

**УКРАЇНА****(19) UA (11) 110504 (13) C2**
(51) МПК**A61K 39/145** (2006.01)**A61K 39/215** (2006.01)**A61K 39/10** (2006.01)**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ****(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2013 09552	(72) Винахідник(и): Абдельмаг'ід Омар Йозіф (US), Брікер Джозеф Майкл (US), Шілдс Шеллі Лінн (US)
(22) Дата подання заявки: 03.02.2012	(73) Власник(и): ЗОЕТИС Сервісез ЛЛК, 100 Campus Drive, Florham Park, New Jersey 07932, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 12.01.2016	(74) Представник: Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/439,597, 61/470,084	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2007082012 A1, 12.04.2007 WO 2007118206 A2, 18.10.2007 WO 2004011651 A1, 5.02.2004 WO 2007047728 A2, 26.04.2007 WO 2007048086 A2, 26.04.2007 WO 2006106424 A2, 12.10.2006 WO 200190143 A2, 29.11.2001 US 2004185062 A1, 23.09.2004 WO 2006038115 A1, 13.04.2006 WO 2005002618 A1, 13.01.2005 MEDHEKAR BOB ET AL: "Bordetella Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo", MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 71, no. 2, January 2009, pages 492-504
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 04.02.2011, 31.03.2011	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.10.2013, Бюл.№ 20	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.01.2016, Бюл.№ 1	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ РСТ/ІВ2012/050510, 03.02.2012	

(54) КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ КОМПЛЕКСУ РЕСПІРАТОРНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ СОБАК**(57) Реферат:**

Винахід належить до композицій, що містять вірус собачого грипу (CIV), депонований у ATCC під номером РТА-7694 та собачий респіраторний коронавірус (CRCoV), депонований у ATCC під номером РТА-11444. Додатково ці композиції можуть містити Bordetella bronchiseptica, пертактин р68, вірус собачого парагрипу (CPIV) та собачий аденовірус серотипу 2 (CAV-2). Композиції є ефективними для лікування або запобігання респіраторним захворюванням собак, в тому числі інфекційної респіраторної хвороби собак.

UA 110504 C2

ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

Заявлений винахід має відношення до імунології, зокрема до імуногенетики та вакцинних композицій. Він стосується вакцинних композицій для застосування проти респіраторних хвороб собак, включно з комплексом інфекційних респіраторних захворювань собак (CIRDC), а також способів вакцинації, лікування або запобігання респіраторних інфекцій у собак.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Інфекційна респіраторна хвороба собак (CIRDC) є дуже заразним захворюванням, що звичайно трапляється у собак, розміщених у скучених умовах, як-то притулки для тварин або тренувальні вольєри. Хоча багато собак страждають тільки на легкий кашель та одужують через невеликий проміжок часу, у деяких випадках виникає розвиток важкої бронхопневмонії.

Вважається, що патогенез CIRDC є багатофакторним та до нього залучені різні віруси та бактерії. Інфекційні агенти, що, як відомо, є збудниками CIRDC охоплюють респіраторний коронавірус собак (CRCoV) (Erles et al., *Virology*, 310(2):216-223, 2003), вірус собачого грипу (CIV) (Crawford et al., *Science*, 310(5747):482-485, 2005), вірус собачого парагрипу (CPIV) (Binn et al., *Exp. Biol. Med.*, 126:140-145, 1967), собачий аденовірус серотипу 2 (CAV-2) (Ditchfield et al., *Can. Vet. J.*, 3:238-247, 1962), мікоплазму *Mycoplasma cynos* (Chalker et al., *Microbiology*, 150:3491-3497, 2004) та бактерію *Bordetella bronchiseptica* (Bemis et al., *Lab. Anim. Sci.*, 29:48-52, 1977).

CRCoV викликає дуже заразну респіраторну інфекцію, що розповсюджується шляхом безпосереднього контакту між собаками, через респіраторні виділення, які знаходяться у аерозольному стані та шляхом контакту з зараженим оточенням або людиною. Деякі собаки мають легку форму хвороби з симптомами, що являють собою кашель, чхання та виділення з носа. Деякі собаки мають безсимптомну інфекцію без клінічних ознак, однак вони розповсюджують вірус, що може заразити інших собак. У деяких собак, інфікованих CRCoV розвивається пневмонія, особливо якщо вони були також інфіковані іншими респіраторними патогенами.

Що стосується CIV, то починаючи з 1956 року головним респіраторним патогеном у коней вважається вірус грипу коней. Симптоми хвороби, яку викликає цей вірус можуть бути тяжкими та часто супроводжуються вторинними бактеріальними інфекціями. Визначено два підтипи вірусу грипу коней, як-то підтип-1 (subtype-1), прототипом якого є штам A/Equine/Prague/1/56 (H7N7) та підтип-2 (subtype-2), прототипом якого є штам A/Equine/Miami/1/63 (H3N8). На даний час, домінуючим вірусним підтипом є підтип-2, штам H3N8. Цей штам вірусу грипу коней може заражати також собак з відсотком смертельних випадків, що іноді досягає 36 %. Одним з пояснень такого явища є те, що міжвидова передача повного кінського вірусу грипу або його частини собакам призводить до появи нового специфічного собачого вірусу грипу, пов'язаного з гострим респіраторним захворюванням (Crawford et al., 2005).

Захворювання, викликане вірусом CPIV уражає верхні респіраторні шляхи. Захворювання, викликане самим тільки вірусом CPIV може бути слабким або безсимптомним, з ознаками, що стають більш тяжкими у разі виникнення конкурентної інфекції з іншими респіраторними патогенами.

Вірус CAV-2 викликає респіраторне захворювання, яке у деяких випадках може бути пневмонією та бронхопневмонією.

Згідно з повідомленнями, бактерія *B. bronchiseptica* є головним етіологічним агентом респіраторного захворювання, що має назву " вольєрний кашель " або трахеобронхіт. Воно робить собак вразливими до впливу інших респіраторних агентів та часто існує одночасно з ними. Звичайно, вольєрний кашель є хворобливим станом верхніх респіраторних шляхів та характеризується виділеннями з носу та кашлем. На цей період існує кілька вакцин, прийнятих для лікування трахеобронхіту, викликаного *Bordetella bronchiseptica*, в тому числі Nobivac®, Bronchi-Shield®, Bronchicine® CAe, Vanguard® B, Univac 2, Recombitek® KC2, Naramune™-2 та Kennel-Jec™ 2. Однак, більшість існуючих комерційних вакцин потребують обтяжливого інтраназального введення, а також додавання допоміжних речовин, що можуть привести до шкідливих побічних проявів, як-то печія та дратівливість (Viera Scheibner et al., *Nexus Dec* 2000 (Vol 8, No1)). Були досліджені також субодичні вакцини, як-то вакцини, що передбачають застосування білка р68 *Bordetella bronchiseptica* (пертактин), але вони досі ще не включені до складу жодної промислової собачої вакцини, можливо, через недостатню імуногенність, побічні реакції, та / або стійкість препарату.

Патологія CIRDC вказує на те, що він бере участь у пошкодженні легенів та, у деяких випадках, у бронхопневмонії, але він відрізняється від вольєрного кашлю (первинний етіологічний агент: *B. bronchiseptica*), що головним чином стосується змін у верхніх респіраторних шляхах. Вольєрний кашель є більш м'яким синдромом, ніж CIRDC та не має

широкого спектру патології, зазначеного для CIRDC. Також CIRDC відрізняється підвищеною тяжкістю та смертністю.

Зараження CIRDC рідко приводить до смертельного результату, але воно затримує процес розміщення собак у притулки у рятувальних центрах, порушує плани навчальних кінологічних центрів та призводить до значних витрат на лікування та проблеми благодійності. На даний час існують вакцини проти деяких інфекційних агентів, пов'язаних з CIRDC, однак, незважаючи на їх застосування, CIRDC все ще залишається домінувати у світі, ймовірно через відсутність ефективної вакцини проти всіх інфекційних агентів, залучених до CIRDC.

Відповідно, залишається потреба у імуногенній композиції, яку можна буде безпечно вводити собакам та яка забезпечить довготривалий імунозахист проти агентів, що викликають CIRDC без шкідливих побічних проявів або негативної дії з іншими антигенами у комбінаційній вакцині. Заявлений винахід задовольняє цим та іншим, пов'язаним з цим потребам.

Головним чином, заявлений винахід стосується імуногенних композицій, які надають антигени, здатні до лікування або запобігання CIRDC. У одному втіленні, імуногенна композиція містить вірус грипу собак (CIV) та респіраторний коронавірус собак (CRCoV). У іншому втіленні, імуногенна композиція додатково містить *Bordetella bronchiseptica*. У іншому втіленні, імуногенна композиція додатково містить виділений пертактиновий антиген. У іншому втіленні, імуногенна композиція містить пертактиновий антиген р68. У іншому втіленні, пертактиновий антиген є рекомбінантним білком. У ще іншому втіленні, пертактиновий антиген є присутнім у кількості біля 1-30 мкг. У іншому втіленні, вказаний пертактиновий антиген отримують шляхом розчинення пертактинових тілець включення у сечовині з вибіркового очищення шляхом колоночної хроматографії. Вказані пертактинові антигени є розчинними та переважним чином позбавленими агрегатів. У іншому втіленні, *Bordetella bronchiseptica* є бактеринном або бактеріальним екстрактом.

У одному втіленні, імуногенна композиція містить CIV, CRCoV, *Bordetella bronchiseptica* та один або обидва антигени, вибрані з вірусу парагрипу собак (CPIV) та собачого аденовірусу типу 2 (CAV-2). У іншому втіленні, вказана імуногенна композиція додатково містить пертактиновий антиген р68. У іншому втіленні, *Bordetella bronchiseptica* є бактеринном або бактеріальним екстрактом.

Інше втілення передбачає імуногенну композицію, що містить CIV, CRCoV, компонент *Bordetella bronchiseptica*, який містить *Bordetella bronchiseptica* та виділений пертактиновий антиген та один або обидва антигени, вибрані з вірусу парагрипу собак (CPIV) та собачого аденовірусу типу 2 (CAV-2). У додатковому втіленні, імуногенна композиція містить обидва віруси CPIV та CAV-2.

У іншому втіленні, імуногенна композиція будь-якого з вищезгаданих втілень додатково містить виділений антиген Bsp22.

У іншому втіленні, імуногенна композиція будь-якого з вищезгаданих втілень не посилена ад'ювантом. У іншому втіленні, імуногенна композиція будь-якого з вищезгаданих втілень містить ад'ювант.

У іншому втіленні, імуногенна композиція будь-якого з вищезгаданих втілень не містить не-респіраторний антиген.

У ще одному втіленні, імуногенна композиція будь-якого з вищезгаданих втілень викликає у собаки імунну відповідь на собачий респіраторний патоген. У іншому втіленні, вказаний собачий респіраторний патоген є принаймні одним з CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica* та *Mycoplasma cynos*.

Інше втілення заявленого винаходу передбачає застосування імуногенної композиції будь-якого з вищезгаданих втілень для лікування або запобігання у собаки інфекції, спричиненої собачим респіраторним патогеном. У іншому втіленні, вказаний собачий респіраторний патоген є принаймні одним з CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica* та *M. cynos*. У іншому втіленні, вказана композиція запобігає виникненню вказаної інфекції на період, що дорівнює біля 6 місяців або більше. У іншому втіленні, вказана композиція запобігає виникненню вказаної інфекції на період, що дорівнює біля одного року. У іншому втіленні, заявлений винахід передбачає застосування імуногенної композиції будь-якого з вищезгаданих втілень у виробництві лікарського засобу для лікування або запобігання у собаки інфекції, спричиненої собачим респіраторним патогеном.

Інше втілення заявленого винаходу передбачає імуногенну композицію будь-якого з вищезгаданих втілень, де вказана композиція лікує або запобігає у собаки інфекційну респіраторну хворобу собак (CIRDC). Інше втілення заявленого винаходу передбачає спосіб лікування або запобігання CIRDC у собаки, що містить введення вказаному собаці імуногенної композиції будь-якого з вищезазначених втілень. У іншому втіленні, вказана композиція

запобігає виникненню CIRDC на період, що дорівнює біля 6 місяців або більше. У іншому втіленні, вказана композиція запобігає виникненню CIRDC на період, що дорівнює біля одного року. Інше втілення передбачає застосування імуногенної композиції будь-якого з вищезгаданих втілень у виробництві лікарського засобу для лікування або запобігання CIRDC у собаки.

5 Стиглий опис малюнків.

Фіг. 1. Гуморальна імунна відповідь проти CRCoV, що нейтралізує сироватку. Вимірювання нейтралізуючої сироватки гуморальної імунної відповіді проти респіраторного коронавірусу собак (CRCoV) при вакцинуванні собак сольовим розчином або композиціями з гідроксидом алюмінію або препаратом Emulsigen® у якості ад'ювантів.

10 Фіг. 2. Назальне виділення вірусу після інфікування. Вимірювання виділення CRCoV з носових ходів при вакцинуванні собак сольовим розчином або композиціями з гідроксидом алюмінію або препаратом Emulsigen® у якості ад'ювантів з наступним інфікуванням тварин вірусом CRCoV.

15 Фіг. 3. Відсоток вірус – позитивних тварин (вірус CRCoV у тканинах) на четверту добу після інфікування. Визначення кількості вірус – позитивних собак (вірус CRCoV у тканинах органів дихання) при вакцинуванні їх сольовим розчином або композиціями з гідроксидом алюмінію або препаратом Emulsigen® у якості ад'ювантів з наступним інфікуванням тварин вірусом CRCoV.

20 У даній заявці застосовані нижченаведені визначення, що замінюють будь-які суперечливі визначення у складі кожної окремої роботи, включеної сюди шляхом посилання. Невизначені слова мають значення, що зазвичай застосовують фахівці у цій галузі. Крім того, якщо іншого не передбачено в контексті, то терміни, застосовані у однині також повинні охоплювати множину та навпаки.

25 Вираз "біля" або "приблизно" при застосуванні у зв'язку з вимірною числовою змінною має відношення до зазначеного значення змінної та до всіх значень змінних, що знаходяться в межах експериментальної похибки вказаного значення (наприклад, у межах 95 % довірчого інтервалу для середнього значення) або у межах 10 відсотків вказаного значення, в залежності від того, що більше. Якщо вираз "біля" застосовують по відношенню до інтервалів часу у тижнях, то "біля 3 тижнів" охоплює 17-25 днів та "біля 2-4 тижнів" охоплює 10-40 днів.

30 "Ад'ювант", як тут застосовано, має відношення до будь-якої речовини, яка може бути неспецифічним стимулятором імунної відповіді. Додатковий опис ад'ювантів див. нижче.

Термін " тварина", як тут застосовано, охоплює будь - яку тварину, сприйнятливую до інфекційного респіраторного захворювання собак, в тому числі приручених та диких ссавців.

35 "Антитіло", як тут застосовано, є будь - яким поліпептидом, що містить сайт зв'язування антигену незалежно від джерела походження, способу отримання або інших характеристик. Цей термін має відношення до імуноглобулінової молекули або його фрагменту, що специфічно зв'язується з антигеном в результаті імунної відповіді на цей антиген. Імуноглобуліни є сироватковими білками, що складаються з "легкого" та

40 "важкого" поліпептидних ланцюгів, що мають "сталі" та "змінні" ділянки та діляться на класи (наприклад, IgA, IgD, IgE, IgG, та IgM) в залежності від складу сталої ділянки. Під антитілом, яке є "специфічним" для вказаного антигену мається на увазі, що змінні ділянки антитіла впізнають та зв'язують виключно специфічний антиген. Цей термін охоплює, але без обмеження: поліклональні антитіла, моноклональні антитіла, моносспецифічні та поліспецифічні антитіла, гуманізовані антитіла, тетрамерні та тетравалентні антитіла, мультиспецифічні антитіла, однокланові антитіла, домен- специфічні антитіла, однокланові антитіла, антитіла з видаленим доменом, злиті (гібридні) білки, злиті білки ScFc, однокланові антитіла, химерні антитіла, синтетичні антитіла, рекомбінантні антитіла, гібридні, мутовані та CDR-щеплені антитіла. Антитіла можуть бути інтактними імуноглобулінами, що походять з природних або з рекомбінантних джерел або можуть являти собою імунореактивні частки інтактних імуноглобулінів. "Антитіло" може бути перетворено на антиген - зв'язуючий білок, що охоплює, 50 але без обмеження фрагменти антитіла, які, в свою чергу, охоплюють, але без обмеження: фрагменти Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, одноклановий фрагмент Fv (ScFv), фрагмент Fd, фрагмент dAb, діатіла, пептид CDR3, обмежений пептид FR3-CDR3-FR4, нанотіла, бівалентні нанотіла, імунофармацевтичні засоби на основі модульного білка малого розміру (SMIP), мінітіла та будь – які з вищезазначених фрагментів та їх отримані хімічним або генетичним чином модифіковані 55 копії, а також інші фрагменти антитіла, що зберігають антиген - зв'язувальну функцію. Звичайно подібні фрагменти будуть містити антиген - зв'язуючий домен. Як буде зрозуміло фахівцям, будь - яка з таких молекул може бути штучно створена (наприклад, за допомогою ембріональних клітинних ліній) зі зниженням своєї імуногенності, підвищенням спорідненості, змінням специфічності або для іншої мети.

"Антиген" або "імуноген", як тут застосовано, має відношення до молекули, що містить один або декілька епітопів (лінійних, конформаційних або лінійних та конформаційних), що при дії на суб'єкт будуть викликати специфічну для цього антигену імунну відповідь. Епітоп є специфічною ділянкою антигену, що зв'язується з Т-клітинним рецептором або зі специфічним антитілом та звичайно містить біля 3-20 амінокислотних залишків. Термін "антиген" має відношення до субодиночних антигенів – антигенів, які є самостійними та відокремленими від цілого організму, з яким вони є природно пов'язаними, а також до вбитих, ослаблених або інактивованих бактерій, вірусів, грибів, паразитів або інших мікробів. Термін "антиген" також має відношення до антитіл, як-то до анти - ідіотипічних антитіл або їх фрагментів та до синтетичних пептидних мімотопів, що можуть імітувати антиген або антигенну детермінанту (епітоп). Також термін "антиген" має відношення до олігонуклеотиду або полінуклеотиду, що експресує антиген або антигенну детермінанту *in vivo*, як-то у застосуваннях ДНК – імунізації.

"Антигенність", як тут застосовано, має відношення до здатності білка або поліпептиду бути імуноспецифічно зв'язаним антитілом, що виникає проти вказаного білка або поліпептиду.

Термін "*Bordetella bronchiseptica*" або "*B. bronchiseptica*" має відношення до живої послабленої бактерії *Bordetella bronchiseptica*, екстракту вбитих цілих клітин (бактерин) *Bordetella bronchiseptica* або до клітинного бактеріального екстракту *Bordetella bronchiseptica*.

Під "буфером" мається на увазі хімічна система, що запобігає зміні у концентрації іншої хімічної речовини. У якості буферів діють протонні донорні та акцепторні системи, що запобігають виникненню помітних змін концентрації іонів водню (pH). Іншим прикладом буфера є розчин, що містить суміш слабкої кислоти та його солі (сполучену основу) або слабку основу та її сіль (сполучену кислоту).

"Собака", як тут застосовано, охоплює тварин, яких звичайно називають собаками та інших членів родини *Canidae*.

Термін "клітинна лінія" або "клітина – хазяїн", як тут застосовано, має відношення до прокаріотичних або еукаріотичних клітин, прийнятих для реплікації або до зберігання вірусу.

Термін "культура", як тут застосовано, означає популяцію клітин або мікроорганізмів, що зростають при відсутності інших видів або типів.

"Доза" має відношення до вакцини або імуногенної композиції, яку отримує суб'єкт. "Перша доза" або "підсилена початкова доза" має відношення до дози такої композиції, яку отримує суб'єкт у нульову добу. "Друга доза" або "третя доза" або "щорічна доза" має відношення до кількості такої композиції, яку вводять після першої дози, що може бути, але не обов'язково є такою ж саме вакциною або імуногенною композицією, як і перша доза.

"Епітоп" є специфічною ділянкою антигену, що зв'язується з Т-клітинним рецептором або зі специфічним антитілом та звичайно складається з приблизно 3-20 амінокислотних залишків.

"Наповнювач", як тут застосовано, має відношення до неактивного компонента - носія вакцини або імуногенної композиції, який не є антигеном.

"Фрагмент" має відношення до усіченої частини білка або гена.

"Функціональний фрагмент" та "біологічно активний фрагмент" має відношення до фрагменту, що зберігає біологічні властивості повнорозмірного білка або гена.

"Тотожність" або "відсоток тотожності" має відношення до відсотка нуклеотидів або амінокислотних залишків кандидатної послідовності, які є ідентичними або подібними до залишків послідовності (послідовностей), яку порівнюють після вирівнювання послідовностей та введення пробілів, якщо це потрібно, для досягнення максимальної відсоткової тотожності послідовності, враховуючи будь - які консервативні заміщення як частину тотожності послідовності.

"Гомологи" або "гомологи видів" містять гени, знайдені у двох або більше різних видів, що мають суттєву полінуклеотидну тотожність послідовності та однакові або подібні біологічні функції та/або властивості. Переважним чином, полінуклеотидні послідовності, що представлені видовими гомологами будуть гібридизуватися у помірно жорстких умовах, як описано тут у прикладі та мають однакові або подібні біологічні функції та/або властивості. У іншому аспекті, полінуклеотиди являють собою види гомологів, що мають більш, ніж біля 60 % тотожності послідовності, більш, ніж біля 70 % тотожності послідовності, більш, ніж біля 80 % тотожності послідовності, більш, ніж біля 90 % тотожності послідовності, більш, ніж біля 95 % тотожності послідовності, більш, ніж біля 96 % тотожності послідовності, більш, ніж біля 97 % тотожності послідовності, більш, ніж біля 98 % тотожності послідовності або більш, ніж біля 99 % тотожності послідовності.

"Ідентичність" або "відсоток ідентичності" має відношення до відсотка нуклеотидів або амінокислот у кандидатній послідовності, які є ідентичними залишкам у порівняльній послідовності після вирівнювання обох послідовностей та введення пробілів, якщо це потрібно,

для досягнення максимальної відсоткової тотожності послідовності, враховуючи будь - які консервативні заміщення як частину тотожності послідовності.

"Імунна відповідь" у суб'єкта, як тут застосовано, має відношення до розвитку гуморальної імунної відповіді, клітинної імунної відповіді або гуморальної та клітинної імунної відповіді на антиген. "Гуморальна імунна відповідь" має відношення до такої відповіді, що принаймні частково опосередкована антитілом. "Клітинна імунна відповідь" є відповіддю, опосередкованою Т- лімфоцитами або іншими білими клітинами крові або цими клітинами разом та полягає у продукуванні цитокінів, хемокінів та подібних молекул активованими Т- клітинами, білими клітинами крові або цими клітинами разом. Імунні відповіді можна визначити з застосуванням відомих у цій галузі стандартних способів імуноаналізу та аналізу нейтралізації.

"Імуногенність", як тут застосовано, має відношення до здатності білка або поліпептиду викликати імунну відповідь, специфічно спрямовану проти антигену.

"Імуногенна композиція" є препаратом, що містить імуноген, в тому числі, наприклад, білок, пептид, цілі клітини, інактивовані, субодиничний або ослаблений вірус або полісахарид або їх комбінацію, який вводять для стимулювання гуморальних та клітинних імунних систем реципієнта до одного або декількох наявних у імуногенній композиції антигенів. "Імунізація" є процесом введення імуногенної композиції та стимулювання у хазяїна імунної або імуногенної відповіді на антиген. Бажаними хазяями є ссавці, як-то собаки. Переважним чином, імуногенна композиція є вакциною.

"Імунологічно захисна кількість", як тут застосовано, є кількістю антигену, що буде ефективною для викликання імуногенної відповіді у реципієнта, яка є адекватною для запобігання або полегшення ознак або симптомів захворювання, в тому числі несприятливих наслідків для здоров'я або їх ускладнень. Викликаними можуть бути або гуморальна або клітинна - опосередкована імунність або обидві з них. Імуногенна відповідь тварини на композицію може бути обчислена, наприклад, безпосереднім чином шляхом вимірювання титрів антитіл, застосуванням аналізів проліферації лімфоцитів або безпосередньо шляхом моніторингу ознак та симптомів після інфікування штамом дикого типу. Захисна імунність, надана композицією або вакциною може бути обчислена шляхом вимірювання, наприклад, скорочення виділення організмів інфікування, зменшення клінічних ознак як-то смертності, захворюваності, температури, загального фізичного стану, здоров'я та продуктивності суб'єкта. Імунна відповідь може охоплювати, без обмеження, викликання клітинної та/або гуморальної імунності. Терапевтично ефективна кількість композиції або вакцини може змінюватися у залежності від певного застосованого організму або стану тварини, що підлягає лікуванню або вакцинації та може бути визначена ветеринаром.

"Інтраназальне" введення, як тут застосовано, має відношення до введення речовини, як-то вакцини або іншої композиції у тіло суб'єкта через ніс та полягає у транспортуванні речовини переважно крізь слизову оболонку носа.

"Виділений", як тут застосовано, означає вилучений зі свого природного оточення або окремо або у складі гетерологічної клітини - хазяїна або хромосоми або вектора (наприклад, плазміди, фага тощо). "Виділені бактерії," "виділені анаеробні бактерії," "виділений бактеріальний штам," "виділений вірус", "виділений вірусний штам" тощо мають відношення до композицій, у яких бактерія або вірус є істотно вільною від інших мікроорганізмів, наприклад, у культурі, як-то при вилученні зі свого природного оточення. Термін "виділений" при застосуванні для опису будь - якої окремо визначеної речовини, як-то полінуклеотиду або поліпептиду, означає речовину, яка є вилученою зі свого природного клітинного оточення, де її (наприклад, нуклеїнову кислоту або поліпептид) звичайно можна знайти. Отже, як тут застосовано тільки у якості прикладу, рекомбінантна клітинна лінія, сконструйована з полінуклеотидом відповідно за винаходом буде застосовувати "виділену" нуклеїнову кислоту. Альтернативно, якщо заявлено про певний білок або специфічний імуногенний фрагмент або його застосовують у якості вакцини або іншої композиції, його також слід розглядати, як виділений, тому що його було ідентифіковано, відокремлено та у деякій мірі очищено у порівнянні зі умовами його природного існування. Якщо продукування білка або його специфічного імуногенного фрагменту відбувається у рекомбінантній бактерії або завдяки еукаріотичному вектору експресії, що продукує антиген, то вважається, що він існує у якості виділеного білка або нуклеїнової кислоти. Наприклад, вважається, що сконструйована з полінуклеотидом рекомбінантна клітинна лінія застосовує "виділену" нуклеїнову кислоту.

"Лікарський засіб" має відношення до будь-якого агента, корисного у запобіганні, лікуванні або покращенні медичного стану або у запобіганні певного психологічного стану або явища.

"Моноклональне антитіло", як тут застосовано, має відношення до антитіл, отриманих від одниничної лінії клітин гібридами, всі з яких спрямовані до одного епітопу певного антигену.

Антиген, що взаємодіє з моноклональним антитілом може бути наданий у вигляді виділеного білка патогену або цілого патогену. "Гібридома" є клональною клітинною лінією, що складається з гібридних клітин, отриманих шляхом злиття клітин мієломи та специфічних клітин, що виробляють антитіла. Головним чином, моноклональні антитіла є мишачого походження, однак вони також мають відношення до клональних популяцій антитіл, отриманих до певного епітопу у складі антигену за допомогою фаг-дисплейної технології або способу, еквівалентному фаг-дисплейної технології або до гібридів клітин не-мишачого походження.

"Оральне" або "пероральне" введення, як тут застосовано, має відношення до введення речовини, як-то вакцини або іншої композиції у тіло суб'єкта через рот та полягає у ковтанні або у транспортуванні речовини через слизову оболонку порожнини рота (наприклад, шляхом сублінгвального або букального (щічного) всмоктування) або у застосуванні обох цих шляхів. Внутрішньотрахеальне введення також вважається оральним або пероральним введенням.

"Ороназальне" введення, як тут застосовано, має відношення до введення речовини, як-то композиції або вакцини у тіло суб'єкта через рот та ніс, як це відбувається, наприклад, шляхом введення у ніс однієї або декількох крапель. Ороназальне введення охоплює транспортні процеси, пов'язані з оральним та інтраназальним введенням.

"Парентеральне введення", як тут застосовано, має відношення до введення речовини, як-то композиції або вакцини у тіло суб'єкта шляхом, що виключає застосування травного тракту. Парентеральне введення охоплює підшкірне, внутрішньом'язове, внутрішньоартеріальне та внутрішньовенне введення. Для цілей даного опису, парентеральне введення виключає шляхи введення, що перш за все охоплюють транспортування речовини через слизову оболонку у порожнини рота, носа, трахеї та легені.

Термін "патоген" або "патогенний мікроорганізм", як тут застосовано, має відношення до мікроорганізму, наприклад, вірусу CPiV, CAV-2, CRCoV, CIV або бактерії *Bordetella bronchiseptica*, що здатен викликати або спонукати виникнення захворювання, слабкість або ненормальний стан своїх тварин - хазяїв.

"Пертактин", як тут застосовано, є білком зовнішньої мембрани *Bordetella*. Переважним чином, пертактин походить з *B. bronchiseptica* та ще переважніше він є білком "p68" та кодується геном *prnA*. Пертактин може бути виділений у нативній формі з *Bordetella bronchiseptica* або його можна отримати рекомбінантним шляхом. Послідовності та приклади пертактину надані у патенті США U.S. Patent No. 7,736,658, зміст якого включений сюди шляхом посилання. Застосований тут пертактиновий антиген охоплює ліпидовані форми білка.

"Фармацевтично прийнятний" має відношення до речовин, які, в рамках медичної точки зору, є придатними для застосування в контакт з тканинами пацієнтів без пов'язаних з ними надмірної токсичності, подразнення, алергічної реакції тощо, прийнятих з розумним ставленням користі до ризику та ефективних для їх призначеного застосування.

"Поліклональне антитіло", як тут застосовано, має відношення до змішаної популяції антитіл, отриманої проти окремого патогену або антигену. Головним чином, популяція містить багато груп антитіл, де кожна група є спрямованою до окремого епітопу патогену або антигену. Для отримання поліклональних антитіл, цілий патоген або виділений антиген вводять хазяїну шляхом інокуляції або інфікуванням, що спонукає хазяїна виробляти антитіла проти цього патогену або антигену.

Термін "полінуклеотид", як тут застосовано, має відношення до органічної полімерної молекули, що складається з ковалентно пов'язаних в ланцюг нуклеотидних мономерів. ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота) та РНК (рибонуклеїнова кислота) є прикладами полінуклеотидів з різною біологічною функцією.

Термін "поліпептид", як тут застосовано, має відношення до органічної полімерної молекули, що складається з двох або більше амінокислот, пов'язаних в ланцюг.

"Запобігання інфекції", як тут застосовано, означає запобігання або інгібування реплікації бактерії або вірусу, що викликає визначене захворювання для інгібування передачі бактерії або вірусу, запобігання укорінення бактерії або вірусу у тілі хазяїна або для зменшення симптомів захворювання, викликаного інфекцією. Лікування вважається терапевтичним, якщо є зниження бактеріального або вірусного навантаження.

"Захист", "захисний", "захисна імунність" тощо, як тут застосовано, має відношення до вакцини або іншої композиції та означає, що ця вакцина або композиція запобігає або зменшує симптоми захворювання, викликані організмом, антиген (антигени) якого були застосовані у отриманій вакцині або композиції. Терміни "захист" та "захисний" тощо також означають, що вакцина або композиція може бути застосована для "лікування" захворювання або одного або більше симптомів захворювання, що вже існує у суб'єкті.

"Респіраторне" введення, як тут застосовано, має відношення до введення речовини, як-то композиції або вакцини у тіло суб'єкта шляхом інгаляції розпиленої (атомізованої) речовини. При такому введенні, основний механізм транспорту полягає у поглинанні розпиленої речовини через слизову оболонку трахей, бронхів та легень, отже відрізняється від інтраназального або перорального введення.

Терміни "специфічне зв'язування", "специфічно зв'язується" тощо стосуються визначення двох або більше молекул, що утворюють комплекс, який піддається вимірюванню у фізіологічних або аналітичних умовах та є селективним. Вважають, що антитіло або інший інгібітор "специфічно зв'язується" з білком, якщо, при відповідно підібраних умовах таке зв'язування істотно не пригнічується, тоді як в той же час має місце інгібування неспецифічного зв'язування. Специфічне зв'язування відрізняється високою спорідненістю та є селективним для сполуки або білка. Неспецифічне зв'язування завжди має низьку спорідненість. Зв'язування антитіл IgG, наприклад, звичайно характеризується спорідненістю принаймні біля 10^{-7} М або вище, як-то принаймні біля 10^{-8} М або вище, або принаймні біля 10^{-9} М або вище або принаймні біля 10^{-10} або вище або принаймні біля 10^{-11} М або вище, або принаймні біля 10^{-12} М або вище. Цей термін також можна застосувати, наприклад, коли антиген-зв'язуючий домен є специфічним для певного епітопу, що не переноситься у складі численних антигенів. У такому разі, антитіло, що несе антиген - зв'язувальний домен звичайно не буде зв'язувати інші антигени.

"Специфічний імуногенний фрагмент", як тут застосовано, має відношення до частини послідовності, що розпізнається антитілом або специфічними для цієї послідовності Т - клітинами.

"Суб'єкт", як тут застосовано, має відношення до будь-якої тварини, що має імунну систему, що охоплює ссавців, як-то собак.

"Істотно ідентичний", як тут застосовано, має відношення до ступеня ідентичності послідовності, що дорівнює принаймні біля 90 %, принаймні біля 95 %, принаймні біля 96 %, принаймні біля 97 %, принаймні біля 98 % або принаймні біля 99 %.

"Субодинична вакцина" та "субодинична композиція", як тут застосовано, має відношення до типу вакцини або композиції, що охоплює один або декілька антигенів, але не обов'язково всі антигени у вакцині або композиції, що походять від антигенів з інтересуючого патогену, як-то вірус, бактерія, паразит або гриб або гомологічні цим антигенам. Така композиція або вакцина є істотно вільною від інтактних клітин патогену або патогенних частин чи лізатів таких клітин або частин. Отже, субодинична вакцина або субодинична композиція може бути отримана з принаймні частково очищених або істотно очищених від патогену імуногенних поліпептидів або їх аналогів. Способи отримання антигену або антигенів у субодиничній вакцині або субодиничній композиції полягають у застосуванні стандартних технологій очищення та виробництва продукту рекомбінантним шляхом або шляхом хімічного синтезу. Отже, "субодинична вакцина" або "субодинична композиція" має відношення до вакцини або композиції, що складається з визначеного антигенного компонента або компонентів вірусу, бактерії або іншого імуногену.

"TCID₅₀" (ЦПД 50) має відношення до "інфективної дози для культури тканин" та визначається, як розведення вірусу, потрібне для інфікування 50 % вибраної партії інокульованих клітинних культур. Для обчислення TCID₅₀ можуть бути застосовані різні способи, в тому числі спосіб Спірмена-Карбера, застосований у даному описі. Опис цього способу див. у B. W. Mahy & H. O. Kangro, Virology Methods Manual 25-46 (1996).

"Терапевтичний агент", як тут застосовано, має відношення до будь-якої молекули, сполуки, вірусу або лікарського засобу, переважно до ослабленого або вбитого вірусу або субодиниці або сполуки, що допомагає у лікуванні вірусної, бактеріальної, паразитарної або грибкової інфекції, захворювання або викликаного цим стану.

"Терапевтично ефективна кількість", як тут застосовано, має відношення до кількості антигену або вакцини або композиції, що буде викликати імунну відповідь у суб'єкта (де суб'єктом є, наприклад, собака), що отримав антиген або вакцину або композицію, яка буде адекватною для запобігання або послаблення ознак або симптомів захворювання, в тому числі негативних дій на здоров'я або їх ускладнень, викликання інфекції з патогеном, як-то вірус, бактерія, паразит або грибок. Може бути викликана гуморальна або клітинно-опосередкована імунність або гуморальна та клітинно - опосередкована імунність разом. Імуногенна відповідь тварини на композицію може бути обчислена, наприклад, безпосереднім чином шляхом вимірювання титрів антитіл, аналізом проліферації лімфоцитів або безпосередньо шляхом моніторингу ознак та симптомів після інфікування штамом дикого типу. Захисна імунність, надана композицією або вакциною може бути обчислена шляхом вимірювання, наприклад, зменшення розповсюдження інфікування організмів, зменшення клінічних ознак як-то

смертність, захворюваності, температури та загального фізичного стану, здоров'я та продуктивності суб'єкту. Терапевтично ефективна кількість вакцини або композиції може змінюватися в залежності від окремого застосованого імуногену або стану суб'єкта та може бути визначена фахівцем у цей галузі.

5 "Лікувати" або "лікування", як тут застосовано, має відношення до реверсії, полегшення, пригнічення розвитку або попередження розладу, стану або захворювання, до якого цей термін застосовано або до запобігання виникнення одного або декількох симптомів такого розладу, стану або захворювання.

10 "Лікування", як тут застосовано, має відношення до акту "лікування", як безпосередньо визначено вище.

"Вакцина" або "вакцинна композиція," як тут застосовано, має відношення до імуногенної композиції, вибраної з вірусу або бактерії, яка є або живою модифікованою, ослабленою або вбитою або до субодиничної вакцини, або до будь-якої комбінації вищезазначеного. Введення вакцини суб'єкту веде до появи імунної відповіді. Вакцину можна ввести безпосередньо суб'єкту за допомогою будь - якого відомого шляху введення, в тому числі парентерально, перорально тощо. Під цим терміном слід розуміти композицію, що запобігає або зменшує інфекцію або що запобігає або зменшує одну чи більше її ознак або симптомів. Звичайно захисних дій вакцинної композиції проти патогену досягають шляхом викликання у суб'єкті імунної відповіді. Взагалі кажучи, зникнення або зниження випадків зараження, полегшення ознак або симптомів або прискорене усунення мікроорганізму з інфікованого суб'єкту свідчить про наявність захисних дій композиції вакцини. Вакцинні композиції заявленого винаходу забезпечують захисний ефект проти інфекцій, викликаних патогенами респіраторного захворювання собак.

20 "Ветеринарно прийнятний", як тут застосовано, має відношення до речовин, які, в рамках медичної точки зору, є придатними для застосування в контакт з тканинами суб'єктів ветеринарії без пов'язаних з ними надмірної токсичності, подразнення, алергічної реакції тощо, прийнятних з розумним ставленням користі до ризику та ефективних для їх призначеного застосування.

25 "Ветеринарно прийнятний носій ", як тут застосовано, має відношення до транспортного середовища, що не впливає на ефективність біологічної активності активного інгредієнта та не є токсичним для ветеринарного суб'єкта, якому його вводять.

Заявлений винахід стосується імуногенних композицій та вакцин, що містять один або декілька вірусів та бактерій. Заявлений винахід стосується імуногенних композицій та вакцин, що містять один або декілька вірусів та бактерій або субодиниць, прийнятних для введення собакам для лікування проти CIRDC.

35 Описаний тут респіраторний коронавірус собак (CRCoV) можна охарактеризувати, як коронавірус, присутній у респіраторних шляхах собаки з інфекційним респіраторним захворюванням. Філогенетично CRCoV є найбільш близько спорідненим до коронавірусу корів (BCoV), штаму OC43 коронавірусу людини (HCoV) та вірусу гемаглютинуючого енцефаломієліту (HEV). Кишковий собачий коронавірус (CCoV) має лише віддалену спорідненість з CRCoV. Характерним прикладом прийнятного для застосування у заявленому винаході вірусу CRCoV є його штам, визначений, як штам 4182 CRCoV (Erles et al., Virus Res., 124:78-87, 2007).

40 Антигени вірусу грипу, що охоплюються цим винаходом можуть належати до будь – якого визначеного штаму вірусу грипу будь - яких птахів або ссавців, в тому числі, але без обмеження, до вірусу грипу що має підтип гемаглютинину H3 та підтип нейрамінідази N8 або підтип H3N8, частіше позначений, як вірус H3N8. Грип може бути пташиним захворюванням або бути грипом ссавців, в тому числі, але без обмеження, свинячим, кінським або собачим. У одному втіленні застосовано антиген собачого грипу, у одному втіленні застосовано антиген кінського грипу. У одному втіленні застосовано штам, що має підтипні глікобілки, позначені, як H3 або N8. У одному втіленні застосовано штам, що має обидва підтипних глікобілка H3 та N8.

50 Антигени грипу, що охоплюються заявленим винаходом можуть бути отримані від собак, коней, свиней, а також від свійських та диких птахів. Тварини, вибрані для відбору зразків повинні проявляти гострі та / або підгострі клінічні синдроми, включаючи важкі респіраторні симптоми та лихоманку. Тварини також можуть проявляти ознаки анорексії та летаргії. Способи виділення вірусу добре відомі фахівцям у цей галузі та охоплюють, серед іншого: інокуляцію клітинних культур клітин ссавців та птахів, інокуляцію ембріонів зразками назального чи глоткового слизу, отриманими з клінічних препаратів, відбір мазків з носових ходів або горла або відбір тканинних зразків, як-то селезінці, легенів, мигдалин, печінки та рідини промивання (лаважу) легенів. Цитопатичну дію вірусу можна спостерігати у культурі клітин. Алантоїсну рідину або клітинні лізати також можна перевірити на їх здатність до аглютинації еритроцитів людини, курки, індика чи морської свинки, яка є можливим свідомством наявності вірусу грипу.

Характерним прикладом штаму вірусу грипу, прийнятого для застосування у заявленому винаході є штам, визначений, як A/canine/Iowa/9A1/B5/08/D12, що зберігається, як РТА-7694 у Американській колекції типових культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 з 29 червня 2006р відповідно до Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентної процедури. Характерним штамом CIV антигену є штам вірусу CIV промислової вакцини Vanguard® CIV (Pfizer, Inc). Цей винахід також охоплює вакцини, що містять штам, визначений, як штам кінського вірусу грипу A/Equine/2/Miami/1/63. Цей штам також зберігається у ATCC під інвентарним номером VR 317 відповідно до Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентної процедури.

Додаткові приклади вірусів грипу для застосування у заявленому винаході охоплюють A/canine/Iowa/13628/2005, A/Equine/Kentucky/1998, A/Equine/Kentucky/15/ 2002, A/Equine/Ohio/1/2003, A/Equine/Kentucky/1/1994, A/Equine/Massachusetts/213/2003, A/Equine/Wisconsin/2003, A/Equine/NewYork/1999 та A/Equine/Newmarket/A2/1993. Інші бажані штами та/або ізоляти вірусу CIV охоплюють описані у патенті США U.S. Patent Nos. 7,959,929 (особливо штами та гемаглютинінові послідовності, що були визначені, як Jacksonville/2005, Miami/2005, FL/242/03 та Florida/43/04), 7,384,642, 7,572,620 та 7,468,187, склад яких, у тому числі всіх послідовностей, особливо гемаглютинінових послідовностей та штамів включений сюди в якості посилання, начебто б вони були викладені тут повністю. Додатково, прийнятним для застосування у заявленому винаході штамом CIV є ізолят Colorado CIV, описаний у Barrell et al., J. Vet. Intern. Med., 24 (6), 1524-1527 (2010), що має інвентарний номер ADW41784.

Вірус парагрипу собак (CPiV), що має відношення до заявленого винаходу можна охарактеризувати як один з вірусів, який є, як відомо, збудником, пов'язаним з вольєрним кашлем. Характерним штамом антигену CPiV є штам ослабленого вірусу CPi у промисловій вакцині Vanguard® Plus 5 (Pfizer). Іншим характерним штамом антигену CPiV є штам ослабленого вірусу CPi, що має назву "NL-CPi-5" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

Собачий аденовірус другого типу (CAV-2), що має відношення до заявленого винаходу можна охарактеризувати як один з вірусів, який є, як відомо, збудником, пов'язаним з вольєрним кашлем. Характерним штамом антигену CAV-2 є штам ослабленого вірусу CAV-2 у промисловій вакцині Vanguard® Plus 5 (Pfizer). Характерним штамом антигену CAV-2 є також штам ослабленого вірусу CAV-2, відомий, як штам "Манхеттен" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

Mycoplasma cynos (M. cynos), що має відношення до заявленого винаходу, описана у Chalker et al., Microbiology, 150:3491-3497, 2004 та є єдиним видом мікоплазми, який звичайно пов'язують з респіраторним захворюванням. Імуногенні композиції проти M. cynos описано у патенті США US 2007/0098739, який є включеним сюди шляхом посилання.

Компонент Bordetella bronchiseptica, що має відношення до заявленого винаходу можна охарактеризувати як бактеріальний агент, який, як відомо, є збудником, пов'язаним з вольєрним кашлем. Імуногенні композиції та вакцини, що охоплюються заявленим винаходом можуть бути одним або декількома з наступного: живими ослабленими Bordetella bronchiseptica, бактеринном Bordetella bronchiseptica або бактеріальним екстрактом. Крім того, композиція також переважно включає виділений субодиночний антиген Bordetella bronchiseptica.

У одному втіленні, Bordetella bronchiseptica отримують у вигляді гомогенату, отриманого з цілих клітин під дією ультразвуку та очищеного шляхом колоночної хроматографії, як передбачено у заявці Patent Application No. FR2571618, що була подана 12 жовтня 1984 р. Іншим характерним прикладом Bordetella bronchiseptica є бактеріальний екстракт Bronchicine™ CAe (Pfizer), отриманий з антигенного матеріалу, екстрагованого з клітин Bordetella bronchiseptica. Іншим прикладом Bordetella bronchiseptica є штам B-C2 живих ослаблених бактерій Bordetella bronchiseptica, присутній у вакцині Nobivac® та/або штаму живих ослаблених бактерій Bordetella bronchiseptica з вакцин Intra-Trac®, Bronchi-Shield®, Naramune™, Recombitek®, Univac, та/або Kennel-Jec™.

Крім того, у комбінації з компонентом Bordetella bronchiseptica переважно також представлені (тобто доповнюють його) субодиноці. Характерним прикладом субодиноці є виділений пертактиновий антиген, переважно антиген р68 Bordetella bronchiseptica, особливо рекомбінантний антиген р68 Bordetella bronchiseptica, що впізнається р68- специфічним моноклональним антитілом Bord 2-7 (що описано у патенті США US 7,736,658, який включений сюди шляхом посилання) та, у одному бажаному втіленні, має амінокислотну послідовність, яка наведена у патенті США US 7,736,658 або має тотожність до неї.

Пертактиновий антиген рекомбінантного білка р68 переважно отримують у розчинній формі зі збереженням та відновленням протягом процесингу його структури, подібної до нативної. Відповідно, одним аспектом винаходу передбачено рекомбінантний білок р68, який є істотно вільним (менш, ніж на біля 80 %, 90 %, 95 % або навіть 99 %) від агрегатів. У іншому втіленні, рекомбінантний білок р68 розчинюють у сечовині, у переважно біля 0.1 М, 0.5 М, 1 М, 2 М, 3 М, або 6 М розчині сечовини. Після цього, антиген р68 може бути очищено, наприклад, шляхом колоночної хроматографії. Один такий процес солюбілізації описаний у Surinder et al., J. Bioscience and Bioengineering, v. 99(4), pgs 303-310 (2005).

Застосовані тут пертактинові антигени також охоплюють ліпідовані форми. Приклади отримання ліпідованих білків наведені у науковій статті від Erdile et al., Infection and Immunity, (1993) v.61(1), p. 81-90, включеній сюди шляхом посилання. Описані тут способи можуть бути застосовані для отримання посттрансляційно модифікованих пертактинових білків, що містять приєднану ліпідну функціональну групу.

Крім того, у іншому втіленні, імуногенна композиція містить *Bordetella bronchiseptica* та виділений антиген Bsp22. У іншому втіленні, імуногенна композиція містить *Bordetella bronchiseptica*, виділений пертактиновий антиген та виділений антиген Bsp22. Антиген Bsp22 можна отримати, як наведено у Medhekar et al., Molecular Microbiology (2009) 71(2), 492–504. Переважним чином, виділений антиген Bsp22 є присутнім разом з (тобто на додачу до) екстрактом *Bordetella bronchiseptica* та виділеним пертактиновим антигеном, специфічним рекомбінантним білком р68.

"Bsp22" також охоплює ліпідовані форми антигену. Приклади отримання ліпідованих білків наведені у Erdile et al., Infection and Immunity, (1993) v.61(1), p. 81-90, включеній сюди шляхом посилання. Описані тут способи можна застосувати для отримання посттрансляційно модифікованих білків Bsp22, що містять приєднану ліпідну функціональну групу.

Віруси, що охоплюються заявленим винаходом можуть бути розмножені у клітинах, клітинних лініях та у клітинах - хазяях. Вказані клітини, клітинні лінії або клітини - хазяї можуть бути наприклад, але без обмеження, клітинами ссавців та іншими клітинами, в тому числі клітинами комах та рослин. Клітини, клітинні лінії та клітини – хазяї, у яких можна розмножувати віруси, що охоплюються заявленим винаходом є добре відомі та доступні фахівцям у цій галузі.

У іншому втіленні, описані тут імуногенні композиції не містять не- респіраторних антигенів. Отже, одне втілення винаходу передбачає композицію, як описано тут, за умовою, що вона не містить не- респіраторний антиген. Не- респіраторні антигени не викликають у суб'єкта респіраторного захворювання. Необмежені приклади таких не- респіраторних антигенів охоплюють вірус сказу, собачий парвовірус, собачий кишковий коронавірус, види *Leptospira* та *Borrelia burgdorferi*.

Бактерії, що охоплюються заявленим винаходом можуть бути культивовані та розмножені з застосуванням різних відомих пересіченим фахівцям культуральних середовищ, в тому числі, середовищ для культивування у вигляді бульйону (рідке) та на основі агару (тверде; напівтверде). Деякі бактерії також можуть бути культивовані та розмножені у клітинах ссавців або у інших клітинах.

Віруси та бактерії, що охоплюються заявленим винаходом можуть бути ослаблені або інактивовані перед застосуванням у імуногенній композиції або вакцині. Способи ослаблення та інактивації добре відомі фахівцям у цей галузі. Способи ослаблення охоплюють, але без обмеження, серійний пасаж у клітинній культурі відповідної клітинної лінії (віруси та деякі бактерії), серійний пасаж у бульйонній культурі (бактерії), ультрафіолетове опромінення (віруси та бактерії) та хімічний мутагенез (віруси та бактерії). Способи вірусної або бактеріальної інактивації охоплюють, але без обмеження, обробку формаліном, бетапропіолактоном (BPL), бінарним етиленіміном (BEI) або інші відомі фахівцям способи.

Інактивацію формаліном можна здійснити шляхом змішування суспензії, що містить мікроорганізм з 37 % формальдегідом до кінцевої 0.5 % концентрації формальдегіду. Суміш мікроорганізм - формальдегід перемішують шляхом постійного збовтування протягом приблизно 24 год. при кімнатній температурі, після чого інактивовану суміш мікроорганізму перевіряють на залишкові живі організми шляхом аналізу зростання у прийнятній клітинній лінії або у бульйонному середовищі.

Для деяких антигенів, інактивацію за допомогою BEI можна здійснити шляхом перемішування суспензії, що містить мікроорганізм заявленого винаходу з 0.1M BEI (2-бромоетиламін у 0.175N NaOH) до кінцевої 1 mM концентрації BEI. Для інших антигенів кінцева концентрація BEI дорівнює 2 mM. Відповідні для застосування концентрації відомі фахівцям у цій галузі. Суміш вірусу з BEI суміш перемішують шляхом постійного збовтування протягом приблизно 48 год. при кімнатній температурі, після чого додають 1.0 M тіосульфат натрію до

кінцевої концентрації 0.1 мМ. Перемішування триває ще додаткові дві години, після чого суміш, що містить інактивованій мікроорганізм перевіряють на залишковий живий вірус шляхом аналізу зростання у відповідній клітинній лінії або бульйонному середовищі.

Імуногенні композиції та вакцини, що належать до заявленого винаходу можуть містити один або декілька ветеринарно прийнятних носіїв. " Ветеринарно прийнятний носій ", як тут застосовано, охоплює будь - які та всі розчинники, дисперсійні середовища, покриття, ад'юванти, стабілізуючі агенти, розріджувачі, консерванти, антибактеріальні та протигрибкові агенти, ізотонічні агенти, агенти затримки адсорбції тощо. Розчинники можуть охоплювати воду, фізіологічний розчин, декстрозу, етанол, гліцерин тощо. Серед інших ізотонічних агентів, відомих фахівцям, до цих речовин також належать хлорид натрію, декстроза, маніт, сорбіт та лактоза. Серед інших стабілізаторів, відомих фахівцям, до цих речовин також належить альбумін. Серед інших консервантів, відомих досвідченим фахівцям, до цих речовин також належить мертіолат.

Ад'ювант може перетворюватися в ході обміну речовин, це стосується ад'ювантів, що складаються з компонентів, здатних перетворюватися в ході обміну речовин інтересуючих видів, як-то ад'ювантів на основі рослинних олій. Такий здатний до перетворення під час метаболізму ад'ювант може бути олією, що має подібні властивості. Здатними до перетворення під час метаболізму речовинами є олії та жири, що звичайно зустрічаються у рослинах та тваринах та звичайно складаються головним чином з суміші тригліцеридів, також відомих, як тригліцериди або нейтральні жири. Ці неполярні, нерозчинні у воді речовини є складними триєфірами жирних кислот гліцерину. Три-ацил-гліцеріни розрізняються в залежності від їх особливих властивостей та від розташування притаманних їм трьох залишків жирних кислот або бічних ланцюгів.

Ад'ювант може також бути нездатним до перетворення під час метаболізму, як-то ад'юванти, що складаються з компонентів, що не перетворюються під час метаболізму організмом тваринного суб'єкту, якому вводять вказану емульсію. Не здатні до метаболізації прийнятні для застосування у композиції заявленого винаходу олії охоплюють алкани, алкени, алкіни та їх відповідні кислоти та спирти, їх прості та складні ефіри та суміші. Переважним чином, окремі олійні сполуки є легкими вуглеводневими сполуками, тобто такі компоненти мають 6-30 карбонових атомів. Подібні олії можна отримати синтетично або отримати з нафтопродуктів шляхом очищення. Бажані для застосування у описаних тут композиціях олії, що не перетворюються в ході метаболізму, наприклад, охоплюють мінеральні оливи, рідкий парафін та циклопарафіни. Термін " мінеральна олива " має відношення до нездатної до перетворення під час метаболізму ад'ювантної олії, яка є сумішшю рідких вуглеводів, отриманих з петролатума (парафіну, що одержують із залишкової сировини) шляхом дистиляції. Цей термін є синонімічним до термінів " зріджений парафін ", " рідкий петролатум " та " біла мінеральна олива ", а також призначений охоплювати поняття " легка мінеральна олива ", тобто олива, яка аналогічним чином була отримана з петролатума шляхом дистиляції, але має трохи меншу густину, ніж біла мінеральна олива. Мінеральну оливу можна отримати з різних комерційних джерел, наприклад, J.T. Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). Легка мінеральна олива є у продажу під торгівельною маркою DRAKEOL®.

Ад'юванти охоплюють, але без обмеження, ад'ювантну систему Emulsigen® (MVP Laboratories; Ralston, NE), ад'ювантну систему RIBI (Ribi Inc.; Hamilton, MT), галун, гель гідроксиду алюмінію, емульсії типу "олія у воді" та "вода у олії", як-то, наприклад, повний та неповний ад'юванти Фрейнда, блок-співполімер (CytRx; Atlanta, GA), SAF-M (Chiron; Emeryville, CA), ад'ювант AMPHIGEN®, сапонін, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc.; Cambridge, MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc.; Birmingham, AL) або інші сапонінові фракції, монофосфорил-ліпід А, ліпід-аміновий ад'ювант Авридин, термолабільний ентеротоксин з E. coli (рекомбінантний або іншого походження), холерний токсин, мураміддипептид, блок-співполімер / поверхнево-активну речовину (SP-oil) Сквален/Плюронік, сульфо - ліпо - бета - циклодекстрин (SL-CD), ліпосоми, що містять імуномодулятор (наприклад, CpG або полі І:С), мураміддипептид (MDP), ад'ювант ISCOMATRIX® (Quil A / фосфатидилхолін), CpG / DEAE-декстран / мінеральна олива (TXO), CpG, тритерпеноїди (наприклад, Quil A або інший очищений або частково очищений сапоніновий препарат), стероли (наприклад, холестерин), імуномодуляторні агенти (наприклад, диметил діоктадеціл бромід амонію - DDA), полімери (наприклад, поліакрилова кислота, як-то CARBOPOL®) та Th2 - стимулятори (наприклад, гліколіпіди, як-то Bay R1005®) та їх комбінації, а також багато інших відомих фахівцям ад'ювантів.

Необмежені приклади різних прийнятних для застосування комбінацій охоплюють комбінацію тритерпеноїду зі стеролом (наприклад, Quil A/ холестерин, також відому, як QAC), комбінацію тритерпеноїду зі стеролом, імуномодуляторним агентом та полімером (наприклад,

Quil A / холестерин / DDA / CARBOPOL®, також відому, як QCDC) та комбінацію тритерпеноїду зі стеролом, імуномодуляторним агентом, полімером та Th2 - стимулятором (наприклад, Quil A / холестерин / DDA / CARBOPOL® та Bay R1005®, також відому, як QCDCR).

Кількості та концентрації ад'ювантів та домішок, корисних у контексті заявленого винаходу можуть бути легко визначені досвідченим фахівцем. У одному втіленні, заявлений винахід розглядає імуногенні композиції та вакцини, що містять біля 20-2000 мкг ад'юванту. У іншому втіленні, ад'ювант включено у кількості біля 100-1500 мкг або біля 250-1000 мкг або біля 350-750 мкг. У іншому втіленні, ад'ювант включено у кількості біля 500 мкг / 2 мл дози імуногенної композиції або вакцини.

Імуногенні композиції та вакцини також можуть містити антибіотики, що охоплюють, але без обмеження, антибіотики, що належать до аміноглікозидів, карбапенемів, цефалоспоринов, глікопептидів, макролідів, пеніцилінів, поліпептидів, хінолонів, сульфаніламідів та тетрациклінів. У одному втіленні, заявлений винахід розглядає імуногенні композиції та вакцини, що містять біля 1-60 мкг/мл антибіотика. У іншому втіленні, імуногенні композиції та вакцини містять біля 5-55 мкг/мл антибіотика або біля 10-50 мкг/мл антибіотика або біля 15-45 мкг/мл антибіотика або біля 20-40 мкг/мл антибіотика або біля 25-35 мкг/мл антибіотика. У іншому втіленні, імуногенні композиції та вакцини містять менш, ніж біля 30 мкг/мл антибіотика.

Імуногенні композиції та вакцини, що охоплюються заявленим винаходом можуть містити одну або декілька полінуклеотидних молекул, що кодуєть вірус або бактерію або вірусний або бактеріальний білок. Також у імуногенній композиції або вакцині можуть бути застосовані молекули ДНК або РНК. Молекули ДНК або РНК можуть бути введені у відсутності інших агентів або їх можна ввести разом з агентом, що сприяє клітинному поглинанню (наприклад, з ліпосомами або катіонними ліпідами). Загальна концентрація полінуклеотиду у імуногенній композиції або вакцині буде звичайно знаходитися у межах біля 0.1-5.0 мг/мл. У іншому втіленні, загальна концентрація полінуклеотиду у імуногенній композиції або вакцині буде звичайно знаходитися у межах біля 1 мкг/мл - 4.0 мг/мл або біля 10 мкг/мл та біля 3.0 мг/мл або біля 100 мкг/мл та біля 2.0 мг/мл. Вакцини та процедури вакцинації, де застосовані нуклеїнові кислоти (ДНК або мРНК) добре описані у науковій літературі, наприклад, у патентах США U. S. Pat. No. 5,703,055, U.S. Pat. No. 5,580,859 та U.S. Pat. No. 5,589,466, всі з яких є включеними сюди шляхом посилання.

На додачу до описаних вище вірусів або бактерій, імуногенні композиції та вакцини, що охоплюються заявленим винаходом можуть також містити інші додаткові антигени. Антигени можуть існувати у вигляді інактивованого цілого або часткового препарату мікроорганізму або у вигляді антигенних молекул, отриманих за допомогою способів генетичної інженерії або хімічного синтезу. Інші прийнятні для застосування відповідно до заявленого винаходу антигени охоплюють, але без обмеження, антигени, що походять від патогенних вірусів, як-то вірус собачої чуми, вірус герпесу собак, вірус собачого грипу, вірус сказу, патогенних бактерій, як-то *Bordetella bronchiseptica*, *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjobovis*, *Porphyromonas* spp., *Bacteriodes* spp., *Borrelia* spp., *Streptococcus* spp., в тому числі *Streptococcus equi subspecies zooepidemicus*, *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp., в тому числі *Mycoplasma cynos* та *Microsporium canis*. Антигени також можуть бути отримані від патогенних грибів, як-то *Candida*, від протозоа, як-то *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria* spp., *Babesia* spp., *Giardia* spp., *Leishmania* spp. або від гельмінтів, як-то *Taenia*, *Cuterebra*, *Echinococcus*, та *Paragonimus* spp.

Імуногенні композиції та вакцини, що охоплюються заявленим винаходом можуть бути введені тваринам для викликання ефективної імунної відповіді проти CIRDC. Відповідно, заявлений винахід передбачає способи стимулювання ефективної імунної відповіді шляхом введення тварині терапевтично ефективної кількості описаної тут імуногенної композиції або вакцини.

Описані тут імуногенні композиції та вакцини можуть бути введені тваринам для вакцинації тваринного суб'єкту проти CIRDC. Імуногенні композиції та вакцини можуть бути введені тваринам для запобігання або лікування CIRDC у тварин. Відповідно, тут описані способи вакцинації тварин проти CIRDC та запобігання або лікування CIRDC, що полягають у введенні тваринам терапевтично ефективної кількості описаної тут імуногенної композиції або вакцини.

Імуногенні композиції та вакцини, що охоплюються заявленим винаходом можуть бути отримані у різних формах у залежності від шляху введення. Наприклад, імуногенні композиції та вакцини можуть бути отримані у вигляді стерильних водних розчинів або дисперсних систем, прийнятних для ін'єкційного застосування або у ліофілізованому стані з застосуванням способів сублімаційного сушіння. Ліофілізовані імуногенні композиції та вакцини звичайно зберігають при

біля 4 °C та потім вони можуть бути відновлені у стабілізуючому розчині, наприклад, у сольовому розчині або HEPES, з ад'ювантом або без нього. Імуногенні композиції та вакцини також можна отримати у формі суспензій або емульсій.

Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу містять терапевтично ефективну кількість одного або декількох вищеописаних мікроорганізмів. Очищені віруси та/або бактерії можна застосувати безпосередньо у імуногенній композиції або вакцині або можуть бути додатково ослаблені або інактивовані. Звичайно, імуногенна композиція або вакцина містить біля 1×10^2 - 1×10^{12} вірусних або бактеріальних частинок або біля 1×10^3 - 1×10^{11} частинок або біля 1×10^4 - 1×10^{10} частинок або біля 1×10^5 - 1×10^9 частинок або біля 1×10^6 - 1×10^8 частинок. Точна кількість мікроорганізмів у імуногенній композиції або вакцині, що буде ефективною для надання захисного ефекту може бути визначена досвідченим фахівцем.

Пертактиновий антиген є присутнім у кількості біля 1-30 мкг та, більш особливо, у кількості біля 5-20 мкг, ще переважніше у кількості біля 7 мкг - 15 мкг та навіть більш особливо у кількості біля 5 мкг, 10 мкг, 15 мкг або 20 мкг.

Імуногенні композиції та вакцини звичайно містять ветеринарно прийнятний носій об'ємом біля 0.5-5 мл. У іншому втіленні, об'єм носія дорівнює біля 1-4 мл або біля 2-3 мл. У іншому втіленні, об'єм носія дорівнює біля 1 мл або біля 2 мл або біля 5 мл. Ветеринарно прийнятні носії, прийнятні для застосування у імуногенній композиції та вакцині може бути будь – яким з вищеописаних.

Фахівець у цій галузі може легко визначити, чи потребує вказаний вірус або бактерія ослаблення або інактивації перед введенням. У іншому втіленні заявленого винаходу, вірус або бактерія може бути введена тварині безпосередньо без додаткового ослаблення. Кількість терапевтично ефективного мікроорганізму може відрізнятися в залежності від окремого застосованого мікроорганізму, стану тварини та/або ступеню інфекції та може бути визначена досвідченим фахівцем.

У відповідності зі способами заявленого винаходу, тваринам може бути введена одинична доза або, альтернативно, можуть мати місце дві або більше інокуляції з інтервалами біля 2-10 тижнів. Також може бути потрібним застосування режимів бустингу та режим дозування може бути відрегульований для забезпечення оптимальної імунізації. Фахівець у цій галузі зможе легко визначити оптимальний режим введення.

Імуногенні композиції та вакцини можуть бути введені безпосередньо у кровотік, у м'яз, внутрішній орган або під шкіру. Прийняті засоби для парентерального введення охоплюють внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньом'язове та підшкірне введення. Прийнятні пристрої для парентерального введення охоплюють голки (в тому числі, мікроголки) ін'єктори та безголкові ін'єктори.

Препарати для парентерального введення звичайно є водними розчинами, що можуть містити наповнювачі, як-то солі, вуглеводи, білки та буферні агенти (переважно з рН біля 3-9 або біля 4-8 або біля 5-7.5 або біля 6-7.5 або біля 7-7.5), але, у деяких випадках, вони можуть бути більш зручніше отримані у вигляді стерильного безводного розчину або у сухому стані для застосування у поєднанні з прийнятним засобом доставки, як-то зі стерильною, апірогенною водою або сольовим розчином.

Отримання препаратів для парентерального введення у стерильних умовах, наприклад, шляхом ліофілізації, може бути легко здійснено за допомогою добре відомих фахівцям стандартних фармацевтичних технічних прийомів.

Розчинність матеріалів, застосованих для отримання розчинів для парентерального введення можна збільшити шляхом застосування відомих досвідченому фахівцю відповідних способів отримання, як-то шляхом включення агентів, що збільшують розчинність, в тому числі буферів, солей, поверхнево-активних речовин, ліпосом, циклодекстринів тощо.

Композиції для парентерального введення можуть бути отримані для негайного або модифікованого вивільнення. Препарати з модифікованим вивільненням охоплюють препарати з затриманим, сталим, імпульсним, контрольованим, цільовим та програмованим вивільненням. Отже, імуногенні композиції та вакцини можуть бути отримані у твердому, напівтвердому або тиксотропному рідкому стані для введення у вигляді імплантованого депо для забезпечення модифікованого вивільнення імуногенних композицій та вакцин.

Інші засоби введення імуногенної композиції або вакцини охоплюють доставку за допомогою мікроголки або шляхом безголкової (наприклад, Powderject™, Bioject™ тощо) ін'єкції.

У випадках застосування підшкірної або внутрішньом'язової ін'єкції бажаним є ізотонічний препарат. Головним чином, ізотонічні домішки можуть охоплювати хлорид натрію, декстрозу, маніт, сорбіт та лактозу. В окремих випадках застосовують ізотонічні розчини, як-то забуферений фосфатом фізіологічний розчин. Додатково, препарати можуть містити

стабілізатори, як-то желатин та альбумін. У деяких втіленнях до препарату також додають судинозвужувальний засіб. Фармацевтичні препарати відповідно до заявленого винаходу звичайно надають в стерильному та апірогенному стані. Однак, фахівцям добре відомо, що препарати фармацевтично прийнятних носіїв є фармацевтичними носіями, затвердженими постановами, прийнятими Департаментом сільського господарства США або еквівалентним урядовим агентством в інших країнах, як-то як Канада чи Мексика, або у будь-який з європейських країн для будь-якої вакцини для собак, поліпептидних (антигенних) субодичинних імуногенних композицій та вакцин, рекомбінантних вірусних векторних вакцин та ДНК - вакцин. Отже, фармацевтично прийнятний носій для промислового виробництва імуногенних композицій або вакцин є носієм, який вже є затвердженим або буде затверджений відповідною державною установою у Сполучених Штатах Америки або у іншій державі. Також імуногенні композиції та вакцини можуть бути додатково змішані з фармацевтично прийнятним ад'ювантом. У деяких препаратах імуногенних композицій та вакцин, імуногенні композиції або вакцини поєднують з іншими собачими імуногенними композиціями або вакцинами для отримання полівалентного продукту, що може захистити собаку проти широкого спектру захворювань, викликаних іншими собачими патогенами.

Описані тут імуногенні композиції можуть запобігти зараженню собаки собачим респіраторним патогеном або CIRDC на період, що дорівнює біля трьох місяців або більше. Композиції можуть запобігти зараженню вказаного собаки вказаним собачим респіраторним патогеном або CIRDC на період, що дорівнює біля шести місяців або більше. Композиції можуть запобігти зараженню вказаного собаки вказаним собачим респіраторним патогеном або CIRDC на період, що дорівнює біля одного року.

Природу та ступінь викликаних у тварин імунних відповідей можна оцінити за допомогою багатьох способів. Наприклад, можна зібрати сироватку з інокульованих тварин та дослідити її на присутність або відсутність антитіл, специфічних до імуногенів. Виявлення відповіді цитотоксичних Т- лімфоцитів (CTL) у лімфоїдних тканинах, що свідчить про індукцію клітинної імунної відповіді, можна отримати шляхом аналізів, наприклад, проліферації Т - клітин. Відповідні способи добре описані у науковій літературі.

Оскільки може бути бажаним введення імуногенної композиції або вакцини у комбінації з додатковими композиціями або сполуками, наприклад, для лікування певного захворювання або стану, це знаходиться в межах обсягу даного винаходу, куди імуногенні композиції або вакцини можуть бути легко включені або можуть знаходитися у вигляді набору, прийнятного для введення або спільного введення композицій.

Отже, набори, що охоплюються заявленим винаходом можуть містити одну або декілька окремих фармацевтичних композицій, де принаймні одна з них є імуногенною композицією або вакциною відповідно до заявленого винаходу та засоби для окремого зберігання вказаних композицій, як-то контейнер, розділена пляшка або розділений пакет з фольги. Прикладом такого набору є шприц та голка тощо. Набір заявленого винаходу є особливо прийнятним для введення різних форм дозування, наприклад, для перорального або парентерального введення окремих композицій з різними інтервалами дозування або для порівняльного титрування окремих композицій між собою. Для сприяння введенню композиції, що охоплюється заявленим винаходом, набір звичайно містить керівництво по введенню.

Інший набір, що охоплюється заявленим винаходом може містити один або декілька агентів, корисних для визначення інфікованих тварин. Набір може містити агенти для аналізу зразка на наявність цілих мікроорганізмів, поліпептидів, епітопів або полінуклеотидних послідовностей. Наявність вірусу, бактерії, поліпептидів або полінуклеотидних послідовностей може бути визначена за допомогою антитіл, ПЛР, гібридизації та інших способів визначення, відомих фахівцям.

Інший набір, що охоплюється заявленим винаходом може передбачати реагенти для визначення антитіл проти певних епітопів. Такі реагенти є корисними для аналізу зразка на присутність антитіл та добре відомі та доступні фахівцям в даній галузі. Наявність антитіл може бути визначена за допомогою стандартних способів визначення, що також відомі фахівцям в даній галузі.

У певних втіленнях, набори можуть містити ще набір надрукованих інструкцій або етикетку, яка вказує на те, що набір є корисним для визначення інфікованих тварин.

Антитіла можуть бути моноклональними, поліклональними або рекомбінантними. Антитіла можуть бути отримані проти імуногену або його частини. У якості імуногену, наприклад, може бути виділено та застосовано синтетичний пептид або пептид, отриманий рекомбінантним шляхом за допомогою технологій клонування на основі амінокислотної послідовності імуногену або продукту природного гену та/або його частин. Імуногени можна застосувати для

продукування антитіл за допомогою добре відомої фахівцям стандартної технології отримання антитіл. Фрагменти антитіл, що охоплюють Fab, F(ab')₂, та Fv також можна отримати з антитіл за допомогою відомих фахівцям способів.

При виробництві антитіл, за допомогою стандартних відомих в цій галузі імунологічних способів можна здійснити перевірку на бажане антитіло. Найбільш бажаними прийнятними типами імуноаналізу є добре відомі фахівцям способи ІФА та Вестерн - блот аналізу, у яких можна застосовувати як поліклональні, так і моноклональні антитіла. Антитіло може бути зв'язано з твердим підтримуючим субстратом, кон'юговане з функціональною групою, яку можна визначити або бути водночас зв'язаним та кон'югованим, як це добре відомо у цій галузі. Прикріплення антитіл до твердого підтримуючого субстрату також добре відомо у цій галузі. Прийнятні для застосування у заявленому винаході функціональні групи, що піддаються визначенню охоплюють, але без обмеження, флуоресцентний, металічний, ферментативний та радіоактивний маркери, як-то біотин, золото, феритин, лужну фосфатазу, бета - галактозидазу, пероксидазу, уреазу, флуоресцеїн, родамін, тритій, ¹⁴C, та йодування.

Заявлений винахід ілюстровано нижче наступними прикладами, що не мають обмежувального характеру.

Приклади.

Приклад 1. Аналіз вакцин, що містять вірус CRCoV.

У дослідженнях приймали участь шістдесят 8 – 9 тижневих собак – гончаків з добрим загальним станом здоров'я. Після прибуття та на -2 або -1 день досліджень всі тварини пройшли перевірку фізичного стану. Загальний стан здоров'я тварин перевіряли щоденно раз на день, починаючи з дня прибуття тварин (-8 день досліджень) до 39 дня досліджень. Тимпанальні температури збирали, починаючи з -1 дня досліджень перед вакцинацією. Зразки крові (приблизно 5 мл) для серологічного аналізу збирали у пробірки для відокремлення сироватки (SST tubes) у 0 та 21 дні досліджень перед кожною вакцинацією.

Вакцинний штам CRCoV отримали зі штаму CRCoV.669, що зберігається у ATCC під назвою РТА-11444 відповідно до Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентної процедури. Вакцинний штам CIV отримали зі штаму, що зберігається у ATCC під назвою РТА-7694. Ізоляти CPIV та CAV-2 отримали з вірусних посівів, застосованих для отримання вакцин вакцинної лінії Vanguard® (Pfizer). Антигени отримали при найвищих пасажах вірусу (Master Seed Virus+5). Вакцинні композиції містили ад'ювант, що мав у своєму складі Quil A (20 мкг), холестерин (20 мкг), диметил діоактодецил амонію бромід (DDA; 10 мкг) та Carborol® (поліакрилову кислоту; 0.05 % у обсяговому співвідношенні). Антиген CRCoV був отриманий у кількості 1.3 відносних антигенних одиниць (RAU) на дозу. Експериментальні вакцини були перевірені на стерильність.

У якості матеріалу для інфікування дослідники застосували гетерологічний ізолят CRCoV (штам "Max"; пасаж 1). Вихідний матеріал вірусного штаму розмножили та відтитрували у клітинах HRT18G та його титр сягав 10^{7.1} ЦПД50 / мл. Цей матеріал інфікування перевірили з підтвердженням задовільності на стерильність та відсутність мікоплазми або собачих/кошачих чужорідних агентів.

Одну тварину вакцинували на 21 день досліджень; всіх позосталих тварин вакцинували на 22 день досліджень. Вакцинацію тварин відповідною вакциною або плацебо проводили підшкірно згідно з планом досліджень, наведеним у Таблиці 1. Першу вакцинацію тваринам робили у ділянку правого плеча (0 день досліджень) та другу вакцинацію - у ділянку лівого плеча (22 день досліджень).

Таблиця 1

План досліджень.

Група	IVP	N	Вакцинація ¹		Інфікування ²		Розтин
			дні досліджень	шлях введення	день досліджень	доза	день досліджень
T01	плацебо, підсилене ад'ювантом QuilA/холестерин /DDA/Carbopol	10	0 та 22	підшкірно	42	10 ⁶ ЦПД50	46
T02	плацебо, підсилене ад'ювантом (QC/DC)	10					56
T03	CRCoV/CIV/CPIV/CAV2 (QC/DC)	10					46
T04	CRCoV/CIV/CPIV/CAV2 (QC/DC)	10					56
T05	моновалентна RTU CRCoV (QC/DC; емульгована)	10					46
T06	моновалентна RTU CRCoV (QC/DC; емульгована)	10					56

¹ Дослідницький ветеринарний продукт (IVP) вводили підшкірно (SC).

² Для інфікування застосували дозу ізоляту CRCoV Max (пасаж 1), яку вводили інтраназально. RTU – готова для застосування рідка вакцина

Після першої вакцинації тварин щоденно спостерігали (з першого по восьмий день досліджень) на наявність ін'єкційних набряків після вакцинації. Після другої вакцинації, на 29 день досліджень, тварин також щоденно спостерігали на наявність ін'єкційних набряків після вакцинації. Для тварин, що мали набряк у місці ін'єкції / біль, крім днів, зазначених вище, спостереження проводили ще двічі на тиждень до зникнення набряку/болю. Тимпанальні температури вимірювали щоденно протягом одного тижня після кожної вакцинації.

Зразки крові (приблизно 8 мл) для серологічного аналізу збирали у пробірки для відокремлення сироватки (SST tubes) на 42 день досліджень перед інфікуванням. Тимпанальні температури вимірювали на 40, 41 та 42 день досліджень перед інфікуванням. Також, на 42 день досліджень перед інфікуванням, з кожного собаки зібрали два типи ротоглоткових мазків (VTM (вірусне транспортне середовище) для отримання вірусу та Amies для отримання бактерій). Для визначення вихідних значень, на 40, 41 та 42 день досліджень перед інфікуванням тварин раз на день спостерігали на наявність клінічних ознак респіраторного захворювання.

На 42 день досліджень, всіх тварин інтраназально (IN) інфікували вірусом CRCoV з цільовою дозою інфікування у 10⁶/ мл / собаку. Перед інфікуванням всім тваринам дали заспокійливі ліки у вигляді внутрішньовенної ін'єкції препарату Domitor®. Після цієї процедури, кожній тварині ввели по 1.0 мл вірусу для інфікування шляхом повільного введення приблизно по 0.5 мл у кожную ніздрю за допомогою шприца без голки. Після цього введення, седативний стан у тварин був скасований шляхом внутрім'язової ін'єкції препарату Antisedan®.

Вимірювання тимпанальних температур, клінічні спостереження та збирання ротоглоткових мазків проводили щоденно після інфікування з 42 по 56 день досліджень. Зразки крові (приблизно 5 мл) для серологічного аналізу збирали на 46 та 56 день досліджень (перед розтином).

Під час розтину, легені (повністю) та трахею асептично відокремили, перенесли на стерильну серветку, долі легенів загальним чином дослідили на наявність легеневих уражень (ущільнень) та був обчислений відсоток ущільнень у кожній долі легенів. Один набір легенів мав неприйнятну кровотечу та не був досліджений. Трахею розрізали, порожнину трахеї дослідили на наявність очевидної патології та будь - які знахідки були занотовані.

Після перевірки легенів, праву хвостову легеневу долю промили приблизно 30.0 мл середовища для наступного бактеріологічного аналізу та отримання вірусу. З трахеї та носової порожнини вилучили пару зразків тканини, де один зразок застосували для отримання вірусу, а

другий - для гістопатологічних досліджень. Праві головні легеневі долі розділили на три зразка, де один був призначений для бактеріологічної перевірки. Кров для серологічних досліджень збирали у заздалегідь визначені дні дослідження.

В результаті IFA – тестування (застосування непрямого флуоресцентного аналізу антитіл) було підтверджено, що перед нульовим днем досліджень всі тварини були негативними до антитіл (титр IFA <40) проти CRCoV. Результати досліджень ротоглоткових мазків з метою отримання вірусу CRCoV підтвердили, що всі тварини у нульовий день досліджень перед вакцинацією не мали вірусу CRCoV. Плацебо - вакциновані контролі залишалися CRCoV - серонегативними до 42 дня досліджень. Наявність групи, вільної від вірусу CRCoV, яка була підтверджена дослідженнями по отриманню вірусу на 42 день досліджень, свідчить про відсутність на об'єкті стороннього вірусу CRCoV. Також на 42 день досліджень була підтверджена відсутність у собак бактерій *Bordetella bronchiseptica*.

Для вимірювання концентрації антигену CRCoV у вакцині у вигляді відносних антигенних одиниць (RAU) порівняно з особливою партією призначеного референсного антигену CRCoV застосували IFA - аналіз. Концентрація антигену CRCoV, як було визначено, дорівнювала 0.5 RAU/ дозу.

Після вакцинації у більшості вакцинованих собак, в тому числі у плацебо - вакцинованій групі виникли набряки у місці ін'єкції. Для моновалентної вакцинованої групи, у більшості вакцинованих тварин розміри набряків звичайно були маленькими (найдовші дорівнювали 2 см або менше) та зникали протягом двох тижнів. У вакцинованих собак не спостерігалось жодного прояву болю чи пов'язаних з вакциною системних реакцій, а також випадків клінічної лихоманки ($\geq 39.5^{\circ}\text{C}$), за винятком одного собаки, хоча підвищена температура у цього собаки не була пов'язана з вакцинацією (температуру вимірювали перед другою вакцинацією). Ці результати вказують на те, що моновалентна вакцина викликає тільки набряки у місці ін'єкції, що й очікувалися для посиленних ад'ювантом вакцин.

Титри нейтралізації сироватки були зведені в таблицю та проведено порівняння між групами. У всіх моновалентно - вакцинованих собак (100 %) через три тижні після другої вакцинації були виявлені титри нейтралізації сироватки (GMT (середнє геометричне значення титру) дорівнювало 371), що вказує на активну імунізацію. Сильну пост - інфікувальну (анамнестичну) відповідь, що полягала у нейтралізації сироватки було виміряно на 56 день досліджень у комбінаційно вакцинованих собак (GMT 6,915) у порівнянні з плацебо - вакцинованими собаками (GMT 471). Статистично ці результати значно відрізнялися та вказували на ефективне стимулювання та викликання вакцинним антигеном CRCoV імунних відповідей у собак проти інфекції CRCoV.

Після інфікування, у ротоглоткових виділеннях всіх плацебо - вакцинованих тварин (100 %) принаймні протягом одного дня між першим та шостим днями після інфікування були виявлені вірусні виділення, що вказує на індукування інфекції CRCoV. Застосування моновалентної вакцини значно зменшує ($p=0.0237$) середню кількість днів ротоглоткового виділення вірусу (2.1 день) у порівнянні з плацебо (3.3 дні), що вказує на ефективність вакцини у зменшенні інфекції CRCoV.

На четвертий день після інфікування, всі плацебо - вакциновані собаки (100 %) дали позитивний результат у дослідженнях по виділенню вірусу з їх трахей, носових порожнин та легенів, що вказує на інфекцію CRCoV у їх органах дихання. На 14 день після інфікування вже не було жодного вірусу, виділеного у будь-якого органу, що наводить на думку про типову респіраторну вірусну інфекцію, подібну до собачого грипу. На відміну від цього, моновалентна вакцина запобігає інфекції у 90 % та 50 % вакцинованих собак (p -величина для легенів <0.0001 та, відповідно, для трахеї <0.0237). Це вказує на те, що моновалентна вакцина викликає достатню імунність для запобігання вірусній інфекції у цих критичних органах. Суттєвої різниці у швидкості інфекції носової порожнини між вакцинованими та контролями виявлено не було.

В експериментальних умовах, інфікування CRCoV викликало тільки помірні клінічні ознаки. У собак з груп лікування була відмічена наявність очних та назальних розладів та кон'юнктивіту. Протягом періоду після інфікування, у п'яти тварин (у двох з груп плацебо, у однієї з групи з моновалентною вакциною та у двох у групах з комбінаційною вакциною) була відмічена клінічна лихоманка ($\geq 39.5^{\circ}\text{C}$).

Загальний аналіз легенів, трахеї та носових раковин проводили на 4 та 14 день після інфікування. Не було відмічено жодних значних наявних уражень, за виключенням того, що дві собаки – один у групі T05, а один у групі T01 мали невелику кількість ущільнень у легенях; Дві собаки – один у групі T01, а один у групі T03 мали осередки некрозу у носових раковинах.

Потім була проведена перевірка та оцінка легенів, трахеї та тканин носових порожнин відносно гістопатологічних змін. Оцінку проводили по чотирьохбальній шкалі в залежності

від ступеню спостережених змінень. Змінення, пов'язані з інфікуванням були найбільш помітними у назальних раковинах, потім у трахеях та, нарешті, у легенях. Це відповідає респіраторної вірусної інфекції, яка головним чином діє на верхні респіраторні шляхи (назальні раковини та трахеї) з подальшою меншою дією на нижні респіраторні шляхи (легені) та демонструє викликання інфекцією CRCoV тканинної патології органів дихання.

Попередні дослідження показали, що циліарні пошкодження в трахеї на четвертий день після інфікування є характерним патологічним наслідком інфекції CRCoV. Дані показують, що моновалентна вакцина запобігає трахеальному циліарному пошкодженню у 60 % тварин у порівнянні з вакцинованими плацебо тваринами (30 % нормальних тварин), але зменшення не є значним ($P=0.1538$). Діагностичні бактеріологічні дослідження легенів та рідині легеневи́х промивань (лаважів) підтвердили, що всі тварини були вільними від бактерій *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella* spp., *Staphylococcus intermedius* та *Streptococcus canis*. Тільки у чотирьох тварин, у легенях, рідині легеневи́х промивань або у обох цих джерелах була виявлена присутність *Mycoplasma* spp. Ці знахідки свідчать про те, що знайдені ураження є наслідками вірусної інфекції та специфічні саме для неї.

В цілому, через три тижні після другої вакцинації, всі вакциновані CRCoV собаки (100 %) у групах T03-T06 мали розвинені титри нейтралізування сироватки, що вказувало на наявність активної імунізації. Імунна відповідь у вакцинатів, викликана моновалентною вакциною зменшила розповсюдження вірусу у ротоглоткових виділеннях та органах дихання. Також її наслідком стало зменшення трахеальних циліарних пошкоджень у вакцинатів порівняно з плацебо - вакцинованими контролями. Гістопатологічна перевірка показала, що моновалентна вакцина запобігає виникненню трахеальних циліарних пошкоджень у 60 % тварин у порівнянні з плацебо - вакцинованими тваринами (30 %).

Приклад 2. Ефективність тестування у собак бівалентної вакцини CRCoV/CIV.

У дослідженнях приймали участь шістдесят 8 – 9 тижневих собак – гончаків з добрим загальним станом здоров'я. Після прибуття, на -9 день досліджень, всі тварини пройшли перевірку фізичного стану та на -2 день досліджень вони пройшли другий медичний огляд, після чого вважалися цілком придатними для участі у дослідженнях, за виключенням одного собаки, відстороненого на -7 день досліджень

Спостереження загального стану здоров'я тварин проводили щоденно, раз на день, починаючи з -7 дня досліджень до 39 дня досліджень. Зразки крові (приблизно 6 мл) для серологічного аналізу збирали у пробірки для відокремлення сироватки (SST tubes) у дні дослідження 0 та 21 перед кожною вакцинацією. Для підтвердження відсутності у собак вірусів CRCoV та CIV, у нульовий день перед вакцинацією з кожного собаки збирали по два набори ротоглоткових мазків - один для отримання вірусу CRCoV та один для отримання вірусу CIV. Для визначення вихідного значення перед вакцинацією, у -1 та 0 дні досліджень були виміряні та записані показники тимпанальних температур піддослідних тварин. Тимпанальні температури також вимірювали на 21 день досліджень перед другою вакцинацією. Перед вакцинацією, у 0 та 21 дні досліджень, плечові ділянки тварин ощупали пальцями для підтвердження відсутності у тварин попередньо існуючих уражень у ділянці місця ін'єкції.

Одного собаку з групи T04 відсторонили від досліджень у -7 день експерименту через розлад дихання. Одного собаку з групи T05 з цієї ж причини відсторонили від досліджень у нульовий день перед вакцинацією. Крім того, двох тварин відсторонили від досліджень після включення через умови, що були не пов'язані з проведенням досліджень. Одного собаку з групи T06 відсторонили від досліджень на 21 день перед отриманням другої вакцинації через розлад дихання. Одного собаку з групи T02 відсторонили від досліджень на 21 день перед отриманням другої вакцинації через невиліковний кератокон'юнктивіт та випадання (пролапс) слізної залози третьої повіки.

Були отримані дві бівалентні вакцини: вакцина на основі інактивованого вірусу CRCoV / інактивованого вірусу CIV, підсилена ад'ювантом Emulsigen® (5 % у обсяговому співвідношенні) та вакцина на основі інактивованого вірусу CRCoV/ інактивованого вірусу CIV, підсилена ад'ювантом Rehydrigel™ (5 % у обсяговому співвідношенні) (Таблиця 2). Вакцинний штам CRCoV отримали від штаму, що зберігається у АТСС під назвою РТА-11444. Вакцинний штам CIV отримали від штаму, що зберігається у АТСС під назвою РТА-7694. Для задоволення вимог імуногенності, обидві партії антигену, застосовані для отримання вакцин були отримані з максимальним пасивуванням вірусу та клітин. Концентрація антигену CRCoV, як було визначено, дорівнювала 1.55 RAU/ дозу. Антиген CIV був отриманий з концентрацією 640 одиниць гемаглютинації / дозу.

Таблиця 3

План досліджень

Група	IVP	N	Вакцинація ¹		Інфікування ²		Розтин
			дні дослід- ження	шлях введення	день дослід- жень	доза	день дослід- жень
T01	сольовий розчин	10	0 та 21	SC	42	10 ⁶ ЦПД50	46
T02	сольовий розчин	9					56
T03	CRCoV-CIV 5 % AlOH	10					46
T04	CRCoV-CIV 5 % AlOH	9					56
T05	CRCoV-CIV 5 % Emulsigen®	9					46
T06	CRCoV-CIV 5 % Emulsigen®	9					56

¹ Дослідницький ветеринарний продукт (IVP) вводили підшкірно (SC).

² Для інфікування застосували дозу ізоляту CRCoV Max (пасаж 1), яку вводили інтраназально. AlOH: гель гідроксиду алюмінію

У якості матеріалу для інфікування застосували гетерологічний ізолят CRCoV (штам "Max"; пасаж 1). Вихідний матеріал вірусного штаму розмножили та відтитрували у клітинах HRT18G та його титр сягав 10^{7.1} ЦПД50 / мл. Цей матеріал інфікування перевірили з підтвердженням задовільності на стерильність та відсутність мікоплазми або собачих/кошачих чужорідних агентів.

У 0 та 21 день досліджень, тварини вакцинували відповідною вакциною або плацебо (Таблиця 2.). Першу вакцинацію проводили у нульовий день досліджень шляхом введення у ділянку правого плеча та другу вакцинацію проводили на 21 день досліджень шляхом введення у ділянку лівого плеча.

Після першої вакцинації тварин спостерігали на наявність ін'єкційних набряків після вакцинації щоденно з першого по восьмий день досліджень та після цього ще на 12, 15, 19, 21, 22, та 26 день досліджень. На восьмий день досліджень, спостереження ін'єкційних набряків для 18 тварин випадково не були записані. На 21 день досліджень для деяких тварин зробили додаткові спостереження ділянки правого плеча (перша доза вакцинації).

Після вакцинації на 21 день досліджень, тварин щоденно спостерігали на наявність ін'єкційних набряків після вакцинації у 21 – 29 дні досліджень після цього ще на 33, 36, та 40 день досліджень. Всі набряки, що виникли після другої вакцинації зникли на 40 день досліджень. Тимпанальні температури збирали у 0-7 та 21-28 дні досліджень, приблизно через 3 години після кожної вакцинації.

Зразки крові (приблизно 6 мл) для серологічного аналізу збирали у пробірки для відокремлення сироватки (SST tubes) на 42 день досліджень перед інфікуванням. Також перед інфікуванням, для визначення вихідних значень, було проведено вимірювання тимпанальних температур (40, 41, та 42 день досліджень). Також, на 42 день досліджень перед інфікуванням, з кожного собаки збирали два типи ротоглоткових мазків (VTM) (вірусне транспортне середовище) для отримання вірусу та Amies для отримання бактерій). Для визначення вихідних значень тварин також досліджували на наявність клінічних ознак респіраторного захворювання.

Кожну групу з шести собак у всіх групах лікування інфікували вірусом шляхом розпилення 19 мл матеріалу для інфікування у камері з оргскла протягом приблизно 30 хв. При інфікуванні менш, ніж шістьох собак протягом часу, об'єм розпиленого у камері вірусу пропорційно корегували. Результати титрування вірусу, яке проводили за допомогою зразків CRCoV, зібраних після інфікування, підтвердили, що кількість живого вірусу для інфікування, розпиленого у камері, дорівнювала 10^{5.1} ЦПД50 / мл. Після інфікування, починаючи з 42 до 56 дня досліджень, у собак щоденно вимірювали тимпанальні температури, проводили клінічні спостереження та відбирали назальні мазки (Sterile Dacron Swabs, Puritan 25-806-1PD) для отримання вірусу (VTM tubes). Зразки крові (приблизно 6 мл) для серологічного аналізу збирали на 46 та 56 день досліджень (перед розтином).

Під час розтину, легені (повністю) та трахею асептично відокремили, перенесли на стерильну серветку, долі легенів були піддані загальному дослідженню на наявність легеневих уражень (ущільнень) та був обчислений відсоток ущільнень у кожній долі легенів. Набори

легенів двох тварин мали неприйнятну кровотечу та не були досліджені. Трахею розрізали, порожнину трахеї дослідили на наявність очевидної патології та будь – які знахідки були занотовані.

Після перевірки легенів, кожну праву хвостову легенеvu долю промили приблизно 30.0 мл середовища VTM (без антибіотиків) для діагностичного бактеріологічного аналізу та отримання вірусу. З трахеї та носової порожнини вилучили зразки тканини та відібрали цілі ліві середні долі легенів для гістопатологічних досліджень. Також, для отримання вірусу та бактеріологічної перевірки відібрали зразки тканин з трахеї, носових порожнин та правої головної долі легенів.

Кров для серологічних досліджень збирали у заздалегідь визначені дні дослідження.

Назальні мазки для бактеріологічної діагностики (транспортне середовище Amies без вугілля) збирали з кожного собаки тільки на 42 день досліджень (перед інфікуванням). Ці мазки перевірили на наявність бактерій *Bordetella* spp., *Pasteurella* spp., *Staphylococcus* spp., *Mycoplasma* spp. та *Streptococcus canis*.

В результаті IFA – тестування 69 цуценят – гончаків було підтверджено, що всі тварини були негативними до антитіл (титр IFA <40) проти CRCoV у нульовий день досліджень перед вакцинацією. Зразки сироватки також перевірили шляхом сироваткової нейтралізації, що підтвердило їх негативність (титр нейтралізації сироватки <20) відносно антитіл до CRCoV. Результати дослідження назальних мазків на виділення вірусу CRCoV підтвердили, що всі тварини у нульовий день досліджень перед вакцинацією не мали вірусу CRCoV. Перевіркою на вірус CIV та антитіла було підтверджено, що тварини у нульовий день досліджень також були вільними від вірусу CIV та антитіл CIV HAI (титр гальмування гемаглютинації <8). На основі цих двох критеріїв тварини були визнані сприйнятливими, отже, прийнятними для аналізу ефективності та безпеки вакцин CRCoV та CIV. Вакциновані сольовим розчином контролі залишалися CRCoV – серонегативними до 42 дня досліджень. Шляхом досліджень отримання вірусу CRCoV у 42 день досліджень було підтверджено, що всі тварини у цей день були вільними від нього, що свідчить про відсутність на об'єкті стороннього вірусу CRCoV. Також на 42 день досліджень (перед інфікуванням) була підтверджена відсутність у всіх собак бактерій *Bordetella bronchiseptica*.

Собак вакцинували двома препаратами, що містять інактивовані антигени CRCoV та інактивовані антигени CIV, посилені або ад'ювантом Emulsigen® або ад'ювантом Rehydragel™. Антигенну ефективність CRCoV у вакцині вимірювали шляхом подвійного " сендвіч "- варіанту імуоферментного аналізу з застосуванням моноклональних антитіл 41.1.1., що нейтралізують CRCoV- специфічну сироватку. У порівнянні з призначеним референсним антигеном, ефективність дорівнювала 1.14 відносних антигенних одиниць (RAU) на дозу. Титр гемаглютинації вірусу CIV для морських свинок дорівнював 955 (критерієм прийнятності був титр гемаглютинації у ≥ 161).

У 10 з 19 тварин, що отримали препарат Emulsigen® (T05 та T06) після першої вакцинації виникли набряки у місці ін'єкції, які можна було виміряти. Також, одразу після першої вакцинації у більшості собак був відмічений свербіж. У двох собак був відмічений біль при дотику. Наступного дня у всіх собак цієї групи, за виключенням однієї, зникли всі набряки. Після другої вакцинації дослідники спостерігали незначне збільшення розмірів та кількості набряків у місці ін'єкції, однак все це знаходилося у межах очікуваної типової реакції на посилену ад'ювантом вакцину. У будь - якого з вакцинованих собак не було відмічено жодної системної реакції, що підтверджувалося відсутністю випадків клінічної лихоманки ($\leq 39.5^{\circ}$ C). Отримані результати свідчать про безпечність введення собакам цієї вікової групи досліджуваного вакцинного препарату та про те, що профіль безпечності цієї вакцини знаходиться у межах очікуваного для посилених ад'ювантом вакцин.

У більшості собак (групи T03 та T04), що отримали препарат Rehydragel™ після кожної вакцинації також виникли набряки у місці ін'єкції. Ці набряки виникли через три дні після першої вакцинації та більшість з них зникла на 19 день досліджень. Подібну реакцію спостерігали також і після другої вакцинації, коли більшість набряків зникла на 36 день досліджень. Ці набряки у місці ін'єкції звичайно були малого розміру та типовими для реакцій на галун у якості ад'юванту. Не було відмічено жодних проявів болю чи лихоманки, що підтверджує відсутність системної реакції на вакцинацію. Отримані результати свідчать про безпечність введення собакам цієї вікової групи досліджуваного вакцинного препарату та про те, що профіль безпечності цієї вакцини знаходиться у межах очікуваного для посилених ад'ювантом вакцин.

Титри нейтралізації сироватки були зведені в таблицю та порівняні між групами (Фіг. 1). Обидва вакцинних препарати викликали відповідь антитіл, що нейтралізувала сироватку у всіх вакцинованих собак після першої дози, що вказує на наявність активної імунізації (Фіг. 1). Геометрична середня відповідь нейтралізації сироватки (GMT (середнє геометричне значення

титру) для Rehydrigel™ = 552; для Emulsigen® = 2030) збільшилася після другої вакцинації, що вказує на її бустерний ефект. Обидва вакцинних препарати після інфікування призвели до виникнення стійкої анамнестичної відповіді нейтралізування сироватки (GMT для Rehydrigel™ = 10,725; GMT для Emulsigen® = 11,584 на 56 день досліджень для собак, що залишилися у дослідженнях), що вказує на ефективну імунологічну пам'ять. Важливо відзначити, що гуморальна імунна відповідь до CRCoV виникає у присутності антигену CIV, що вказує на відсутність перешкоджаючих дій між антигенами у бівалентній вакцині.

На 42 день досліджень, 46 позосталих у дослідженнях собак інфікували шляхом аерозольного розпилення. Назальне отримання вірусу після інфікування виявило вірусні виділення у всіх собак, вакцинованих сольовим розчином (100 %) протягом принаймні трьох днів між 1 та 6 днями після інфікування, що вказує на наявність зараження собак вірусом CRCoV, з вірусними виділеннями, що тривали в середньому 4.5 днів (Фіг. 2). Два вакцинних препарати значно зменшили цей період до 2.6 днів ($p < 0.0001$) та 3.4 днів ($p = 0.0042$) для Rehydrigel™ та Emulsigen®, відповідно. Ці результати свідчать, що індукована вакциною ефективність призвела до зниження вірусної інфекції.

Дані отримання вірусу з тканин показали, що 90-100 % собак у групі, де тварини були вакциновані сольовим розчином були вірус – позитивними (тканини порожнини носу, трахеї та легенів) на четвертий день досліджень після інфікування, що вказує на інфекції органів дихання (Фіг. 3). На відміну від цього, обидві вакцини значно зменшили відсоток вірус- позитивних тварин у дослідженнях по отриманню вірусу з легенів ($p < 0.0001$) та з порожнин носу ($p < 0.002$). У той час, як дія кожної з вакцин зменшила отримання вірусу з трахеї (вірус виділили у 70 % групи з препаратом Rehydrigel™ та у 44 % групи з препаратом Emulsigen®), тільки дія препарату Emulsigen® привела до суттєвого зменшення отримання вірусу у порівнянні з контролем, вакцинованими сольовим розчином ($p = 0.0089$). Вірус не вдалося виділити з жодної з тварин на 14 день після інфікування, що вказує на те, що інфекція CRCoV, подібно до собачого грипу, дуже швидко проникає у тканини органів дихання та також швидко їх залишає. Результати даних отримання вірусу вказують на те, що обидва вакцинні препарати значно зменшують вірусну інфекцію у собак.

Інфікування вірусом CRCoV у експериментальних умовах викликає лише незначні респіраторні клінічні ознаки. У собак з груп лікування були зареєстровані випадки очних та назальних розладів.

На 41 день досліджень (один день перед інфікуванням), всі тварини у контрольній групі з сольовим розчином за винятком однієї мали нормальну температуру. Після інфікування, у двох тварин з цієї групи була відмічена клінічна лихоманка. На другий день після інфікування (44 день досліджень) обидві собаки мали температуру у 39.6°C . У однієї з цих тварин лихоманка (40°C) була знов відмічена на четвертий день після інфікування та собака отримав лікування проти конкурентного гастроентериту. Саме цим можна пояснити реакцію у вигляді лихоманки, що виникла у цій тварині після інфікування вірусом CRCoV, оскільки попередньо не було відмічено випадків викликання цим вірусом лихоманки в експериментальних умовах. У жодної з вакцинованих собак випадків клінічної лихоманки відмічено не було.

На 4 та 14 день після інфікування був проведений загальний аналіз розтину легенів, трахеї та назальних раковин. Значних помітних уражень відмічено не було, за виключенням легеневих ущільнень у двох собак з групи T05, двох собак з групи T01 та одного собаки з групи T02. Причина цих уражень є неясною, але ймовірно вона не пов'язана з CRCoV, оскільки картина уражень не є відповідною та не була доведена здатність вірусу CRCoV викликати легеневі ущільнення. Діагностична бактеріологічна перевірка тканин не свідчить про причетність будь-якого іншого патогену.

Також була проведена перевірка та оцінка тканинних зразків легенів, трахеї та порожнини носу. В залежності від спостережуваного ступеню змінень була застосована шкала оцінки від 0 до 4 балів. Проведені попередні дослідження показали, що циліарні пошкодження епітелію трахеї на четвертий день після інфікування є характерним патологічним ефектом, пов'язаним з зараженням вірусом CRCoV (Priestnall et al 2009). Дані гістопатологічних досліджень показали, що на четвертий день після інфікування 70 % вакцинованих сольовим розчином собак зазнали певних трахеальних циліарно-епітеліальних пошкоджень. На відміну від цього, обидві вакцини зменшили кількість уражених собак на 40 % для препарату Rehydrigel™ ($p = 0.1184$) та 0 % для препарату Emulsigen® ($p = 0.0003$), що свідчить про те, що ці вакцини викликають імунну ефективність, важливий вроджений механізм оборони, який захищає інфікованих собак проти трахеальних мукоциліарних пошкоджень або їх зменшує.

Для оцінки можливого втручання у дослідження інших респіраторних патогенів, тварини були піддані діагностичній бактеріологічній перевірці перед інфікуванням (назальні мазки) та

після інфікування (тканини легенів або рідина легеневого лаважу). Отримані результати показали, що тварини більшим чином не мали інших респіраторних патогенів, що вказує на те, що клінічні результати, виміряні після інфікування були специфічно пов'язані з інфекцією CRCoV.

- 5 В цілому, у всіх CRCoV-CIV- вакцинованих собак (100 %) через три тижні після другої вакцинації були виявлені титри антитіл, що нейтралізують сироватку CRCoV, що вказує на активну імунізацію з наступною стійкою пост-інфекційною анамнестичною відповіддю, що свідчить про добре примування імунної системи. Два вакцинних препарати також значно зменшили виділення вірусу та значно зменшили відсоток тварин, з легенів ($p < 0.0001$) та
- 10 порожнин носу ($p < 0.002$) яких був отриманий вірус. Обидві вакцини зменшили виділення вірусу з трахеї, хоча тільки застосування препарату Emulsigen® привело до значного зменшення отриманого вірусу у порівнянні з контролями, вакцинованими сольовим розчином ($p = 0.0089$). Обидві вакцини також зменшили кількість собак з ураженнями циліарного епітелію трахей. Ефективність антигену CRCoV цих вакцин була досягнута у присутності антигену CIV, що вказує
- 15 на відсутність перешкоджаючої дії фракції CIV на CRCoV.

Приклад 3. Безпечність та ефективність для собак вакцин, що містять бактерії *Bordetella bronchiseptica*.

- У дослідженнях приймали участь п'ятдесят (50) собак, розподілених на 5 груп лікування. Прийнятність тварин для досліджень визначали на основі медичного огляду на - 4 день. Зразки
- 20 крові кожної тварини (приблизно 8 мл) для серологічного аналізу збирали у пробірки для відокремлення сироватки (SST tubes) на -2, 21 та 28 день досліджень перед кожною вакцинацією. Зразки сироватки збирали на -2 день досліджень для підтвердження відсутності у тварин бактерій *B. Bronchiseptica*. Назальні мазки збирали у нульовий день перед вакцинацією та перевіряли на присутність *B. bronchiseptica*. Тимпанальні температури вимірювали,
- 25 починаючи з -4 досліджень для визначення вихідного значення перед вакцинацією.

Вакцинацію тварин відповідною вакциною проводили у 0, 21, та 28 день досліджень у відповідності з планом, наведеним у Таблиці 4. Першу вакцинацію тваринам робили у ділянку правого плеча, а другу вакцинацію - у ділянку лівого плеча.

Таблиця 4

План досліджень

Група	IVP	N	Вакцинація ¹			Інфікування ²		
			об'єм (мл)	дні дослідження	шлях введення	день дослідження	цільова доза /собаку	шлях введення
T01	<i>B. bronchiseptica</i> (інактивовані) + пертактин (10мкг) без ад'юванта	10	1.0	0 та 28	SC	56	10^9	інтра-назально (розпилюванням у камері)
T02	сольовий розчин	10	1.0	0 та 28				
T03	<i>B. bronchiseptica</i> (інактивовані) + пертактин (10 мкг) без ад'юванта	10	1.0	0 та 21				
T04	CRCoV/CIV/CPIV/ CAV2 регідратований з <i>B. bronchiseptica</i> (інактивованими) + пертактин (10мкг) без ад'юванта	10	1.0	0 та 28				
T05	CRCoV/CIV/CPIV/ CAV2 регідратований з водою (розчинник)	10	1.0	0 та 28				

¹ Дослідницький ветеринарний продукт (IVP) вводили підшкірно (SC).

² Цільова доза інфікування складала 10^9 організмів штаму *Bordetella bronchiseptica*.

Обстеження тварин на наявність у них побічних реакцій у місці ін'єкції, що виникають протягом вакцинації проводили у 0, 21, та 28 дні після вакцинації. Також тварин щоденно обстежували на наявність у них пост-вакцинаційних побічних реакцій у місці ін'єкції у 1-7 та 22-35 дні досліджень. Тимпанальні температури збирали у 0-7 та 21 – 35 дні досліджень.

Зразки крові (приблизно 6 мл) для серологічного аналізу збирали на 55 день досліджень, за один день перед інфікуванням. Тимпанальні температури збирали перед інфікуванням на 54, 55 та 56 день досліджень. Назальні мазки збирали на 55 день досліджень, за один день перед інфікуванням та перевірили їх на наявність бактерій *B. bronchiseptica*. Двічі на день (вранці та ввечері) тварин також обстежували (тривалість кожного обстеження сягала приблизно 30 хв.) на 54 та 55 день досліджень та на 56 день досліджень (вранці) на наявність клінічних ознак респіраторного захворювання для визначення вихідних значень.

Штам *Bordetella bronchiseptica* був застосований для інфікування з отриманням цільової дози інфікування у 10^9 КУОFU/4 мл / собаку. На 56 день досліджень, собак у всіх групах лікування інтраназально інфікували *B. bronchiseptica* шляхом розпилення штаму у плексигласовій камері протягом 30 хв. на кожне поміщення для тварин. За один раз піддавали інфікуванню п'ять собак з одного й того ж поміщення (по одній з кожної групи лікування).

Тимпанальні температури після інфікування записували раз на день, на 56 – 77 день досліджень. Клінічні спостереження проводили з 56 по 77 день досліджень (двічі на день (вранці та ввечері)) та на 77 день досліджень (тільки вранці) протягом приблизно 30 хв. у окремій кімнаті для кожного спостереження. Стисло кажучи, хворобливі явища, як-то кашель, виділення з носа, чхання, очні розлади, позиви на блювоту та депресію спостерігали за допомогою наступної оціночної системи: відсутність (0), слабкий ступінь (1), помірний ступінь (2) та тяжкий ступінь (3). Назальні мазки збирали на 59, 62, 66, 69, 74, 76 та 77 день досліджень для визначення ступеню виділення організмів інфікування.

Зразки крові (приблизно 6 мл) для серологічного аналізу збирали на 77 день досліджень. Назальні мазки для отримання *B. bronchiseptica* збирали за допомогою тампонів та транспортного середовища.

Аглютинуючі антитіла до *B. bronchiseptica* визначали шляхом застосування мікропроби на аглютинацію (MAT). Зразки сироватки груп лікування T04 та T05, зібрані у 0, 28, 55 та 77 дні досліджень титрували на антитіла CRCoV шляхом сироваткової нейтралізації та непрямого флуоресцентного аналізу антитіл, а на антитіла CIV шляхом аналізу гемаглютинації. Отримання бактерій *B. bronchiseptica* з назальних мазків проводили згідно зі стандартною процедурою. Кожну пробу піддали якісному тестуванню на присутність або відсутність бактерій.

В результаті перевірки 50 цуценят – гончаків восьмитижневого віку шляхом отримання культур назальних мазків було підтверджено, що всі тварини у нульовий день досліджень були вільними від бактерій *B. Bronchiseptica*. Перевірка зразків сироватки на наявність антитіл, здатних до аглютинації *B. bronchiseptica* за допомогою MAT – аналізу підтвердила, що всі цуценята були сприйнятливими на 2 день досліджень та мали MAT - титри ≤ 8 .

Після першої вакцинації, застосування всіх досліджуваних тут експериментальних вакцин призвело до появи слабких набряків у місці ін'єкції. Для більшості вакцинатів, ці набряки спостерігали тільки у нульовий день досліджень. Після другої вакцинації у місці ін'єкції також були відмічені слабкі набряки. Якщо такі набряки мали місце, то вони потім зникали протягом 1 – 3 днів після другої вакцинації. Свербіж був головним чином відмічений у групі з 5-позиційною комбінацією (T04). Жодних випадків клінічної лихоманки після вакцинації спостережено не було. Жодних набряків у місці ін'єкції у групі, вакцинованої сольовим розчином спостережено не було. Отримані дані підтверджують безпечність вакцин.

Підрахунок колоній, проведений перед та після щеплення шляхом інфікування підтверджує, що у камері було розпилено в середньому по 1.45×10^8 КУО *Bordetella* / собаку. Щеплення шляхом інфікування викликало кашель у всій контрольній групі, що отримала сольовий розчин (T02), який тривав 12.2 днів в середньому у 43.5 % піддослідних тварин. У групі лікування T05, яка була вакцинована тільки 4-х компонентною вірусною сумішшю (CRCoV/CIV/CPIV/CAV2) без антигену *Bordetella* також, подібно до групи T02 спостерігали кашель, що тривав 12.2 днів в середньому у 43.4 % піддослідних тварин. Ці результати свідчать про те, що інфікування було адекватним та прийнятним для оцінки досліджуваних вакцин.

Тварини у групі лікування T01, що були вакциновані вакциною з *Bordetella* були у більшій мірі захищені проти інфікування (3.6 днів кашлю, $p < 0.0001$) у порівнянні з контрольною групою (12.2 днів кашлю). Та ж саме вакцина також значно захистила собак у групі T03 при її застосуванні з трьохтижневим інтервалом (5.8 днів кашлю, $p = 0.0004$). Зменшення кашлю у цих двох групах (T01 vs T03) суттєво не розрізнялося (p -величина = 0.1883), що наводить на думку про схожість рівня захисту для вакцини, яку застосовують з інтервалом у 3 або у 4 тижні.

Собаки у групі T04, що отримали 5-компонентну комбінаційну вакцину, не посилену ад'ювантом були значніше ($p=0.0016$) захищені проти інфікування Bordetella (6.6 днів кашлю) у порівнянні з контролями, вакцинованими сольовим розчином (12.2 днів кашлю) та у порівнянні з групою T05, що отримала 4-компонентну вірусну (CRCoV/CIV/CPiV/CAV2) комбінацію (12.1 днів кашлю, $p=0.0019$) що вказує на ефективність фракції Bordetella у комбінаційній вакцині без ад'юванта.

Проведення серологічного аналізу вірусних фракцій у 5-компонентній комбінаційній вакцині було можливим тільки для двох фракцій, CIV та CRCoV, де у собак була підтверджена серонегативність на -2 день досліджень. Гемаглютинаційна відповідь CIV у групі з 4-компонентною вакциною (T04) на 56 день досліджень була чисельно подібною до такої ж відповіді у групі з 5-компонентною вакциною (T05), що свідчить про відсутність перешкоджаючої дії фракції Bordetella на CIV антиген. Відповіді нейтралізації сироватки CRCoV на 56 день досліджень були чисельно вищими у 4-компонентній вакцинній групі (T04), ніж у 5-компонентній вакцинній групі (T05), що вказує на можливу наявність перешкоджаючої дії Bordetella на фракцію CRCoV. Однак, ці висновки не є остаточними, оскільки ці вакцини не були підсилені ад'ювантами, препарат не було оптимізовано та не проводили інфікування CRCoV для перевірки ефективності.

Була підтверджена безпечність та ефективність моновалентної вакцини з Bordetella. Ефективність такої моновалентної вакцини була доведена, коли її застосовували з 21- або 28-денними інтервалами. Було також показано, що фракція Bordetella також є ефективною при застосуванні у 5-компонентній комбінаційній вакцині без ад'юванта.

Приклад 4. Мультивалентні серологічні дослідження.

40 собак приблизно восьмижневого віку з добрим загальним станом здоров'я попередньо перевірили на наявність Bordetella bronchiseptica шляхом мікрореакції аглютинації (MAT) та на наявність собачого респіраторного коронавірусу (CRCoV) шляхом непрямого флуоресцентного аналізу антитіл (IFA). Також, для оцінки рівнів антитіл був застосований спосіб нейтралізації сироватки (SN). У нульовий день досліджень, всі собаки були негативними до антитіл до Bordetella bronchiseptica (визначено шляхом MAT; ≤ 16) та негативними до антитіл до CRCoV (визначено шляхом IFA; < 40). Всі собаки також були вільними від Bordetella bronchiseptica та CRCoV, як було визначено шляхом перевірки з отриманням назальних мазків перед першою вакцинацією (нульовий день досліджень).

Собак розділили на 5 груп лікування по 8 тварин у кожній та вакцинували відповідно за планом досліджень, наведеним у Таблиці 1. Першу вакцинацію тваринам робили у ділянку правого плеча, а другу вакцинацію - у ділянку лівого плеча.

Таблиця 1

План досліджень

Група лікування	Дослідницький ветеринарний продукт (IVP)	Ад'ювант	N	Вакцинація ¹	
				дні дослідження	шлях введення
T01	CAV2/CPiV/CPV/L4	5 % Rehydragel	8	0 та 21	підшкірно (SC)
T02	CAV-2, CPI, CRCoV+Bordetella, CIV	QCDC	8		
T03	CAV-2, CPI, CRCoV+Bordetella, CIV	1 % EMA ¹ / 3 % Neocryl/ 5 % Emulsigen SA	8		
T04	CAV-2, CPI, CRCoV+Bordetella, CIV	QCDC	8		
T05	CAV-2, CPI, CRCoV+Bordetella, CIV	QCDC	8		

¹ EMA= етилен-малеїновий ангідрид

Після другої вакцинації, групи T04 та T05 були відсторонені від подальших досліджень через ускладнення. Собак у позосталих групах (T01, T02 та T03) щоденно обстежували на пост-вакцинаційні реакції та вимірювали їх тимпанальні температури впродовж тижня після кожної вакцинації. Зразки крові для вимірювання гуморальних імунних відповідей відбирали у 0, 21, 42 та 56 дні досліджень.

Зразки сироватки, зібрані у 0, 21, 42 та 56 дні досліджень були перевірені на аглютинацію антитіл до *Bordetella bronchiseptica* за допомогою MAT - тесту. Також зразки сироватки, зібрані у ці дні титрували на наявність антитіл CRCoV шляхом сироваткової нейтралізації, на наявність антитіл CIV шляхом гемаглютинації та на наявність антитіл CAV-2 та CPI також шляхом сироваткової нейтралізації. Для кожної групи лікування були отримані геометричні середні титри антитіл.

Досліджувані вакцини викликали гуморальні імунні відповіді у всіх (100 %) вакцинованих собак у групах T02 та T03 після другої дози, що вказує на активну імунізацію проти вірусного антигену. Після другої вакцинації у більшості вакцинованих собак спостерігалось підвищення гуморальної імунної відповіді, що вказує на бустерний ефект другої вакцинації. Важливо зазначити, що гуморальні імунні відповіді були досягнуті серед вірусних фракцій у присутності різноманітних вірусних та бактеріальних (*B. bronchiseptica*) антигенів, що вказує на відсутність імунологічного перешкоджаючого ефекту. Серологія з застосуванням MAT – тесту не є корелятивним засобом для захисту проти *Bordetella*, але вона є скоріше цінним інструментом перевірки для зарахування прийнятих піддослідних тварин. На закінчення, на основі імунологічної відповіді у вакцинованих собак можна прогнозувати ефективність вірусних антигенів у 5 – компонентній мультивалентній вакцини.

Приклад 5. Тривалість досліджень імунності.

Метою цих досліджень була демонстрація тривалості мультивалентної респіраторної комбінаційної вакцини у собак. Ця вакцина містила наступні антигенні компоненти: модифікований живий вірус CAV-2, модифікований живий вірус CPiV, інактивовані віруси CIV, інактивовані віруси CRCoV та екстракт *Bordetella bronchiseptica*, доповнений рекомбінантним антигеном, що був або пертактином або Bsp22 або обома з них.

Всі тварини знаходилися у доброму стані здоров'я та не мали жодних щеплень проти будь-якого з патогенів, до якого була призначена вакцина. Для досліджень собак розділили на декілька наборів груп лікування. Кожен з таких наборів складався з двох груп лікування, контрольної групи, що була вакцинована плацебо та групи вакцинатів, що отримала досліджувану вакцину. Тварин вакцинували двічі, з приблизно 2-4 тижневою перервою. Також, після кожної вакцинації, тварин досліджували на наявність реакцій у місці ін'єкції.

Приблизно через 3-12 місяців після вакцинації, кожен набір з двох груп лікування (вакцинати та контролю) інфікували одним з патогенів, для захисту проти якого була призначена вакцина. Клінічні спостереження проводили перед та після інфікування. Назальні мазки для отримання патогену інфікування збирали впродовж постінфікувального періоду. Кров кожної тварини збирали для отримання сироватки, яку застосовували у наступних аналітичних дослідженнях. Критеріями оцінки ефективності вакцин були присутність клінічних ознак респіраторного захворювання, розповсюдження патогену у середовище після інфікування та серологічні відповіді.

Всі вищенаведені посилання включені в даний опис за допомогою посилання, як начебто вони були б повністю викладені у даному документі.

Маючи таким чином докладно описані різні варіанти втілення даного винаходу, має бути зрозумілим, що винахід, визначений у доданій Формулі Винаходу не повинен бути обмежений окремими деталями, вказаними у вищенаведеному описі, тому що є очевидним існування багатьох інших його варіантів без відходу від суті або обсягу заявленого винаходу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Вакцинна композиція, що містить вірус грипу собак (CIV) та респіраторний коронавірус собак (CRCoV).

2. Вакцинна композиція за п. 1, що додатково містить *Bordetella bronchiseptica*.

3. Вакцинна композиція за п. 2, що додатково містить пертактиновий антиген р68.

4. Вакцинна композиція за п. 2, де вказана *Bordetella bronchiseptica* є бактерином або бактеріальним екстрактом.

5. Вакцинна композиція за п. 2, що додатково містить один або обидва антигени, вибрані з вірусу парагрипу собак (CPiV) та собачого аденовірусу типу 2 (CAV-2).

6. Вакцинна композиція за п. 5, де один або обидва антигени є CPiV та CAV-2.

7. Вакцинна композиція за будь-яким одним з пп. 2-6, що додатково містить виділений антиген Bsp22.

8. Вакцинна композиція за будь-яким одним з попередніх пунктів, де вказана композиція не містить ад'юванту.

9. Вакцинна композиція за будь-яким одним з пп. 1-7, що додатково містить ад'ювант.

10. Вакцинна композиція за будь-яким одним з попередніх пунктів, де вказана композиція не містить нереспіраторного антигену.

11. Вакцинна композиція за будь-яким одним з попередніх пунктів, де вказана композиція викликає у собаки імунну відповідь на собачий респіраторний патоген.

5 12. Вакцинна композиція за п. 11, де вказаний собачий респіраторний патоген є принаймні одним з CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica* та *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*).

13. Застосування вакцинної композиції за будь-яким одним з пп. 1-10 для лікування або запобігання інфекції у собаки, спричиненої собачим респіраторним патогеном, де вказаний собачий респіраторний патоген є принаймні одним з CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica* та *M. cynos*.

14. Застосування за п. 13, де вказана композиція запобігає вказаній інфекції на період, що складає приблизно шість місяців або більше.

15. Застосування за п. 13, де вказана композиція запобігає вказаній інфекції на період, що складає приблизно один рік.

16. Застосування вакцинної композиції за будь-яким одним з пп. 1-10 у виробництві лікарського засобу для лікування або запобігання інфекції у собаки, спричиненої собачим респіраторним патогеном, де вказаний собачий респіраторний патоген є принаймні одним з CIV, CRCoV, CPIV, CAV-2, *Bordetella bronchiseptica* та *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*).

17. Вакцинна композиція за будь-яким одним з пп. 1-10, де вказана композиція лікує або запобігає виникненню у собаки комплексу інфекційної респіраторної хвороби собак (CIRDC).

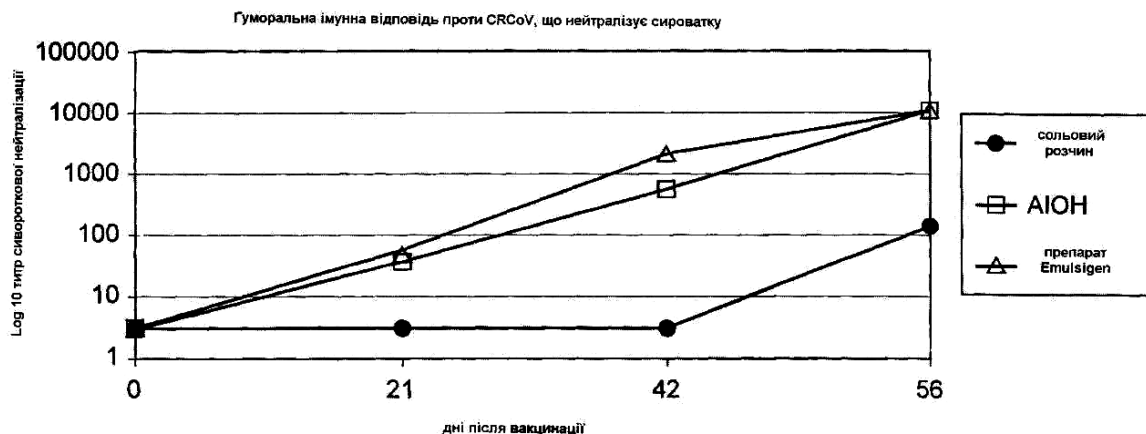
18. Спосіб лікування або запобігання CIRDC у собаки, що полягає у введенні вказаному собаці вакцинної композиції за будь-яким одним з пп. 1-10.

19. Спосіб за п. 18, де вказана композиція запобігає виникненню CIRDC на період, що складає приблизно шість місяців або більше.

20. Спосіб за п. 18, де вказана композиція запобігає виникненню CIRDC на період, що складає приблизно один рік.

21. Застосування вакцинної композиції за будь-яким одним з пп. 1-10 у виробництві лікарського засобу для лікування або запобігання CIRDC у собаки.

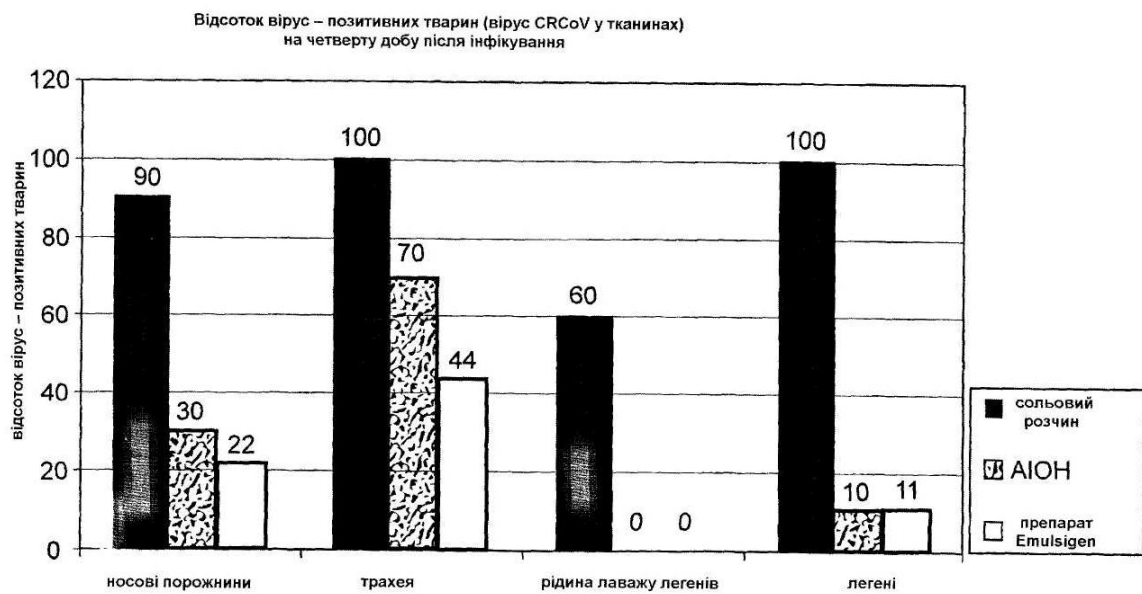
22. Вакцинна композиція за п. 1, де вказаний CIV являє собою штам, що є депонованим у ATCC як PTA-7694, а вказаний CRCoV являє собою штам, що є депонованим у ATCC як PTA-11444.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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