дозу.

40 [00107] Більш конкретно, полі І:С може бути присутнім в кількості 5-100 мкг на дозу (наприклад, 5-50 мкг, або 10-30 мкг) в деяких варіантах здійснення прийнятні для великої рогатої худоби, дорослих свиней, або овець. В деяких варіантах здійснення прийнятна для домашніх тварин або поросят одна доза TCMYO містить від приблизно 1 до приблизно 50 мкг (наприклад, 5-50 мкг, або 10-20 мкг) полі І:С. В деяких варіантах здійснення прийнятні для вакцин для домашньої птиці одна доза TCMYO містить від приблизно 1 до приблизно 10 мкг (наприклад, 1-5 мкг, або 3-5 мкг) полі І:С.

45 [00108] В деяких варіантах здійснення, TCMYO ад'юванти отримують аналогічно до TCMO ад'ювантів, та полі І:С додають до водного розчину.

50 [00109] В наборі варіантів здійснення, в QTCMO ад'ювантах холестерин, олія, необов'язкові емульгатори, MPL-A, та імуностимулюючі олігонуклеотиди присутні як в TCMO композиції ад'юванта для відповідних видів. Сапонін переважно представляє собою Quil A або його очищену фракцію, та може бути присутнім в кількостях від приблизно 0,1 мкг до приблизно 1000 мкг на дозу.

55 [00110] Більш конкретно, в деяких варіантах здійснення в прийнятних вакцинах для домашньої птиці сапонін може бути присутнім в кількості від 0,1 до 5 мкг на 50 мкл вакцинної композиції (наприклад, 0,5 - 30 мкг на 50 мкл композиції, або більш переважно 1-10 мкг) на дозу. В деяких варіантах здійснення прийнятних для застосування у домашніх тварин та поросят, сапонін, наприклад, Quil A або його очищена фракція, присутній в кількостях від приблизно 10 до приблизно 100 мкг на дозу (наприклад, 10-50 мкг або 20-50 мкг на дозу). В деяких варіантах здійснення прийнятний для великої рогатої худоби, дорослих свиней або овець, сапонін, такий як Quil A або його очищена фракція, присутній в кількості від приблизно 100 до приблизно 1000 мкг на дозу (наприклад, 200-800 мкг, або 250-500 мкг на дозу).

[00111] В деяких варіантах здійснення, QTCMO ад'юванти отримують аналогічно до TCMO ад'ювантів, та сапонін додають до водного розчину.

[00112] В наборі варіантів здійснення, в QTCMYO ад'ювантах, сапонін є присутнім як в QTCMO ад'юванті, та останні з інгредієнтів є присутніми як в TCMYO, для відповідних видів.

5 [00113] В деяких варіантах здійснення, QTCMYO ад'юванти отримують аналогічно до TCMYO ад'ювантів, та сапонін додають до водного розчину.

[00114] В альтернативних варіантах здійснення, на додаток до олії та необов'язкового(их) емульгатора(ів), композиції ад'ювантів також містять (або фактично складаються з, або складаються з) комбінацію з монофосфорильного ліпиду A (MPL-A) або його аналога та полікатіонного носія. Дані ад'юванти називаються як "ХОМ".

10 [00115] В наборі варіантів здійснення, в ХОМ ад'ювантах для домашніх тварин або поросят, полікатіонний носій присутній в кількості 1-50 мг на дозу (наприклад, 1-25 мг на дозу, або 10-25 мг на дозу), та MPL-A або його аналог присутній в кількості приблизно 1-50 мкг на дозу (наприклад, 1-25 мкг на дозу, або 10-25 мкг на дозу).

15 [00116] В деяких варіантах здійснення прийнятний для великої рогатої худоби, овець та дорослих свиней, полікатіонний носій присутній в кількості від приблизно 5 до приблизно 500 мг на дозу (наприклад, 10-500 мг, або 10-300 мг, або 50-200 мг на дозу), та MPL-A або його аналог присутній в кількості від приблизно 1 до приблизно 100 мкг на дозу (наприклад, 5-100 мкг, або 5-50 мкг, або 10-30 мкг).

20 [00117] В деяких варіантах здійснення прийнятний для домашніх тварин та поросят, полікатіонний носій присутній в кількості від приблизно 1 до приблизно 50 мг на дозу (наприклад, 1-25 мг на дозу, або 10-25 мг на дозу), та MPL-A або його аналог присутній в кількості від приблизно 0,5 до приблизно 200 мкг (наприклад, 1-100 мкг, або 5-50 мкг, або 5-20 мкг) на дозу.

25 [00118] В деяких варіантах здійснення в прийнятних вакцинах для домашньої птиці, полікатіонний носій є присутнім в кількості від 0,5 до 25 мг на дозу (наприклад, 1-20 мг, або 1-10 мг або 5-10 мг), та MPL-A або його аналог є присутнім в кількості від приблизно 0,5 та 10 мкг на дозу (наприклад, 1-10 мкг, або 1-5 мкг, або 2-5 мкг).

[00119] В деяких варіантах здійснення, ХОМ ад'юванти отримують за наступним способом:

30 а) Сорбітану моноолеат, MPL-A та холестерин розчиняють в легкій мінеральній олії. Отриманий в результаті розчин олії піддають стерильній фільтрації;

б) Декстран DEAE та поліоксіетилен (20) сорбітану моноолеат розчиняють у водній фазі, таким чином утворюючи водний розчин;

35 в) Водний розчин додають до розчину олії при безперервній гомогенізації, таким чином, утворюючи композицію ад'юванта ХОМ.

[00120] В додаткових альтернативних варіантах здійснення, на додаток до олії та емульгатора(ів), композиції ад'ювантів також містять (або фактично складаються з, або складаються з) комбінацію з імуностимулюючого олігонуклеотида та полікатіонного носія, за умови, що якщо зазначений полікатіонний носій є декстраном DEAE, то антиген не є бактеринном Е солі J-5. Дані ад'юванти називаються як "ТХО". В деяких варіантах здійснення, вакцини, в які додають ад'ювант з ТХО, містять антиген(и), який(і) містить збудники, які інфікують велику рогату худобу, овець, коней або свиней. В інших варіантах здійснення, антигени отримують із зазначених збудників. В інших варіантах здійснення, вакцини, в які додають ад'ювант з ТХО містять антиген(и), який(і) містить збудники, які інфікують птицю або кішок, або антигени можуть отримувати з таких збудників. В наборі варіантів здійснення, ТХО ад'юванти також можуть включати джерело алюмінію, таке як гель $Al(OH)_3$. ТХО ад'юванти з алюмінієм називаються як "ТХО-А".

[00121] В наборі варіантів здійснення, в ТХО ад'ювантах, імуностимулюючий олігонуклеотид, переважно ODN, який переважно містить паліндромну послідовність, та необов'язково з модифікованим скелетом, може бути присутнім в кількості 0,5-400 мкг на дозу, та полікатіонний носій може бути присутнім в кількості 0,5-400 мг на дозу. Дозування варіюють в залежності від виду суб'єкта.

50 [00122] Наприклад, в деяких варіантах здійснення прийнятна для великої рогатої худоби, овець або дорослих свиней одна доза ТХО буде містити від приблизно 50 до 400 мкг (наприклад, 50-300, або 100-250 мкг, або від приблизно 50 до приблизно 100 мкг для дорослих свиней та від приблизно 100 до приблизно 250 мкг для великої рогатої худоби) імуностимулюючого олігонуклеотида, та полікатіонний носій може бути присутнім в кількості від приблизно 5 до приблизно 500 мг на дозу (наприклад, 10-500 мг, або 10-300 мг, або 50-200 мг на дозу).

[00123] В деяких варіантах здійснення прийнятна для домашніх тварин або поросят одна доза ТХО буде містити від приблизно 5 до 100 мкг (наприклад, 10-80 мкг, або 20-50 мкг) імуностимулюючого олігонуклеотида, тоді як полікатіонний носій може бути присутнім в кількості 1-50 мг на дозу (наприклад, 1-25 мг на дозу, або 10-25 мг на дозу).

5 [00124] В деяких варіантах здійснення прийнятна для домашньої птиці одна доза ТХО ад'юванта буде містити від приблизно 0,1 до приблизно 5 мкг (наприклад, 0,5-3 мкг, або 0,9-1,1 мкг) імуностимулюючого олігонуклеотида, та полікатіонний носій може бути присутнім в кількості від 0,5 до 25 мг на дозу (наприклад, 1-20 мг, або 1-10 мг, або 5-10 мг).

[00125] В деяких варіантах здійснення, ТХО ад'юванти отримують за наступним способом:

10 а) Сорбітану моноолеат розчиняють в легкій мінеральній олії. Отриманий в результаті розчин олії піддають стерильній фільтрації;

б) Імуностимулюючий олігонуклеотид, декстран DEAE та поліоксіетилен (20) сорбітану моноолеат розчиняють у водній фазі, таким чином, утворюючи водний розчин; та

15 в) Водний розчин додають до розчину олії при безперервній гомогенізації, таким чином, утворюючи композицію ад'юванта ТХО.

[00126] В наборі варіантів здійснення, в ТХО-А ад'ювантах, імуностимулюючий олігонуклеотид є присутнім як ТХО ад'ювант, джерело алюмінію є присутнім в кількості аж до 40 % об./об. (наприклад, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 1 %). В наборі варіантів здійснення, джерело алюмінію є присутньою в кількості 2 %-20 % об./об. від вакцинної композиції, більш переважно від приблизно 5 % до приблизно 17 % об./об.

20 [00127] В деяких варіантах здійснення, ТХО-А ад'юванти отримують аналогічно до ТХО ад'ювантів, та джерело алюмінію додають до водного розчину.

[00128] В додаткових варіантах здійснення, ад'юванти за представленим винаходом містять олію, необов'язковий(і) емульгатор(и), імуностимулюючий олігонуклеотид та джерело алюмінію. Дані сполуки є присутніми в діапазонах, розкритих для ТХО-А ад'юванта, за винятком того, що полікатіонний носій відсутній в ТОА. ТОА ад'ювант отримують аналогічно до ТХО ад'юванта, за винятком того, що водна фаза містить джерело алюмінію, а не DEAE декстран.

25 [00129] В деяких варіантах здійснення, на додаток до олії та емульгатора(ів), композиції ад'ювантів також містять (або фактично складаються з, або складаються з) комбінацію з полікатіонного носія та джерела алюмінію. Даний ад'ювант називається як АХО. Дані сполуки можуть бути присутніми в кількостях аналогічних до тих, що присутні в ад'юванті ТХО-А для відповідних видів, та ад'ювант АХО можуть отримати аналогічно до ТХО-А, але без додавання імуностимулюючого олігонуклеотида.

30 [00130] В деяких інших варіантах здійснення, на додаток до олії та емульгатора(ів), композиції ад'ювантів також містять (або фактично складаються з, або складаються з) комбінацію сапоніну та стерину. Даний ад'ювант називається як QCO. Природа та кількості інгредієнтів QCO є аналогічними до кількостей сапоніну, стерину, олії та емульгатора(ів) в ад'юванті QTCMO. QCO можуть отримати шляхом додавання водного розчину, який містить сапонін, стерин та, переважно, розчинний у воді емульгатор в олійній фазі, яка містить олію та, переважно, розчинний в олії емульгатор при безперервній гомогенізації.

40 [00131] В ще наступних альтернативних варіантах здійснення, на додаток до олії та емульгатора(ів), композиції ад'ювантів також містять (або фактично складаються з, або складаються з) комбінацію з четвертинного аміну, гліколіпиду, MPL-A або його аналога, та полі І:С. Дані ад'юванти називаються як "ODYRM".

45 [00132] В ODYRM ад'ювантів, олія, в цілому, представляє собою суміш фосфоліпідів, таких як фосфотидилхоліні. AMPHIGEN® представляє собою прийнятний приклад такої олії, та повинна бути присутньою в кількості аналогічній до кількості олії, як описано вище.

50 [00133] В наборі варіантів здійснення, в ODYRM ад'ювантах, четвертинний амін, наприклад, DDA, є присутнім в кількості від приблизно 1 мкг до приблизно 200 мкг на дозу, полі І:С є присутнім в кількості від приблизно 0,5 мкг до 100 мкг на дозу, гліколіпід є присутнім в кількості від приблизно 0,5 мкг до приблизно 2000 мкг на дозу, та MPL-A або його аналог є присутнім в кількості від приблизно 0,5 мкг до 100 мкг на дозу.

55 [00134] Більш конкретно, в деяких варіантах здійснення прийнятний для введення великій рогатій худобі, дорослим свиням, або вівцям, четвертинний амін може бути присутнім в кількості від приблизно 50 мкг до приблизно 200 мкг на дозу (наприклад, 50-150 мкг, або приблизно 100 мкг), полі І:С може бути присутнім в кількостях від приблизно 1 мкг до приблизно 100 мкг на дозу (наприклад, 1-50 мкг або 5-50 мкг), гліколіпід може бути присутнім в кількості від приблизно 500 мкг до приблизно 2000 мкг на дозу (наприклад, 500-1000 мкг або приблизно 1000 мкг), та MPLA або його аналог може бути присутнім в кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 100 мкг на дозу (наприклад, 5-50 мкг, або 10-50 мкг).

[00135] В деяких варіантах здійснення прийнятний для введення домашнім тваринам та поросят, четвертинний амін може бути присутнім в кількості від приблизно 5 до приблизно 500 мкг на дозу (наприклад, 10-100 мкг на дозу, або 20-50 мкг на дозу), полі І:С може бути присутнім в кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 25 мкг на дозу (наприклад, 5-20 мкг, або приблизно 10 мкг), гліколіпід може бути присутнім в кількості від приблизно 10 до приблизно 100 мкг на дозу (наприклад, 20-100 мкг або 25-50 мкг), та MPL-A або його аналог може бути присутнім в кількості від приблизно 5 до приблизно 50 мкг на дозу (наприклад, 5-20 мкг, або 10-20 мкг).

[00136] В деяких інших варіантах здійснення, в прийнятних вакцинах для домашньої птиці, одна доза буде містити від приблизно 1 мкг до приблизно 10 мкг четвертинної аміної сполуки (наприклад, 5-10 мкг, або приблизно 5 мкг), від приблизно 0,5 до приблизно 10 мкг полі І:С (наприклад, 1-10 мкг або 1-5 мкг), від приблизно 0,5 та 10 мкг гліколіпиду (наприклад, 1-10 мкг, або 5-10 мкг, або 1-5 мкг), та від приблизно 0,5 мкг до приблизно 5 мкг MPL-A або його аналога (наприклад, 0,5-5 мкг або 1-5 мкг).

[00137] В деяких варіантах здійснення, ODYRM ад'юванти отримують за наступним способом:

а) Сорбітану моноолеат, MPL-A розчиняють в легкій мінеральній олії. Отриманий в результаті розчин олії піддають стерильній фільтрації та диспергують у воді з деякою кількістю поверхнево-активної речовини, етанолу та оцтової кислоти;

б) Поліоксіетилен (20) сорбітану моноолеат, четвертинний амін, наприклад, DDA, та полі І:С розчиняють у водній фазі, таким чином, утворюючи водний розчин; та

с) Водний розчин додають до розчину олії при безперервній гомогенізації, таким чином, утворюючи композицію ад'юванта ODYRM.

[00138] В ще наступному наборі варіантів здійснення, на додаток до олії та емульгатора(ів), композиції ад'ювантів також містять (або фактично складаються з, або складаються з) комбінацію з сапоніну, стерину, четвертинного аміну, полікатіонного носія, за умови, що, якщо зазначений полікатіонний носій є декстраном DEAE, то антиген не є бактеринном E coli J-5. Дані ад'юванти називаються як "QCDXO".

[00139] В QCDXO ад'ювантах, в деяких варіантах здійснення, сапонін, наприклад, Quil A, може бути присутнім в кількостях від приблизно 0,1 мкг до приблизно 1000 мкг на дозу, стерин, наприклад, холестерин, є присутнім від приблизно 1 мкг до приблизно 1000 мкг на дозу, четвертинний амін, наприклад, DDA, є присутнім в кількості від приблизно 1 мкг до приблизно 200 мкг на дозу, та полікатіонний носій може бути присутнім в кількості 0,5-400 мг на дозу. Дозування варіюють в залежності від виду суб'єкта.

[00140] В деяких варіантах здійснення прийнятний для великої рогатої худоби, овець, та дорослих свиней сапонін є присутнім в кількості від приблизно 100 до приблизно 1000 мкг на дозу (наприклад, 200-800 мкг, або 250-500 мкг на дозу), стерин є присутнім в кількостях від приблизно 100 до приблизно 1000 мкг (наприклад, 200-1000, 250-700 мкг, або приблизно 400-500 мкг), четвертинний амін може бути присутнім в кількості від приблизно 50 мкг до приблизно 200 мкг на дозу (наприклад, 50-150 мкг, або приблизно 100 мкг), та полікатіонний носій може бути присутнім в кількості від приблизно 5 до приблизно 500 мг на дозу (наприклад, 10-500 мг, або 10-300 мг, або 50-200 мг на дозу).

[00141] В деяких варіантах здійснення прийнятні для застосування у домашніх тварин та поросят, сапонін, наприклад, Quil A або його очищена фракція, є присутнім в кількостях від приблизно 10 до приблизно 100 мкг на дозу (наприклад, 10-50 мкг або 20-50 мкг на дозу), стерин є присутнім в кількостях від приблизно 5 до 100 мкг (наприклад, 10-80, або 20-50 мкг), четвертинний амін може бути присутнім в кількості від приблизно 5 до приблизно 500 мкг на дозу (наприклад, 10-100 мкг на дозу, або 20-50 мкг на дозу), та полікатіонний носій може бути присутнім в кількості 1-50 мг на дозу (наприклад, 1-25 мг на дозу, або 10-25 мг на дозу).

[00142] В деяких варіантах здійснення в прийнятних вакцинах для домашньої птиці, сапонін може бути присутнім в кількості від 0,1 до 5 мкг на 50 мкл вакцинної композиції (наприклад, 0,5 - 30 мкг на 50 мкл композиції, або більш переважно 1-10 мкг) на дозу, стерин може бути присутнім в кількостях від приблизно 0,5 до приблизно 50 мкг (наприклад, 1-20 мкг, або 1-10 мкг), четвертинний амін може бути присутнім в кількості від приблизно 5 до приблизно 500 мкг на дозу (наприклад, 10-100 мкг на дозу, або 20-50 мкг на дозу), та полікатіонний носій може бути присутнім в кількості від 0,5 до 25 мг на дозу (наприклад, 1-20 мг, або 1-10 мг або 5-10 мг).

[00143] В деяких варіантах здійснення, QCDXO ад'юванти отримують за наступним способом:

а) Сорбітану моноолеат розчиняють в олії. Отриманий в результаті розчин олії піддають стерильній фільтрації;

b) Поліоксіетилен (20) сорбітану моноолеат, четвертинний амін, наприклад, DDA, полікатионний носій, стерин та сапонін розчиняють у водній фазі, таким чином, утворюючи водний розчин; та

5 c) Водний розчин додають до розчину олії при безперервній гомогенізації, таким чином, утворюючи композицію ад'юванта QCDXO.

[00144] В деяких випадках, неможливим або недоцільним є концентрувати антиген, зокрема, в масштабах комерційних застосувань, та повинні використовуватись низькі концентрації антигенових розчинів. Таким чином, в деяких варіантах здійснення, вакцинні композиції за представленим винаходом містять композиції ад'ювантів, як описано вище, де розбавляють

10 вміст олійної фази в даних композиціях ад'ювантів, та де вакцинна композиція представляє собою емульсію вода-в-олії.

[00145] На практиці, можливим є створити емульсію вода-в-олії, в якій олійна фаза становить менше, ніж 50 % об./об.

[00146] Коротко кажучи, по-перше, композицію ад'юванта за представленим винаходом отримують, як описано вище. В зазначеному ад'ювантному препараті олійна фаза містить понад

15 50 % об./об. композиції ад'юванта. Кількості інгредієнтів інших, ніж олія та емульгатор(и), збільшують, відповідно, ґрунтуючись на кінцевій цільовій концентрації та необхідному розбавленні. Наприклад, якщо один націлюється на отриманні вакцинної композиції, де композиція ад'юванта містить 80 % об./об., кількості інгредієнтів інших, ніж олія збільшують за

20 показником 1,25 (1/0,8). Кількості емульгаторів, якщо будь-яка (наприклад, TWEEN®80 та/або SPAN®80) не обов'язково повинні бути збільшені, але переважно, об'ємне співвідношення між олією та емульгатором(ами) зберігається таким самим в композиції ад'юванта та в кінцевій вакцинній композиції.

[00147] Розчин антигена потім додають до композиції ад'юванта.

[00148] Цілісність емульсії вода-в-олії може бути збережена до тих пір, доки дисперговані сферичні краплі води не присутні в більш концентрованій формі, ніж максимальна фракція упаковки для випадкової упаковки монодисперсних крапель, тобто: 0,64. Дивись Tadros, Emulsion Formation, Stability and Rheology, 1st ed. 2013, Wiley-VCH GmbH & Co KGaA. До тих пір, доки загальний об'єм фракції, який займається водяними краплями не перевищує 0,64, тобто:

30 64 % об./об. З іншого боку це означає, що олійна фаза не повинна падати нижче 36 % об./об.

[00149] Відповідно, в різних варіантах здійснення даного аспекту винаходу передбаченими є вакцинні препарати, які містять антигенну сполуку, та розбавлену композицію ад'юванта відповідно до раніше описаних варіантів здійснення, де олійна фаза складає понад 36 % вакцинної композиції, об./об., та де вакцинна композиція представляє собою емульсію вода-в-олії. Без обмеження, композиції ад'ювантів, прийнятні для даного аспекту винаходу, включають

35 TCMO, TCMYO, QTCMO, QTCMYO, XOM, TXO, TXO-A, TAO, AXO, QCO, ODYRM, QCDXO. Об'єм олійної фази становить, в різних варіантах здійснення, 37 % об./об., 38 % об./об., 39 % об./об., 40 % об./об., 41 % об./об., 42 % об./об., 43 % об./об., 44 % об./об., 45 % об./об., 46 % об./об., 47 % об./об., 48 % об./об., 49 % об./об. або 50 % об./об. вакцинної композиції.

[00150] Концентрація олійної фази повинна бути досить високою, щоб створити ефект депо та захистити антиген та імуномодулятор(и) від швидкого розкладання імунною системою господаря, переважно 20 % або більше об./об. вакцинної композиції.

[00151] Відповідно, в іншому аспекті, в вакцинних композиціях за представленим винаходом, кількості олійної фази в композиціях ад'ювантів розбавляють таким чином, що вакцинний

45 препарат представляє собою емульсію олія-в-воді або емульсію вода-в-олії-в-воді, з олійною фазою, яка складає 20 % або більше об./об. вакцинної композиції. Кількості інгредієнтів інших, ніж олія та емульгатори, збільшуються, відповідно, ґрунтуючись на кінцевій цільовій концентрації та необхідному розбавленні. Наприклад, для отримання вакцинної композиції, де композиція ад'юванта складає 33,3 % об./об., кількості інгредієнтів інших, ніж олія та

50 емульгатор(и) збільшуються за показником 3 (1/0,333). Кількості емульгаторів, якщо такі є (наприклад, TWEEN®80 та/або SPAN®80), не повинні збільшуватися, але переважно, об'ємне співвідношення між олією та емульгатором(ами) зберігається таким самим в композиції ад'юванта та в кінцевій вакцинній композиції.

[00152] В різних варіантах здійснення, вакцинна композиція представляє собою емульсію олія-в-воді або емульсію вода-в-олії-в-воді, де олійна фаза становить 21 % об./об., 22 % об./об., 23 % об./об., 24 % об./об., 25 % об./об., 26 % об./об., 27 % об./об., 28 % об./об., 29 % об./об., 30 % об./об., 31 % об./об., 32 % об./об., 33 % об./об., 34 % об./об., 35 % об./об., 36 % об./об., 37 % об./об., 38 % об./об., 39 % об./об., 40 % об./об., 41 % об./об., 42 % об./об., 43 % об./об., 44 % об./об., 45 % об./об., 46 % об./об., 47 % об./об., 48 % об./об., 49 % об./об., або 50 % об./об. вакцинної композиції.

60

[00153] Композиції ад'ювантів, прийнятні для даного аспекту винаходу, включають ТСМО, ТСМґО, QТСМО, QТСМґО, ХОМ, ТХО, ТХО-А, ТАО, АХО, QCO, ODYRM, QCDXO, за умови, що олійна фаза в композиції ад'юванта може становити менше 50 % об./об., але більше 20 % об./об. від кінцевої вакцинної композиції.

5 Антигени та захворювання

[00154] Композиції можуть містити один або більше антигенів. Антиген може представляти собою будь-яку з широкого спектру речовин, здатних продукувати потрібну імунну відповідь у суб'єкті, включаючи, без обмеження, один або декілька з вірусів (інактивованих, ослаблених та модифікованих живих), бактерій, паразитів, нуклеотидів (включаючи, без обмеження, антигени на основі нуклеїнової кислоти, наприклад, ДНК вакцини), полінуклеотидів, пептидів, поліпептидів, рекомбінантних протеїнів, синтетичних пептидів, протеїнових екстрактів, клітин (включаючи клітини пухлини), тканин, полісахаридів, вуглеводів, жирних кислот, тейхоевої кислоти, пептидогліканів, ліпідів або гліколіпідів, індивідуально або в будь-яких їх комбінаціях.

[00155] Антигени, які використовуються з ад'ювантами за винаходом, також включають імуногенні фрагменти нуклеотидів, полінуклеотидів, пептидів, поліпептидів, які можуть бути виділені з організмів, які зазначені в даному документі.

[00156] Живі, модифіковані живі, та ослаблені вірусні штами, які не викликають захворювання у суб'єкта, виділяти в невірулентній формі або ослаблювали, застосовуючи способи, добре відомі в даній галузі з рівня техніки, включаючи серійний пасаж в прийнятній клітинній лінії або піддавання дії ультрафіолетового світла або хімічного мутагену. Інактивовані або вбиті вірусні штами є такими, які були інактивовані за способами, відомими кваліфікованому фахівцю в даній галузі, включаючи обробку формаліном, бетапропіолактоном (BPL), бінарним етиленіміном (BEI), стерилізуючим опроміненням, нагріванням, або іншими такими способами.

[00157] Два або більше антигенів можуть бути об'єднані для отримання полівалентної композиції, яка може захистити суб'єкта проти широкого спектру захворювань, викликаних патогенними мікроорганізмами. В даний час, комерційні виробники вакцин, а також кінцеві користувачі, надають перевагу полівалентним вакцинним продуктам. Тоді як традиційні ад'юванти часто є обмеженими в різноманітних антигенах, з якими вони можуть бути ефективно використані (або моновалентно, або полівалентно), ад'юванти, описані в даному документі, можуть бути ефективно використані з широким спектром антигенів, як моновалентно, так і полівалентно. Таким чином, антигени, описані в даному документі, можуть бути поєднані в одній композиції, яка містить ад'юванти, описані в даному документі.

[00158] Деякі приклади бактерій, які можуть використовувати як антигени з ад'ювантними композиціями включають, але не обмежуються цим, *Aceinetobacter calcoaceticus*, *Acetobacter paseruianus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Arhaeglobus fulgidus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomydia spp.*, *Chromobacterium viscosum*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Ehrlichia canis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, *Helicobacter suis*, *Lawsonia intrakлітиннийis*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella sp.*, *Mycobacterium bovis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides LC*, *Clostridium perfringens*, *Odoribacter denticanis*, *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Photobacterium luminescens*, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas salivosa*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas wisconsinensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens C9*, *Pseudomonas fluorescens SIKW1*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas sp B11-1*, *Alcaligenes eutrophus*, *Psychrobacter immobilis*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsia*, *Salmonella enterica* всі серовари, включаючи наприклад: *Salmonella enterica Typhimurium*, *Salmonella enterica Bongori*, *Salmonella enterica Dublin*, *Salmonella enterica Choleraesuis*, та *Salmonella enterica Newport*, *Serratia marcescens*, *Spirillum platensis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces cinnamomeus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus suis*, *Streptomyces exfoliates*, *Streptomyces scabies*, *Sulfolobus кислотаocaldarius*, *Syechocystis sp.*, *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema denticola*, *Treponema minutum*, *Treponema phagedenis*, *Treponema refringens*, *Treponema vincentii*, *Treponema palladium*, *Trueperella pyogenes* та *Leptospira species*, такі як відомі збудники *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-bovis*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-prajitno*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona* та *Leptospira bratislava*, та їх комбінації.

[00159] Як інактивовані віруси, так і ослаблені живі віруси можуть використовуватись в ад'ювантних композиціях. Деякі приклади вірусів, які можуть бути використані як антигени включають, але не обмежуються цим, пташині герпесвіруси, бичачі герпесвіруси, собачі герпесвіруси, кінські герпесвіруси, вірус котячого вірусного ринотрахеїту, вірус хвороби Марека, овечі герпесвіруси, свинячі герпесвіруси, свинячий вірус епідемічної діареї (PEDv), вірус псевдоскажу, пташині параміксовіруси, бичачий респіраторно-синцитіальний вірус, собачий вірус чумки, собачий парагриповірус, собачий аденовірус, собачий парвовірус, бичачий парагриповірус 3, овечий парагриповірус 3, вірус чуми великої рогатої худоби, вірус пограничного захворювання овець, вірус бичачої вірусної діареї (BVDV), BVDV типу I, BVDV типу II, вірус класичної чуми свиней, пташиний лейкозний вірус, вірус імунodefіциту великої рогатої, вірус лейкемії великої рогатої, туберкульоз великої рогатої худоби, вірус інфекційної анемії коней, вірус імунodefіциту котят, котячий вірус лейкемії (FeLV), вірус хвороби Ньюкасла, овечий вірус прогресивної пневмонії, овечий вірус легеневої аденокарциноми, собачий коронавірус (CCV), пантропний CCV, собачий респіраторний коронавірус, бичачий коронавірус, котячий каліцивірус, котячий кишковий коронавірус, котячий вірус інфекційного перитоніту, свинячий вірус епідемічної діареї, свинячий гемаглютинуючий енцефаломієліто-вірус, свинячий парвовірус, свинячий цирковірус (PCV) типу I, PCV типу II, свинячий вірус репродуктивного та респіраторного синдрому (PRRS), Вірус трансмісивного гастроентериту, індюшачий коронавірус, бичачий вірус ефемерної лихоманки, сказ, ротавірус, вірус везикулярного стоматиту, лентивірус, пташиний грип, риновіруси, вірус грипу коней, вірус грипу свиней, собачий вірус грипу, котячий вірус грипу, вірус грипу людини, вірус східного кінського енцефаліту (EEE), вірус венесуельського кінського енцефаліту, вірус Західного Нілу, Західний вірус кінського енцефаліту, вірус імунodefіциту людини, вірус папіломи людини, вірус вітряної віспи, вірус гепатиту B, риновірус та вірус кору, а також їх комбінації.

[00160] Приклади пептидних антигенів включають *Bordetella bronchiseptica* p68, GnRH, IgE пептиди, Fe1 d1, та антигени раку, та їх комбінації. Приклади інших антигенів включають нуклеотиди, вуглеводи, ліпіди, гліколіпіди, пептиди, жирні кислоти, ліпотейхоєву та тейхоєву кислоту, та пептидоглікани, та їх комбінації.

[00161] Деякі приклади паразитів, які можуть бути використані як антигени з ад'ювантними композиціями включають, але не обмежуються цим, *Anaplasma*, *Fasciola hepatica* (печінкова двоустка), *Coccidia*, *Eimeria* spp., *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia*, *Dirofilaria* (серцевий гельмінт), *Ancylostoma* (анкилостоматида), *Cooperia*, *Haemonchus contortus* (Barber pole гельмінт) *Ostertagia ostertagi* (шлунковий гельмінт), *Dictyocaulus viviparus* (легеневі гельмінти), *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Trichomonas* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Babesia*, *Schistosoma*, *Taenia*, *Strongyloides*, *Ascaris*, *Trichinella*, *Sarcocystis*, *Hammondia*, та *Isospora*, та їх комбінації. Крім того, розглядаються зовнішні паразити включаючи, але не обмежуючись цим, кліщі, включаючи *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Boophilus*, *Hyalomma*, та *Haemaphysalis species*, та їх комбінації.

[00162] Кількість антигену, який використовують для індукції імунної відповіді, буде варіювати в значній мірі в залежності від антигену, який використовують, суб'єкта, та рівня бажаної відповіді, та може бути визначена кваліфікованим фахівцем в даній галузі. Для вакцин, які містять модифіковані живі віруси або ослаблені віруси, терапевтично ефективна кількість антигену, в цілому, знаходиться в діапазоні від приблизно 10^2 інфекційної дози для тканинної культури (TCID₅₀) до приблизно 10^{10} TCID₅₀, включно. Для багатьох таких вірусів, терапевтично ефективна доза, в цілому, знаходиться в діапазоні від приблизно 10^2 TCID₅₀ до приблизно 10^8 TCID₅₀, включно. В деяких варіантах здійснення, діапазони терапевтично ефективних доз становлять від приблизно 10^3 TCID₅₀ до приблизно 10^6 TCID₅₀, включно. В деяких інших варіантах здійснення, діапазони терапевтично ефективних доз становлять від приблизно 10^4 TCID₅₀ до приблизно 10^5 TCID₅₀, включно.

[00163] Для вакцин, які містять інактивовані віруси, терапевтично ефективна кількість антигену, в цілому, становить, щонайменше, приблизно 100 відносних одиниць на дозу, та часто знаходиться в діапазоні від приблизно 1,000 до приблизно 4,500 відносних одиниць на дозу, включно. В інших варіантах здійснення, терапевтично ефективна кількість антигену знаходиться в діапазоні від приблизно 250 до приблизно 4 000 відносних одиниць на дозу, включно, від приблизно 500 до приблизно 3 000 відносних одиниць на дозу, включно, від приблизно 750 до приблизно 2 000 відносних одиниць на дозу, включно, або від приблизно 1 000 до приблизно 1 500 відносних одиниць на дозу, включно.

[00164] Терапевтично ефективна кількість антигену в вакцинах, які містять інактивовані віруси, також можуть вимірювати з точки зору відносної активності (RP) на мл. Терапевтично ефективна кількість часто знаходиться в діапазоні від приблизно 0,1 до приблизно 50 RP на мл,

включно. В інших варіантах здійснення, терапевтично ефективна кількість антигену знаходиться в діапазоні від приблизно 0,5 до приблизно 30 RP на мл, включно, від приблизно 1 до приблизно 25 RP на мл, включно, від приблизно 2 до приблизно 20 RP на мл, включно, від приблизно 3 до приблизно 15 RP на мл, включно, або від приблизно 5 до приблизно 10 RP на мл, включно.

[00165] Кількість клітин для бактеріального антигену, яку вводять в вакцину, знаходиться в діапазоні від приблизно 1×10^6 до приблизно 5×10^{10} колонієутворюючих одиниць (КУО) на дозу, включно. В інших варіантах здійснення, кількість клітини знаходиться в діапазоні від приблизно 1×10^7 до 5×10^{10} КУО/доза, включно, або від приблизно 1×10^8 до 5×10^{10} КУО/доза, включно. В ще інших варіантах здійснення, кількість клітини знаходиться в діапазоні від приблизно 1×10^2 до 5×10^{10} КУО/доза, включно, або від приблизно 1×10^4 до 5×10^9 КУО/доза, включно, або від приблизно 1×10^5 до 5×10^9 КУО/доза, включно, або від приблизно 1×10^6 до 5×10^9 КУО/доза, включно, або від приблизно 1×10^7 до 5×10^9 КУО/доза, включно, або від приблизно 1×10^6 до 5×10^8 КУО/доза, включно.

[00166] Кількість клітини для паразитарного антигена, яку вводять в вакцину, знаходиться в діапазоні від приблизно 1×10^2 до приблизно 1×10^{10} на дозу, включно. В інших варіантах здійснення, кількість клітини знаходиться в діапазоні від приблизно 1×10^3 до приблизно 1×10^9 на дозу, включно, або від приблизно 1×10^4 до приблизно 1×10^8 на дозу, включно, або від приблизно 1×10^5 до приблизно 1×10^7 на дозу, включно, або від приблизно 1×10^6 до приблизно 1×10^8 на дозу, включно.

[00167] Добре відомим в даній галузі з рівня техніки є те, що з загальноприйнятими ад'ювантами, фактично більша кількість інактивованих вірусів, ніж модифікованих живих або ослаблених вірусів є потрібною для стимулювання співставимого рівня серологічної відповіді. Однак, несподівано виявлено, що з ад'ювантними композиціями, описаними в даному документі, приблизно однакові кількості інактивованого вірусу та модифікованого живого вірусу стимулюють аналогічні рівні серологічної відповіді. Крім того, менші кількості модифікованого живого, ослабленого та інактивованого вірусу є потрібними з ад'ювантами, описаними в даному документі, в порівнянні з загальноприйнятими ад'ювантами, щоб досягти однакового рівня серологічної відповіді. Дані несподівані результати демонструють збереження ресурсів та зниження витрат під час приготування імуногенних та вакцинних композицій. Для вакцин з широким застосуванням, необхідним є виробництво мільйонів доз на рік, тому дана економія може бути суттєвою.

Введення композицій

[00168] Розміри дози композицій, як правило, знаходяться в діапазоні від приблизно 1 мл до приблизно 5 мл, включно, в залежності від суб'єкта та антигену. Наприклад, для собак або котят, як правило, використовують дозу приблизно 1 мл, тоді як для великої рогатої худоби, як правило, використовують дозу приблизно 2-5 мл. Однак, дані ад'юванти також можуть бути сформульовані як мікродози, де можуть використовувати дози приблизно 100 мкл.

[00169] Шляхи введення для ад'ювантних композицій включають парентеральне, пероральне, ороназальне, інтраназальне, інтратрахеальне, місцеве, підшкірне, внутрішньом'язове, транскутанне, інтрадермальне, внутрішньочеревне, внутрішнє, внутрішньовенне введення та в яйця. Будь-який прийнятний пристрій можуть використовувати для введення композиції, включаючи шприци, крапельниці, безголкові ін'єкційні пристрої, пластирі, тощо. Шлях та пристрій, використаний для застосування, буде залежати від складу ад'юванта, антигену та суб'єкта, та вони є добре відомими кваліфікованому фахівцю в даній галузі.

Застосування композицій

[00170] Однією з вимог для будь-якого препарату вакцинного ад'юванта для комерційного застосування є встановлення стабільності розчину ад'юванта протягом тривалого періоду зберігання. Передбаченими в даному документі є композиції ад'ювантів, які є простими у виробництві та стабільні протягом, щонайменше, 18 місяців. В одному варіанті здійснення, препарати є стабільними протягом приблизно 18 місяців. В іншому варіанті здійснення, препарати є стабільними протягом від приблизно 18 до приблизно 24 місяців. В іншому варіанті здійснення, препарати є стабільними протягом приблизно 24 місяців. Прискорені процедури тестування також показують, що препарати, описані в даному документі, є стабільними.

[00171] Переважною відмінною ознакою представлених ад'ювантних композицій є те, що вони можуть бути безпечно та ефективно введені в широкому діапазоні суб'єктів. З рівня техніки, слід очікувати, що комбінації ад'ювантів будуть демонструвати більшу реактогенність, ніж окремі компоненти. Однак, композиції, описані в даному документі, показують знижену реактогенність в порівнянні з композиціями, в яких використовують будь-який один або два з

компонентів, тоді як ефект ад'юванта зберігається. Крім того, було несподівано виявлено, що ад'ювантні композиції, описані в даному документі, демонструють підвищення безпеки в порівнянні з іншими ад'ювантними композиціями.

5 [00172] Ад'ювантні композиції, описані в даному документі, є корисними для індукування
 10 потрібної імунної відповіді у суб'єкта. Вони є ефективними для декількох видів. Прийнятним суб'єктом є будь-яка тварина, для якої є необхідним введення ад'ювантної композиції. Це включає ссавців та нессавців, включаючи приматів, свійську худобу, домашніх тварин, лабораторних піддослідних тварин, диких тварин, які утримуються в неволі, пернатих (включаючи в яйцях), рептилій та риб. Таким чином, даний термін включає, але не обмежується

15 цим мавп, людей, свиней; велику рогату худобу, овець, кіз, коней, мишей, щурів, морських свинок, хом'яків, кроликів, кішок, собак, курей, індичок, качок, інші птахів, жаб та ящірок.
 [00173] Ад'юванти, описані в даному документі, можуть використовувати, щоб показати серологічну диференціацію між інфікованими та вакцинованими тваринами. Таким чином, вони можуть бути використані в маркерній вакцині, в якій антиген в вакцині викликає у вакцинованих тварин різні конфігурації антитіла від вірусу немутантного типу. Маркерні вакцини, в цілому, використовують в поєднанні з додатковим діагностичним тестом, який вимірює різницю в конфігураціях антитіл та демонструє, які тварини були вакцинованими, та які тварини є інфікованими вірусом немутантного типу. Така технологія є корисною в контролі та ліквідації вірусів в популяції суб'єктів.

20 [00174] Представлений винаходом також передбачає нові вакцинні композиції корисні для захисту проти інфекції та захворювання, викликаного вірусом Ніпах та/або вірусом Хендра, застосовуючи антиген, який забезпечується протеїном G вірусу Хендра (та фрагментами, димерами, мультимерами та їх модифікованими формами), всі з яких є добавленими як ад'ювантами, як описано в даному документі. В деяких варіантах здійснення, ад'ювант вибирають з групи, що складається з ТХО, ТАО та ТХО-А. Такі вакцини можуть використовуватись в попередженні інфекції та захворювання у, наприклад, коней, собак, свиней та людей. В найбільш переважному варіанті здійснення, як свиней, так і собак захищають від вірусу Хендра та Ніпах.

30 [00175] Періодичні спалахи NiV, які в результаті призводять до значного числа смертельних випадків людей, останнім часом були проблематичними, дивись, наприклад, Butler, Nature, vol. 429, at page 7 (2000); та Gurley et al., Emerging Infectious Diseases, vol. 13(7), pp. 1031-1037 (2007). Тематичні дослідження пов'язують захворювання у людей до зоонотичної передачі від свиней, дивись Parashar et al., J. Infect. Dis. vol 181, pp. 1755-1759 (2000). Вірус Хендра, крім того, явно був пов'язаний з смертями у людей, через передачу від коней. На даний момент існує одна ліцензована вакцина для профілактики інфекції або захворювання, викликаного вірусом Хендра (Equivac® HeV; Zoetis) затверджена для використання у коней, хоча ліцензованої вакцини вакцини для профілактики вірусної інфекції Ніпах не існує. Тому, залишається потреба у вакцинах вірусу Ніпах або вірусу Хендра, які можуть бути клінічно ефективними.

40 [00176] Параміксовіруси, такі як вірус Хендра та вірус Ніпах мають два основних зафіксованих на мембрані глікопротеїни в оболонці вірусної частинки. Один глікопротеїн є необхідним для приєднання віріона до рецепторів на клітинах-господарях та позначається як або гемагглютинін-нейрамінідазний протеїн (HN) або гемагглютиніновий протеїн (H), та інший є глікопротеїном (G), який не має ні гемагглютинаційної, ні нейрамінідазної активностей. Глікопротеїни приєднання представляють собою мембранні протеїни типу II, де аміно (N) кінець молекули є орієнтованим в напрямку цитоплазми, та карбокси (C) кінець протеїну є позаклітинним. Інший основний глікопротеїн є злитим (F) глікопротеїном, який представляє собою тримерний клас I фузогенний оболонковий глікопротеїн, який містить дві гептадних повторюваних (HR) ділянки та гідрофобний злитий пептид. Вірус Хендра та вірус Ніпах інфікує клітини через рН-незалежний процес мембранного злиття в сприйнятливих клітинах-господарях, за рахунок узгоджених дій їх приєднання G глікопротеїну та F глікопротеїну після зв'язування з рецептором.

50 [00177] Такий G глікопротеїн вірусу Хендра може потенційно проходити через захист проти інфекції та захворювання, викликаного вірусом Ніпах припускається K. Bossart et al., Journal of Virology, vol. 79, pp. 6690-6702 (2005), та B. Mungall et al., Journal of Virology, vol. 80, pp. 12293-12302 (2006). Однак, попередня робота не забезпечує вакцинні композиції, які є насправді клінічно ефективними в цьому відношенні, для будь-яких видів ссавців. Відповідно, представлений винахід охоплює імуногенну композицію, яка містить G протеїн вірусу Хендра, ад'ювант, як описано відповідно до практики за представленим винаходом, та один або більше ексципієнтів, в кількостях ефективних, щоб викликати клінічно ефективний захист проти вірусу Хендра та/або Ніпах.

[00178] Стосовно G глікопротеїнових поліпептидів вірусу Хендра, які використовуються на практиці за представленим винаходом, та їх рекомбінантна експресія, робиться посилання на повне розкриття опублікованих міжнародних заявок на патент WO 2012/158643 та WO 2006/085979, де така інформація є чітко представленою. Переважні приклади конкретних G протеїнових поліпептидів вірусу Хендра, які використовуються в даному документі, є розкритими в WO 2012/158643, та включають, наприклад: повнодовжинний G протеїн (його SEQ ID NO:2); його розчинний фрагмент (який кодує амінокислоти 73-604 з SEQ ID NO:2 WO 2012/158643); та додатковий фрагмент, розкритий в даному документі, який має Ig(капа) лідерну послідовність (SEQ ID NO 16 з WO 2012/158643). В цілому, розчинні форми G глікопротеїну вірусу Хендра містять всі або частину ектодомена, та виробляються шляхом видалення всього або частини трансмембранного домену глікопротеїну G, та всього або частини цитоплазматичного хвоста. Переважно, послідовність, яка кодує ген, представляє собою кодон, оптимізований для експресії.

[00179] В деяких варіантах здійснення, G глікопротеїн Хендра може бути в димерній та/або тетрамерній формі. Такі димери залежать від утворення дисульфідних зв'язків, які утворюються між залишками цистеїну в G глікопротеїну. Такі дисульфідні зв'язки можуть відповідати тим, які утворюються в нативному G глікопротеїні, або дисульфідні зв'язки можуть утворюватися в результаті отримуючи різні димерні та/або тетрамерні форми G глікопротеїну, які підвищують антигенність. Крім того, недимеризовані та тетрамеризовані форми також можуть бути використані відповідно до практики за представленим винаходом, знову беручи до уваги те, що G глікопротеїн забезпечує численні конформаційно залежні епітопи (тобто, які виникають з третинної тривимірної структури), та що збереження численних таких природних епітопів є відповідно дуже переважним для того, щоб надати нейтралізуючи антитільну відповідь.

[00180] Взагалі кажучи, конструювання векторів експресії для G протеїнів Хендра може бути таким, як описано в прикладі 1 з WO 2012/158643, з отриманою в результаті експресією протеїну з CHO клітин, які є такими, як описано в їх прикладі 2, або альтернативно, застосовуючи вакцинну систему (дивись їх приклад 3) або 293 клітини (дивись їх приклад 4). В конкретному переважному прикладі, передбаченим є розчинний G протеїн, як амінокислоти 73-604 нативного G глікопротеїну вірусу Хендра (дивись SEQ ID NO: 2 в WO 2012/158643). Їх димеризація відбувається спонтанно, одночасно з експресією з CHO клітин, та отриманий в результаті G протеїн містить приблизно 50 % димеру та 50 % тетрамер, з невеликою кількістю мономера, що залишається. Експресія в 293F клітинах призводить до приблизно 70 % димеру. Отримані в результаті протеїнові фракції змішують з ад'ювантами, як описано в представленому описі. Як описано в WO 2012/158643, переважні дози антигену для великих тварин знаходяться в діапазоні 50-200 мікроорганізмів на дозу, з 100 мікрограмами, яка є найбільш переважною дозою. Для невеликих тварин, таких як собаки, менші кількості є необхідними, такі як 25-50 мікрограмм, як буде зрозуміло кваліфікованим фахівцем в даній галузі.

[00181] Крім того, ад'юванти відповідно до будь-якого з варіантів здійснення, описаних вище можуть бути використані для створення діагностичних або терапевтичних антитіл. В даному аспекті винаходу, тваринне джерело імунізують препаратом, який містить ад'ювантні композиції за представленим винаходом та антиген. Вибір антигену визначається особою, яка потребує отримання зазначеного терапевтичного або діагностичного антитіл та включає, без обмеження, віруси, бактерії, вірусні частинки, екстракти, рекомбінантні антигени, структури клітинних стінок, тощо. Антигени можуть також включати отрути для приготування лікарських засобів проти зміїних укусів.

[00182] Антигени, прийнятні для даного аспекту винаходу, можуть бути котячого, собачого, кінського, свинячого, бичачого, овечого або пташиного походження. В деяких варіантах здійснення, антиген може бути вибраним з FeLVgp70, бичачого парагриповірусу-3 BPI-3 (HN протеїну), Histophilus somni p31, Bordetella FHA, Parapox, BVDV1 gp53, BVDV2 gp53, токсинів клостридії, собачого цирковірусу, Brachyspira hyodysenteriae (види свиней) антигенів; інактивованих цільних клітин та інактивованого пепсинового гідролізату.

[00183] Деякий час після імунізації, джерело антитіл екстрагують з тварини-джерела (наприклад, мишей, щурів, хом'яків, свиней, морських свинок, кроликів, кіз, овець, домашньої птиці, великої рогатої худоби, коней). В деяких інших варіантах здійснення, тварина-джерело є котом або собакою. Джерело антитіл в кінцевому рахунку залежить від того, чи є потрібними моноклональні, або поліклональні антитіла. Для поліклональних антитіл, антитіло може розглядатися з використанням сироватки або молока. Для моноклональних антитіл, клітини селезінки є прийнятним джерелом. Такі антитіла можуть використовувати для діагностики, наукових досліджень або терапевтичних цілей, включаючи, без обмеження, протиотрути,

лікарські засоби від відторгнення трансплантата, аналізи сироваткової нейтралізації, ІФА, ELISPOT, Вестерн-блот, аналізи на основі клітин, аналізи ефективності, та імуногістохімію. Винахід передбачає моноклональні та поліклональні антитіла, екстраговані з тварини-джерела для використання в діагностичних та терапевтичних застосуваннях, включаючи без обмеження, протиотрути, лікарські засоби від відторгнення трансплантата, аналізи сироваткової нейтралізації, ІФА, ELISPOT, Вестерн-блот, аналізи на основі клітин, аналізи ефективності, та імуногістохімію.

[00184] В деяких варіантах здійснення, імунізації композиціями за представленим винаходом будуть викликати досить високі серологічні титри бажаного антигену (більше 1000, або більш переважно, більше 5000, або більш переважно, більше 10000, або більш переважно, більше 50000, або більш переважно, більше 100000, або більш переважно, більше 250000, або більш переважно, більше 500000, або більш переважно, більше 1000000) у, щонайменше, однієї тварини (переважно, щонайменше, 2 тварин, або, щонайменше, у трьох тварин, або у 50 % оброблених тварин, або у, щонайменше, 75 % оброблених тварин, або, найбільш переважно, у кожної обробленої тварини), таким чином, отримуючи в результаті достатню кількість антитіла для діагностичних або дослідницьких застосувань.

[00185] Як правило, антитіла ізотипу імуноглобуліну G (IgG) використовують в даних застосуваннях, хоча антитіла інших ізотипів, наприклад, імуноглобулін M (IgM), також використовують. Джерело антитіл, в кінцевому рахунку, залежить від того, чи є бажаним поліклональне, або моноклональне антитіло. Для поліклональні антитіла, як джерело антитіл можуть використовувати сироватку або молоко. Для моноклональних антитіл, селезінкові макрофаги є властивим джерелом антитіла. Додаткова очистка антитіл, якщо необхідно, або отримання моноклональних антитіл є широко описаними в літературі, та кваліфікований фахівець в даній галузі не буде мати ніяких надмірних труднощів в здійсненні даних процедур. Крім того, антитіла можуть бути адаптовані до цільових видів, якщо необхідно (наприклад, канонізованими або фелінізованими). Більш того, способи для такої практики є добре відомими в даній галузі з рівня техніки та не існує необхідності їх описувати в даній заявці.

Застосування антитіл

[00186] Антитіла були б прийнятними як реагенти для аналізів сироваткової нейтралізації, ІФА, ELISPOT, Вестерн-блот, аналізів на основі клітин, аналізів ефективності, та імуногістохімії. Дані методи є добре відомими в галузі.

[00187] Антитіла за представленим винаходом також можуть бути використані як терапевтичні агенти, наприклад, у відторгненні трансплантата, наприклад, для генерації антитимоцитарних глобулінових (ATG) агентів. На даний час, два таких агенти присутні на ринку: Atgam® та Thymoglobulin®. Способи отримання антитимоцитарних глобулінів в цілому були описані в US20040023340.

[00188] Крім того, їх можуть використовувати для отримання протиотрутих лікарських засобів. В даних варіантах здійснення, компоненти отрути змії будуть використовуватися як антигени. Отрути та їх компоненти також є добре відомими в даній галузі з рівня техніки.

[00189] Тварини багатьох видів можуть бути використані як тваринні джерела, включаючи, без обмеження, види птиці, мишей, щурів, хом'яків, морських свинок, кроликів, собак, кішок, овець, кіз, свиней, велику рогату худобу та коней. Вибір тваринного джерела залежить від поставленого завдання та судження особи, з кваліфікованих фахівців в даній галузі.

[00190] Конкретні необмежуючі варіанти здійснення є наступними:

[00191] В першому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта, яка містить олійну фазу та водну фазу, де олійна фаза складає, щонайменше, 50 % препарату об./об., де зазначений препарат містить, щонайменше, один монофосфорильний ліпід A (MPL-A) або його аналог та імуностимулюючий олігонуклеотид, за умови, що:

а) якщо зазначений імуностимулюючий олігонуклеотид відсутній, то препарат містить:

i. полі І:С, гліколіпід, та, необов'язково, четвертинний амін; або

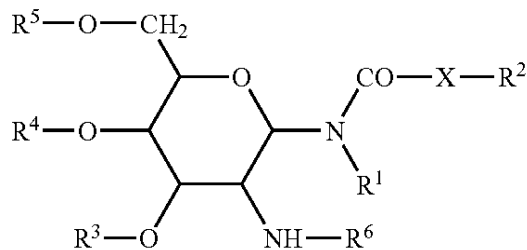
ii. полікатіонний носій;

б) якщо зазначений монофосфорильний ліпід A (MPL-A) або його аналог відсутній, то препарат містить джерело алюмінію.

[00192] В другому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за першим варіантом здійснення, де імуностимулюючий олігонуклеотид, якщо присутній, представляє собою CpG або олігорибонуклеотид; полікатіонний носій, якщо присутній, вибирають з групи, що складається з декстрану, декстрану DEAE (та їх похідних), ПЕГ, гуарових смол, хітозанових похідних, поліцелюлозних похідних, таких як гідроксіетилцелюлоза (HEC), поліетиленімін, поліаміни; та четвертинний амін, якщо присутній, вибирають з групи, що складається з DDA та авридину.

[00193] В третьому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта відповідно до першого або другого варіанта здійснення, де імуностимулюючий олігонуклеотид, якщо присутній, представляє собою CpG, полікатіонний носій, якщо присутній, представляє собою декстран DEAE, та четвертинний амін, якщо присутній, представляє собою DDA.

- 5 [00194] В четвертому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта відповідно до будь-якого одного з першого по третій варіанти здійснення, де гліколіпід, якщо присутній, містить сполуку формули I



Формула I

- 10 де, R^1 та R^2 незалежно є воднем, або насиченим алкільним радикалом, який має аж до 20 атомів вуглецю; X є $-CH_2-$, $-O-$ або $-NH-$; R^2 є воднем, або насиченим або ненасиченим алкільним радикалом, який має аж до 20 атомів вуглецю; R^3 , R^4 та R^5 незалежно є воднем, $-SO_4^{2-}$, $-PO_4^{2-}$, $-COC_{1-10}$ алкілом; R^6 є L-аланіном, L-альфа-амінобутилом, L-аргініном, L-аспаргініном, L-аспартилом, L-цистеїніном, L-глутаміном, L-гліцином, L-гістидіном, L-гідроксипропілом, L-ізолейцином, L-лейцином, L-лізином, L-метіоніном, L-орнітином, L-фенілаланіном, L-проліном, L-серилом, L-треоніном, L-тирозином, L-триптофаніном, та L-валіном або їх D-ізомерами.

- 15 [00195] В п'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за четвертим варіантом здійснення, в якій гліколіпід представляє собою N-(2-дезоксиглюкопіранозил)-N-октадецилдодеканоїламід або його сіль.

- 20 [00196] В шостому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за п'ятим варіантом здійснення, де сіль є ацетатом.

- 25 [00197] В сьомому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з першого по четвертий варіанти здійснення, яка містить як зазначений монофосфорильний ліпід A (MPL-A) або його аналог, так і додатковий, який містить, щонайменше, один з стерину та полі I:C.

- [00198] В восьмому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта відповідно до сьомого варіанта здійснення, яка містить стерин, та яка додатково містить сапонін.

- 30 [00199] В дев'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з сьомого та восьмого варіантів здійснення, в якій сапонін, якщо присутній, представляє собою тритерпеноїдний сапонін, та стерин, якщо присутній, вибирають з групи, що складається з ергостерину, ланостерину та холестерину.

- 35 [00200] В десятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта відповідно до дев'ятого варіанта здійснення, в якій сапонін, якщо присутній, представляє собою Quil A, та стерин, якщо присутній, представляє собою холестерин.

- [00201] В одинадцятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта відповідно до сьомого варіанта здійснення, яка містить полі I:C, та додатково яка містить, щонайменше, один з четвертинного аміну та гліколіпиду.

- 40 [00202] В дванадцятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з першого-одинадцятого варіантів здійснення, яка містить MPL-A або його аналог в кількості 0,5 - 100 мкг на дозу.

- [00203] В тринадцятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта відповідно до дванадцятого варіанта здійснення, в якій MPL-A або його аналог є присутнім в

- 45 кількості 5-50 мкг на дозу, або 5-20 мкг на дозу, або 1-5 мкг на дозу.
- [00204] В чотирнадцятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з першого-тринадцятого варіантів здійснення, яка містить імуностимулюючий олігонуклеотид в кількості від 0,5 до 400 мкг на дозу.

- 50 [00205] В п'ятнадцятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за чотирнадцятим варіантом здійснення, в якій імуностимулюючий олігонуклеотид є присутнім в кількості від приблизно 100 до приблизно 250 мкг на дозу або від приблизно 20 до приблизно 50 мкг на дозу, або приблизно 1 мкг на дозу.

[00206] В шістнадцятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з першого по п'ятнадцятий варіанти здійснення, яка містить полікатіонний носій в кількості від приблизно 0,5 до приблизно 400 мг на дозу.

5 [00207] В сімнадцятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за шістнадцятим варіантом здійснення, в якій зазначений полікатіонний носій є присутнім в кількості 50-300 мг на дозу або 1-25 мг на дозу, або 1-10 мг на дозу.

[00208] У вісімнадцятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з першого-сімнадцятого варіанта здійснення, яка містить гліколіпід в кількості від приблизно 0,5 до приблизно 2000 мкг на дозу.

10 [00209] В дев'ятнадцятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за вісімнадцятим варіантом здійснення, в якій гліколіпід є присутнім в кількості приблизно 1000 мкг на дозу, або 25-50 мкг на дозу, або 1-10 мкг на дозу.

[00210] В двадцятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з першого-дев'ятнадцятого варіантів здійснення, яка містить стерин в кількості 15 від приблизно 0,1 до приблизно 1000 мкг на дозу.

[00211] В двадцять першому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта відповідно до двадцятого варіанта здійснення, в якій стерин є присутнім в кількості 250-500 мкг на дозу, або 20-50 мкг на дозу, або 1-10 мкг на дозу.

20 [00212] В двадцять другому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з першого по двадцять перший варіант здійснення, яка містить сапонін в кількості від 0,1 до 1000 мкг на дозу.

[00213] В двадцять третьому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за двадцять другим варіантом здійснення, в якій сапонін є присутнім в кількості 250-500 мкг на дозу, або 20-50 мкг на дозу, або 1-10 мкг на дозу.

25 [00214] В двадцять четвертому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з першого по двадцять третій варіант здійснення, яка містить полі І:С в кількості від приблизно 0,5 до приблизно 100 мкг на дозу.

[00215] В двадцять п'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за двадцять четвертим варіантом здійснення, в якій полі І:С є присутнім в кількості 5-50 мкг на дозу, або 5-20 мкг на дозу, або 1-5 мкг на дозу.

[00216] В двадцять шостому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з першого по двадцять п'ятий варіант здійснення, яка містить джерело алюмінію, яке представляє собою гель гідроксиду алюмінію.

35 [00217] В двадцять сьомому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за двадцять шостим варіантом здійснення, в якій зазначене джерело алюмінію є присутнім в кількості 5 %-20 % об./об. препарата.

[00218] В двадцять восьмому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за двадцять сьомим варіантом здійснення, в якій зазначене джерело алюмінію є присутнім в 40 кількості 10 % об./об. препарата.

[00219] В двадцять дев'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з першого по двадцять-восьмий варіант здійснення, в якій олійна фаза містить олію та розчинний в олії емульгатор.

45 [00220] В тридцятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з першого по двадцять дев'ятий варіант здійснення, в якій зазначена олійна фаза є присутньою в кількості аж до 85 % об./об.

[00221] В тридцять першому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта відповідно до тридцятого варіанта здійснення, в якій зазначена олійна фаза є присутньою в кількості 51 %.

50 [00222] В тридцять другому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за будь-яким одним з двадцять дев'ятого по тридцять перший варіанти здійснення, в якій олія складає 40-84 % об./об. препарата, та розчинний в олії емульгатор складає 1-11 % об./об. препарата.

[00223] В тридцять третьому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта за тридцять-другим варіантом здійснення, в якій олія складає 45 % об./об. препарата, та розчинний в олії емульгатор складає 6 % об./об. препарата.

55 [00224] В тридцять четвертому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта відповідно до будь-якого одного з першого по тридцять-третій варіант здійснення, в якій зазначену олію вибирають з групи, що складається з сквалану, рослинних олій, тригліцеридів, неметаболізуючих олій з алканом з лінійним ланцюгом, та будь-якої їх комбінації.

[00225] В тридцять п'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає композицію ад'юванта відповідно до тридцять четвертого варіанта здійснення, в якій зазначена олія є легкою мінеральною олією.

5 [00226] В тридцять шостому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить ефективну кількість антигену та композицію ад'юванта відповідно до будь-якого одного з першого по тридцять п'ятий варіант здійснення, в якій олійна фаза композиції становить, щонайменше, 50 % об./об.

10 [00227] В тридцять сьомому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить ефективну кількість антигену та композицію ад'юванта, яка містить олійну фазу та водну фазу, в якій олійна фаза складає, щонайменше, 50 % препарата об./об., полікатіонний носій, та

а. комбінацію сапоніну та стерину, та необов'язково, четвертинний амін; за умови, що, якщо зазначена композиція ад'юванта фактично складається з DEAE декстрану, Quil A, холестерину та DDA, антигеном не є бактерин E coli J-5; або

15 б. імуностимулюючий олігонуклеотид, за умови, що, якщо зазначена композиція ад'юванта фактично складається з DEAE декстрану та імуностимулюючого олігонуклеотиду, антиген містить збудник негативно діє на велику рогату худобу, овець, коней або свиней, або є похідною зазначеного збудника, та не є бактерином E coli J-5.

20 [00228] В тридцять восьмому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію відповідно до тридцять сьомого варіанта здійснення, в якій сапонін, якщо присутній, представляє собою тритерпеноїдний сапонін, стерин, якщо присутній, вибирають з групи, яка складається з ергостерину, ланостерину та холестерину, полікатіонний носій, якщо присутній, вибирають з групи, яка складається з декстрану, декстрану DEAE (або його похідних), ПЕГ, гуарових смол, хітозанових похідних, поліцелюлозних похідних, таких як гідроксіетилцелюлоза (HEC), поліетиленімін, поліаміни, та четвертинний амін, якщо присутній, вибирають з групи, яка складається з DDA та авридицину.

30 [00229] В тридцять дев'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію відповідно до тридцять восьмого варіанта здійснення, в якій сапонін представляє собою Quil A, стерин представляє собою холестерин, полікатіонний носій представляє собою декстран DEAE, та четвертинний амін представляє собою DDA.

[00230] В сороковому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за будь-яким одним з тридцять сьомого по тридцять дев'ятий варіанти здійснення, в якій імуностимулюючий олігонуклеотид представляє собою CpG.

35 [00231] В сорок першому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за будь-яким одним з тридцять сьомого по сороковий варіант здійснення, в якій зазначений полікатіонний носій є присутнім в кількості від приблизно 0,5 до приблизно 400 мг на дозу.

[00232] В сорок другому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за сорок першим варіантом здійснення, в якій зазначений полікатіонний носій є присутнім в кількості 50-300 мг на дозу або 1-25 мг на дозу, або 1-10 мг на дозу.

40 [00233] В сорок третьому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за будь-яким одним з тридцять сьомого по сорок другого варіантів здійснення, яка містить сапонін в кількості від приблизно 0,1 до приблизно 1000 мкг на дозу.

45 [00234] В сорок четвертому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за сорок третім варіантом здійснення, в якій сапонін є присутнім в кількості 250-500 мкг на дозу, або 20-50 мкг на дозу, або 1-10 мкг на дозу.

[00235] В сорок п'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за будь-яким одним з тридцять сьомого по сорок четвертий варіанти здійснення, яка містить стерин в кількості від приблизно 0,1 до приблизно 1000 мкг на дозу.

50 [00236] В сорок шостому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за сорок п'ятим варіантом здійснення, в якій стерин є присутнім в кількості 250-500 мкг на дозу, або 20-50 мкг на дозу, або 1-10 мкг на дозу.

[00237] В сорок сьомому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за будь-яким одним з тридцять сьомого по сорок шостий варіанти здійснення, яка містить четвертинний амін в кількості від приблизно 1 до приблизно 200 мкг на дозу.

55 [00238] В сорок восьмому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за сорок сьомим варіантом здійснення, в якій четвертинний амін є присутнім в кількості приблизно 100 мкг на дозу або від приблизно 10 до приблизно 100 мкг на дозу або приблизно 5 мкг на дозу.

60 [00239] В сорок дев'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за будь-яким одним з тридцять сьомого по сорок восьмий варіанти здійснення, яка містить

імуностимулюючий олігонуклеотид в кількості від приблизно 0,5 мкг до приблизно 400 мкг на дозу.

5 [00240] В п'ятидесятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за сорок дев'ятим варіантом здійснення, в якій імуностимулюючий олігонуклеотид є присутнім в кількості 100-250 мкг на дозу, або 20-50 мкг на дозу або приблизно 1 мкг на дозу.

[00241] В п'ятдесят першому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за будь-яким одним з тридцять сьомого по п'ятидесятий варіанти здійснення, в якій олійна фаза містить олію та розчинний в олії емульгатор.

10 [00242] В п'ятдесят другому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за будь-яким одним з тридцять сьомого по п'ятдесят перший варіанти здійснення, в якій зазначена олійна фаза є присутньою в кількості аж до 85 % об./об.

[00243] В п'ятдесят третьому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за п'ятдесят другим варіантом здійснення, в якій зазначена олійна фаза є присутньою в кількості 51 % об./об.

15 [00244] В п'ятдесят четвертому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за будь-яким одним з п'ятдесят першого по п'ятдесят третій варіанти здійснення, в якій олія складає 40-84 % об./об. вакцинної композиції, та розчинний в олії емульгатор містить 1-11 % об./об. вакцинної композиції.

20 [00245] В п'ятдесят п'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за п'ятдесят третім варіантом здійснення, в якій олія складає 45 % об./об. препарата, та розчинний в олії емульгатор складає 6 % об./об. препарата.

[00246] В п'ятдесят шостому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить *Eimeria maxima* або *Clostridium perfringens* антиген та композицію ад'юванта, яка містить:

25 а) олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції; полікатіонний носій, та необов'язково, імуностимулюючий олігонуклеотид; або

б) олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції; імуностимулюючий олігонуклеотид, стерин та монофосфорильний ліпід А (MPL-A) або його аналог.

30 [00247] В п'ятдесят сьомому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за п'ятдесят шостим варіантом здійснення, яка містить антигени проти *Eimeria maxima* та *Clostridium perfringens*.

35 [00248] В п'ятдесят восьмому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за п'ятдесят шостим варіантом здійснення або п'ятдесят сьомим варіантом здійснення, в якій зазначений полікатіонний носій представляє собою DEAE-Декстран.

[00249] В п'ятдесят дев'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає застосування вакцинної композиції відповідно до пунктів з п'ятдесят шостого по п'ятдесят восьмий варіант здійснення для лікування або попередження інфекцій, викликаних *Eimeria maxima* або *Clostridium perfringens* у домашньої птиці.

40 [00250] В шістдесятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить *Neospora* антиген та композицію ад'юванта, яка містить олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції; та

а) монофосфорильний ліпід А (MPL-A) або його аналог; або

б) комбінацію з імуностимулюючого олігонуклеотида та полікатіонного носія.

45 [00251] В шістдесят першому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за шістдесятим варіантом здійснення, яка містить комбінацію з імуностимулюючого олігонуклеотиду та декстрану DEAE.

50 [00252] В шістдесят другому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за шістдесятим варіанта здійснення, яка містить монофосфорильний ліпід А (MPL-A) або його аналог, та додатково яка містить імуностимулюючий олігонуклеотид.

[00253] В шістдесят третьому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцину за шістдесят другим варіантом здійснення, яка додатково містить стерин.

[00254] В шістдесят четвертому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцину за шістдесят третім варіантом здійснення, в якій стерин є холестерином.

55 [00255] В шістдесят п'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцину відповідно до будь-якого одного з шістдесятого по шістдесят четвертий варіант здійснення, в якій *Neospora* антиген представляє собою *Neospora caninum* антиген.

60 [00256] В шістдесят шостому варіанті здійснення, винахід передбачає застосування вакцини відповідно до будь-якого одного з шістдесятого по шістдесят п'ятий варіант здійснення для лікування або попередження інфекції, викликані *Neospora*.

[00257] В шістдесят сьомому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить *Chlamydothila abortis* антиген та композицію ад'юванта, яка містить олійну фазу, де зазначена олійна фаза є присутньою в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції; стерин; імуностимулюючий олігонуклеотид; монофосфорильний ліпід А (MPL-A) або його аналог; та полі І:С.

[00258] В шістдесят восьмому варіанті здійснення, винахід передбачає застосування вакцини відповідно до шістдесят сьомого варіанта здійснення для лікування або попередження викидня, викликаного *C. abortis* в вівцематок.

[00259] В шістдесят дев'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить міостатин та композицію ад'юванта, де зазначена композиція ад'юванта містить олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції, імуностимулюючий олігонуклеотид та або:

- a) полікатіонний носій; або
- b) MPL-A або його аналог.

[00260] В семидесятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за шістдесят дев'ятим варіантом здійснення, яка містить MPL-A або його аналог, в якій зазначений препарат містить менше, ніж 0,5 мкг стерину на 50 мкл зазначеної композиції.

[00261] В сімдесят першому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за семидесятим варіантом здійснення, яка не містить стерин.

[00262] В сімдесят другому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за семидесятим варіантом здійснення, в якій стерин є холестерином.

[00263] В сімдесят третьому варіанті здійснення, винахід передбачає застосування вакцини відповідно до будь-якого одного з варіантів здійснення від 69 по 72 для зменшення кількості міостатину у тварини.

[00264] В сімдесят четвертому варіанті здійснення, винахід передбачає застосування відповідно до сімдесят третього варіанта здійснення, в якій зазначений тварина є домашньою птицею.

[00265] В сімдесят п'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить *Trueperella pyogenes* антиген та композицію ад'юванта, в якій композиція ад'юванта містить олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції; імуностимулюючий олігонуклеотид та полікатіонний носій.

[00266] В сімдесят шостому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за сімдесят п'ятим варіантом здійснення, в якій *Trueperella pyogenes* антиген є піолізином.

[00267] В сімдесят сьомому варіанті здійснення, винахід передбачає застосування вакцинної композиції за сімдесят четвертим або сімдесят п'ятим варіантом здійснення для лікування або попередження інфекції, викликані *Trueperella pyogenes*.

[00268] В сімдесят восьмому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить антиген *E coli*, антиген BRV або антиген BCV, та композицію ад'юванта, в якій зазначена композиція ад'юванта містить олійну фазу, присутню в кількості, щонайменше, 50 % об./об. зазначеної вакцинної композиції, імуностимулюючий олігонуклеотид та, щонайменше, один з полікатіонного носія та джерела алюмінію.

[00269] В сімдесят дев'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за сімдесят восьмим варіантом здійснення, яка містить антиген *E coli*, антиген BRV та антиген BCV.

[00270] В вісімдесятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за сімдесят восьмим або сімдесят дев'ятим варіантом здійснення в якій:

- a. антиген *E coli*, якщо присутній, вибирають з групи, що складається з *E coli* K99, *E coli* F41 та їх комбінації;
- b. антиген BRV, якщо присутній, вибирають з групи, що складається з BRV G6, BRV G10 та їх комбінації.

[00271] У вісімдесят першому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію відповідно до будь-якого одного з сімдесят восьмого по вісімдесятий варіант здійснення, в якій полікатіонний носій, якщо присутній, представляє собою декстран DEAE, та імуностимулюючий олігонуклеотид представляє собою CpG.

[00272] У вісімдесят другому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію відповідно до будь-якого одного з сімдесят восьмого по вісімдесят перший варіант здійснення, яка містить джерело алюмінію, який представляє собою гель гідроксиду алюмінію.

[00273] У вісімдесят третьому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за вісімдесят другим варіантом здійснення, в якій зазначене джерело алюмінію є присутнім в кількості 5 %-20 % об./об.

[00274] У вісімдесят четвертому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за вісімдесят третім варіантом здійснення, в якій зазначений джерело алюмінію є присутнім в кількості 10 %-17 % об./об.

5 [00275] У вісімдесят п'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає застосування вакцинної композиції відповідно до будь-якого одного з сімдесят восьмого по вісімдесят четвертий варіант здійснення для лікування або попередження ентериту, викликаного E coli, BCV або BRV в бичачій тварині.

10 [00276] У вісімдесят шостому варіанті здійснення, винахід передбачає застосування відповідно до дев'яного першого варіанта здійснення, де зазначена вакцина викликає, щонайменше, тривалістю в шість місяців імунітет до зазначеного(их) антигена(ів).

[00277] У вісімдесят сьомому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить антиген Rhipicephalus microplus та ад'ювант, де зазначений ад'ювант вибирають з групи, що складається з:

15 а) водного ад'юванта, який містить імуностимулюючий олігонуклеотид, сапонін, стерин, четвертинний амін, поліакриловий полімер, та гліколіпід; та

б) на олійній основі ад'ювант, який містить олійну фазу, присутню в кількості, щонайменше, 50 % об./об. вакцинної композиції, та яка містить імуностимулюючий олігонуклеотид та полікатіонний носій.

20 [00278] У вісімдесят восьмому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за вісімдесят сьомим варіантом здійснення, в якій сапонін представляє собою Quil A, стерин представляє собою холестерин, четвертинний амін представляє собою DDA, гліколіпід представляє собою N-(2-дезоксидеокси-2-L-лейциламіно-b-D-глюкопіранозил)-N-октадецилдодеканоїламід або його сіль, та імуностимулюючий олігонуклеотид представляє собою CpG.

25 [00279] У вісімдесят дев'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за вісімдесят сьомим варіантом здійснення, в якій полікатіонний носій представляє собою декстран DEAE, та імуностимулюючий олігонуклеотид представляє собою CpG.

30 [00280] В дев'яностому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за будь-яким одним з вісімдесят сьомого по вісімдесят дев'ятий варіант здійснення, в якій Rhipicephalus microplus антиген представляє собою Bm86 протеїн.

[00281] В дев'яносто першому варіанті здійснення, винахід передбачає застосування вакцинної композиції відповідно до будь-якого одного з вісімдесят сьомого по дев'яностий варіант здійснення для лікування або попередження інфекції, викликаной Rhipicephalus microplus.

35 [00282] В дев'яносто другому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить антиген захворювання ящуру (FMD) та композицію ад'юванта, де зазначена композиція ад'юванта містить олійну фазу, присутню в кількості, щонайменше, 36 % об./об. зазначеної вакцинної композиції, імуностимулюючий олігонуклеотид та полікатіонний носій, де зазначена вакцинна композиція представляє собою емульсію вода-в-олії. В різних варіантах здійснення, зазначений антиген вірусу ящура може бути або немутантним типом FMDV, генетично модифікованим та/або ослабленими FMDV штамами, або рекомбінантно експресованими FMDV структурними протеїнами, такими як вірусоподібні частинки (VLP) серотипів A, C, O, Asia1, SAT1, SAT2 або SAT3.

40 [00283] В дев'яносто третьому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за дев'яносто другим варіантом здійснення, в якій імуностимулюючий олігонуклеотид представляє собою CpG, та полікатіонний носій представляє собою DEAE декстран.

45 [00284] В дев'яносто четвертому варіанта здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за дев'яносто другим або дев'яносто третім варіантом здійснення, в якій антиген представляє собою винахід, що передбачає вакцинну композицію за пунктом дев'яносто восьмого або дев'яносто дев'ятого варіанта здійснення, в якій антиген отримують з генетично модифікованого вірусу на платформі FMD-LL3B3D, який є ослабленим у великій рогатій худоби та свиней, особливо, FMD-LL3B3D-A24 Cruzeiro.

50 [00285] В дев'яносто п'ятому варіанті здійснення, винахід передбачає застосування вакцинної композиції за будь-яким одним з дев'яносто другого або дев'яносто четвертого варіанта здійснення для лікування або попередження FMD у великій рогатій худоби.

[00286] В дев'яносто шостому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію, яка містить антиген Streptococcus uberis (S. uberis) та композицію ад'юванта, яка містить олійну фазу, де зазначена олійна фаза присутня в кількості, щонайменше, 50 % об./об. композиції; полікатіонний носій; та

60 а) імуностимулюючий олігонуклеотид;

- b) комбінацію, яка містить сапонін, стерин та четвертинний амін; або
 c) їх комбінацію.

[00287] В дев'яносто сьомому варіанті здійснення, винахід передбачає вакцинну композицію за дев'яносто шостим варіантом здійснення, в якій антиген представляє собою адгезійну молекулу *S. uberis* або її імуногенний фрагмент.

[00288] В дев'яносто восьмому варіанті здійснення, винахід передбачає застосування вакцини відповідно до будь-якого одного з дев'яносто шостого або дев'яносто сьомого варіанта здійснення для лікування або попередження інфекції, викликаной *S. uberis*.

[00289] Наступні приклади представлені як ілюстративні варіанти здійснення, їх не слід розглядати як обмежуючі об'єм винаходу. Багато змін, варіацій, модифікацій та інших використань та застосувань даного винаходу будуть очевидні кваліфікованим фахівцям в даній галузі.

ПРИКЛАДИ.

Приклад 1. Розробка рекомбінантної стратегії вакцинації для підвищення імунітету проти некротичного ентериту свиней.

[00290] Мета дослідження полягала в тому, щоб оцінити вплив вакцинації *in vivo* ад'ювантною рекомбінантною клостридієвою вакциною проти живого контрольного зараження інфекцією *Eimeria maxima* та *Clostridium perfringens* в моделі захворювання некротичного ентериту.

Матеріали та способи

[00291] Рекомбінантні протеїни: Повнодовжинні кодуєчі послідовності для генів, які кодують *C. perfringens* (ATCC 13124, Американська колекція типових культур, Manassas, VA) NetB та EF-Tu клонували, застосовуючи ПЛР в рЕТ32a(+) векторі з NH₂-термінальним поліістидиновим епітопним тегом. Клоновані гени трансформували в компетент *Escherichia coli*, бактерії культивували протягом 16 год. при 37 °C, та індукували протягом 5 год. при 37 °C 1,0 мМ ізопропіл β-D-тіогалактопіранозидом (Amresco, Cleveland, OH). Бактерії збирали, застосовуючи центрифугування на 10 000 обер./хв. протягом 10 хв. при 4 °C, знову суспендували в PBS, руйнували ультразвуком, та центрифугували на 10 000 обер./хв. протягом 15 хв. Супернатант інкубували протягом 1 год. при 22 °C з Ni-NTA агарозою (Qiagen, Valencia, CA), смоли промивали PBS, та очищені клостридієві протеїни елюювали 250 мМ імідазолу в PBS, pH 9.2. Чистота протеїну чистота була підтверджена на Кумассі забарвлених синім SDS-акриламідних гелях. Концентрацію протеїну визначали з використанням комерційного набору від Sigma.

[00292] Тварини: Одноденного віку бройлери птиці (Ross/Ross), які вилупилися в інкубаторії Longeneckers (Elizabethtown, PA) транспортували до BARC-East, Building 1082, та пташенята були розміщені в Petersime стартерні брудер-одиниці відповідно до встановлених настанов BARC комітету з догляду за малими тваринами. Птахів утримували в брудерних місцях в вільних від *Eimeria* засобу та переносили в великі підвісні клітки в окремому місці, де їх інфікували та утримували до кінця експериментального періоду для дослідження живого контрольного зараження інфекцією. Всі процедури, що стосуються транспортування, вимірювання маси тіла, інфекції, та збирання крові та селезінки були схвалені BARC комітетом з догляду за малими тваринами (SOP додається). ARS BARC комітет з догляду за малими тваринами встановив настанови для експериментів на тваринах при BARC та проводить регулярні інспекції всіх засобів для тварин.

[00293] Імунізація: Первинну імунізацію проводили шляхом підшкірної ін'єкції одноденного віку курчат-бройлерів 100 мкл вакцини (Ag 100мкг/доза). Вторинну імунізацію проводили шляхом підшкірної ін'єкції семиденного віку курчат-бройлерів, яким підшкірно ін'єкційно вводили 100 мкл вакцини (Ag 100 мкг/доза).

[00294] Контрольне зараження *Eimeria*: BARC штами *Eimeria* spp., які зберігались в паразитарній лабораторії захворювань тварин та поширювали відповідно до встановленої процедури. *E. maxima* (41A) чистили за рахунок флотації з 5 % розчином гіпохлориту натрію, промивали тричі PBS, та життєздатність підраховували за допомогою трипанового блакитного, застосовуючи гемоцитометр. Кількість ооцисту ґрунтується на тільки спорулірованих ооцистах. Через шість днів після бустер-імунізації, кури були щеплені стравохідно 10 000 *E. Maxima* застосовуючи інокуляційну голку.

[00295] Контрольне зараження *C. perfringens*: Через чотири дні після інфекціонування *Eimeria*, птахів з NE групи щеплювали стравохідно 1×10^9 КУО *Clostridium perfringens* кожному, застосовуючи інокуляційну голку.

[00296] Аналізи: Птахи були зважені в день прибуття, одразу перед контрольним зараженням ЕМ, перед контрольним зараженням *C. perfringens*, через 2 дні після С.Р., та 10 днів після С.Р. контрольного зараження, щоб розрахувати збільшення ваги.

[00297] Для підрахунку кишкових уражень, птахів (5 птахів/група) умертвляли через два дні після С.Р. інфікування. Приблизно 20 см кишкові сегменти, що розтягуються на 10 см від переднього відділу та заднього до дивертикулу, отримували та розрізали в поздовжньому напрямку. Бали ураження оцінювались 2 незалежними спостерігачами від 0 до 4 в порядку зростання ступеня тяжкості ураження.

[00298] Двома основними чинниками *C. perfringens* вірулентності у курей є альфатоксин та NetB (В-подібний некротичний ентерит) токсин, обидва з яких беруть участь в патогенезі NE. Додаткові *C. perfringens* протеїни, які можуть бути включеними в бактеріальний патогенез та захисний імунітет господаря, включаючи піруват: ферредоксин оксидоредуктазу (PFO), та фактор елонгації G (EF-G), як раніше повідомлялося, індукує захисний імунітет проти експериментального контрольного зараження інфекцією з *C. perfringens*. Відповідно, титри антитіла до даних чинників визначали, як описано нижче.

[00299] П'ять птахів в кожній групі вибирали випадковим чином для крові, яку збирали за допомогою пункції серця відразу ж після евтаназії. Сироватку отримували центрифугуванням з низькою швидкістю та використовували в твердофазному імуноферментному аналізі (ІФА), щоб виміряти рівні α -токсин-, NetB-, EF, та PFO-специфічного антитіла. Коротко кажучи, 96-лункові планшети для мікротітровання покривали протягом ночі 1,0 мкг/лунка очищених рекомбінантних протеїнів α -токсину-, NetB-, EF, та PFO. Планшети промивали PBS, який містить 0,05 % Tween (PBS-T) та блокували PBS, який містить 1 % BSA. Сироватку (100 мкл/лунка) інкубували протягом 2 год. при кімнатній температурі з обережним перемішуванням. Планшети промивали PBS-T, та зв'язане антитіло детектували з використанням кон'югованого з пероксидазою кролячого антикурячого IgG (Sigma, St. Louis, MO) та пероксидаза-специфічний субстрат. Оптичну густину (OD) на 450 нм вимірювали застосовуючи автоматизований мікропланшетний рідер (Bio-Rad, Richmond, CA).

[00300] Статистичні аналізи: Всі значення виражені у вигляді середнього значення \pm SEM. Середні значення для збільшення ваги тіла та бали ураження порівнюються між групами за допомогою тесту Туреччини після ANOVA з використанням SPSS 15.0 для Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Відмінності між середніми значеннями будуть вважатися значимими при $p < 0,05$.

[00301] Експериментальний дизайн ілюструється в таблиці 1.

Таблиця 1

Група #	Птахи (Кількість)	Протеїн (100 мкг/птахи)	Ад'ювант	Інфекція для NE (EM+CP)*
1	15	-	10 мМ Буфер	-
2	15	-	10 мМ Буфер	+
3	15	NetB (50мкг) + EF-Tu (50мкг)	10 мМ Буфер	+
4	15	"	1. TXO	+
5	15	"	2. TCMO	+
6	15	"	3. XO	+
7	15	"	4. XOM	+
8	15	"	5. SP-OIL	+
9	15	"	6. 5 % AMPHIGEN®	+
10	15	"	7. 5 % AMPHIGEN® + полі I:C	+
11	15	"	8. 5 % AMPHIGEN® + CpG	+
12	15	"	9. 5 % AMPHIGEN® + DEAE Декстран	+
13	15	"	10. 5 % AMPHIGEN® + DDA	+

* Кури були заражені перорально $1,0 \times 10^4$ ооцист/птахи E. maxima (EM) на 14 день після штрихування та $1,0 \times 10^9$ КУО/птахи C. perfringens (CP) на 18-й день.

5

[00302] Композиції ад'ювантів були наступними (на 50 мкл):

[00303] TXO: SEQ ID NO: 8 була присутня в кількості 1 мкг, декстран DEAE був присутній в кількості 5 мкг, легка мінеральна олія була присутня в кількості 51 % об./об. композиції.

10 [00304] TCMO: SEQ ID NO: 8 була присутня в кількості 1 мкг, холестерин був присутній в кількості 1 мкг, MPL-A був присутній в кількості 1 мкг/50 мкл доза, легка мінеральна олія була присутня в кількості 51 % об./об. композиції.

[00305] XO: Декстран DEAE був присутній в кількості 5 мкг, легка мінеральна олія була присутня в кількості 51 % об./об. композиції.

15 [00306] XOM: Декстран DEAE був присутній в кількості 5 мкг, легка мінеральна олія була присутня в кількості 51 % об./об. композиції, MPL-A був присутній в кількості 1 мкг.

[00307] 5 % AMPHIGEN® + полі I:C: полі I:C був присутній в кількості 1 мкг.

[00308] 5 % AMPHIGEN® +CpG: SEQ ID NO: 8 був присутній в кількості 1 мкг.

[00309] 5 % AMPHIGEN® +DEAE Декстран: DEAE декстран був присутній в кількості 25 мкг.

[00310] 5 % AMPHIGEN® + DDA: DDA був присутній в кількості 1 мкг.

20 [00311] Збільшення маси тіла було значно знижено при EM та CP інфекції в контрольній групі NE (P <0,05). Однак, збільшення маси тіла, в цілому, підвищувалося в групах, імунізованих рекомбінантними CP протеїнами (Net B+EF) на 4 ~21 %. Значна відмінність з контролем NE

була виявлена в Prot TCMO групі, яка була імунізована CP протеїнами, кон'югованими з TCMO ад'ювантом.

Таблиця 2

Збільшення маси тіла

Група	Лікування	Середнє значення	SEM
1	Контроль	347,93	9,387
2	NE контроль	286,36	14,436
3	Prot	317,86	7,828
4	Prot TXO	316,42	8,826
5	Prot TCMO	345,73	11,745
6	Prot XO	334,67	8,605
7	Prot XOM	331,17	11,387
8	Prot SPO	304,09	10,330
9	Prot AMP	310,09	9,479
10	Prot AMPPIC	314,86	9,571
11	Prot AMP CPG	313,82	11,976
12	Prot AMP DEAE	299,20	15,000
13	Prot AMP DDA	301,25	10,440

5

Таблиця 3

Бали щодо ураження

Група	Середнє значення	SEM
2	NE контроль	3,0
3	Prot	2,7
4	Prot TXO	2,5
5	Prot TCMO	2,6
6	Prot XO	1,7
7	Prot XOM	2,4
8	Prot SPO	2,4
9	Prot AMP	1,7
10	Prot AMPPIC	2,1
11	Prot AMP CPG	2,3
12	Prot AMP DEAE	2,1
13	Prot AMP DDA	2,2

[00312] Через шість днів після ЕМ інфікування та через 2 дні після CP інфікування оцінювали антитільні відповіді в сироватці проти α -токсину, Net-B, EF та PFO. Результати представлені в таблиці 4. Коротко кажучи, CP протеїн в цілому підвищував Ab титри проти CP антигенів у птахів, імунізованих CP протеїнами. Ab відповіді до Net B, EF та PFO антигенів були значно вищими, ніж до α -токсину.

10

Таблиця 4

Ab відповіді до Net B, EF та PFO антигенів

Групи		α-токсин		Net B		EF		PFO	
		Середнє	SEM	Середнє	SEM	Середнє	SEM	Середнє	SEM
2	NE контроль	,36	,02	,33	,01	,21	,01	,22	,01
3	Prot	,40	,04	,44	,05	,40	,09	,36	,05
4	Prot TXO	,39	,03	,41	,04	,56	,05	,40	,03
5	Prot TCMO	,34	,02	,42	,03	,48	,06	,40	,06
6	Prot XO	,34	,02	,53	,05	,38	,07	,36	,04
7	Prot XOM	,33	,02	,40	,04	,55	,03	,41	,04
8	Prot SPO	,30	,01	,33	,02	,19	,02	,20	,02
9	Prot AMP	,37	,01	,33	,00	,22	,03	,32	,07
10	Prot AMPPIC	,32	,02	,53	,06	,36	,10	,33	,02
11	Prot AMP CPG	,42	,02	,41	,02	,24	,08	,28	,01
12	Prot AMP DEAE	,38	,02	,53	,05	,17	,02	,23	,03
13	Prot AMP DDA	,41	,01	,58	,02	,45	,03	,36	,03

Приклад 2: Куряча антиміостатинова вакцина.

- 5 [00313] Міостатин є секретованим фактором диференціації росту, який є членом родини TGF бета-протеїну, яка інгібує м'язове диференціювання та ріст. Міостатин продукується в основному в клітинах скелетних м'язів, циркулює в крові та впливає на м'язову тканину, шляхом зв'язування клітинно-зв'язаного рецептора, який називається рецептором активіну типу II. Відповідно, інгібування міостатину в результаті призводить до тварин, які мають, підвищену
- 10 кількість м'яса/м'язів. Одним з підходів до зниження кількості міостатину у тварини є генерувати анти-міостатинову імунну відповідь, яку можуть зручно вимірювати, використовуючи титри анти-міостатинового антитіла. В даному прикладі використовували курячу модель.

- 15 [00314] Кури Cobb 500 Parent Stock та Ross 308 (віком 12-10 тижнів, відповідно) ініціювали вакциною, яка містить міостатин-кон'югований пептид та композицію ад'юванта. Композиції ад'юванта, які використовували в дослідженні, є показаними в таблиці 5.

Таблиця 5

Групи лікування

Лікування	Ад'ювант	Носій	Доза
T01	CFA/IFA	CRM	50 мкг
T02	IFA/CFA	CRM	50 мкг
T03	CFA/IFA	KLH/CRM	50 мкг
T04	TCMO	KLH/CRM	50 мкг
T05	TCMO	CRM	200 мкг/50 мкг
T06	TMO	CRM	200 мкг/50 мкг
T07	TCMO	CRM	50 мкг
T08	MO	CRM	50 мкг
T09	TMO	CRM	50 мкг
T10	TXO	CRM	50 мкг

Позначення "200 мкг/50 мкг" стосується кількості антигену в "прайм-буст" дозі, об'єм 0,2 мл.

20

[00315] Компоненти в ад'ювантах є такими, як описано в таблиці 6.

[00316] Кури Cobb 500 Parent Stock та Ross 308 ініціювали на тижнях 12 або 10 та збільшували на тиждень 18. Титри сироватки антиміостатинового антитіла вимірювали, застосовуючи ІФА перед вакцинуванням та кожні два тижні після первинної обробки до 22 та 20 тижневого віку, відповідно.

- 5 [00317] Групи T06, T07, T09 та T10 продукували найвищі відповіді (середньо геометричне титрів антитіла становить від 50000 до 15000 на 22 тижні). Серед цих чотирьох груп, птахи Cobb 500 в групах T06 та T07 продемонстрували середньо геометричні титри вище 100 000.

Таблиця 6

Ад'ювант назва	Компоненти ад'юванта	Концентрація ад'юванта /доза
ТСМО	SEQ ID NO: 8 /Холестерин/ MPLA/олія	10 мкг/10 мкг/5 мкг / Drakeol 5 олія (45 %), SPAN® 80(6,3 %) & TWEEN® 80 (1,45 %)
МО (20:80 W:O)	MPLA (20:80 W:O) емульсія низької в'язкості	MPLA-5 мкг / Drakeol 6 мінеральна олія, SPAN & TWEEN 80
ТМО (20:80 W:O) Застосування МО емульсії та змішування CpG та кон'югованих пептидів	SEQ ID NO: 8 /MPLA (20:80 W:O) емульсія низької в'язкості	10 мкг /5 мкг / Drakeol 6 мінеральна олія, SPAN & TWEEN 80
ТХО	SEQ ID NO: 8 /DEAE- Декстран	10 мкг /20 мкг / Drakeol 5 мінеральна олія, (45 %), SPAN® 80(6,3 %) & TWEEN® 80 (1,45 %)

- 10 Приклад 3. Вакцини проти *T. pyogenes*

[00318] *Trueperella pyogenes* (раніше *Arcanobacterium pyogenes*, та раніше *Actinomyces pyogenes* та також *Corynebacterium pyogenes*) часто призводять до важкого клінічного метриту у великої рогатої худоби, що характеризується густою, гнійної секреції. Неприємний запах, іноді пов'язаний з даним станом, ймовірно, є викликаним анаеробними бактеріями, які також є присутніми, але не виявляються звичайними культуральними способами. Захворювання найбільш часто зустрічається в сухих корів або телиць до або під час періоду отелення, та іноді відбувається в період лактації тварин, як наслідок травми сосків або вимені. Економічно важливі захворювання, спричинені даним організмом включають метрит, та викидня у молочних корів та абсцесів печінки у великої рогатої худоби, що утримується на пасовиськах ділянках. Піолізін (PLO), холестерин-залежний цитолізін, експресований *Trueperella pyogenes*, є важливим господар-захисним антигеном.

[00319] Ангус кросбред великої рогатої худоби приблизно віком 14 місяців використовували в даному дослідженні. Тварини були в цілому з гарним здоров'ям та не мали будь-яких захворювань, які б ускладнювали включення в дослідження. Тварини мали досхочу доступу до

25 корму та води.
[00320] Препарати: Всі бактерії (*E. coli* та *T. pyogenes*) з 1×10^9 на дозу. Піолізін вводили 150 мікроорганізмів на дозу тваринам в групах T02 - T07. Група T01 використовували як контроль.

[00321] Композиції ад'ювантів, які досліджували в даному дослідженні, були наступними:

ISC/Полі ІС-ISC 1000 мкг/ Полі І:С 50 мкг в 2 мл дози

- 30 ISC/CpG-ISC 1000мкг/ 100 мкг CpG (SEQ ID NO: 8) в 2 мл дози

ТХО-CpG 100 мкг (SEQ ID NO: 8)/DEAE Декстран/Мінеральну олія 5LT NF в 2 мл дози

QCDCRT-Quil A 150 мкг /холестерин 150 мкг/DDA 100 мкг/CARBOPOL® (поліакриловий полімер) 0,0375 %/R1005 1000 мкг/CpG (SEQ ID NO: 8) 100 мкг в 2 мл дози

QAC-Quil A 500 мкг/холестерин 500 мкг/AMPHIGEN® (емульсія лецитинової олії) 2,5 % в 2

- 35 мл дози

[00322] Піолізинове антитіло вимірювали застосовуючи опосередкований ІФА, антиген на планшеті з наступним зразком сироватки (первинне антитіло), з наступним антибіотичним IgG кон'югатом вимірювали в дні 0, 28 та 56.

[00323] Всі зразки та контролі розбавляли 1:2000, та відповідь визначали шляхом

- 40 розрахунку співвідношення OD зразка до OD позитивного контролю (Поз. контр. був пул

сироватки від видужуючих тварин). Антитіло детектували HRP-кон'югованими з овечим антибіотичним IgG.

Таблиця 7

Дизайн дослідження

Група лікування	Кількість Тварин	Лікування*	День	Доза	Одиниці дози	Шлях†	Маточне Контроль-не зараження
T01	8	Сольовий розчин	0, 28	2	мл	п.ш., п.ш.	День 56 5×10^8
T02	8	E. coli+T (A). pyogenes+PLO в ISC/Poly:IC	0, 28	2	мл	і.н., п.ш.	День 56 5×10^8
T03	8	E. coli+T (A). pyogenes+PLO в ISC/CpG	0, 28	2	мл	і.н., п.ш.	День 56 5×10^8
T04	8	E. coli+T (A). pyogenes+PLO в TXO	0, 28	2	мл	п.ш., п.ш.	День 56 5×10^8
T05	8	E. coli+T (A). pyogenes+PLO в QCDCRT	0, 28	2	мл	і.н., п.ш.	День 56 5×10^8
T06	8	E. coli+T (A). pyogenes+PLO в QAC	0, 28	2	мл	п.ш., п.ш.	День 56 5×10^8
T07	8	PLO в ISC/Poly:IC	0, 28	2	мл	і.н., п.ш.	День 56 5×10^8

* E. coli strain 51323+T (A). pyogenes штам 51496, PLO=піолізін

† п.ш. = підшкірно, і.н. = інтраназально.

5

[00324] Результати наведені в таблиці 8

Таблиця 8

Лікування No.	LSM IgG до PLO (Точка часу є днем в дослідженні)		
	День 00	День 28	День 56
T01	0,216	0,226	0,208
T02	0,274	0,245	0,444
T03	0,252	0,229	0,451
T04	0,205	0,506*	0,590*
T05	0,291	0,246	0,373
T06	0,243	0,512*	0,687*
T07	0,315	0,280	0,624

[00325] Групи T04 та T06 (ад'юванти TXO та QAC) здійснювали значно краще, ніж контроль (P<0,05). Крім того, виявленими були численні тенденції серед різних груп лікування (вибрані як різниці, де P<0,1). Дані тенденції представлені в таблиці 9.

10

Таблиця 9

Відмінності між групами на день 0 (перший параметр), 28 (другий параметр), 56 (третій параметр). "Y" означає, що $P < 0,1$

	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07
T01	X	X	X	X	X	X	X
T02	N, N, Y	X	X	X	X	X	X
T03	N, N, Y	N, N, N	X	X	X	X	X
T04	N, Y, Y	Y, Y, Y	N, Y, N	X	X	X	X
T05	Y, N, Y	N, N, N	N, N, N	Y, Y, N	X	X	X
T06	N, Y, Y	N, Y, Y	N, Y, Y	N, N, Y	N, Y, Y	X	X
T07	Y, N, Y	N, N, Y	N, N, N	Y, Y, N	N, N, N	Y, Y, Y	X

Приклад 4. Оцінка піолізинового вакцинного препарату в дійних корів проти метриту, контрольне зараження.

5 [00326] Мета даного дослідження полягала в тому, щоб оцінити ефективність нативних та рекомбінантних піолізинових вакцинних препаратів, з ад'ювантом ТХО, у невагітних лактуючих гольштинських або гольштинських перехресних молочних корів, застосовуючи модель штучного контрольного зараження метритом.

10 [00327] Тварини мали в цілому гарне здоров'я, не мали будь-яких ускладнюючих захворювань, та не отримували ніякої хіміотерапії, системний антибіотик або інші протизапальні лікарські засоби протягом семи (7) днів, що передували та після вакцинації та контрольне зараження. Вони були в своїй 1й - 3й парності, раніше в історії не мали метриту, та не давали позитивний результат на культуру *T. pyogenes* до контрольного зараження (день -1 або 0). Тварини, у яких розвивалися клінічно значущі паралельні захворювання під час дослідження, 15 були видалені.

[00328] Тварини мали досхочу доступ до корму протягом, щонайменше, 20 годин на кожен 24-годинний період, за єдиним винятком, коли їх доїли. Використовували базальний, виготовлений на замовлення змішаний раціон харчування, представник промисловості для лактації. Тварини акліматизувалися протягом щонайменше 7 днів до початку дослідження. 20 Сформульовані вакцини, які вводили коровам (n=20 на групу), містили наступні компоненти: T01- Сольовий розчин; T02-ТХО + нативний піолізін (nPLO); T03-ТХО + рекомбінантний піолізін (rPLO). Рекомбінантний піолізін отримували клонуванням, експресією, та очисткою антигену з *Corynebacterium glutamicum*. Очищений протеїн потім інактивували шляхом обробки формаліном. Нативний піолізін, експресований та очищений з *Trueperella pyogenes*, також інактивували шляхом обробки формаліном. ТХО ад'ювант містив CpG олігонуклеотиди, DEAE- 25 Декстран, мінеральну олію, та поверхнево-активні речовини Span 80 та Tween 80.

[00329] В день вакцинації, відповідний IVP (Таблиця 10) вводили підшкірним способом. Вакцини вводили в шию в день 0, та на протилежному боці шиї в день 28. Місце введення вакцини оцінювали в дні дослідження 0, 1, 2, 3, 7, 28, 29, 30, 31, 35, 49 та 77 реакції в місцях ін'єкції. В день вакцинації, місце введення оцінювали, щоб підтвердити, що ніяких набряків не 30 було присутніх до введення вакцини. В день дослідження 28, 49 та 77 оглядали з обох боків шиї. Оцінки місця ін'єкції реєстрували. Крім того, вимірювали ректальні температури та реєстрували в дні дослідження 0 (до 1ої вакцинація), 1, 2, 3, 7, 28 (до 2ої вакцинації), 29, 30, 31 та 35 під час фази вакцинації. Крім того, вимірювали ректальну температуру та реєстрували в 35 контрольному зараженні з дня 0 до 28.

[00330] Клінічні спостереження після вакцинації реєстрували в дні дослідження 0, 1, 2, 3, 7, 28, 29, 30, 31 та 35 (під час фази вакцинування). Крім того, клінічні спостереження спостерігали та реєстрували під час фази контрольного зараження починаючи з дня 49 до 77.

40 [00331] Антитільні відповіді на піолізін визначали, застосовуючи ІФА в дні дослідження 0, 28, 49, та останній день дослідження (d77). Гемолітичний аналіз інгібування також проводили на кожному зразку сироватки. Даний аналіз вимірює анти-піолізинову антитільну відповідь, яка корелює з біологічною активністю (захистом).

Таблиця 10

Група	# Тварин	Лікування	День	Шлях
T01	20	Сольовий розчин	0, 28	п.ш.
T02	20	ТХО + Нативний піолізін	0, 28	п.ш.
T03	20	ТХО + Рекомбінантний піолізін	0, 28	п.ш.

[00332] До контрольного зараження, оваріальний цикл всіх корів був синхронізований. Прогестерон вводили перед контрольним зараженням, та щодня протягом всієї фази 28 денного контрольного зараження. Застосовуючи стерильну канюлю подібну до селекційної канюлі, 10 мл *Escherichia coli* штаму контрольного зараження та 10 мл *Trueperella pyogenes* штаму контрольного зараження (попередньо визначені дози контрольного зараження), кожен поміщали в окремий шприц, інфузійно вводили в матку всім коровам при контрольному зараженні в день 0. Для забезпечення повної доставки матеріалу контрольного зараження, канюлю промивали 10 мл стерильного культурального середовища.

[00333] Контрольне зараження було визнане успішним, якщо, щонайменше, у 60 % тварин в групі лікування T01 (контрольна група) розвивався метрит. Присутність метриту буде визначатися присутністю слизово-гнійних маточних/вагінальних виділень з оцінкою ≥ 2 . (Дана система підрахунку балів була прийнята зі способу, описаного Sheldon et al., Theriogenology, 65:1516-1530, 2006; в якому оцінки 0 та 1 вважалися нормальними).

[00334] Первинна змінна була присутністю слизово-гнійних маточних/вагінальних виділень з оцінкою ≥ 2 , яка показує наявність метриту. Маточне/вагінальне виділення збирали, застосовуючи асептичний Simcro MetriCheck™ пристрій з асептичною чашкою, та оцінений початок контрольного зараження в день 0 до 28 (день дослідження 49 до 77).

[00335] Лікування вважалось ефективним, якщо тільки у T01 корів розвивався клінічний метрит, або якщо тривалість та/або частина днів з слизово-гнійними вагінальними виділеннями (оцінка ≥ 2) була значно коротшою ($p = <0,1$) в порівнянні з контрольною групою. Якби не було ніяких істотних відмінностей між групами за тривалістю та частиною днів з метритом, то частота *T. pyogenes* виділення за допомогою маткового бактеріальної тампону використовували як допоміжні дані для ефективності вакцини. Безпеку відповідних вакцин оцінювали на основі оцінки місця ін'єкції, ректальних температур та будь-яких несприятливих наслідків для лактації.

[00336] Зібрані дані щодо метриту (присутність вагінальних/маточних виділень, Так/Ні; оцінка вагінальних/маточних виділень) підсумовували для кожної тварини в кожній часовій точці, та використовували для визначення розподілу частоти кожної категорії для кожної обробки в кожен момент часу точкове. Розподіл частот для будь-якої тварини було Нормальне/анормальне (Нормальне є рахунком = 0 або 1; Анормальне є рахунком ≥ 2) для кожної ознаки метриту (наприклад, оцінка вагінальних/маточних виділень) були узагальнені за обробкою та точкою часу. Коли тварина мала анормальну (оцінка ≥ 2) оцінку маточних виділення підсумовували за обробкою, застосовуючи узагальнену лінійну змішану модель (Proc Glimmix), з біноміальним розподілом помилок та функцією логіт-зв'язок. Статистична модель включала фіксований ефект лікування, та рандомізований ефект партії. Контрасти були зроблені між групами лікування. Це повторювалось для кожного варіабельного метриту, описаного в даному параграфі. Якщо Proc Glimmix не сходилися для варіабельного метриту, потім використовували точний критерій Фішера замість того, щоб порівняти групи лікування.

[00337] Тривалість анормальної оцінки (для кожного варіабельного метриту) визначали для кожної тварини, та розраховували як "(остання анормальна точка часу мінус перша анормальна точка часу) + 1". Тривалість анормальної оцінки була встановлена на ноль для тварин, що не мали ніяких точок часу з анормальною оцінкою для такого варіабельного метриту. Тривалість анормальної оцінки розраховували як "(остання запланована точка часу колекції даних мінус перша анормальна точка часу) + 1" для тварин, що були видалені з дослідження до останньої запланованої точки часу колекції даних для такого варіабельного метриту. Тривалість анормальної оцінки (для кожного варіабельного метриту) перетворювали в log, та потім аналізували за допомогою узагальненої лінійної змішаної моделі з фіксованим ефектом лікування, та випадковим ефектом залишок. Лінійні комбінації оцінок параметрів були використані в a priori контрастах після дослідження для значного ефекту лікування ($P \leq 0,10$). Порівняння були зроблені між лікуваннями. Зворотньо перетворювали середні значення, отримані методом

найменших квадратів, їх стандартні похибки та їх 90 % довірчі інтервали розраховували для кожної групи лікування, оцінки параметрів за методом найменших квадратів отримували з аналізу.

[00338] Частина днів з аномальною оцінки (для кожного варіабельного метриту), а також частина днів з нормальною відсутністю *E. coli* та *T. ruogenes* в виділеннях (відсутність вважається значенням $\leq 1+$), визначали для кожної тварини. Кожен потім трансформували, застосовуючи \arcsin перетворення квадратного кореня до аналізів. Дану трансформовану варіабельну частину днів потім кожну аналізували за узагальненою лінійною змішаною моделлю з фіксованим ефект: лікування, та випадковим ефект: залишок. Лінійні комбінації оцінок параметрів використовували в а ріогі контрастах після дослідження для значного ефекту лікування ($P \leq 0,10$). Порівняння були зроблені між лікуваннями. Зворотньо перетворювали середні значення, отримані методом найменших квадратів, їх стандартні похибки, та їх 90 % довірчі інтервали розраховували для кожної групи лікування, оцінки параметрів за методом найменших квадратів отримували з аналізу. Частотні розподілу будь-якої тварини мали *E. coli* присутні (присутні вважається значенням $>1+$), *T. ruogenes* присутні (присутні вважається значенням $>1+$), та обидва *E. coli* та *T. ruogenes* присутні (присутні вважається значенням $>1+$), підсумовувалися за обробкою в кожній часовій точці.

[00339] Результати. Антитільну відповідь до піолізину оцінювали, застосовуючи ІФА, вимірювання рівнім сироватки IgG. Результати (Таблиця 11), представлені як середні титри за методом найменших квадратів (LSM), показують, що титри були значно вищими у корів в T02 та T03, в порівнянні з T01, в дні дослідження 28, 49 та 77. Вони також припускають, що не було статистично істотної відмінності між титрами груп T02 та T03. По відношенню до титрів антитіла в матці також оцінювали, застосовуючи ІФА, результати (Таблиця 12) продемонстрували, що були значно вищі титри в дні 49 та 77 у корів в межах T02 та T03, в порівнянні з тими, які в T01, в ті самі дні. Стосовно гемолітичного інгібування антитіл, результати в таблиці 13 показують, що тварини в T02 мали значно більш високі титри в дні дослідження 49 та 77, ніж ті, які в групах T01 та T03.

Таблиця 11

LSM ¹ сироваткові титри IgG співвідношення S:P				
	День 0	День 28	День 49	День 77
T01	0,250 ^a	0,197 ^a	0,178 ^a	0,366 ^a
T02	0,226 ^a	0,645 ^b	0,782 ^b	0,820 ^b
T03	0,224 ^a	0,626 ^b	0,725 ^b	0,746 ^b

30 ¹ Різні індекси представляють собою значні відмінності між групами.

Таблиця 12

LSM ¹ IgG анти-PLO в матці		
	День 49	День 77
T01	0,033 ^a	0,120 ^a
T02	0,433 ^b	0,353 ^b
T03	0,444 ^b	0,382 ^b

¹ Різні індекси представляють собою значні відмінності між групами.

5

Таблиця 13

LSM¹ HI Антитіло співвідношення S:P в сироватці

	День 0	День 28	День 49	День 77
T01	0,09 ^a	0,10 ^a	0,11 ^a	0,12 ^a
T02	0,08 ^a	0,78 ^b	2,75 ^c	1,12 ^c
T03	0,09 ^a	0,77 ^b	2,13 ^b	0,84 ^b

¹ Різні індекси представляють собою значні відмінності між групами.

10 [00340] Стосовно первинної змінної, оціненої за рівнем слизово-гнійних маточних/вагінальних виділень (оцінка вагінального виділення, або VDS), коли вимірювали тривалість метриту, вона була значно коротшою в групі T02, в порівнянні з групами T01 та T03, як вимірювали в дні 7 та 10 після контрольного зараження бактеріями (Таблиці 14, 15).

15

Таблиця 14

	Тривалість метриту (VDS > 2); LSM ¹	
	Тиждень 1 (дні з 50 до 56)	Контрольне зараження дні з 0 до 10
T01	4,2 ^a	7,1 ^a
T02 n-PLO	2,2 ^b	4,2 ^b
T03 r-PLO	4,3 ^{a, c}	7,4 ^{a, c}

¹ Різні індекси представляють собою значні відмінності між групами.

Таблиця 15

	P значення; 1 ^{ий} - 7 дні	P значення; 1 ^{ий} - 10 дні	Відмінності лікування
T01 v T02	0,0096	0,0276	ТАК
T01 v T03	0,8658	0,6962	НІ
T02 v T03	0,0063	0,0109	ТАК

- 5 [00341] Стосовно % днів, за які метрит був очевидним (тобто VDS > 2) протягом 10 днів після контрольного зараження (Таблиці 16 та 17), є очевидним, що група T02 мала менше аномальних днів, в порівнянні з групами T01 та T03. Крім того, було продемонстровано, що *T. ruodenes* найбільш часто виділявся у корів в групі T03 (дані не показані). Таким чином, ефект вакцини був найбільш помітним в групі T02 (нативний піолізін + ТХО).

Таблиця 16

	% Нормальні дні	
	Тиждень 1	Контрольне зараження дні з 0 до 10
T01	70±6,7 %	75±6,1 % (25 %)
T02	44,3±10,4 %	53,1±9,7 % (46,9 %)
T03	67,2±6,4 %	73,4±5,7 % (26,6 %)

Таблиця 17

	Р значення; 1 ^{го} - 7 дні	Р значення; 1 ^{ий} - 10 дні
T01 v T02	0,0472	0,0594
T01 v T03	0,7712	0,8204
T02 v T03	0,0699	0,0790

[00342] Додаткове дослідження було проведено з метою оцінки ефективності експериментальних метритових вакцин, в нових композиціях ад'ювантів, у вагітних молочних корів. В даному дослідженні вагітних корів вакцинували під час сухого періоду. Ефективність вимірювали протягом перших 10 днів після отелення (пологів).

[00343] Вагітність гольштинських або гольштинських перехресних корів, в їх з 1^{ої} по 3^ю лактацію, були відібрані для дослідження. Всі відібрані корови мали в цілому гарне здоров'я, не було в історії ніякого метриту, та мали відому передбачувану дату отелення. Вони також не мали ніяких ускладнюючих захворювань, та не отримували ніякої хіміотерапії, системного антибіотика, або інших протизапальних лікарських засобів протягом семи (7) днів до і після вакцинації. Тварини, у яких розвивалися клінічно значущі паралельні захворювання в будь-який час під час дослідження були видалені. В ході дослідження, тварини мали досхоchu доступ до корму, щонайменше, 20 годин на кожен 24-годинний період, за єдиним винятком під час доїння. Тварини також мали досхоchu доступ до води протягом всього дослідження.

[00344] Вакцини вводили групам (n=15/група) були як зазначено далі: тварини в T01 отримували 2 мл вакцини, яка містить сольовий розчин; ті, які в T02 отримували 2 мл вакцини, яка містить ISCOMS/Полі І:С+nPLO; ті, які в T03 отримували 2 мл вакцини, яка містить TXO+nPLO; ті, які в T04 отримували 2 мл вакцини, яка містить TXO+Escherichia coli+Trueperella ruogenes+nPLO. (Всі вакцинні антигени були формалін - інактивованими.)

[00345] Після їх прибуття, тварин давали акліматизуватися протягом 7 днів. Приблизно за 2 місяці до отелення (день дослідження 0), тварини отримували першу вакцинацію, підшкірно в ліву сторону шиї, за винятком того, що тварини в групі T02 отримували вакцину інтраназально (Таблиця 18). Через двадцять вісім днів, всі тварини отримували другу вакцинацію, підшкірно в праву сторону шиї (Таблиця 18). Починаючи з першої вакцинації, всі корови були сухими.

Таблиця 18

Група	# Тварин	Лікування	День	шлях
T01	15	Сольовий розчин	0, 28	п.ш., п.ш.
T02	15	ISC + Піолізін (PLO)	0, 28	і.н., п.ш.
T03	15	TXO + Піолізін (PLO)	0, 28	п.ш., п.ш.
T04	15	TXO+E. coli+T. ruogenes + Піолізін (PLO)	0, 28	п.ш., п.ш.

[00346] Починаючи з дня отелення, та тривалістю протягом 21 днів після цього, оцінювали наявність маточних/вагінальних виділень, та якщо присутні, збирали та присвоювали оцінку, де оцінка > 2 показувала наявність метриту. Приблизно 30 мл крові збирали (Дні дослідження 0, 28, та 49), для визначення антитільних відповідей до E. coli, T. ruogenes, та піолізін, застосовуючи ІФА. Будь-які побічні реакції, які не потрапили в межі процедурного збору даних, були задокументовані.

[00347] Первинна змінна була наявністю слизово-гнійного маточного/вагінального виділення; оцінка ≥ 2 буде вказувати на наявність метриту. Лікування вважалося ефективним,

якщо тільки у T01 корів розвивався клінічний метрит, або якщо тривалість слизово-гнійного вагінального виділення (оцінка ≥ 2) була значно коротшою ($p = < 0,1$) в порівнянні з контрольними групами. Якщо присутній, слизово-гнійне виділення збирали після пологів.

[00348] Порівняння були зроблені між лікуваннями в кожному пункті часу. Розраховували середні значення, отримані методом найменших квадратів (зворотньо перетворювали для серологічних даних), їх стандартні похибки, та їх 90 % довірчі інтервали, оцінки параметрів за методом найменших квадратів отримували з аналізу. Діапазони та кількість тварин за даними розраховували для кожної групи лікування в кожному пункті часу.

[00349] Зібрані метритні дані (присутнє вагінальне/маточне виділення, Так/Ні; оцінка вагінального/маточного виділення; клінічні ознаки) підсумовувалися для кожної тварини в кожному пункті часу, та застосовували для визначення частотного розподілу кожної категорії для кожного лікування в кожному пункті часу. Частотний розподіл будь-якої тварини було Нормальне/анормальне (нормальне є оцінкою = 0 або 1; анормальне є оцінкою ≥ 2) для кожної метритної ознаки (наприклад, оцінка вагінального/маточного виділення) підсумовували за лікуванням та точкою часу. Будь-яка тварина мала анормальну оцінку (оцінка ≥ 2) маточного виділення, підсумовану за лікуванням, та аналізували, застосовуючи узагальнену лінійну змішану модель (Proc Glimmix), з біноміальним розподілом похибок та функцією логит-зв'язок. Статистична модель включала фіксований ефект лікування та випадкові ефекти партії, та блок всередині партії. Контрасти були зроблені між групами лікування (це повторювали для кожного варіабельного метриту, описаного в даному параграфі). Якщо Proc Glimmix не сходиться для варіабельного метриту, то точний критерій Фішера використовували замість того, щоб порівнювати групи лікування.

[00350] Тривалість анормальної оцінки (для кожного варіабельного метриту) визначали для кожної тварини, та розраховували як "(остання анормальна точка часу мінус першу анормальну точку часу) + 1". Тривалість анормальної оцінки була встановлена на нуль для тварин, які не мали ніяких точок часу з анормальної оцінки для такого варіабельного метриту. Тривалість анормальної оцінки розраховували як "(остання запланована точка часу колекції даних мінус перша анормальна точка часу) + 1" для тварин, яких видаляли з дослідження перед останньою запланованою точкою часу колекції даних для такого варіабельного метриту. Тривалість анормальної оцінки аналізували за узагальненою лінійною змішаною моделлю з фіксованим ефектом лікування, та випадковими ефектами партії, блоком всередині партії та залишок. Лінійні комбінації оцінок параметрів використовували в а ргіорі контрастах після дослідження для значного ($P \leq 0,10$) ефекту лікування. Порівняння були зроблені між лікуваннями. Середні значення, отримані методом найменших квадратів, їх стандартні похибки, та їх 90 % довірчі інтервали розраховували для кожної групи лікування оцінки параметрів за методом найменших квадратів отримували з аналізу.

[00351] Результати. Всі корови, які народжували близнюків, були видалені з дослідження, оскільки така подія провокувала у корови метрит, та могла спотворити дані. Корів, яких видаляли, включали 6 з контрольної групи T01, 2 кожні з груп T02 та T03, та 1 з групи T04. З решти корів в кожній групі, захворюваність метритом, та розраховували встановлені дні метриту. Як можна побачити в таблиці 19, захворюваність метритом в групах T03 та T04 була чисельно нижчою в порівнянні з іншими групами. Крім того, дані показують, що групи T03 та T04 мали коротшу тривалість метриту в перші 10 днів після отелення, ніж мали тварини в групах T01 та T02. Таким чином, можна зробити висновок про те, що нативний піолізін, будь то самотійно або в комбінації з бактеринами *E. coli* та *T. ryogenes*, коли як ад'ювант є ТХО, є ефективним в зниженні частоти захворюваності природнім метритом у великої рогатої худоби.

Таблиця 19

Група (# тварини)	Захворюваність метритом (%)	Дні оцінки LSM	нижче 90 % CI	вище 90 % CI
T01 (8)	100	5,2	3,6	17,3
T02 (13)	100	6,7	5,1	8,7
T03 (13)	84,6	3,7	2,1	6,2
T04 (14)	78,6	3,5	2,0	5,7

Приклад 5. Вакцини проти маститу у великої рогатої худоби

5 [00352] Бактерин E. Coli J-5 представляє собою відомий антиген для лікування маститу. В даному дослідженні, різні ад'юванти, поєднані з бактеринами J-5 оцінювали щодо анти-маститних ефектів.

10 [00353] Дизайн дослідження є підсумованим в таблиці 20. Отелення відбулося на ~день 49. Зразки крові та молока були взяті в дні нуль, 7, 28, 35, 49, 63, 70 та 84. Корови були контрольно заражені в день 70.

Таблиця 20

Група лікування	Кількість тварин	Лікування	День	Доза	Одиниці дози	Шлях
T01	20	Сольовий розчин	0, 28	5,0	мл	п.ш.
T02	20	Бактерин Escherichia Coli, J-5 штам (ENVIROCOR®)	0, 28	5,0	мл	п.ш.
T03	20	E. coli TXO	0, 28	5,0	мл	п.ш.
T04	20	E. coli VACCIMAX® - CpG	0	2,0	мл	п.ш.
T05	20	E. coli VACCIMAX® - Полі I:C	0	2,0	мл	п.ш.

15 [00354] Тривалість інфекції, викликаной E. Coli в групах T01-T06 була наступною: T01 - 252,1 год., T02 - 213 год., T03-191,6 год., T04 - 190,2 год., T05 - 198,7 год. Обробки VACCIMAX® забезпечували найбільш коротку тривалість інфікування. VACCIMAX® представляє собою емульсію олія-в-воді, яка містить багаточарові ліпоси, в яких антиген є запакованим між двома шарами ліпосои.

20 [00355] Захисні ефекти лікування були також оцінені шляхом визначення стратифікованої пом'якшеної фракції. Чим вищою є стратифікована пом'якшена фракція, тим більший є захисний ефект. Знову ж, препарати з VACCIMAX® мали найбільший ефект (в 13,95 - 17,19 разів більше в порівнянні з контролем), але лікування з TXO також була ефективною (в 6,24 разів більше в порівнянні з контролем).

25 [00356] Загальні антитільні відповіді на специфічну IgG в цільноклітинній сироватці J-5 вимірювали, застосовуючи опосередковане захоплення ІФА. Результати підсумовували в таблицях 21 та 22.

Таблиця 21

контраст	стратифікована пом'якшена фракція	90 % довірчий інтервал
T01 проти T02	2,1	від -14,9 до 33,3
T01 проти T03	13,1	від -15,4 до 62,9
T01 проти T04	30,5	від 6,4 до 47,9
T01 проти T05	36,1	від 7,6 до 68

Таблиця 22

	Точка часу				
	Період 0	Період 1	Період 2	Період 3	Період 4
T01	4996 ^a	6787 ^a	4457 ^a	4049 ^a	16303 ^a
T02	4425 ^a	15106 ^b	12498 ^{bc}	20281 ^c	51040 ^c
T03	4815 ^a	27806 ^c	28982 ^d	27612 ^c	49968 ^c
T04	3465 ^a	17969 ^{bc}	7495 ^{ab}	6318 ^{ab}	22010 ^{ab}
T05	4477 ^a	18012 ^{bc}	18404 ^{cd}	7805 ^b	17626 ^{ab}

5

Період 0 = в день 1 – вакцинація, 1 = в день 28, 2 = в день 49, 3 = перед контрольним зараженням, 4 = кінець контрольного зараження. Групи лікування з однаковими літерами в межах кожної точки часу суттєво не відрізняються при альфа = 0,10

Приклад 6: Neospora Caninum вакцина.

10

[00357] Neospora caninum представляє собою кокцидій паразит, який був ідентифікований як вид в 1988 році. Він є основною причиною самовільного аборту в заражених тварин. Крім того, будучи основною причиною абортів у великої рогатої худоби, неоспороз є значущим захворюванням у собак по всьому світу. Якщо захворювання спіймане рано, собаки можуть бути успішно вилікуваними за допомогою кліндаміцину та інших антипротозойних лікарських засобів.

15

Однак, захворювання часто має смертельні наслідки для маленьких цуценят. Профілактичні вакцини були випробувані на великій рогатій худобі. Інактивована вакцина була комерційно доступною, але мала змішані результати. Жива вакцина з використанням ослаблених N. caninum тахізоїтів була більш успішною, але є більш коштовною у виробництві. В даному дослідженні, автори винаходу визначали ефекти різних ад'ювантів на властивості вакцини проти N. Caninum з використанням N. caninum циклофіліну (NcCYP) та профіліну (NcPro) як антигенів.

20

[00358] Від восьми до 10 тижнів віком самок мишей лінії BALB/c використовували для цього експерименту. Всі тварини були імунізовані двічі з 3-тижневими інтервалами rNcCyP та rNcProf в присутності зазначеного ад'юванта. Через три тижні після другої імунізації, всіх тварин евтанізували та збирали селезінку та кров. NcCyP/NcProf-специфічну спленоцитарну проліферативну відповідь визначали за проліфераційним аналізом (з 3 до 4 дня). NcCyP/NcProf-специфічну спленоцитарну цитокінову відповідь визначали шляхом стимулювання селезінкових макрофагів Neospora антигеном протягом 48 год. та визначали рівні цитокінів в супернатанті, застосовуючи цитокін-специфічний ІФА. Рівні антитіла в сироватці визначали, застосовуючи ІФА. Тварин обробляли як підсумовано в таблиці 23.

30

Таблиця 23

Лікування	Ад'ювант	Кількості (отримані як 2 мл дози та 1/10 ^м 2 мл використовували / миша доза.)	Антиген (Neospora caninum cyclophilin (NcCyP)	Кількість, введена мишам в час, мкл
T01	QCDCRT	Quil-A (250 мкг /2 мл), Холестерин (250 мкг/2 мл), DDA (100 мкг/2 мл), Carbopol (0,075 %об./об./2 мл), R1005 (1,000 мкг/2 мл), CpG (SEQ ID NO: 8; 250 мкг/2 мл)	(100 мкг/2 мл доза)	100
T02	TXO	CpG (SEQ ID NO: 8; 250 мкг/ 2 мл), DEAE-Декстран (100 мг/2 мл), Мінеральна олія (50 %об./об./2 мл), SPAN (1,5 %об./об./2 мл), TWEEN 80 (7 %об./об./2 мл)	NcCyP (100 мкг/2 мл доза)	100
T03	TCMO	CpG (SEQ ID NO: 8; 250 мкг/ 2 мл), Мінеральну олія (50 %об./об./2 мл), SPAN (1,5 %об./об./2 мл), TWEEN 80 (7 %об./об./2 мл), MPLA (25 мкг/2 мл)	NcCyP (100 мкг/2 мл доза)	100
T04	QCDCRTc	Quil-A (250 мкг /2 мл), Холестерин (250 мкг/2 мл), DDA (100 мкг/2 мл), Carbopol (0,075 %об./об./2 мл), R1005 (1,000 мкг/2 мл,) з "Тс" = Химерні-ODN/ORN SEQ ID NO: 14 (250 мкг/2 мл)	NcCyP (100 мкг/2 мл доза)	100
T05	ISCX	ISC=ISCOM (100 мкг/2 мл), DEAE-Декстран (100 мг/2 мл)	NcCyP (100 мкг/2 мл доза)	100
T06	Негативний Контроль	Нормальний сольовий розчин	Н/А	Н/А

[00359] властивості груп лікування, зазначених вище, є підсумованими в таблиці 24.

5

Таблиця 24

	Селезінкові макрофаги, індекс стимуляції (середнє значення+/- SEM)	IFN γ продукування селезінковими макрофагами (пг/мл) (середнє значення+/- SEM)	Загальний IgG, OD в 1:16000 (середнє значення+/- SEM)	IgG2a, OD в 1:2000 (середнє значення+/- SEM)	IgG1, OD в 1:2000 (середнє значення+/- SEM)
T01 (QCDCRT)	8,0+/-7,0	23,0+/-15,3	0,2076+/- 0,0547	0,6155+/- 0,264	0,3823+/- 0,03145
T02 (TXO)	62,9+/-59,0	680,5+/-446,7	0,279+/- 0,06855	0,6742+/- 0,192	0,7675+/- 0,08285
T03 (TCMO)	92,1+/-46,4	961,5+/-205,5	0,2722+/- 0,0581	0,6217+/- 0,3393	0,972+/- 0,199359048
T04 (QCDCRTc)	2,2+/-0,9	18,1+/-15,0	0,10780+/- 0,01125	0,2584+/- 0,03315	0,4404+/- 0,0693
T05(ISCX)	5,4+/-3,6	84,4+/-49,4	0,1313+/- 0,018	0,2255+/- 0,0206	0,6486+/- 0,23585
T06(Контроль)	1+/-2	12,0+/-7,3	0,0778+/- 0,0033	0,18127+/- 0,00959	0,22+/-0,012

[00360] Взяті разом, ці дані демонструють чудові результати, отримані з використанням ТХО та ТСМО.

Приклад 7. Ефекти різних ад'ювантів на імунні відповіді на інфекції статевих шляхів з *Chlamydomphila abortus*

[00361] *C. abortus* є внутрішньоклітинною бактерією, що викликає аборт у овець та кіз. Інфікування зазвичай відбувається під час експозиції наївних вівцематок абортним матеріалом (наприклад, плацентою, рідиною, плодом). Ділянка бактерії була латентною в інфікуванні вівцематок до розведення та протягом середини або пізньої вагітності, вона є присутньою в плаценті та викликає некротичний запалення плаценти навіть незважаючи на антитільну відповідь. Після аборту, вівцематки, як правило, мають імунітет до повторного зараження.

[00362] Вважається, що вакцинація може бути корисною перед впливом оскільки він запобігає первинному інфікуванню та запобігає хоумінгу бактерій до плаценти. Вищий IFNg, пов'язаний з антитільною відповіддю при після-абортному імунітеті, є ключовим корелятом захисту. IFNg також може бути пов'язаним з персистенцією, яку спостерігали у невагітних вівцематок.

[00363] Вівцематки були вакциновані в дні нуль та 28 та проводили контрольне зараження в день 49. Тварин умертвляли в день 63 та проводили некропсію. В день нуль, відбирали вагінальні зразки та зразки цільної крові для qПЛР. Кров відбирали щотижня для серологічних результатів та в дні нуль, 7, 28, та 35 для вимірювання цитокінів та Elispot вимірювання.

[00364] Групи лікування представлені в таблиці 25.

Таблиця 25

Група	Ад'ювант	Композиція
A	ТСМЮО	СрG (SEQ ID NO: 8, 100 мкг/л, р.), Холестерин (100 мкг/л, р.), MPLA (100 мкг/л, р.), Полі І:С (50 мкг/л, р.) загущений 45 % мінеральною олією з 6,3 % SPAN® 80 та QS з TWEEN® 80 (1,45 %) та вода
B	ТСХМО	СрG (SEQ ID NO: 8, 100 мкг/л, р.), Холестерин (100 мкг/л, р.), MPLA (100 мкг/л, р.), DEAE-Декстран (100 мг/л.р.), загущений 45 % мінеральною олією з 6,3 % SPAN® 80 та QS з TWEEN® 80 (1,45 %) та вода
C	ТСМО	СрG (SEQ ID NO: 8, 100 мкг/л, р.), Холестерин (100 мкг/л, р.), MPLA (100 мкг/л, р.) загущений 45 % мінеральною олією з 6,3 % SPAN® 80 та QS TWEEN® 80 (1,45 %) та вода
D	Без ад'юванта (сольовий розчин)	Нормальний сольовий розчин
E	Без вакцинації	Н/А
F	Без інфікування або вакцинації	Н/А

[00365] Антиген отримували з нирки абортного овечого плода та розмножували на клітинах McCoу. Елементарні тіла були очищені центрифугуванням та обробляли ультразвуком. Антиген фіксували на рівні 100 мкг/доза в 0,1 % формальдегідом в 0,9 % хлориді натрію для вакцинації.

Таблиця 26

Група	Серед. OD на день:								
	0	7	14	28	35	42	49	56	63
A	0,055	0,090	0,060	0,192	0,266	0,374	0,314	0,315	0,395
B	0,015	0,052	0,073	0,137	0,204	0,234	0,234	0,364	0,460
C	0,057	0,075	0,065	0,217	0,347	0,494	0,481	0,487	0,584
D	0,040	0,079	0,074	0,034	0,079	0,078	0,074	0,044	0,109
E	0,042	0,082	0,056	0,022	0,038	0,032	0,039	0,008	0,170
F	0,051	0,095	0,055	0,016	0,033	0,029	0,038	0,015	0,033

5 [00366] Серологічні результати отримували, застосовуючи набір Chek-it IFA, та є підсумованими в таблиці 26 вище.

[00367] Визначали рівні експресії IFNg, IL-2 та IL-4 в овечій РВМС, стимульованих Chlamydia AG. Результати представлені в таблиці 27.

Таблиця 27

Рівні експресії IFNg, IL-2 та IL-4 в овечій РВМС, стимульованих Chlamydia AG

Група	IFNg			IL-2			IL-4		
	День 7	День 28	День 35	День 7	День 28	День 35	День 7	День 28	День 35
A	18,08	4,20	10,77	4,79	7,62	8,53	3,26	3,01	1,53
B	1,67	2,05	2,52	4,08	7,35	5,63	2,26	1,12	3,24
C	1,39	1,77	2,61	1,18	1,78	8,09	1,48	0,94	1,09
D	1,58	4,58	2,70	0,87	2,73	3,27	0,64	1,27	1,24
E	2,52	2,42	2,14	2,53	1,95	1,68	1,44	1,38	1,35
F	0,83	1,20	2,05	0,74	3,13	3,71	1,91	2,11	1,47

10 [00368] Відповідь овечих РВМС на антиген Chlamydia abortus є підсумованим в таблиці 28.

Таблиця 28

Відповіді овечих РВМС на антиген Chlamydia abortus

Група	Середні значення SFC x 10 ⁶ клітини			Кратне підвищення		
	День 0	День 28	День 35	День 0	День 28	День 35
A	20,5	50,0	97,0	1,0	12,1	19,5
B	7,5	38,0	14,0	1,0	26,8	14,0
C	1,0	13,0	33,5	1,0	12,8	28,8
D	31,0	49,5	33,5	1,0	33,8	33,8
E	15,5	19,5	6,0	1,0	2,3	0,7
F	10,0	7,0	6,0	1,0	0,8	0,4

15 [00369] Крім того, аналізували кількість білих кров'яних клітин (дані не показані). 2-смуговий ANOVA вказує на те, що Група F мала значно вищу кількість WBC, ніж Група А та В, та що Група Е мала значно вищу кількість WBC кількість, ніж Група В.

[00370] Вузли в час ін'єкцій також аналізували. Як і слід було очікувати, Групи А-С мали більш великі вузли, ніж Групи С-Д. Серед трьох ад'ювантів, які використовували (Групи А-С), Група С мали найбільш великий розмір вузла, з наступною Групою В, з наступною Групою А.

20 [00371] Визначали об'єм вузлів. Знову, групи А-С мали більш великі об'єми вузлів, ніж групи D-F. Серед груп А-С, Група А мала найменший об'єм. Вузли в Групах А та В мали більші крововиливні та/або некротичні тканини. Вузли в Групі С мав більший фіброз. Клітинні характеристики є аналогічними у всіх трьох вузлів, хоча Група С може мати більш лімфоцитарний компонент.

Приклад 8. Додавання алюмінію до ТХО давало в результаті покращену стабільність

[00372] На даний момент ТХО змішаний препарат містить 50 мг/мл DEAE Декстран. Декстран, коли він присутній у високих концентраціях у підшкірних ін'єкціях, може викликати реакції в місцях ін'єкції у тварин. Отже, пропонується спробувати різні концентрації для DEAE Декстрану, щоб перевірити, якщо безпека та гарне терапевтичне значення можуть отримувати без шкоди для стабільності вакцинного препарату.

[00373] Дослідження характеристики та стабільності є важливими, оскільки вони повідомляють нам про те, чи дана вакцина може бути сформульована послідовно та з гарним терміном придатності для виготовлення. Дослідження в'язкості проводять в діапазоні швидкостей зсуву для того, щоб шукати зменшення в'язкості при зсуві (різке зниження динамічної в'язкості, оскільки швидкість зсуву йде вгору) або потовщення зсуву (збільшення динамічної в'язкості, оскільки швидкість зсуву йде вгору), що є характеристикою потоку неньютоновських рідин. Шприц силові випробування проводяться, щоб гарантувати, що вакцина буде легко витягатися та легко вводиться через велику кількість доз в області.

[00374] Оскільки не очікувалось, що імуностимулюючий олігонуклеотид змінить стабільність препарату, його не додавали до ад'ювантних сумішей в даному прикладі. AXO (Алюмінію + Декстран + Олія) змішують з різними REHYDRAGEL® (від 5 % до 16 %), та концентрації DEAE Декстрану (50 мг/мл - 10 мг/мл) формулюють для дослідження на в'язкість, шприцеву силу та осадження, застосовуючи XO (Декстран + Олія) суміш як контроль. Досліджувані композиції були наступними:

[00375] Приблизно 10 мл зразка завантажували в кожну з п'яти 15-мл центрифужні пробірки Corning та залишили ще протягом тижня для того, щоб спостерігати за впливом на прискорене осідання емульсій через вузькі розміри пробірок та конічне дно. Зразки також досліджували на здатність проходження через голку шприца та в'язкість. Результати наведені нижче.

Таблиця 29

LOT	Водна фаза				Органічна фаза	
	DEAE Декстран	REHYDRAGEL® 2 % мас./об. Al ₂ O ₃	TWEEN80	10 mM PBS	Мінеральна Олія	SPAN 80
124008-65	50 мг/мл	0	1,45 % об./об.	q,s	45 % об./об.	6,3 % об./об.
124008-95	50 мг/мл	5 % об./об.	1,45 % об./об.	q,s	45 % об./об.	6,3 % об./об.
124008-83	20 мг/мл	10 % об./об.	1,45 % об./об.	q,s	45 % об./об.	6,3 % об./об.
124008-89	10 мг/мл	16 % об./об.	1,45 % об./об.	q,s	45 % об./об.	6,3 % об./об.

[00376] Ці дані вказують на те, що при піддаванні дії прискореному осадженню в центрифужних пробірках, суміш з 16 % REHYDRAGEL® є найбільш стабільним. Крім того, з попередньої роботи авторів винаходу, було відомо, що більш висока концентрація DEAE Декстрану є пов'язаною з більш високими в'язкостями та можливим розрідження при зсуві. Результати даних експериментів показують, що додавання REHYDRAGEL® є більшими, ніж компенсуються очікувані втрати в'язкосних при зсуві (псевдопластичні рідини) властивостей, що надаються DEAE Декстраном. Крім того, спостерігалось, що хоча 16 % REHYDRAGEL® препарат мав більш високу шприцеву силу, було не помітно, що його важче ін'єкційно вводити (шприцева сила для води становить 3 Н).

Таблиця 30

Lot	В'язкість (сП)	Шприцева сила (Ньютон)	Спостереження осадження (День 7)
124008-65	180	6,5	Тонкий шар водної фази спостерігався зверху
124008-95	160	6,5	Спостерігалось незначне осадження
124008-83	180	6,5	Тонкий шар водної фази спостерігався зверху
124008-89	180	7,5	Ніякого осадження не спостерігалось

5 [00377] Із загальних даних, є очевидним, що суміш з 16 % REHYDRAGEL® та 10 мг/мл DEAE Декстрану є оптимальною для застосування в вакцинних препаратах, особливо тих, які вимагають зв'язування вільного ендотоксину та/або де більший термін придатності емульсії може бути потрібним.

Приклад 9. BRV, BCV та E coli антигени

10 [00378] В даному прикладі, автори винаходи досліджують застосування ад'ювантів за представленим винаходом в вакцинах проти ентериту. Ентерит спричиняється бактеріальними, вірусними та/або паразитарними інфекціями. Велика рогата худоба, зокрема, новонароджені молочні та м'ясні телята є вразливими до проносу телят, тому що вони піддаються дії багатьох стресів протягом перших декількох годин життя, коли їх імунні системи повністю не є розвиненими. Втрата рідини через пронос телят в результаті призводить до дегідратації та часто до смерті. Тварини, які переживають пронос телят, часто залишаються слабкими та

15 погано працюють протягом усього свого життя. Агенти, пов'язані з проносом, включають бактерії, зокрема, E. coli K99 та F41, та віруси, такі як бичачий коронавірус (BCV) та бичачі ротавірус (BRV).

20 [00379] Гольштинські бички віком десять місяців використовували в даному дослідженні. Тварини були серонегативними або мали низькі титри щодо E coli (K99 та F41), BRV (B223 та Lincoln) та BCV.

[00380] Групи лікування були наступними:

Таблиця 31

Група	N	Антиген	Ад'ювант	Кількості на дозу	Шл.	Об'єм (мл)
T01	10	Сольовий розчин	N/A		п.ш.	2
T02	10	ROTAVEC® (E coli K99, BRV G6 та BCV	Мінеральна Олія + Алюмокалієвий галун	NA (комерційний продукт)	в.м.	2
T03	10		Quil A + Холестерин + REHYDRAGEL® (15 % об./об., 2 % Al ₂ O ₃ мас./об.) + CpG (SEQ ID NO: 8)	Quil-A (500 мкг/2,5 мл доза), Холестерин (200 мкг/2,5 мл доза), REHYDRAGEL® (15 % об./об.), CpG (100 мкг/2,5 мл доза)	п.ш.	2.5
T04	10	E. coli K99/F41; BRV G6/G10, BCV (всі інактивовані)	Quil A + Холестерин + REHYDRAGEL® (15 % об./об., 2 % Al ₂ O ₃ мас./об.) + CpG (SEQ ID NO: 8) + AMPHIGEN®	Quil-A (500 мкг/2,5 мл доза), Холестерин (200 мкг/2,5 мл доза), REHYDRAGEL® (15 % об./об.), CpG (100 мкг/2,5 мл доза), Amphigen (2,5 % об./об.)	п.ш.	2.5

Продовження таблиці 31

T05	10		TXO+REHYDRAGEL® (15 % об./об., 2 % Al ₂ O ₃ мас./об.)	СрG (100 мкг/5 мл доза), DEAE-Декстран (100 мг/5 мл доза), Мінеральну Олія (45 %об./об.), Span (6,3 %), Tween (1,45 %об./об.)	п.ш.	5
T06	10		TO+REHYDRAGEL® (15 % об./об., 2 % Al ₂ O ₃ мас./об.)	СрG (100 мкг/5 мл доза), Мінеральна Олія (45 %об./об.), Span (6,3 %), Tween (1,45 %об./об.), REHYDRAGEL®(15 %)	п.ш.	5

- 5 [00381] Зразки крові збирали кожні 21 днів протягом шести місяців для серології. Реакції місця ін'єкції вимірювали в дні 0 (перед вакцинацією), 1, 2, 3, 7, 14, 21 та кожні 21 днів після цього. Відповіді на E. coli K96, E coli F41, BRV Lincoln, BRV B223 та BCV вимірювали шляхом кількісного визначення титру антитіл у вибрані дні. Результати є підсумованими нижче (різні літери вказують на відмінності при $\alpha=0,1$):

Таблиця 32

	Середньо геометричні титри проти вірусів (LSM)								
	BRV G6 (Lincoln) Титр мішені >1255			BRV G10 (B223), Титр мішені >1472			BCV, Титр мішені >1107		
	День 0	День 21	День 189	День 0	День 21	День 189	День 0	День 21	День 189
T01	142,1 _b	208,1 ^a	152,3 ^a	430,5 _a	512,1 ^a	588,5 ^a	238,9 ^a	430,6 ^a	548,8 ^a
T02	129,2 _b	750,5 ^b	349,9 ^b	530,1 _a	1024,2 ^b	675,7 ^{ab}	349,8 ^b	5997,1 ^b	1398,9 ^b
T03	140,2 _b	3649,6 _c	533,9 ^b	532,2 _a	2681,9 ^c	985,6 ^{ab}	348,4 ^{ab}	7299,1 ^{bc}	1106,1 ^b
T04	91,4 ^{ab}	3128,8 _c	575,0 ^b	492,7 _a	3511,8 ^{cd}	1064,3 ^b	298,8 ^{ab}	7023,0 ^{bc}	1448,3 ^b
T05	81,8 ^{ab}	4705,6 _c	1498,9 _c	494,6 _a	9089,6 ^e	2998,6 ^c	326,3 ^{ab}	10085,5 _c	2521,6 ^c
T06	39,1 ^a	2682,1 _c	4706,4 _d	456,2 _a	6020,2 ^{de}	4683,8 ^c	237,2 ^a	9556,2 ^c	2298,9 ^c

- 10 [00382] Лікування T05 та T06 в результаті призводило до найвищих титрів антитіла з дня 21 до кінця дослідження (день 189). Слід зазначити, що комерційна вакцина (ROTAVEC®) не давала гарні результати, а також T05 та T06 в індукції антитіл проти вірусних компонентів ентериту.

Таблиця 33

Група	Середньо геометричні титри проти анти-Е. coli							
	антиген Е. coli K99 pilus (мішень >742)				антиген Е coli F41 pilus (невизначена мішень)			
	День 0	День 21	День 106	День 189	День 0	День 21	День 106	День 189
T01	35 ^a	36 ^a	82 ^a	44 ^a	187 ^a	152 ^a	142 ^a	66 ^a
T02	41 ^a	349 ^b	4386 ^c	2986 ^c	152 ^a	12801 ^c	6970 ^d	4223 ^e
T03	43 ^a	588 ^{bc}	686 ^b	467 ^b	200 ^a	3200 ^b	467 ^b	200 ^b
T04	50 ^a	588 ^{bc}	1089 ^b	686 ^b	147 ^a	3734 ^b	800 ^b	400 ^{cd}
T05	50 ^a	1056 ^d	3200 ^c	2986 ^c	264 ^a	12801 ^c	1600 ^c	607 ^d
T06	54 ^a	864 ^{cd}	3456 ^c	1601 ^c	216 ^a	1600 ^b	800 ^b	234 ^{bc}

5 [00383] Лікування T02 та T05-T06 давала результати аналогічно гарні, викликаючи відповідь проти К 99. Лікування T02 викликало найкращу відповідь до Е. coli F41. Лікування T05 було другим найбільш ефективним у викликанні відповіді до такого антигену.

10 [00384] Взяті разом, ці дані демонструють, що T05 та T06, як видається, є найбільш перспективними препаратами. Обидва мають доставлені відповіді мішені IgG для декількох фракцій на день 189. Обидва T05 та T06, як представляється, забезпечують вищу або еквівалентну серологічну ефективність в порівнянні з ROTAVEC® (T02, IM) шляхом п.ш. введення. T03 та T04 зберігали підвищені серологічні титри за коротші терміни, ніж T05 та T06. З одиначною дозою вакцинація T03, T04, T05 та T06 доставляла вищі цільові титри рівнів в сироватці для BRV G6, BRV G10 та BCV. З одиначною дозою вакцинація T04, T05 та T06 доставляла вищі цільові титри рівнів в сироватці для Е. coli K99. T04, T05 та T06 зберігали антивірусні титри в сироватці вищі за цільові рівні протягом 6 місяців. T05 та T06 зберігали титри анти-Е. coli K99 в сироватці вищі за цільові рівні протягом 6 місяців. Всі оцінені препарати продемонстрували достатню безпеку в гольштинських бичків.

20 [00385] Ректальні температури вимірювали в дні нуль, 1, 2 та 3. В той же час були статистично значущі відмінності між групами T01 (контроль) та групами T02-T06, відмінності в температурах (LSM) не були великими (в межах одного градуса F).

Таблиця 34

*	День 000	День 001	День 002	День 003
T01	101,1 ^a (38,4)	102,2 ^{ab} (39,0)	102,0 ^a (38,9)	102,3 ^b (39,1)
T02	101,7 ^b (38,7)	102,6 ^{abc} (39,2)	102,2 ^{ab} (39,0)	101,8 ^a (38,8)
T03	101,8 ^b (38,8)	102,7 ^{bc} (39,3)	102,2 ^{ab} (39,0)	101,9 ^a (38,8)
T04	101,3 ^{ab} (38,5)	102,8 ^c (39,3)	102,0 ^a (38,9)	102,0 ^{ab} (38,9)
T05	101,7 ^b (38,7)	102,3 ^{abc} (39,1)	102,5 ^b (39,2)	102,4 ^b (39,1)
T06	101,6 ^{ab} (38,7)	102,1 ^a (38,9)	102,4 ^b (39,1)	102,1 ^{ab} (38,9)

25 [00386] Попереднє дослідження препаратів у вагітних молочних корів продемонструвало безпеку. Групи T01, T03 та T05 досліджували, 5 корів в кожній групі. Тринадцять з 15 корів отелилися, 12 телят були нормальними, один був мертвонародженим.

Приклад 10. Анти-Tick вакцина.

Експериментальний дизайн

[00387] Досліджували два вакцинних препарата на основі антигену Bm86. Один препарат містив водний ад'ювант (QCDCRT) та інший ад'ювант на олійній основі (TXO), як підсумовано нижче.

5

Таблиця 35

Група	Антиген	Ад'ювант	Кількості інгредієнтів
T01	H/A	Не має	H/A
T02	Rhipicerphalus microplus (раніше Boophilus) очищений rBm86 протеїн (вихідний, 1,16 мг/мл)	QCDCRT	250 мкг Quil-A, 250 мкг Холестерин, 100 мкг DDA, 0,0375 % Carbopol, 1,000 мкг R1005, 100 мкг SEQ ID NO: 8
T03		TXO	100 мкг SEQ ID NO: 8 /100 мг DEAE-Декстран в мінеральній олії (45 %), SPAN® 80(6 %) та TWEEN® 80 (1,45 %)

[00388] Двадцять чотири телят рандомізовано розподіляли в одну з трьох груп лікування по вісім телят кожна. Телят з кожної групи лікування індивідуально вакцинували 2сс або одним з двох Bm86+композицію ад'юванти або сольовий розчин (контроль група). Вакцинації здійснювали в день 0 та 28. В день 41, велику рогату худобу поміщали в підпірку, та в день 42 інфікували 250 мг личинки R. annulatus. Кліщів, яких використовували в даному дослідженні, спочатку збирали з ранчо в Val Verde County, Texas. Всі відщеплені наповнені дорослі самки збирались щодня з індивідуальних телят на 63-84 день. Телята були видалені з підпірку на день 85. Зібраних кліщів підраховували та аж до 10 з кожного теляти зважували та поміщали в кліматичну камеру кожен день збору протягом 13 днів. Відпрацьовані самки були відкинуті через 14 днів після збору та масу отриманого яйця зважували. Через чотирнадцять днів після першого вилуплення, кількість вилуплених та інтактних яєць реєстрували та розраховували визначений відсоток вилуплення. Перед кожною ін'єкцією вакцини та протягом наступних трьох днів після ін'єкції, перевіряли місце ін'єкції у кожного теляти щодо припухлостей, та вимірювали ректальні температури. Сироватку крові збирали з кожного теляти в дні -7, 0, 14, 28, 42, та 85 для визначення титрів Bm86 антитіла протягом усього дослідження як визначали, застосовуючи ІФА.

Результати

[00389] Попередні результати показують 98,6 та 99,6 % контроль з T02 та T03 препаратів, відповідно, який є значно вищим, ніж T01. Дані розрахунки відсоткового контролю враховують тільки зниження маси наповнених самок та маси яєць. Зниження відсотку вилуплення будуть визначати в більш пізній термін та додаватимуть до кінцевих результатів. Одне з 24 телят в дослідженні дає невелику припухлість після кожної ін'єкції (препарат, який містить олійний ад'ювант). Припухлості є меншими, ніж 10 см в довжину та 3 см в ширину. Припухлості є м'якими та не здаються болючими для тварини. Не відбувалося підвищення ректальної температури у оброблених тварин протягом усього дослідження.

[00390] Серологічні результати демонструють статистично значущі відмінності між кожною з обробок у відповідні тимчасові точки за винятком тих, які не мали ніякої статистичної значущості ($p=0,114$) між обробками QCDCRT та TXO в точку часу день 14. Як QCDCRT, так і TXO ефективно підвищують титри Bm86 антитіла в кожній точці часу, які досліджували. TXO був кращим за QCDCRT ($p<0,05$) в кожену точку часу, яку досліджували, за винятком дня 14 ($p=0,114$).

Таблиця 36

Група	N	Титр антитіла Bm86, Зворотне перетворений середній за методом найменших квадратів (Середнє \pm SEM)			
		День 14	День 28	День 41	День 83
T01	8	100 \pm 46,42	100 \pm 31,52	100 \pm 17,05	100 \pm 17,31
T02	8	2018 \pm 937	1179 \pm 372	13532 \pm 2308	4082 \pm 707
T03	8	5956 \pm 2765	8404 \pm 2649	28557 \pm 4870	18638 \pm 3227

40 Приклад 11. Захворювання ящура (морські свинки)

[00391] Мета даного дослідження полягала в тому, щоб порівняти гуморальні імунні відповіді у морських свинок, вакцинованих тривалентними FMD доповненими з ад'ювантами вакцинами, з різними композиціями ад'ювантів. Морських свинок вакцинували в дні нуль та 28 як підсумовано в таблиці 37.

5 [00392] В кожній дозі T03-T07, антиген представляв собою комбінацію з FMVD типу O (9 мкг), A (5 мкг) та Asia1 (5 мкг/мл). Антигенна композиція в T02 є власною інформацією виробника та, таким чином, була недоступною.

[00393] Зразки крові збирали для серологічного дослідження в дні -3, 25 та 53. Титри сироватки антитіл проти серотипів O, A та Asia 1 є підсумованими нижче.

10 [00394] В той час як відповіді проти серотипів O та A були низькими навіть в позитивній контрольній групі (T02), відповідь проти Asia 1 була вищою в T07 (TXO ад'ювант), ніж в групі позитивного контролю, та більше, ніж в будь-якому іншому лікуванні. Низькі відповіді проти серотипів O та A можуть бути загнаними в присутності низьких рівнів O та A антигенів в препараті.

15 [00395] Слід зазначити, що на основі ліпосом групи VACCIMAX® (T03-T05) не демонстрували значної відповіді проти будь-яких антигенів (O, A, Asia1).

Таблиця 37

Група	N	Ад'ювант/Інгредієнти		Дні лікування	Доза	Шлях
T01	24/22	Сольовий розчин		0, 28	0,2 мл	в.м.
T02	24/24	Комерційні вакцини- Raksha моновалентні FMDV вакцини (vet) (позитивний контроль)	Власний патентований засіб	0, 28	0,2 мл	в.м.
T03	23/22	VACCIMAX® S100/полі І:С	S100/Холестерин, 12 %мас./об. (60 мг/доза)/Полі І:С 100 мкг/доза вода в олії, 50 % водні ліпосоми + 50 % Marcol 52 / Montanide 888	0, 28	0,2 мл	в.м.
T04	23/23	VACCIMAX® S100/Pam3Cys	Proprietary	0, 28	0,2 мл	в.м.
T05	23/22	VACCIMAX® (Biolipon 95) /Pam3Cys	VacciMax Biolipon 95, 100 мкг/ Полі І:С/л.р., вода в олії, 50 % водного ліпосоми + 50 % Marcol 52 / Montanide 888	0, 28	0,2 мл	в.м.
T06	24/24	QCDCRT (80 % об'єм)	250 мкг Quil-A, 250 мкг Холестерин, 100 мкг DDA, 0,0375 % Carbopol, 1 000 мкг R1005, 100 мкг SEQ ID NO: 8	0, 28	0,2 мл	в.м.
T07	24/23	TXO (80 % об'єм)	100 мкг SEQ ID NO: 8; 100 мг Декстран DEAE, 45 % мінеральна олія, 6,3 % SPAN®80, 1,45 % TWEEN®80, QS вода	0, 28	0,2 мл	в.м.

N позначає кількість тварин, що прожили протягом першого/другому вакцинація

Таблиця 38

Група	Титри серотипу O SN, Середньо геометричний титр			Титри серотипу A SN, Середньо геометричний титр			Титри серотипу Asia1 SN, Середньо геометричний титр		
	День - 3	День 28	День 56	День - 3	День 28	День 56	День - 3	День 28	День 56
T01	4	4	4,1	4	4	4	4	4,1	4,1
T02	4	9,6	49,9	4	7	14,1	4	14	266,9
T03	4	4,8	13,8	4	4,1	9	4	5,9	24,3
T04	4	4,1	10,3	4	4,5	5,8	4	4,3	9,7
T05	4	4,1	8,1	4	4,5	4,7	4	4,3	13,6
T06	4	4,1	5	4	4	4	4	4,2	5,1
T07	4	5	9	4	5,6	43,1	4	19,8	320,8

Приклад 12. Захворювання ящуру (Велика рогата худоба)

- 5 [00396] В даному дослідженні, визначали ефект різних ад'ювантів, які використовували в вакцині проти FMD в моделі контрольного зараження. Досліджували три ад'юванти. Вакцина представляла собою ARS експериментальна вакцина проти FMD в моделі контрольного зараження, яка розроблена PIADC. FMD-LL3B3D-A24 Cruzeiro використовували як антигенний компонент вакцини (10 мкг), та немутантний тип FMDV A-24 Cruzeiro використовували як вірус
- 10 контрольного зараження. Антиген був описаний раніше, наприклад, в US 20120315295 (Rieder et al, подана 9 червня 2011 та опублікована 13 грудня 2012). Коротко кажучи, FMD-LL3B3D-A24 Cruzeiro містить генетично модифікований FMDV (Вірус Захворювання Ящуру). FMDV є генетично модифікованим, тобто, який представляє собою безлідерний вірус, який містить делецію лідерного (Lpro) протеїну, який кодує ділянку таким чином, що FMD віруси, які втратили
- 15 даний протеїн є ослабленими у великої рогатої худоби та свиней. Крім того, він містить мутації (негативні маркери), введені в два неструктурні вірусні протеїни, що в результаті призводить до ліквідації двох антигенних епітопів, які розпізнаються специфічними антитілами, один, розташований в протеїні 3B, та інший в протеїні 3D (замінені на відповідну послідовність бичачого ріновірусу, що служить як негативний антигенний епітоп в даних протеїнах), таким
- 20 чином, забезпечуючи дві можливих мішені для DIVA (диференціація природно інфікованих з вакцинованих тварин) серологічні тести.

- [00397] Від чотирьох до семи корів використовували в кожній групі. Загальний об'єм ін'єкції становив 2 мл. Тварини були вакциновані в день нуль шляхом в.м. ін'єкції (2,0 мл на дозу) та проводили контрольне зараження в день 21 інтрадермальним шляхом немутантним типом
- 25 FMDV. Клінічні оцінки виставляли в дні 0, 3, 7 та 10, відповідно, до наступної шкали: без клінічних ознак: 0, везикулярні ураження стопи: 1 бал за кожне ураження стопи. Максимальний бал дорівнює 4. Результати експерименту полягають в наступному:

Таблиця 39

Група	Ад'ювант	Деталі/На дозу	Середня клінічна оцінка			
			День 0	День 3	День 7	День 10
T01	Сольовий розчин	Н/А	0	3,0	3,5	4,0
T02	MONTANIDE®ISA 206 VG	ад'ювант на основі мінеральної олії, яка була розроблена для виробництва емульсій вода-в-олії-в-воді (W/O/W). Вона містить високий клас здатності для ін'єкційного введення мінеральної олії та високо очищений емульгатор отримували з маніту та очищену олеїнову кислоту рослинного походження. MONTANIDE® ISA 206 VG не містить інгредієнтів тваринного походження. Точна композиція є власністю виробника (Seppic Inc)	0	0	0	0
T03	QCDCRT (80 % об'єм)	250 мкг Quil-A, 250 мкг Холестерин, 100 мкг DDA, 0,0375 % Carbopol, 1 000 мкг R1005, 100 мкг SEQ ID NO: 8	0	1,14	2,86	2,43
T04	TXO (80 % об'єм)	100 мкг SEQ ID NO: 8 /100 мг DEAE-Декстран в WO емульсії	0	0	0	0

[00398] Відмінності між T01 та T02 та між T01 та T04 були статистично значущими.

- 5 [00399] З наведеної вище таблиці, можна зробити висновок про те, що, щонайменше, на підставі клінічних показників, ад'юванти TXO та MONTANIDE®ISA 206 VG мають приблизно однакову ефективність. Однак, серологічні аналізи щодо вимірювання сироватки, які нейтралізують активність проти FMDV-A24, демонструє, що група T04 (ад'ювант TXO) мали більш високі титри, ніж в групі T02 (MONTANIDE®ISA 206 VG).

10

Таблиця 40

Середні титри нейтралізації сироватки за методом найменших квадратів (зворотньо перетворювані)

	Точка часу			
	День 0	День 7	День 14	День 21
T01	0,45 ^a	0,45 ^a	0,45 ^a	0,45 ^a
T02	0,45 ^a	1,60 ^c	1,13 ^c	1,20 ^b
T03	0,45 ^a	1,10 ^b	0,66 ^b	0,61 ^a
T04	0,45 ^a	2,21 ^d	2,21 ^d	2,21 ^d

Різні букви вказують статистично значуща відмінність ($p \leq 0,05$)

- 15 [00400] Дані результати демонструють, що TXO ад'ювант був здатний забезпечити 100 % захист проти контрольного зараження FMD, викликаного агентом у великої рогатої худоби та надають більш високі титри антитіла, ніж контрольний сольовий розчин та інші два ад'юванти, які досліджували.

- 20 [00401] Кількість РНК FMDV (копій на мл) визначали в назальних мазках та в сироватці. Дані представлені в таблицях 41-44. Коротко кажучи, ці дані демонструють, що групи T02 та T04 в результаті дають менші кількості FMDV в назальних мазках. Серед T02 та T04, слід зазначити,

що тварини в групі T04 демонстрували більш раннє зменшення (або відсутність збільшення) FMDV RNA кількості, таким чином, знову демонструючи кращі властивості ад'юванта ТХО.

Таблиця 41

FMDV в назальних мазках ("зниження маси" FMDV РНК копію на мл вимірювали, застосовуючи ВРЧ-ПЛР; середні LS)

	Точка часу										
	День 21	День 22	День 23	День 24	День 25	День 26	День 27	День 28	День 29	День 30	День 31
T01	1,35	1,75	6,16	7,09	6,88	6,13	5,19	4,98	2,51	1,81	1,35
T02	1,35	1,49	4,63	5,31	5,62	4,14	2,21	1,84	1,58	2,66	1,83
T03	1,35	1,92	3,54	4,66	5,39	5,27	3,12	1,87	1,56	1,84	1,84
T04	1,35	1,59	3,97	5,05	4,47	3,75	2,31	1,61	1,56	2,58	1,55

5

Таблиця 42

Статистична значимість (назальні мазки)

	P<=0,05?										
	День 21	День 22	День 23	День 24	День 25	День 26	День 27	День 28	День 29	День 30	День 31
T01 пр T02	Ні	Ні	Так	Так	Ні	Так	Так	Так	Ні	Ні	Ні
T01 пр T03	Ні	Ні	Так	Так	Ні	Ні	Так	Так	Ні	Ні	Ні
T01 пр T04	Ні	Ні	Так	Так	Так	Так	Так	Так	Ні	Ні	Ні
T02 пр T03	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні
T02 пр T04	Ні	Ні	Ні	Ні	Так	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні
T03 пр T04	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні	Так	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні

Таблиця 43

FMDV в сироватці ("Viremia", FMDV RNA число копій на мл вимірювали, застосовуючи ВРЧ-ПЛР; середні LS)

	Точка часу										
	День 21	День 22	День 23	День 24	День 25	День 26	День 27	День 28	День 29	День 30	День 31
T01	1,35	6,85	8,67	8,56	5,96	3,91	1,77	1,35	1,35	1,35	1,35
T02	1,35	1,58	1,57	1,75	1,83	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35
T03	1,35	3,84	3,77	3,20	2,72	1,82	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35
T04	1,35	1,59	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35

Таблиця 44

Статистична значимість (сироватка)											
	P<=0,05?										
	День 21	День 22	День 23	День 24	День 25	День 26	День 27	День 28	День 29	День 30	День 31
T01 пр T02	Ні	Так	Так	Так	Так	Так	Так	Ні	Ні	Ні	Ні
T01 пр T03	Ні	Так	Так	Так	Так	Так	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні
T01 пр T04	Ні	Так	Так	Так	Так	Так	Так	Ні	Ні	Ні	Ні
T02 пр T03	Ні	Так	Так	Так	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні
T02 пр T04	Ні	Ні	Ні	Так	Так	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні
T03 пр T04	Ні	Так	Так	Так	Так	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні

Приклад 12: ТХО активує клітинно-опосередкований імунітет

- 5 [00402] Тоді як всі тварини в групі T01 демонстрували лихоманку після контрольного зараження, жодна з тварин в групі T04 не мала лихоманки. Відповіді в групах T02 та T03 були суперечливі (деякі тварини демонстрували лихоманку та деякі ні). Дане спостереження підтверджує висновок загальної переваги ТХО в порівнянні з іншими ад'юванти, які використовували в даному дослідженні.

10 Приклад 13: ТХО активує клітинно-опосередкований імунітет

- [00403] Застосовуючи FMD як ілюстративний антиген в тваринній моделі, описаний в попередньому прикладі, аналізували ефект ад'ювантів на клітинно-опосередкований імунітет. Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) були очищені від бичачої цільної крові, зібраної в дні 4, 7, 14 та 21 після вакцинація. FMDV-специфічні Т клітинні проліферативні
- 15 відповіді оцінювали, застосовуючи фарбування діацетатом карбоксифлуоресцеїну суцїнімідилового складного ефіру (CFSE).

[00404] Результати представлені в таблиці 45.

Таблиця 45

Індекс проліферації (Середнє значення \pm SD)

Лікування/День	День 4	День 7	День 14	День 21
T01	1 \pm 0	1,22 \pm 0,365	1,12 \pm 0,070	0,965 \pm 0,144
T02	1 \pm 0	1,633 \pm 1,046	1,813 \pm 0,860	4,473 \pm 4,012
T03	1 \pm 0	1,769 \pm 0,877	1,850 \pm ,980	1,549 \pm 0,608
T04	1 \pm 0	1,589 \pm 0,682	2,667 \pm 1,424	6,757 \pm 4,653

- 20 [00405] Ці дані демонструють кращий ефект ТХО на клітинно-опосередкований імунітет як на 14-й день, так і на день 21. Ці дані також показують, що, оскільки клітинно-опосередкований імунітет відповідає за тривалість поза імунітетом, ад'ювант ТХО можливо може забезпечити більшу тривалість імунітету, ніж MONTANIDE®ISA 206 VG.

25 Приклад 14. Одержання антитіл для застосування в діагностиці

- [00406] Ад'ювант ТХО за представленим винаходом використовували для одержання антитіл для застосування в діагностиці. Коротко кажучи, тваринні джерела були імунізовані кожні 2-4 тижні препаратами, які містять вибрані рекомбінантні антигени з доданням як ад'ювант ТХО, композиція з якого була наступною: SEQ ID NO: 8 - 125 мкг; DEAE декстран - 125 мг; Мінеральна олія - 46,56 % об./об. препарату; TWEEN® 80 - 1,5 % об./об. препарату; SPAN®80-6,518 % об./об. препарату.

[00407] Кінцевий об'єм становив 2 мл.

[00408] Спостерігалися видимі реакції в місці ін'єкції після ін'єкції, але знаходились в межах очікуваного розміру реакцій. На підставі щоденних спостережень, реакції, які спостерігалися по ребрах, як виявилось, не були болючими для кіз.

5 [00409] Зразки крові збирали через 2-3 тижні після кожної імунізації, та проводили різні аналізи, щоб оцінити титр антитіла. Серологічний титр за ІФА більше 1000 визнавався достатнім, щоб починати збирати антитіла.

10 [00410] У тварин брали кров щотижня (7,5 % об'єму крові на основі маси тіла). Після закінчення дослідження, кіз евтанізували термінальним кровопусканням, та дану кров також збирали для збору антитіл. За необхідності або тварин переорієнтовували для додаткових досліджень.

Таблиця 46

Короткий опис повних досліджень отримання козиних поліклональних реагентів

Антиген	Кількість (мкг)/ доза	Тваринне джерело (N)	Джерело АВ	Загальний об'єм зібраної сироватки	Імунізації, N	Коментарі
FeLV gp70	100-150 мкг	Коза (6)	Сироватка, молоко*	26,7 л сироватки, 300 л молока	15	У всіх кіз досягався титр понад 2000000 [#]
Histophilus somni (H. somni) p31 протеїн	150 мкг	Коза (4)	Сироватка	4,84 л	8	У всіх кіз досягався титр понад 2500000. Дві досягали титр понад 5000000
Протеїн бичачого парагриповірусу-3 (BPI-3) HN	61,8 мкг	Коза (4)	Сироватка	3,19 л	4	У всіх кіз досягався титр понад 2000. Три кози досягали титр понад 8000
rBVD1 E2 (gp53)	150 мкг	Коза (4)	Сироватка	3,93 л	3	У всіх кіз досягався титр понад 100000. Одна коза стабільно мала титри понад 1200000
Антиген собачого цирковірусу	150 мкг	Коза (4)	Сироватка	4,51 л	4	У всіх кіз досягався титр понад 500000. Дві досягали титр понад 2000000
Протеїн Bordetella FHA	100 мкг	Коза (4)	Сироватка	2,57 л	4	У всіх кіз досягався титр понад 800 000. Дві досягали титр понад 4 000 000

Продовження таблиці 46

Parapoxvirus (інактивованій)	150 мкг	Коза (4)	Сироват- ка	1,35 л	6	У всіх кіз досягався титр понад 40000
---------------------------------	---------	----------	----------------	--------	---	---

* У однієї кози в групі розвинулась псевдовагітність та лактація. 300 л молока зібрали з цієї кози.

5 # Титри, виведені з проведених аналізів ІФА. У той же час титри кінцевої точки не були зазначені, та сироватку не розбавляли достатньо, щоб визначити кінцеву точку.

10 [00411] Сироватка антитіл для FeLV gp70 була успішно очищена, застосовуючи або Протеїн А, або Протеїн G фірмові колонки, для невеликого масштабу очищення, або Протеїн G хроматографію для великомасштабного очищення, в Maine Biotechnology Services (MBS), Portland, ME. Поліклональні антитіла концентрували, застосовуючи Millipore 30K Ultra Filter Units до кінцевої концентрації приблизно 1 мг/мл. Антитіла проти інших антигенів, розкриті в таблиці 46 не очищували.

15 [00412] Антитіла виділяли з молока, отриманого від спонтанно лактуючої кози, імунізованої FeLVgp70 відповідно до способу, який включає наступні стадії:

а) рН молока титрували до 4,6 2 М розчином HCl та перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин для осадження казеїну;
 б) молоко центрифугували на 17 000 x g протягом 30 хвилин та збирали супернатант;
 20 с) буфер для врівноваження додавали до супернатанту з 3,3 М NaCl, 0,3 М гліцину та 0,2 М Tris основи;

д) Супернатант освітлювали центрифугуванням на 3000 x g протягом 15 хвилин;
 е) Освітлений супернатант молока завантажували в колонку MabSelect, врівноважену буфером зі стадії "с";

25 ф) Колонку промивали буфер для врівноваження та елюювали 0,15 М гліцином рН 3,0;

г) фракції елювання нейтралізували 0,2 М розчином фосфату Na.

[00413] Як необмежуючі приклади, способи отримання анти-PI-3 та анти-FeLV gp70 представлені нижче.

30 [00414] Одним із завдань було створення козиної поліклональної антисироватки до очищеного протеїну бичачого парagriповірусу-3 (BPI-3) HN для застосування в аналізах in-vitro. Дане дослідження було розроблено, щоб вакцинувати кіз очищеним протеїном бичачого парagriповірусу-3 (BPI-3) HN, сформульованим з ТХО ад'ювантом протеїну бичачого парagriповірусу-3 (BPI-3) HN, який використовували як антиген.

35 [00415] Через приблизно сім тижнів після першої ін'єкції, визначили, що всі чотири з кіз мали достатньо високі концентрації антитіла в сироватці (SN понад 1000), щоб почати робити кровотечі для сироватки. Утворення кровотеч починали через один тиждень після четвертої імунізації. Кров збирали для сироватки з інтервалом в тиждень протягом трьох тижнів. Сироватку від кожної кози об'єднували для окремих виробничих кровоточень. Всього 3 187,50 мл сироватки збирали протягом приблизно 3 тижнів виробництва кровоточень. Сироватку обробляли та зберігали при -80°C для оцінки а аналізах на основі BPI-3 HN.

40 [00416] Всю сироватку, зібрану з трьох кіз (#30, 31 та 35) розморожували при кімнатній температурі. Сироватку з кози за номером 34 не використовували через низьку реакцію антитіл в скринінгу ІФА. Дивись таблицю 47 (продукування PI3-NH поліклонального антитіла: SN відповідь та ефективність антигену за ІФА).

45 [00417] Коза за номером 35, збирали 20 листопада 13, мала найнижчий об'єм доступної сироватки, 117 мл. Таким чином, 117 мл з кожної кози на колекцію збирали в стерильну 1 л Nalgene PETG ємність. Приблизно 1053 мл (9 × 117 мл) сироватки розливали в аліквотах 20, 50 мл в стерильні 60 мл Nalgene PETG ємності та в аліквотах 50, 1,0 мл.

Таблиця 47

Імунізація	Тварина ID з титром PI3 SN titer			
	30	31	34	35
0	<2	76	<2	<2
1	215	1218	54	362
2	4096	8192	2435	9192
3	8192	16384	2696	9742

[00418] В результаті, дане дослідження при завершенні успішно генерувало всього 3 187,5 мл цільної крові, зібраної з чотирьох кіз, яких неодноразово імунізували очищеним BPI-3 протеїном, сформульованим з ТХО, протягом трьохтижневого періоду виробництва кровотеч. Гарні титри поліклонального антитіла були згенеровані в сироватці. Достатні кількості очищеного реагенту отримували для застосування в призначеному аналізі in-vitro.

[00419] В 2010 році, USDA повідомив промисловість, що FeLV gp85/70 реагент захоплення, який використовується для LEUKOCELL® та VERSIFEL® аналізів не буде більше поставлятися. Таким чином, мета даного дослідження полягала в тому, щоб створити козині поліклональні антисироватки з рекомбінантним FeLV gp70 протеїном для застосування в аналізах in-vitro.

[00420] Попередні спроби отримання антитіл після вакцинації з ад'ювантом Фрейнда не були успішними. Дане дослідження було розроблено, щоб вакцинувати кіз 444 амінокислотним фрагментом рекомбінантного E. coli-експресованого FeLV gp70 протеїну, сформульованого з ад'ювантом. Починаючи з 4ої ін'єкції, дозу ін'єкція зменшували до 100 мкг FeLV gp70 протеїну (замість вихідної дози 282 мкг FeLV gp70 протеїну). Зміну дози було зроблено тому, що початкова доза в 282 мкг/мл викликала високу частоту реакцій в місці ін'єкції. Дозу спочатку зменшували до 100 мкг/мл, але потім підвищували до 150 мкг/мл для сьомої імунізації та залишали на такому рівні до кінця дослідження (всього 15 імунізацій). PBS буфер використовували, щоб компенсувати різницю в об'ємі дози, яка залишалася в 1 мл.

[00421] Кров збирали з кіз, та одночасово титри антитіла визначали за допомогою прямого ІФА аналізу та сендвіч-аналізу ІФА, щоб бути достатньо високими, сироватку збирали та поліклональний антитіл очищували.

[00422] Шість здорових самок кіз порід LaMancha та альпійських порід, які мали вік 1-3 роки та важили > 100 фунтів отримували для застосування в даному дослідженні. Кіз годували сіном та зерном, та кози мали досхочу доступ до води протягом всього дослідження. Загальні обстеження стану здоров'я проводили один раз на день. Доза 1 мл експериментальної вакцини вводили підшкірно кожній козі з інтервалами 21 день, всього 15 імунізацій вводили кожній з п'яти кіз, які завершили дослідження. Імунізації спочатку проводили в шию або задню ногу, змінюючи боки та місця для наступних імунізацій. Невеликі реакції, видимі в місці ін'єкції, спостерігалися після імунізацій. Коли імунізацію, проводили козам в пухку шкірі тільки краніальної правої задньої ноги, то повідомляли про випадок невеликого набряку, чутливості та помірну кульгавість у всіх кіз на наступний день. Наступні ін'єкції вводили в альтернативні боки шиї або ділянки над ребрами та як правило, добре переносились. Однак, ділянки над ребрами, як виявилось в кінцевому рахунку, були таким розташуванням, де ін'єкції найкраще переносились козами.

[00423] Через приблизно вісім тижнів після першої ін'єкції визначили, що чотири з шести кіз (21, 22, 24, 25) мали достатньо високі концентрації антитіла в сироватці, щоб почати робити кровотечі для сироватки. Утворення кровотеч з двох кіз, які залишилися (23, 26) починали через п'ять тижнів пізніше. Кров збирали для сироватки з інтервалом в тиждень. Коза 25 була видалена з дослідження після шести тижнів проведення збору крові. Вона була кульгавою після прибуття та відображалась постійна кульгавість, незважаючи на лікування Banamine. Евтаназія була специфічною для термінального кровоточення та введеною в місце процедури, щоб забезпечити максимальний збір об'єму крові. Сироватку з кожної кози об'єднували для окремих утворень кровотеч. В цілому 26,7 л сироватки збирали протягом В цілому 26,7 л сироватки збирали протягом приблизно 7 місяців утворень кровотеч.

[00424] Несподівано виявилось, що у кози 24 розвинулась псевдо вагітність під час дослідження. Молоко збирали від даної кози протягом >3 місяців, всього зібрали 300 л молока, доступного для збору антитіла. Протокол був розроблений для очищення високого рівня FeLV gp70 поліклонального антитіла з молока.

[00425] Антитіла були очищені з двох різних дат з 500 мл об'єднаної сироватки від кози 24, застосовуючи Протеїн G афінну хроматографію в Maine Biotechnology Services. Всього 6388 мг

(321 мл 19,9 мг/мл) та 7343 мг (348 мл 21,1 мг/мл) очищених козиних анти-FeLV gp70 антитіл отримували для оцінки в аналізах на основі FeLV.

5 [00426] Зразки крові(приблизно 25 мл/зразок) збирали в 12,5 мл пробірки сепаратора для сироватки (SST) через чотирнадцять днів після кожної вакцинації для визначення концентрацій антитіл до FeLV gp70. SST помічали ID кози та датою збору. Після того, як аналізи визначили, що титри антитіл gp70 FeLV на основі інтенсивності сигналу ІФА для тваринного були в прийнятній концентрації, виробництво колекції починали з цієї тварини. Об'єми крові, відібрані від кожної кози були визначені на основі маси кози, щоб отримати максимальний об'єм крові. Рекомендації IACUC дозволяють збирати до 7,5 % від об'єму крові щотижня.

10 [00427] Кров збирали в 12,5 мл SST для створення колекцій. Після закінчення дослідження, кіз піддавали евтаназії шляхом термінального кровоточення та таку кров також збирали для збору антитіла. Всі пробірки маркували ID кози та датою збору.

15 [00428] Крові давали згорнутися при кімнатній температурі. Після центрифугування, сироватку збирали та переносили в поліпропіленові флакони. Збирали сироватку, зібрану з різних SST, від однієї кози на день збору. Сироватка тримали на кризі доки не передавали для очищення. Коротка інформація про продукцію представлена в таблиці 48.

Таблиця 48

ID Кози	Тижневі об'єми (мл)	Термінальне кровоточення (мл)	Загальне продукування (мл)
21	75-125	1000	4430
22	85-150	875	4665
23	85-125	1000	3630
24	110-200	1580	6785
25	80-105	980	1565
26	125-200	1750	6125
Всього			26.7 л

20 [00429] Коза 24 продукувала сироватку з найвищими концентраціями антитіла з усіх кіз.

[00430] Очищені антитіла в сироватці від кози 24 в порівнянні з USDA 94-06 як реагентом захоплення, застосовуючи FeLV gp70 C11D8, детектування mAb в сандвіч-аналізі ІФА показало аналогічну дозу-відповідь. Очищену сироватку від кози 24 порівнювали з USDA 94-06 реагентом, застосовуючи Вестерн-блот через здатність детектувати FeLV gp85/70 протеїн.
25 Аналогічний Вестерн-блот профіль спостерігали між поточним захопленням, 94-06 та новим захопленням кози 24, за виключенням того, що додаткова ~15 кДа смуга спостерігалась із захопленням кози 24. Дані з використанням нового антитіла захоплення показали, що поточний еталон має різні форми кривих доза-відповідь, ніж поточний реагент, коли його застосовують для захоплення еталону та серій, які досліджують.

30 [00431] Обидва anrendati-FeLV gp70, очищені від сироватки, та молоко функціонували добре як реагент захоплення в аналізах FeLV ІФА.

[00432] Додаткові дослідження ведуться, як це передбачено в таблиці 49.

35 [00433] Очікується, що кожен з препаратів (антигенів, розкритих в таблиці 49 та з добавленим як ад'ювант ТХО) будуть викликати достатньо високі серологічні титри (понад 1000, або більш переважно, понад 5000, або більш переважно, понад 10000, або більш переважно, понад 50000, або більш переважно, понад 100000, або більш переважно, понад 250000, або більш переважно, понад 500000, або більш переважно, понад 1000000) у, щонайменше, однієї тварини (переважно, щонайменше, у 2 тварин, або більш переважно, щонайменше, у трьох тварин, або найбільш переважно, у кожної обробленої тварини), таким чином, даючи в
40 результаті достатню кількість антитіл для діагностичних або дослідницьких застосувань.

Таблиця 49

Антиген	Кількість (мкг)/доза	Тваринне джерело (N)	Джерело АВs	Загальний об'єм зібраної сироватки	імунізації, N
Альфа токсин Clostridium perfringens (інактивований)	100 мкг	Коза (3)	Сироватка	3,31 л/діючий	10
Бета токсин Clostridium perfringens (інактивований)	100 мкг	Коза (3)	Сироватка	3,93 л/діючий	9
Епсілон токсин Clostridium perfringens (інактивований)	100 мкг	Коза (3)	Сироватка	4,07 л/діючий	10
rBVD2 E2 (gp53) очищений протеїн	150 мкг	Коза (4)	Сироватка		6/діючий
цільноклітинний інактивований Brachyspira hyodysenteriae (штам B204)	150 мкг	Коза (3)	Сироватка		3/діючий
Пепсиновий гідролізат Brachyspira hyodysenteriae (BR2019-12 штам)	150 мкг	Коза (3)	Сироватка		3/діючий

5 [00434] Всі публікації, цитовані в описі, як патентні публікації, так і непатентні публікації, свідчать про високу кваліфікацію фахівців в даній галузі, до якої відноситься даний винахід. Всі дані публікації є в повному обсязі включеними в даний документ у вигляді посилання в тій самій мірі, як би, якщо кожна окрема публікація була конкретно та індивідуально вказана як включена за допомогою посилання.

10 [00435] Хоча винахід в даному документі був описаний з посиланням на конкретні варіанти здійснення, слід розуміти, що дані варіанти здійснення є лише ілюстраціями принципів та застосувань за представленим винаходом. Тому слід розуміти, що численні модифікації можуть бути зроблені на ілюстративні варіанти здійснення, та що інші механізми можуть бути розроблені без відступу від суті та обсягу представленого винаходу як визначено наведеною нижче формулою винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ZOETIS LLC
 MOREDUN RESEARCH INSTITUTE
 DOMINOWSKI, Paul Joseph
 WILMES, Lauren
 FOSS, Dennis L
 MOHR, Kaori
 GALLO, Guillermo
 HARDHAM, John Morgan
 KREBS, Richard Lee
 LIGHTLE, Sandra Ann Marie
 MAHAN, Suman
 MEDIRATTA, Sangita
 MWANGI, Duncan
 RAI, Sharath K
 SALMON, Sarah A
 VORA, Shaunak
 FONTAINE, Michael Christopher
 SMITH, David George Emslie
 FITZPATRICK, Julie Lydia
 DONACHIE, William
 JAGLARZ, Anita DorotaAM

<120> Ад'юванти на основі олії

<130> ZP000025A

<141> 2014-09-19

<150> 61/879959

<151> 2013-09-19

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ДНК

<210> 1

<211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CpG олігонуклеотид

 <400> 1
 tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

 <210> 2
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CpG олігонуклеотид

 <400> 2
 tcgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23

 <210> 3
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CpG олігонуклеотид

 <400> 3
 tcgacgtcga tcggcgcgcg ccgt 24

 <210> 4
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CpG олігонуклеотид

 <220> Ознака
 <221> модифікована_основа
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-Йод-2'-дезоксіурин

 <400> 4
 ncgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 5
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CpG олігонуклеотид

<220> Ознака
 <221> модифікована_основа
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-Йод-2'-дезоксіурин

<400> 5
 ncgacgtcga tcggcgcgcg ccgt 24

<210> 6
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CpG олігонуклеотид

<220> Ознака
 <221> модифікована_основа
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-Йод-2'-дезоксіурин

<400> 6
 ncgacgtcga tcggcgcgcg ccgt 24

<210> 7
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CpG олігонуклеотид

<220> Ознака
 <221> модифікована_основа
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-Етил-2'-дезоксіурин

<400> 7

ncgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 8
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CpG олігонуклеотид

<220> Ознака
<221> модифікована_основа
<222> (1)..(1)
<223> 5'-Йод-2'-дезоксіурин

<400> 8
ncgtcgacga tcggcgcgccg ccgt 24

<210> 9
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CpG олігонуклеотид

<220> Ознака
<221> модифікована_основа
<222> (1)..(1)
<223> 5'-Йод-2'-дезоксіурин

<400> 9
ncgtcgacga tcggcgcgccg ccgt 24

<210> 10
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CpG олігонуклеотид

<400> 10
tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

$\langle 210 \rangle$	11
$\langle 211 \rangle$	20
$\langle 212 \rangle$	ДНК
$\langle 213 \rangle$	Штучна послідовність

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 223 \rangle$ PHK

<400> 11
uuuguuguugu uguuguuguu 20

$\langle 210 \rangle$	12
$\langle 211 \rangle$	20
$\langle 212 \rangle$	ДНК
$\langle 213 \rangle$	Штучна послідовність

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 223 \rangle$ PHK

<400> 12
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 20

$\langle 210 \rangle$	13
$\langle 211 \rangle$	19
$\langle 212 \rangle$	ДНК
$\langle 213 \rangle$	Штучна послідовність

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 223 \rangle$ PHK

<400> 13
aaacgcucag ccaaagcag 19

$\langle 210 \rangle$	14
$\langle 211 \rangle$	21
$\langle 212 \rangle$	ДНК
$\langle 213 \rangle$	Штучна послідовність

<223> ДНК/РНК

<220> Ознака
<221> Name/Key: зміш_ознака
<222> (11)..(17)
<223> рибонуклеотиди

<400> 14
tcgtcgttt guugugutt t 21

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Вакцинна композиція, яка містить ефективну кількість антигену та ад'ювантну композицію, яка містить олійну фазу та водну фазу, причому:
 - а) олійна фаза складає щонайменше 36 % об./об. композиції;
 - б) вказана композиція містить монофосфорильний ліпід А (MPL-A) або його аналог та імуностимулюючий олігонуклеотид;
 - в) вказана вакцинна композиція являє собою емульсію вода-в-олії; іантиген вибирають з групи, яка складається з антигену *Eimeria maxima*, антигену *Clostridium perfringens*, антигену *Neospora* та антигену *Chlamydomphila abortis*.
2. Вакцинна композиція за пунктом 1, в якій імуностимулюючий олігонуклеотид являє собою CpG або олігорибонуклеотид; ад'ювантна композиція додатково містить:
 - а) полікатіонний носій, вибраний з групи, яка складається з декстрану, декстрану DEAE (та його похідні), ПЕГ, гуарових смол, похідних хітозану, похідних поліцелюлози, поліетиленіміну, поліамінів; і
 - б) необов'язково, четвертинний амін, вибраний із групи, яка складається з DDA та авридину.
3. Вакцинна композиція за будь-яким одним з пунктів 1-2, яка додатково містить принаймні один зі стеролу та полі І:С.
4. Вакцинна композиція за пунктом 3, яка містить стерол та додатково містить сапонін.
5. Вакцинна композиція за будь-яким одним з пунктів 1-4, яка містить принаймні один антиген *Eimeria maxima* або *Clostridium perfringens*.
6. Застосування вакцинної композиції за пунктом 5 для лікування або профілактики інфекцій, викликаних *Eimeria maxima* або *Clostridium perfringens* у домашньої птиці.
7. Вакцинна композиція за будь-яким одним з пунктів 1-4, в якій антиген містить *Neospora* антиген.
8. Застосування вакцини за пунктом 7 для лікування або профілактики інфекції, викликаной *Neospora* у собак.
9. Вакцинна композиція за пунктом 3, яка містить *Chlamydomphila abortis* антиген та додатково містить полі І:С.
10. Застосування вакцини за пунктом 9 для лікування або профілактики викидня у овець, викликаного *C. abortis*.

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601