

**УКРАЇНА****(19) UA****(11) 115029****(13) C2****(51) МПК****A61K 39/12** (2006.01)**A61K 39/39** (2006.01)**A61P 31/20** (2006.01)

**МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2013 10517	(72) Винахідник(и):	Багі Седо Мартін (US), Чілдерс Тедд Алан (US), Доміновскі Пол Джозеф (US), Кребс Річард Лі (US), Маннан Рамасамі Маннар (US), Ольсен Марі Кетрін (US), Томпсон Джеймс Річард (US), Вератна Рісіні Дамміка (CA), Янсей Роберт Джон Джр. (US), Зан Шучен (US)
(22) Дата подання заявки:	24.06.2009	(73) Власник(и):	ПФАЙЗЕР ІНК., 235 East 42nd Street, New York, New York 10017, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	11.09.2017	(74) Представник:	Кукшина Тетяна Архипівна, реєстр. №88
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/076,232, 61/214,557	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2005/220814 A1, 06.10.2005 WO 2004/067031 A1, 12.08.2004 WO 03/003941 A2, 16.01.2003
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	27.06.2008, 24.04.2009		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.12.2013, Бюл.№ 23		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.09.2017, Бюл.№ 17		
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21):	, a201013068, 24.06.2009		

(54) НОВІ АД'ЮВАНТНІ КОМПОЗИЦІЇ**(57) Реферат:**

Винахід стосується вакцинної композиції, що включає ад'ювантну композицію та терапевтично ефективну кількість антигенного компонента, де ад'ювантна композиція містить сапонін, стерол, сполуку четвертинного амонію та поліакрилову кислоту та де антигенний компонент включає котячий вірус лейкемії або котячий вірус пташиного грипу.

UA 115029 C2

Цей винахід головним чином стосується нових ад'ювантних препаратів для підсилення імунної відповіді на антигени для використання у імуногенних та вакцинних композиціях, без продукування токсичних або неочікуваних побічної дії у суб'єкті. Цей винахід також стосується способів приготування та використання ад'юванту, імуногенних та вакцинних композицій.

Бактеріальні, вірусні, та спричинені паразитами інфекції є широко поширеними у людей та тварин. Хвороби, спричинені цими інфекційними агентами є часто стійкими до антимікробної фармацевтичної терапії, без ефективних засобів лікування. Отже, шлях створення вакцин все частіше використовують для контролю інфекційних захворювань. Цілий інфекційний патоген може бути зроблений придатним для використання у препараті вакцини після хімічної інактивації або відповідної генетичної маніпуляції. Крім того, білкова субодинація патогену може бути експресована у рекомбінантній системі експресії та очищена для використання у препараті вакцини. Вакцини можуть бути зроблені більш дієздатними додаванням у композицію відповідного ад'юванту.

Також є підвищений інтерес у застосуванні вакцинології для лікування раку у тварин та людей. Цей терапевтичний підхід до лікування раку полягає у вакцинації пацієнтів, хворих на рак вакциною, що містить специфічний до пухлин антиген та ад'ювант. Проте, жодна з багатьох подібних вакцин не була схвалена регулювальними органами. Не показано, що вакцини здатні зменшувати пухлини, застосування стандартних засобів ліків проти раку є більш дієвим.

Термін ад'ювант головним чином стосується будь-якого препарату, що збільшує гуморальну або клітинну імунну відповідь на антиген. Ад'юванти використовують для досягнення двох цілей - вони сповільнюють вивільнення антигенів з місця ін'єкції та вони стимулюють імунну систему. Традиційні вакцини головним чином складаються з грубого приготування інактивованих або вбитих або модифікованих живих патогенних мікроорганізмів. Домішки, пов'язані з цими культурами патологічних мікроорганізмів можуть виступати в якості ад'юванту для посилення імунної відповіді. Проте, імунітет, викликаний вакцинами, де як антигени використовують гомогенні препарати патологічних мікроорганізмів або очищені білкові субодинації, часто низький. Отже, становиться необхідним додавання певних екзогенних речовин, таких як ад'юванти.

Більш того, виробництво синтетичних та субодиначних вакцин багато коштує. Додавання ад'юванту може дозволити використання поменшеної дози антигену для стимуляції подібної імунної відповіді, таким чином знижуючи ціну виробництва вакцини. Отже, ефективність деяких придатних для введення шляхом ін'єкції лікувальних агентів може бути суттєво підвищена, коли агент є поєднаним з ад'ювантом.

Багато факторів повинні бути прийняті до уваги при підборі ад'юванту. Ад'ювант повинен викликати відносно повільний рівень вивільнення та ефективне поглинення антигену з мінімальними токсичними, алергенними, запальними, та іншими неочікуваними проявами в організмі господаря. Бажано, щоб ад'ювант був невіроцидним, здатним до біологічного розпаду, здатним послідовно створювати високий рівень імунітету, здатним стимулювати перехресний захист, сумісним з численними антигенами, дієздатним у численних різновидах, нетоксичним та безпечним для господаря (наприклад, без реакцій у місці ін'єкції). Іншими бажаними характеристиками ад'юванту є здатність до мікродозування, якщо доз недостатньо, чудова стійкість при зберіганні, він повинен піддаватися сушінню, може бути зроблений без додавання олій, може існувати як у твердому, так та у рідкому стані, бути ізотонічним, здатним до легкого виробництва, та недорогим. Зрештою, дуже бажано для ад'юванту бути здатним утворювати різні конфігурації для викликання гуморальної, або клітинної імунної відповіді, або обох, у залежності від вимог сценарію вакцинації. Проте, кількість ад'ювантів, що може відповідати вищезгаданим умовам є обмеженою.

Вибір ад'юванту залежить від потреб для вакцини, будь-то збільшення розміру або функції відповіді антитіл, збільшення клітинної імунної відповіді, індукції мукозного імунітету, або скорочення дози антигену. Було запропоновано кілька ад'ювантів, проте, жоден, як було показано, не був ідеально придатним для всіх вакцин. Перший ад'ювант, описаний у літературі, був повний ад'ювант Фрейнда (FCA), який містить емульсію вода-в-олії та екстракти мікобактерій. На жаль, FCA погано переноситься та може викликати неконтрольоване запалення. Після відкриття FCA більш ніж 80 років тому були зроблені зусилля по скороченню небажаної побічної дії ад'ювантів.

Деякі інші речовини, використані у якості ад'ювантів охоплюють оксиди металів (наприклад, гідроксид алюмінію), галун, неорганічні хелати солей, желатини, різні олії типу парафіну, синтезовані камеді, альгінати, мукоїдні та полісахаридні сполуки, казеїнати, та речовини, що було отримано з крові, такі як згустки фібрину. Хоча ці речовини є головним чином дієздатними у стимулюванні імунної системи, жодна з них не була повністю прийнятною через шкідливі

прояви у організмі хазяїна (наприклад, створення стерильних абсцесів, пошкодження органу, канцерогенність, або алергенні реакції) або через неочікувані фармацевтичні властивості (наприклад, швидке розповсюдження або поганий контроль розповсюдження з місця ін'єкції, або набрякання речовини).

Синтетичні олії та похідні нафти теж мали використання у якості ад'ювантів, тому що вони проявляли відносно повільне розповсюдження у тілі хазяїна, але вони могли себе несподівано проявляти, так як вони часто розпадаються на ароматичні вуглеводні, які можуть бути канцерогенними. Більш того, деякі з цих речовин, як було виявлено, були здатні створювати стерильні абсцеси та не можуть бути повністю усунені організмом. Олії, коли вони є відповідно відібраними та зробленими у відповідних концентраціях можуть бути відносно безпечними та нетоксичними.

Сапоніни, отримані з кори південноамериканського дерева *Quillaja saponaria* деякий час теж використалися у якості ад'ювантів. Див. Lacaille-Dubois, M та Wagner H. (A review of biological та pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386. 1996). Багато ветеринарних вакцин, що використовують зараз, містять Quil A, який є фракцією сапоніну з кори південноамериканського дерева *Quillaja saponaria molina*. Подальшим розділенням на фракції Quil A було отримано суб-фракції, що охоплюють QS-7, QS-17, QS-18, та QS-21. (Див. U. S. Pat. No. 5, 057, 540)

Використання сапонінів у якості ад'ювантів пов'язано з численними незручностями. Сапоніни є розчинними, тому стимулюють виникнення неспецифічної імунної відповіді. Метою вакцинології, проте, є стимулювання цілеспрямованої відповіді на специфічний антиген або антигени. Сапоніни мають сильну взаємну прихильність до холестерину. Вони утворюють комплекс з холестерином, знайденим у клітинних мембранах, що спричинює гемоліз клітини. Вони, як також було показано, викликають некроз у місці ін'єкції та їх важко зробити у вигляді окремих структур. При використанні у вакцинах, що містять модифіковані живі віруси у оболонці, сапоніни порушують вірусну оболонку та таким чином інактивують вірусні антигени.

Для подолання гемолітичної та віроцидної властивостей Quil A, він був поєднаним з холестерином та фосфоліпідами, та була створена специфічна структура, znana як імуностимуляторний комплекс (ISCOM) або матриця ISCOM (ISCOMATRIX). Див. Ozel M., et al.; J. Ultrastruc. та Molec. Struc. Re 102, 240-248 (1989). ISCOMи, коли вони є поєднаними з антигеном, головним чином викликають Th1 цитотоксичну Т-клітинну відповідь. Проте, хоча гемолітичні властивості Quil A були значно знижені, комбінування Quil A з холестерином не повністю їх усуває. Іншим обмеженням ISCOMів є те, що білок антигену повинен мати гідрофобні домени, достатньо великі для взаємодії з ISCOM для того, щоби приєднатися до нього. Білок який є високо гідрофільним не може бути приєднаним до ISCOM. Крім того, ISCOMи можуть стимулювати неочікувану автоімунну реакцію у суб'єкта.

Імуномодулятори можуть бути використані у якості ад'ювантів, наприклад, диметилдіоктадециламонію бромід (надалі, "DDA"), та авірдин. DDA - ліпофільна четвертинна сполука амонію (амін) з двома 18 карбоновими алкіловими ланцюгами та двома метильними групами, пов'язаними з позитивно зарядженою четвертинною молекулою амонію з молекулярною масою 631. Його використання у якості ад'юванту було відкрито Gall, (Immunol. V. 11, p. 369, 1966). DDA, як описано, стимулює сильні клітинні імунні відповіді, та також, як було показано, викликає гуморальні імунні відповіді. Крім того, було опубліковано багато документів, де показана ефективність DDA у якості ад'юванту для білкових антигенів, гаптенів, пухлин, вірусів, найпростіших та бактерій. (Див. Korsholm, K S., et al., Immunology, vol. 121, pp. 216-226, 2007). Більшість досліджень було зроблено на лабораторних тваринах, поки тільки декілька досліджень було проведено на великих тваринах, таких як курчата (Див. Katz, D., et al. FEMS Immunol Med Microbiol. Vol 7(4):303-313, 1993), свині, та велика рогата худоба. DDA є ефективним для викликання реакції гіперчутливості уповільненого типу (DTH) як у лабораторних тварин, так та у великих тварин. Проте, він погано розчиняється у воді.

Полімери також використовують у якості ад'ювантів, наприклад, діетил-аміноетил (DEAE)-декстран, поліетиленгліколь, та поліакрилова кислота (наприклад, CARBOPOL®). Полісахарид DEAE-декстран, як відомо, є дуже сильним ад'ювантом. Проте, його дія пов'язана з неприпустимою реактогенністю. Полімери CARBOPOL® є полімерами акрилової кислоти, зшитими з поліалкеніловими естерами або дивінілгліколем. CARBOPOL® використовується у деяких вакцинах, але його використання як ад'юванту не засвідчено.

Деякі ад'юванти, як показано, стимулюють Th2 відповідь, наприклад N-(2-деоксі-2-L-лейциламіно-b-D-глюкопіранозил)-N-октадецилдодеканоламід у гідроацетат, також відомий під торгівельною маркою Bay R1005®, коли він є у формі ацетату та алюмінію. Bay R1005® у комбінації з очищеною вірусною вакциною або субодиничною вакциною приводить до

підвищення виробництва антитіл у мишей, інфікованих вірусами. Доклінічні випробування на інших видах тварин (свині, вівці, коні) дали порівнянні результати відносно виробництва антитіл. Підвищення синтезу антитіл, яке викликано Bay R1005® особливо залежить від антигену та не є результатом поліклональної стимуляції.

Перед цим винаходом не було у наявності такого препарату ад'юванту, який би мав широкий діапазон бажаних характеристик, що повинен мати ідеальний ад'ювант. Були зроблені зусилля, щоб знайти нові ад'юванти для вакцин, що можуть подолати недоліки традиційних ад'ювантів. Зокрема, дуже бажано було створити ад'ювант, що викликає потужні клітинні та гуморальні імунні відповіді до широкого ряду антигенів у людей та тварин, проте не має побічної дії та труднощів приготування, властивих звичайним ад'ювантам.

Цей винахід стосується нових ад'ювантних, імуногенних, та вакцинних композицій. Зокрема, цей винахід стосується ад'ювантних препаратів, що містять Th1 ад'юванти, імуномодулятори, полімери, та Th2 ад'юванти. Цей винахід також стосується імуногенних та вакцинних композицій, що містять такі ад'ювантні препарати та один або більше антигенів, так само, як і способи приготування ад'ювантних та вакцинних композицій.

У одному втіленні, ад'ювантні композиції охоплюють комбінацію сапоніну, стеролу, та четвертинної сполуки амонію. У одному втіленні, сполука ад'юванту містить Quil A, холестерин, та DDA.

У іншому втіленні, ад'ювантні композиції складаються з комбінації сапоніну, стеролу, четвертинну сполуку амонію, та полімеру. У одному втіленні, сполука ад'юванту - Quil A, холестерин, DDA, та поліакрилова кислота.

У іншому втіленні, ад'ювантні композиції складаються з комбінації сапоніну, стеролу, четвертинну сполуку амонію, полімеру, та глюколіпиду. У одному втіленні, сполука ад'юванту - Quil A, холестерин, DDA, поліакрилова кислота, та Bay R1005®.

У одному втіленні, імуногенна композиція, що містить препарат ад'юванту та імунологічну ефективну кількість антигену, де препарат ад'юванту, що охоплює сапонін, стерол, четвертинні сполуки амонію, та полімер, є отриманою способом, що полягає у:

- a) приготуванні сполуки антигену у буфері,
- b) додаванні сапоніну до сполуки за п. a;
- c) додаванні стеролу до сполуки за п. b;
- d) додаванні четвертинної сполуки амонію до сполуки за п. c,
- e) додаванні полімеру до сполуки за п. d.

У одному втіленні цього процесу, сапонін - Quil A, стерол - холестерин, четвертинна сполука амонію - DDA, та полімер - поліакрилова кислота.

У одному втіленні, вакцина, що містить препарат ад'юванту та імунологічну ефективну кількість антигену, де препарат ад'юванту містить сапонін, стерол, четвертинні сполуки амонію, полімер, та глюколіпід є отриманою способом, що полягає у:

- a) приготуванні композиції антигену у буфері,
- b) додаванні сапоніну до сполуки за п. a;
- c) додаванні стеролу до сполуки за п. b;
- d) додаванні четвертинної сполуки амонію до сполуки за п. c,
- e) додаванні полімеру до сполуки за п. d, та
- f) додаванні глюколіпиду до сполуки за п. e.

У одному втіленні цього процесу, сапонін - Quil A, стерол - холестерин, четвертинна сполука амонію - DDA, полімер - поліакрилова кислота, та глюколіпід - Bay R1005®.

Було встановлено, що вищезгадані ад'ювантні композиції мають несподівані та неочікувані властивості понад того, що можна було б очікувати від такої комбінації. Було несподівано знайдено, що віроцидна властивість Quil A/холестерину у цих композиціях є усуненою та вони є придатними у якості розчинників для ліофілізованих модифікованих живих вірусних антигенів.

Ад'ювантні композиції, що описано тут, здатні створювати конфігурації для отримання надзвичайно сильної імунної відповіді, спрямованої, як клітинна імунна відповідь, як гуморальна імунна відповідь, або як обидва типи відповіді. На додаток, при використанні цих ад'ювантних препаратів можна уникнути реакцій у місці ін'єкції. Реактогенність є значно нижче, ніж у деяких окремих компонентів, що входять у склад комбінації ад'ювантів. На додаток, ці ад'ювантні препарати мають здатність довго зберігатися.

Заявники відкрили, що ці нові ад'ювантні композиції мають високу імуногенність, коли поєднані з одним або більшою кількістю різних антигенів у широкому діапазоні видів. Вони можуть бути використані з одним або більше вірусними, бактеріальними, паразитарними, рекомбінантно-білковими, та синтетичними пептидними антигенами, та їх комбінаціями. Нові

вакцинні ад'ювантні композиції можуть бути використані у терапевтичних вакцинах для лікування раку.

Отже, цей винахід забезпечує створення ад'ювантних, імуногенних, та вакцинних композицій. На додаток передбачено способи виробництва композицій. Також передбачено їх використання у лікуванні хвороб. Також передбачено їх використання у приготуванні ліків для лікування суб'єктів проти хвороб, особливо проти хвороб, описаних вище. Також передбачено їх використання у приготуванні ліків для профілактики або послаблення хвороби у суб'єкта.

Більш того, передбачено їх використання у приготуванні ліків для лікування кішок проти інфекції, викликаной вірусом лейкемії кішок, для лікування птахів проти пташиного кокцидіозу, для лікування корів проти хвороб, спричинених *Escherichia coli*, для лікування корів проти хвороб, спричинених вірусом вірусного проносу корів, для лікування свиней проти хвороб, спричинених *Mycoplasma hyorhynchopneumoniae*, для лікування кішок проти хвороб, спричинених вірусом котячого грипу, суб'єктів проти раку, для лікування собак проти хвороб, спричинених собачим коронавірусом, для лікування корів проти хвороб, спричинених ротавірусом корів, та для лікування собак проти хвороб, спричинених вірусом собачого грипу. Також передбачено використання ад'ювантів в якості маркера вакцини, щоб допомогти в ідентифікації тварин, які були вакциновані. Також передбачено використання CpG для посилення дії ад'ювантів.

Фіг. 1 зображує гель-перебіг при застосуванні радіоіммунопреципітаційного аналізу, де відображаються відмінності у профілі антитіл між NS2/3 білком та E2 білком вірусу BVD. Група, що оброблена PreZent A показує відповідь антитіл на NS2/3 білки та E2 білки, у той час як оброблені QCDC та QCDCR групи демонструють відповідь антитіл тільки до білка E2 та відсутність відповіді до білків NS2/3.

Поняття "приблизно" або "приблизно, " використовується у зв'язку з вимірними числовими перемінними, стосується вказаного значення перемінної, та всіх значень перемінної, що є у межах експериментальної похибки вказаного значення (наприклад, у довірчому інтервалі у 95 % для середнього значення) а бо у межах 10 відсотків від вказаного значення, що значно більше, за виключенням використання при посиланні на інтервали часу у тижнях, де "приблизно 3 тижнів, " означає 17-25 діб, та від приблизно 2 до 4 тижнів означає 10-40 діб.

Термін ад'ювант головним чином стосується будь-якого препарату, що збільшує гуморальну або клітинну імунну відповідь на антиген. Ад'юванти більшим чином використовують для досягнення двох цілей - вони сповільнюють вивільнення антигенів з місця ін'єкції та стимулюють імунну систему.

"Алкіл" стосується як та прямих, так і розгалужених насичених вуглеводневих груп.

"Амін" стосується хімічної сполуки, яка містить нітроген. Аміни є групою сполук, що походять з аміаку шляхом заміни вуглеводневими групами атомів гідрогену. "Четвертинний амін" стосується сполуки на основі амонію з чотирма вуглеводневими групами.

"Антитіло" стосується молекули імуноглобуліну, що може зв'язуватися з специфічним антигеном як результат імунної відповіді антигену. Імуноглобуліни є білками сироватки, що складаються з "легких" та "важких" поліпептидних ланцюгів, що мають "сталі" та "мінливі" частини та поділяються на класи (наприклад, IgA, IgD, IgE, IgG, та IgM) на основі сполучення сталих частин.

"Антиген" або "імуноген" стосується будь-яких речовин, що стимулюють імунну відповідь. Термін охоплює вбитих, інактивованих, послаблених, або модифікованих живих бактерій, вірусів, або паразитів. Термін "антиген" також охоплює полінуклеотиди, поліпептиди, рекомбінантні білки, синтетичні білки, екстракти білків, клітини (у тому числі пухлинні клітини), тканини, полісахариди, або ліпіди, або їх фрагменти, окремо або у будь-якої їх комбінації. Термін "антиген" також охоплює антитіла, такі як анти-ідіотипічні антитіла або їх фрагменти, та синтетичні пептидні мімотопи, що можуть імітувати антиген або антигенний детермінант(епітоп).

"Бактерин" означає суспензію одної або більше вбитих бактерій, яка може бути використана як компонент вакцини або імуногенної композиції.

"Буфер" означає хімічну систему, яка попереджає змінення у концентрації інших хімічних речовин, наприклад, протонів донорна та акцепторна системи служать у якості буферів, що попереджують значні змінення концентрації іонів гідрогену (pH). Іншим прикладом буферу є розчин, який містить суміш слабкої кислоти та її солі (сполучену основу) або слабкої основи та її солі (сполучена кислота).

"Клітинна імунна відповідь" або "клітинні імунні відповіді" є опосередкованою Т-лімфоцитами або іншими білими клітинами крові або обома разом, та охоплює виробництво цитокінів, хемокінів та подібних молекул, що виробляються активованими Т-клітинами, білими клітинами крові, або обома разом.

"Холестерин" стосується білої кристалічної речовини з хімічною формулою $C_{27}H_{45}OH$. Це - циклічний вуглеводневий спирт, який класифікується як ліпід. Він є нерозчинним у воді, але розчиняється у деяких органічних розчинниках.

5 "Гіперчутливість уповільненого типу (DTH)" стосується запальної реакції, що розвивається від 24 до 72 годин після дії антигену, який імунна систем визнає як сторонній. Цей тип імунної відповіді містить переважно Т-клітини, ніж антитіла (які виробляються В-клітинами).

"Доза" стосується вакцини або імуногенної композиції, яку дають суб'єкту. Поняття "перша доза" або "первинна вакцина" стосується дозування такої композиції, яку дають у нульову добу. "Друга доза" або "третя доза" або "щорічна доза" стосується кількості такої композиції, що була дана слідом за першою дозою, яка може бути або ні той самою вакциною або імуногенною композицією, як у першій дозі.

"Емульгатор" означає речовину, використання якої робить емульсію більш стабільною.

"Емульсія" означає композицію двох не змішуваних рідин, у який малі краплі однієї рідини знаходяться у суспензії з суцільною фазою іншої рідини.

15 "Естери" стосується будь-якого з класу органічних сполук, подібних неорганічним солям, що є сформованими в результаті реакції конденсації, де молекула органічної кислоти з'єднується з молекулою спирту з усуненням молекули води.

"Наповнювач" стосується будь-якого компонента вакцини, який не є антигеном.

20 "Гомогенізація" стосується процесу змішування одного або більше компонентів, або однакових, або різних, у однорідну суміш.

"Гуморальна імунна відповідь" стосується такої, що є опосередкованої антитілами.

"Гідрофобні" означає нерозчинні у воді, які важко поглинають вологу, або на яких несприятливо впливає вода; або несумісні з водою, або з маленької спорідненістю до неї.

25 "Імунна відповідь" у суб'єкта стосується розвитку гуморальної імунної відповіді, клітинної імунної відповіді, або гуморальної та клітинної імунної відповіді на антиген. Імунні відповіді можуть звичайно бути визначені з застосуванням стандартних відомих способів імуноаналізу та нейтралізації.

30 "Імунологічно запобіжна кількість" або "імунологічно ефективна кількість" або "ефективна кількість для отримання імунної відповіді" на антиген є кількістю, яка буде ефективною для викликання імуногенної відповіді у реципієнта. Імуногенної відповіді може бути достатньо для діагностичних цілей або інших тестів, або може бути достатньо для попередження ознак або симптомів хвороб, в тому числі шкідливих наслідків для здоров'я або їх ускладнень, спричинених інфекцією агента хвороби. Як гуморальний імунітет, так та клітинно-опосередкований імунітет, або обидва можуть бути викликані. Імуногенна відповідь тварин на імуногенну композицію може бути оцінена, наприклад, непрямим вимірюванням титрів антитіл, методами проліферації лімфоцитів, або безпосередньо через моніторинг ознак та симптомів після зараження штамом дикого типу, де захисний імунітет, наданий вакциною може бути оцінено шляхом вимірювання, наприклад, зниженням таких клінічних ознак як смертність, захворюваність, температура, загальний фізичний стан, та загальний стан здоров'я та характеристика суб'єкта. Імунна відповідь може охоплювати, без обмеження, індукцію клітинного та/або гуморального імунітету.

"Імуногенний" означає такий, що викликає імунну або антигенну відповідь. Тому імуногенна композиція може бути будь-якою композицією, що викликає імунну відповідь.

45 "Імуностимуляторний комплекс" або ISCOM відноситься до специфічної структури, яка формується, коли Quil A є поєднанням з холестеринном та фосфоліпідами.

"Імуноад'ювантна молекула" стосується молекули, що породжує імунну відповідь.

50 "Ліпіди" стосується будь-якої групи органічних сполук, в тому числі жирів, олій, восків, стеролів та тригліцеридів, що є нерозчинними у воді, але розчиняються у неполярних органічних розчинниках, є оліїстими на дотик, та разом з вуглеводами та білками утворюють головний структурний матеріал живих клітин.

"Ліпофільний" означає такий, що має відмічену схильність до ліпідів або розчинність у ліпідах.

55 "Ліпосома" має відношення до мікроскопічної сферичної частинки, що сформована ліпідним подвійним шаром, яка має рідку серцевину та використовується у медичних цілях для переносу ліків, антигену, вакцини, ензиму, або інших речовин до цільових клітин у тілі.

"Лікувальний агент" стосується будь-якого агенту, який є корисним у попередженні, лікуванні, або послабленні хвороби, або у профілактиці деяких психологічних станів або випадків.

60 "Парентеральне введення" стосується введення речовини, такої як вакцина, у тіло суб'єкта будь-яким шляхом, що оминає травний тракт. Парентеральне введення охоплює підшкірне,

внутрішньом'язове, введення крізь шкіру, внутрішньошкірне, внутрішньочеревне, внутрішньоочне та внутрішньовенне введення.

"Фармацевтично прийнятний" стосується речовин, які є у межах відомих медичних обговорень, придатні для використання у контакті з тканинами суб'єктів без спричинення токсичних, подразнюючих, алергічних відповідей, та ін., з порівняно розумним співвідношенням ризику, та ефективні для їх призначеного використання.

"Реактогенність" стосується побічної дії, викликаної у суб'єкта у відповідь на введення ад'юванту, імуногенної, або вакцинної композиції. Вона може трапитися приблизно місця введення, та її звичайно оцінюють з точки зору розвитку ряду симптомів. Ці симптоми можуть охоплювати запалення, почервоніння, та абсцес. Їх також оцінюють з точки зору виникнення, тривалості, та суворості. "Низькі" реакції можуть, наприклад, спричинювати опухлість, що можна визначити на дотик та неможливо побачити, або вона може бути короткотривалою. Більш суворі реакції можуть, наприклад, бути довготривалими та їх прояви можна побачити візуально.

"Кімнатна температура" означає температуру 18-25 °C.

"Сапонін" стосується групи поверхнево-активних глікозидів рослинного походження, що складаються з гідрофільної частини (звичайно це декілька цукрових ланцюгів) у поєднанні з гідрофобною частиною або стероїдної або тритерпенової структури.

"Стероїди" стосується будь-якої групи органічних сполук, що належать до біохімічного класу ліпідів, які є легко розчинними у органічних розчинниках та слабо розчиняються у воді. Стероїди містять систему з чотирьох конденсованих кілець - трьох конденсованих кілець циклогексану (6-карбон) та четвертого циклопентанового (5-карбон) кільця.

"Стероли" стосується сполук у тваринах, які є біологічно виробленими з терпеноїдних прекурсорів. Вони містять стероїдну кільцеву структуру, мають гідроксильну (ОН) групу, що звичайно прикріплена до карбону-3. Вуглеводневий ланцюг жирної кислоти-замісника змінюється у довжині, звичайно з 16-20 атомів карбону, та може бути насиченим або ненасиченим. Стероли звичайно містять один або більше подвійних зв'язків у кільцевій структурі, а також безліч замісників, прикріплених до кілець. Стероли та їх естери жирних кислот по суті є нерозчинними у воді.

"Суб'єкт" стосується будь-якої тварини, для якої бажано введення ад'ювантної композиції. Цей термін охоплює ссавців та не-ссавців, в тому числі приматів, домашню худобу, домашніх тварин, лабораторних експериментальних тварин, спійманих диких тварин, птахів (включаючи яйця), рептилій та рибу. Отже, цей термін охоплює без обмежень мавп, людей, свиней; велику рогату худобу, баранів, кіз, коней, мишей, щурів, морських свинок, хом'яків, кролів, кішок, собак, курчат, індиків, качок, іншу свійську птицю, жаб, та ящірок.

"TCID₅₀" стосується "інфекційної дози культури тканин" та визначається як розведення вірусу, якого потрібно, щоб заразити 50 % із даної партії щеплених культур клітин. Різні способи можуть бути використані для обчислення TCID₅₀, в тому числі спосіб Spearman-Kärber, який використовується в цієї специфікації. Опис способу Spearman-Kärber, див. у B. W. Many & H. O. Kangro, Virology Methods Manual, p. 25-46 (1996).

"Терапевтично ефективна кількість" стосується кількості антигену або вакцини, що буде викликати імунну відповідь у суб'єкта, що отримав антиген або вакцину, якої достатньо для попередження або зниження ознак або симптомів хвороби, в тому числі шкідливих для здоров'я проявів або їх ускладнень, спричинених патогенними інфекціями, такими як вірусні або бактеріальні. Гуморальний імунітет або клітинно-опосередкований імунітет або як гуморальний, так і клітинно-опосередкований імунітет можуть бути викликані. Імуногенна реакція тварини на введення вакцини може бути оцінена, наприклад, непрямим вимірюванням титрів антитіл, аналізами проліферації лімфоцитів, або безпосередньо моніторингом ознак та симптомів після введення штаму дикого типу. Захисний імунітет, наданий вакциною може бути оцінено шляхом вимірювання, наприклад, скороченням клінічних ознак, таких як смертність, захворюваність, температура, загальний фізичний стан, загальний стан здоров'я та характеристика суб'єкта. Кількість вакцини, що є терапевтично ефективним може змінюватися у залежності від конкретного використаного ад'юванту, конкретного використаного антигену, або від стану суб'єкта, та може бути визначений фахівцями у цій галузі.

"Лікування" стосується попередження розладу, стану, або хвороби, до якої застосовується такий термін, або для попередження або зниження одного або більше симптомів такого розладу, стану, або хвороби.

"Тритерпеноїди" стосується великого та різноманітного класу природних органічних молекул, похідних від шести одиниць п'ять-карбон ізопрену (2-метил-1,3-бутадієн), яких може бути зібрано та модифіковано у безліч способів. Більшість з них - мультициклічні структури, які

відрізняються одна від іншої по функціональним групам та по їх базовим карбоновим скелетам. Ці молекули можуть бути знайдені у всіх класах живих істот.

"Вакцина" стосується композиції, що охоплює антиген, як визначено тут. Введення вакцини до суб'єкта спричинює імунну відповідь, головним чином проти однієї або більше специфічних хвороб. Кількість вакцини, що є терапевтично ефективною може змінюватися у залежності від конкретного використаного антигену, або від стану суб'єкту, та може бути визначена фахівцями у цієї галузі.

Тритерпеноїди, придатні для використання у ад'ювантній композиції, можуть надходити з багатьох джерел, бути або рослинного походження або синтетичними еквівалентами, в тому числі, але без обмеження, *Quillaja saponaria*, томатін, екстракти женьшеню, гриби, та алкалоїдний глюкозид, структурно подібний до стероїдних сапонінів. Отже, тритерпеноїди, придатні для використання у ад'ювантних композиціях охоплюють сапоніни, сквален, та ланостерол. Кількість тритерпеноїдів, яка необхідна для використання у ад'ювантних композиціях залежить від походження використаних тритерпенів. Тим не менш, їх зазвичай використовують у кількості приблизно 1 мкг - 5000 мкг на дозу. Їх також використовують у кількості приблизно 1 мкг - 4000 мкг на дозу, приблизно 1 мкг - 3000 мкг на дозу, приблизно 1 мкг - 2000 мкг на дозу, та приблизно 1 мкг - 1000 мкг на дозу. Їх також використовують у кількості приблизно 5 мкг - 750 мкг на дозу, приблизно 5 мкг - 500 мкг на дозу, приблизно 5 мкг - 200 мкг на дозу, приблизно 5 мкг - 100 мкг на дозу, приблизно 15 мкг - 100 мкг на дозу, та у кількості приблизно 30 мкг - 75 мкг на дозу.

Якщо було використано сапонін, ад'ювантні композиції головним чином містять імунологічно активну фракцію сапоніну з кори *Quillaja saponaria*. Сапоніном може бути, наприклад, Quil A або інший очищений або частково очищений препарат сапоніну, який може бути отриманий на комерційній основі. Отже, екстракти сапоніну можуть бути використані у вигляді суміші або очищених індивідуальних компонентів, таких як QS-7, QS-17, QS-18, та QS-21. У одному втіленні, Quil A має щонайменше 85 % чистоту. У інших втіленнях, Quil A має щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % чистоту.

CpG ODNи є нещодавно описаним класом фармакотерапевтичних агентів, що характеризуються присутністю неметильованого CG динуклеотиду у специфічних "основа-послідовність" положеннях (CpG фрагмент). (Hansel TT, Barnes PJ (eds): New Drugs для Asthma, Allergy and COPD. Prog Respir Res. Basel, Karger, 2001, vol. 31, pp. 229-232, який є включеним тут, як вказано у посиланні) Ці CpG фрагменти не спостерігають у еукаріотичній ДНК, у якій CG динуклеотиди є подавленими та, коли вони є у наявності, звичайно метильовані, але вони присутні у бактеріальній ДНК, яку вони наділяють імуностимуляторними властивостями. Ці імуностимуляторні властивості охоплюють індукцію відповіді Th1-типу з помітним вивільненням IFN- γ , IL-12, та IL-18. CpG ODN (18-24 пар основ у довжину) мають імуномодуляторні властивості, подібні до бактеріальної ДНК. Білки клітинної поверхні можуть взаємодіяти з цими молекулами з перемінними результатами. Проте, з носієм, таким як QCDC, QCDCR та іншими комбінаціями, що приведені у межах цього патенту, імуномодуляційні властивості та поглинання CpG значно підсилюються.

Кількість CpG для використання у ад'ювантних композиціях залежить від походження використаного CpG та від передбачених видів. Проте, їх зазвичай використовують у кількості приблизно 1 мкг - 20 мг на дозу. Їх також використовують у кількості біля 1 мкг - 10 мг на дозу, приблизно 1 мкг - 5 мг на дозу, приблизно 1 мкг - 4 мг на дозу, приблизно 1 мкг - 3 мг на дозу, приблизно 1 мкг - 2 мг на дозу, та приблизно 1 мкг - 1 мг на дозу. Їх також використовують у кількості приблизно 5 мкг - 750 мкг на дозу, приблизно 5 мкг - 500 мкг на дозу, приблизно 5 мкг - 200 мкг на дозу, приблизно 5 мкг - 100 мкг на дозу, 10 мкг - 100 мкг на дозу, приблизно 15 мкг - 100 мкг на дозу, та у кількості приблизно 30 мкг - 75 мкг на дозу.

Стероли, придатні для використання у ад'ювантних композиціях охоплюють β -сiтостерол, стiгмастерол, ергостерол, ергокальциферол, та холестерин. Ці стероли є добре відомі фахівцям та можуть бути комерційно придбані. Наприклад, холестерин є у Merck Index, 12th Ed., p. 369. Кількість стеролів, придатна для використання у ад'ювантних композиціях залежить від походження використаних стеролів. Проте, їх зазвичай використовують у кількості приблизно 1 мкг - 5000 мкг на дозу. Їх також використовують у кількості біля 1 мкг - 4000 мкг на дозу, приблизно 1 мкг - 3000 мкг на дозу, приблизно 1 мкг - 2000 мкг на дозу, та приблизно 1 мкг - 1000 мкг на дозу. Їх також використовують у кількості приблизно 5 мкг - 750 мкг на дозу, приблизно 5 мкг - 500 мкг на дозу, приблизно 5 мкг - 200 мкг на дозу, приблизно 5 мкг - 100 мкг на дозу, приблизно 15 мкг - 100 мкг на дозу, та приблизно 30 мкг - 75 мкг на дозу.

Ад'ювантні композиції можуть, крім того, охоплювати один або більше імуномодуляторних агентів, таких, наприклад, як четвертинні сполуки амонію (наприклад, DDA), та інтерлейкіни,

інтерферони, або інші цитокіни. Ці речовини можуть бути комерційно придбані. Кількість імуномодулятору, придатного для використання у ад'ювантних композиціях залежить від походження використаного імуномодулятору та суб'єкта. Проте, їх зазвичай використовують у кількості приблизно 1 мкг - 5000 мкг на дозу. Їх також використовують у кількості біля 1 мкг - 4000 мкг на дозу, приблизно 1 мкг - 3000 мкг на дозу, приблизно 1 мкг - 2000 мкг на дозу, та приблизно 1 мкг - 1000 мкг на дозу. Їх також використовують у кількості приблизно 5 мкг - 750 мкг на дозу, приблизно 5 мкг - 500 мкг на дозу, приблизно 5 мкг - 200 мкг на дозу, приблизно 5 мкг - 100 мкг на дозу, приблизно 15 мкг - 100 мкг на дозу, та у кількості приблизно 30 мкг - 75 мкг на дозу. Як конкретний приклад, ад'ювантні композиції, які містять DDA можуть бути отримані простим змішуванням розчину антигену та свіжо приготованого розчину DDA.

Ад'ювантні композиції можуть, крім того, містити один або більше полімерів, таких, наприклад, як DEAE декстран, поліетиленгліколь, поліакрилова кислота та поліметакрилова кислота (наприклад, CARBOPOL®). Такі речовини можуть бути комерційно придбані. Кількість полімерів, придатна для використання у ад'ювантних композиціях залежить від походження використаного полімеру. Проте, їх зазвичай використовують у кількості приблизно 0.0001-75 об %. у інших втіленнях, вони є використаними у кількості приблизно 0.001 об % - 50 об %, приблизно 0.005 об % - 25 об %, приблизно 0.01 об % - 10 об %, приблизно 0.05 об % - 2 об %, та приблизно 0.1 об % - 0.75 об %. У іншому втіленні, вони є використаними у кількості приблизно 0.02-0.4 об %. DEAE-декстран може мати молекулярну масу у межах від 50000 Да до 5000000 Да, або вона може бути у межах від 500000 Да до 2000000 Да. Такі речовини можуть бути комерційно придбані або приготовані з декстрану.

Інші специфічні приклади - це поліакрилова кислота (наприклад, полімери CARBOPOL®), яка має середню еквівалентну масу 76. Вони вироблені з первинних полімерних частин приблизно 0.2 до 6.0 мікрон у середньому діаметрі. Полімери CARBOPOL® розбухають у воді більш ніж у 1000 разів від їх початкового об'єму та у десять разів від їх первісного діаметра з утворенням гелю при дії рН середовища більше, ніж рКа карбоксилатної групи. При рН, більшім, ніж рКа карбоксилатної групи, карбоксилатні групи іонізуються в результаті відштовхування між негативними зарядами, яке веде до опухлості полімеру.

Ад'ювантні композиції можуть, крім того, містити один або більше Th2 ад'ювантів, таких як, наприклад, Bay R1005® та алюміній. Кількість Th2 ад'ювантів, придатна для використання у ад'ювантних композиціях залежить від походження використаного Th2 стимулятора. Проте, їх зазвичай використовують у кількості приблизно 0.01 мг - 10 мг на дозу. У інших втіленнях, вони є використаними у кількості приблизно 0.05 мг - 7.5 мг на дозу, приблизно 0.1 мг - 5 мг на дозу, приблизно 0.5 мг - 2.5 мг на дозу, та 1 мг - 2 мг на дозу. Конкретним прикладом є Bay R1005®, гліколіпід з хімічним ім'ям "N-(2-деокси-2-L-лейциламіно-β-D-глюкопіранозил)-N-октадецилдодеканаміду ацетат. Він може бути синтезований відповідно типів лікувань, що можна знайти у Lockhoff, O. (Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30:1611-1620; 1991). Його рекомендовано зберігати при 2-8 °C у герметичному контейнері. Його хімічні або фізичні властивості охоплюють легку гігроскопічність без утворення поліморфних форм, він є хімічно стабільним у повітрі та світлі при температурі до 50 °C та у водних розчинниках при рН 2-12 при кімнатній температурі. Він є амфіфільною молекулою, яка утворює міцели у водних розчинах.

Ад'ювантні композиції можуть містити один або більше антигенів. Антиген може бути будь-яким з широкого кола речовин, здатних до продукування бажаної імунної відповіді у суб'єкта. Хоча сам Quil A є віроцидним, його можна позбавити токсичності додаванням холестерину при формуванні спіральних міцел (Див. US Patent № 7, 122, 191). Описані тут ад'ювантні композиції, як було виявлено, невіроцидні та негемолітичні або мембранолітичні. Отже, антигени, що використані з цими ад'ювантними композиціями можуть бути одним або кількома вірусами (інактивованими, послабленими, та живими модифікованими), бактеріями, паразитами, нуклеотидами, полінуклеотидами, пептидами, поліпептидами, рекомбінантними білками, синтетичними білками, екстрактами білків, клітин (охоплюючи пухлини клітин), тканинами, полісахаридами, вуглеводами, жирними кислотами, тейхоєвою кислотою, пептидоглюканами, ліпідами або гліколіпідами, поодинокі або у будь-якій їх комбінації.

Антигени, використані з ад'ювантами винаходу також містять імуногенні фрагменти нуклеотидів, полінуклеотидів, пептидів, поліпептидів, які можуть бути виділені з організмів, згаданих в цьому документі.

Живі, живі модифіковані, та послаблені вірусні штами, що не викликають хвороб у суб'єкта, були виділені у невірулентній формі, або були послаблені з застосуванням способів, добре відомих фахівцям, в тому числі серійним пасажем у придатній лінії клітин або обробкою ультрафіолетовим світлом або хімічним мутагеном. Інактивовані або вбиті вірусні штами - ті, які інактивовані різними способами, відомими фахівцям, в тому числі обробкою формаліном,

бетапропіолактодином (ВРЛ), бінарним етиленіміном (ВЕІ), стерилізацією радіацією, нагріванням, або такими іншими способами.

Два або більше антигенів можуть бути поєднаними для виробництва полівалентної композиції, що може захистити суб'єкт проти широкого ряду хвороб, спричинених патогенами. Зараз комерційні виробники вакцин, так само, як і їх користувачі, віддають перевагу полівалентним вакцинним продуктам. Поки звичайні ад'юванти часто обмежені різновидами антигенів, з якими вони можуть бути ефективно використані (або моновалентно, або полівалентно), ад'юванти, що описані тут, можуть бути ефективно використані з широким рядом антигенів, як моновалентних, так і полівалентних. Отже, описані тут антигени можуть бути поєднаними у окрему композицію, що містить описані тут ад'юванти.

Деякі приклади бактерій, які можуть бути використані у якості антигенів з ад'ювантними композиціями містять, але без обмеження, *Aceinetobacter calcoaceticus*, *Acetobacter paseruianus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Arhaeglobus fulgidus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila* spp., *Chromobacterium viscosum*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Ehrlichia canis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, *Helicobacter suis*, *Lawsonia intracellularis*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella* sp., *Mycobacterium bovis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, *Clostridium perfringens*, *Odoribacter denticanis*, *Pasteurella* (*Mannheimia*) *haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Photobacterium luminescens*, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas salivosa*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas wisconsinensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* C9, *Pseudomonas fluorescens* SIKW1, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas* sp B11-1, *Alcaligenes eutrophus*, *Psychrobacter immobilis*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsia*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica*, *Salmonella dublin*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella newport*, *Serratia marcescens*, *Spirillum platensis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces cinnamomeus*, *Streptococcus suis*, *Streptomyces exfoliates*, *Streptomyces scabies*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Syechocystis* sp., *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema denticola*, *Treponema minutum*, *Treponema phagedenis*, *Treponema refringens*, *Treponema vincentii*, *Treponema palladium*, та різновиди *Leptospira*, такі як відомі патогени *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira borgpetersenii* hardjo-bovis, *Leptospira borgpetersenii* hardjo-prajitno, *Leptospira interrogans*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, та *Leptospira bratislava*, та їх комбінації.

Як інактивовані віруси, так і ослаблені живі віруси можуть бути використані у ад'ювантних композиціях. Деякі приклади вірусів, які можуть бути використані як антигени містять, але без обмеження, вірус герпесу птахів, віруси герпесу корів, віруси герпесу собак, віруси герпесу коней, вірус кошачого рінотрахеїту, вірус хвороби Марека, овечі віруси герпесу, віруси герпесу свиней, вірус псевдоскажу, параміксовіруси птахів, респіраторний синцитіальний вірус корів, вірус собачої чуми, вірус собачого парагрипу, собачий аденовірус, собачий парвовірус, вірус парагрипу корів 3, вірус парагрипу овець 3, вірус чуми рогатої худоби, вірус граничної хвороби, вірус вірусного проносу корів (BVDV), BVDV типу I, та BVDV типу II, класичний вірус свинячої лихоманки, вірус лейкозу птахів, вірус імунodefіциту корів, вірус лейкемії корів, туберкульоз корів, вірус інфекційної анемії коней, вірус кошачого імунodefіциту, вірус кошачої лейкемії (FeLV), вірус хвороби Ньюкастла, вірус прогресивної пневмонії овець, вірус легеневої аденокарциноми овець, собачий коронавірус (CCV), пантропічний CCV, собачий респіраторний коронавірус, коронавірус корів, кошачий каліцивірус, кошачий ентеричний коронавірус, вірус кошачого інфекційного перитоніту, вірус свинячого проносу, вірус свинячого гемаглютинаційного енцефаломієлітиту, свинячий парвовірус, свинячий цирковірус(PCV) типу I та PCV типу II, вірус свинячого відтворювального та дихального синдрому (PRRS), вірус заразного гастроентериту, індійський коронавірус, вірус короткочасної лихоманки корів, різні види скажу, ротавірус, вірус везикулярного стоматиту, лентовірус, вірус пташиного грипу, рінковіруси, вірус грипу коней, вірус грипу свиней, вірус собачого грипу, вірус кошачого грипу, вірус грипу людини, східний вірус енцефаліту коней(EEE), венесуельський вірус енцефаліту коней, вірус західного Нілу, західний вірус енцефаліту коней, вірус імунodefіциту людини, вірус папіломи людини, вірус вітряної віспи, вірус оперізувального лишаю, вірус гепатиту B, риновірус, вірус кіру та їх комбінації.

Приклади пептидних антигенів охоплюють *Bordetella bronchiseptica* p68, GnRH, IgE пептиди, Fel d1, та антигени раку та їх комбінації. Приклади інших антигенів охоплюють нуклеотиди, вуглеводи, ліпіди, гліколіпіди, пептиди, жирні кислоти, тейхоеву кислоту, пептидоглюкани, та їх комбінації.

Деякі приклади паразитів, які можуть бути використані як антигени з ад'ювантними композиціями охоплюють, але без обмеження, *Anaplasma*, *Fasciola hepatica* (печінка камбали), *Coccidia*, *Eimeria* spp., *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia*, *Dirofilaria* (серцеві глисти), *Ancylostoma* (крюкоподібні глисти), *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Trichomonas* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Babesia*, *Schistosoma*, *Taenia*, *Strongyloides*, *Ascaris*, *Trichinella*, *Sarcocystis*, *Hammondia*, *Isospora*, та їх комбінації. Також передбачено використання зовнішніх паразитів, що охоплюють, але без обмеження, кліщів, в тому числі *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Boophilus*, *Hyalomma*, та різновидів *Haemaphysalis*, та їх комбінації.

Кількість антигену, використаного для викликання імунної відповіді буде значно змінюватися у залежності від використаного антигену, суб'єкту, від рівня бажаної відповіді, та може бути визначена фахівцями. Для вакцин, які містять модифіковані живі або послаблені віруси, терапевтично ефективна кількість антигену головним чином зазвичай становить від 10^2 інфективної дози культури тканини (TCID₅₀) до 10^{10} TCID₅₀, включно. Для багатьох таких вірусів, терапевтично ефективна доза є головним чином у межах 10^2 TCID₅₀- 10^8 TCID₅₀, включно. У деяких втіленнях, терапевтично ефективні дози *Haemaphysalis* є приблизно 10^3 TCID₅₀- 10^6 TCID₅₀, включно. У де яких інших втіленнях, межі терапевтично ефективних доз дорівнюють приблизно 10^4 TCID₅₀- 10^5 TCID₅₀, включно.

Для вакцини, яка містить інактивовані віруси, терапевтично ефективна кількість антигену дорівнює головним чином щонайменше приблизно 100 відносних одиниць на дозу, та часто у межах приблизно 1000-4500 відносних одиниць на дозу, включно. У інших втіленнях, терапевтично ефективна кількість антигену є у межах приблизно 250-4000, включно, відносних одиниць на дозу, приблизно 500-3000 включно, відносних одиниць на дозу, приблизно 750-2000 включно, відносних одиниць на дозу, або приблизно 1000-1500 включно, відносних одиниць на дозу. Терапевтично ефективна кількість антигену у вакцинах, які містять інактивовані віруси може також бути виміряна у межах відносної імуногенності (BI) на мл. Терапевтично ефективна кількість часто дорівнює приблизно 0.1-50 BI на мл, включно. У інших втіленнях, терапевтично ефективна кількість антигену дорівнює приблизно 0.5-30 BI на мл, включно, приблизно 1-25 BI на мл, включно, приблизно 2-20 BI на мл, включно, приблизно 3-15 BI на мл, включно, або приблизно 5-10 BI на мл, включно.

У одному втіленні, антиген FeLV був вироблений з клітинної лінії FL74-UCD-1 (ATCC № CRL-8012) яку було систематично інфіковано вірусним штамом KT-FeLV-UCD-1 вірусу котячої лейкемії. Кількість антигену FeLV у вакцині може бути виміряна як кількість вірусного білка gp70 на мл. Терапевтично ефективна кількість антигену FeLV, яка може бути виміряна як кількість вірусного білка gp70 на мл, головним чином є у межах приблизно 100-350000, включно. У іншому втіленні - у межах приблизно 1000-300000 нг/мл, включно, або приблизно 2500-250000 нг/мл, включно, або приблизно 4000-220000 нг/мл, включно, або приблизно 5000-150000 нг/мл, включно, або приблизно 10000 нг/мл - 100000 нг/мл, включно.

Кількість клітин для бактеріального антигену, введеного у вакцині, коливається у межах приблизно 1×10^6 - 5×10^{10} одиниць, що формують колонію (CFU) на дозу, включно. У інших втіленнях, кількість клітин коливається приблизно 1×10^7 - 5×10^{10} CFU на дозу, включно, або приблизно 1×10^8 - 5×10^{10} CFU на дозу, включно. Ще у інших втіленнях, кількість клітин коливається приблизно 1×10^2 - 5×10^{10} CFU на дозу, включно, або приблизно 1×10^4 - 5×10^9 CFU на дозу, включно, або приблизно 1×10^5 - 5×10^9 CFU на дозу, включно, або приблизно 1×10^6 - 5×10^9 CFU на дозу, включно, або приблизно 1×10^6 - 5×10^8 CFU на дозу, включно, або приблизно 1×10^7 - 5×10^9 CFU на дозу, включно.

Кількість клітин для антигену паразиту, введеного у вакцині, коливається приблизно 1×10^2 - 1×10^{10} на дозу, включно, у інших втіленнях, кількість клітин коливається приблизно 1×10^3 - 1×10^9 на дозу, включно, або приблизно 1×10^4 - 1×10^8 на дозу, включно, або приблизно 1×10^5 - 1×10^7 на дозу, включно, або приблизно 1×10^6 - 1×10^8 на дозу, включно.

При застосуванні звичайних ад'ювантів добре відомо, що значно більша кількість інактивованих вірусів, ніж модифікованих живих або послаблених вірусів необхідна для симулювання відповідного рівня серологічної відповіді. Проте, було несподівано знайдено, що з ад'ювантними композиціями, які тут описано, приблизно однакові кількості інактивованого вірусу та модифікованого живого вірусу стимулюють подібні рівні серологічної відповіді. На додаток, менші кількості модифікованих живих, послаблених, та інактивованих вірусів необхідні разом з описаними тут ад'ювантами, порівняльно з звичайними ад'ювантами для досягнення того ж

самого рівня серологічної відповіді. Ці неочікувані знахідки демонструють збереження ресурсів та скорочення витрат у процесі приготування імуногенних та вакцинних композицій. Для вакцин широкого споживання, потрібно виробництво мільйонів доз на рік, так що ця економія може бути суттєвою.

Водні ад'юванти забезпечують певні переваги. Вони головним чином легкі для утворення та введення, та можуть викликати небагато або менш серйозні реакції у місці ін'єкції. Проте, водні ад'юванти з антигеном мають тенденцію розсіюватися з місця ін'єкції, очищуватися печінкою суб'єкта, та породжувати неочікувану неспецифічну імунну відповідь. Було несподівано знайдено, що описані тут водні ад'ювантні композиції залишаються у місці ін'єкції до біометаболізації, яка трапляється впродовж довгого періоду часу та забезпечують цільову імунну відповідь.

Олія, коли її додано, як компонент ад'юванту, головним чином забезпечує довге та повільне вивільнення. У даному винаході, олія може бути здатною або не здатною до метаболізації. Олія може бути у вигляді "олія у воді", "вода у олії", або емульсії "вода у олії у воді".

Олії, придатні для використання у цьому винаході охоплюють алкани, алкени, алкіни, та їх подібні кислоти та спирти, естери та їх складні естери, та їх суміші. Індивідуальні сполуки олій - це легкі вуглеводневі сполуки, тобто, такі компоненти мають 6-30 атомів карбону. Олія може бути синтетично приготованою або отриманою з продуктів нафти. Група може мати пряму або розгалужену ланцюгову структуру. Вона може бути цілком насиченою або мати один або більше подвійних або потрійних зв'язків. Деякі нездатні до метаболізації олії, що можуть використовуватися у цьому винаході охоплюють, наприклад, мінеральні олії, парафінові олії, та циклопарафіни.

Термін "олія" також охоплює термін "легка мінеральна олія", тобто, олія, яка так само отримана шляхом дистиляції нафти, але яка має трохи нижчу питому вагу ніж біла мінеральна олія.

Здатні до метаболізації олії охоплюють здатні до метаболізації, нетоксичні олії. Олія може бути будь-якою олією рослинного, тваринного, або рибного походження, або синтетично приготованою олією, яка може бути метаболізована тілом суб'єкта, якому введено ад'ювант, та яка не є токсичною для суб'єкта. Джерела походження для рослинних олій охоплюють горіхи, насіння та зерно.

Емульсія "олія у воді", передбачена цим винаходом складаються з препарату AMPHIGEN®. Цей препарат містить водний компонент, лецитин, мінеральну олію, та поверхнево-активні речовини. Компоненти цього препарату докладно викладені у патентах US 5, 084, 269 та US 6, 572, 861.

Звичайно, компонент олії у цьому винаході присутній у кількості 1 % - 50 об%; або у кількості 10 % - 45 %; або у кількості 20 % - 40 %.

Інші компоненти композицій можуть охоплювати фармацевтично прийнятні наповнювачі, такі як носії, розчинники, та розріджувачі, ізотонічні агенти, буферні агенти, стабілізатори, консерванти, судинозвужуючі агенти, антибактеріальні агенти, протигрибкові агенти, тощо. Типові носії, розчинники, та розріджувачі охоплюють воду, фізіологічний розчин, декстрозу, етанол, гліцерол, олію, тощо. Характерні ізотонічні агенти охоплюють натрію хлорид, декстрозу, манітол, сорбітол, лактозу, тощо. Корисні стабілізатори охоплюють желатин, альбумін, та подібн.

Поверхнево-активні речовини використані для стабілізації емульсії, відібраної для дії у якості носія для ад'юванту та антигену. Поверхнево-активні речовини, придатні для використання у даному винаході охоплюють природні біологічно сумісні поверхнево-активні речовини та неприродні синтетичні поверхнево-активні речовини. Біологічно сумісні поверхнево-активні речовини охоплюють фосфоліпідні сполуки або суміші фосфоліпідів. Бажаними фосфоліпідами є фосфатидилхоліни (лецитин), такі як соєвий або яєчний лецитин. Лецитин може бути отриманий як суміш фосфатидів та тригліцеридів миттям водою необробленої рослинної олії, та відділенням та висушуванням отриманих гідратованих речовин. Очищений продукт може бути отриманий шляхом фракціонування суміші до нерозчинних у ацетоні фосфоліпідів та гліколіпідів, які залишилися після усунення тригліцеридів та рослинної олії промиванням ацетоном. Крім того, лецитин може бути отриманий з різних торговельних джерел. Інші придатні фосфоліпіди охоплюють фосфатиділгліцерін, фосфатидилінозитол, фосфатидилсерин, фосфатидну кислоту, кардіоліпін, та фосфатидилетаноламін. Фосфоліпіди можуть бути отримані з природних джерел або синтезовані традиційним способом.

Неприродні, синтетичні поверхнево-активні речовини, придатні для використання у цьому винаході охоплюють неіонні поверхнево-активні речовини на базі сорбітану, наприклад, заміщені жирними кислотами сорбітанові поверхнево-активні речовини (що є у продажу під

торгівельними марками SPAN® або ARLACEL®), естери жирної кислоти поліетоксильованого сорбітолу (TWEEN®), поліетиленгліколеві естери жирних кислот з таких джерел, як касторова олія (EMULFOR®); поліетоксильована жирна кислота (наприклад, стеаринова кислота, що є у наявності під торгівельною маркою SIMULSOL M-53®), поліетоксильований полімер ізооктилфенолу/формальдегіду (TYLOXAPOL®), поліоксиетиленові жирні спиртові естери (BRIJ®); поліоксиетиленові нефенилові естери (TRITON® N), поліоксиетиленові ізооктилфенілові естери (TRITON® X).

Взагалі кажучи, по поверхнево-активна речовина, або комбінації поверхнево-активних речовин, якщо використано дві або більше поверхнево-активних речовин, присутні у емульсії у кількості 0.01 % - 10 об%, бажано, 0.1 % - 6.0 %, більш бажано 0.2 % - 5.0 %.

Як використано тут, "фармацевтично прийнятний носій" охоплює будь-який, та всі розчинники, дисперсні середовища, матеріали оболонки, ад'юванти, стабілізатори, розчинники, консерванти, антибактеріальні та протигрибкові агенти, ізотонічні агенти, агенти затримки адсорбції, тощо. Носій(носії) повинен бути "прийнятним", тобто бути сумісним з іншими компонентами композиції та не бути шкідливим для суб'єкту. Звичайно, носії повинні бути стерильними, апірогенними, та відібраними в залежності від обраного способу введення. Фахівцям добре відомо, що бажані препарати для фармацевтично прийнятних носіїв, які містять композиції є затвердженими у відповідних положеннях, що встановлюються United States (US) Department of Agriculture or US Food and Drug Administration, або подібними урядовими органами у інших країнах. Отже, фармацевтично прийнятим носієм для комерційного виробництва композиції є носій, що вже затверджений або буде затверджений відповідною урядовою установою у Сполучених Штатах або у іншій країні.

Композиції також можуть містити сумісні фармацевтично прийнятні (тобто стерильні або нетоксичні) рідики, напівтверді, або тверді розчинники, які служать у якості фармацевтичних засобів для транспорту, наповнювачів, або посередників. Розчинники можуть містити воду, фізіологічний розчин, декстрозу, етанол, гліцерин тощо. Ізотонічні агенти можуть містити хлорид натрію, декстрозу, манітол, сорбітол, та, серед іншого, лактозу. Стабілізатори містять, серед іншого, алюміній.

Композиції можуть також містити антибіотики або консерванти, наприклад, гентаміцин, мертіолат, або хлорокрезол. Різні класи антибіотиків або консервантів, з яких можна підібрати бажані, добре відомі фахівцям.

ОТРИМАННЯ КОМПОЗИЦІЙ

Отримання композицій ад'ювантів

ISCOM може бути приготований шляхом об'єднання сапоніну, стеролу, та фосфоліпіду. Наприклад, ISCOM може містити 5 % - 10 % від загальної маси Quil A, 1 % - 5 % - холестерину та фосфоліпідів, та білок у залишку. Співвідношення сапоніну до стеролу у ад'ювантних препаратах звичайно дорівнює від 1:100 (співвідношення однієї маси до другої за масою до 5:1 за масою. У деяких втіленнях, присутній надлишок стеролу та співвідношення сапоніну до стеролу є щонайменше 1:2 за масою, або 1:5 за масою. У інших втіленнях, сапонін є у надлишку до стеролу, та використовується співвідношення сапоніну до стеролу приблизно 5:1 за масою. ISCOM та ISCOMATRIX є у наявності у продажу від Isconova AB (Sweden).

У деяких втіленнях, CARBOPOL® використовується у комбінації з DDA у кількості щонайменше 0.1 частини маси CARBOPOL® на частину маси DDA. У інших втіленнях, використовується щонайменше 0.5 частини маси CARBOPOL® на частину маси DDA. Ще у інших втіленнях, використовується щонайменше 1 частина маси CARBOPOL® на частину маси DDA. Комбінація CARBOPOL® та DDA утворює комплекс, за допомогою чого функціональна група третинного аміну DDA надає імунні функції боковим групам карбонової кислоти полімеру. Це дозволяє специфічним імунним клітинам поцілювати одночасно у антиген та у ад'ювант та доставляти разом антиген та ад'ювант за оптимальний час та у оптимальній концентрації до вказаної клітини. Ад'юванти, що тут вказані, головним чином не потребують будь-яких специфічних носіїв, та можуть бути приготовані у водному або іншому фармацевтично прийнятному буфері. У деяких випадках, вакцини названих втілень можуть бути представлені з відповідним носієм, таким як, наприклад, додаткові ліпосоми, мікросфери або частини антигену у капсулах. Антиген може розміщатися на внутрішньому боці везикулярної мембрани, або розміщатися назовні. Головним чином, розчинні антигени містяться назовні, а гідрофобні або модифіковані ліпідами антигени розміщуються або всередині, або назовні мембрани.

Ад'ювантні композиції можуть бути зроблені в різних формах, залежно від шляху введення, вимог зберігання, тощо. Наприклад, вони можуть бути зроблені у вигляді стерильних водних розчинів або дисперсної суміші, придатних для введення шляхом ін'єкції, або зроблені у ліофілізованих формах з застосуванням способів ліофілізації, вакуумного підсушування, або

підсушування розпиленням. Ліофілізовані композиції можуть бути відтворені перед використанням у стабілізаційному розчині, наприклад, у фізіологічному розчині або HEPES. Отже, ад'ювантні композиції можуть бути використані у твердому, напівтвердому, або рідкому вигляді дозування.

5 Ад'юванти можуть бути вироблені з застосуванням технологій, що відомі фахівцям. Наприклад, сапонін та холестерин можуть бути змішані у придатний детергент, після чого застосовується екстракція розчинника для утворення ліпосом або ISCOMів. Сапонін та холестерин також можуть бути поєднаними для створення спіральних міцел, як описано у US Patent № 7, 122, 191.

10 Буферований фосфатом фізіологічний розчин (PBS) може бути використаний як водна буферна середа; рН буферу може бути нейтральним або слабо лужним або слабо кислим. Відповідно, рН може бути у межах рН 6-8. Загальним є рН приблизно 7.0-7.3. Сила буферу може бути 10-50 мМ PO_4 та 10-150 мМ PO_4 . У одному прикладі, було використано 0.063 % PBS. РН може бути відрегульовано застосуванням NaOH або HCl, якщо це потрібно. Типові

15 концентрації охоплюють 1N-10N HCl та 1N-10N NaOH.

Кількість використаного ад'юванту залежить від антигену, до якого він використовується та від дозування антигену, яке повинно застосовуватися. Також це залежить від призначених видів та бажаного препарату. Звичайно кількість є у межах, які традиційно використовують для ад'ювантів. Наприклад, ад'юванти звичайно становлять приблизно 1 мкг - 1000 мкг, включно, у

20 1-мл дозі. Так само, антибіотики звичайно становлять приблизно 1 мкг - 60 мкг, включно, у 1-мл дозі. Препарати стимуляторів можуть бути гомогенізовані або мікрофлюїдовані. Препарати піддають первинному процесу змішування, звичайно, проходженням за один або разів крізь один або декілька гомогенізаторів. Для цієї мети може бути використано будь-який комерційно доступний гомогенізатор, наприклад, емульгатор Росса (Hauppauge, NY), Gaulin гомогенізатор (Everett, MA), або Microfluidics (Hobton, MA). У одному втіленні, препарати були гомогенізовані

25 впродовж трьох хвилин при 10000 об./хв. Мікрофлюїдування може бути зроблено використанням комерційно доступного мікрофлюїдайзера, такого як модель № 110Y, що можна придбати у Microfluidics, (Hobton, Mass.); Gaulin модель 30CD (Gaulin, Inc., Everett, Mass.); та Rainnie Minilab тип 8. 30H (Miro Atomizer Food та Dairy, Inc., Hudson, Wis.). Ці мікрофлюїдайзери

30 працюють, примушуючи рідини проходити крізь малі отвори під високим тиском, таким, що два струмені рідини взаємодіють на великих швидкостях у камері взаємодії для формування суміші з крапель субмікронного розміру. У одному втіленні, препарати були мікрофлюїдовані проходженням крізь 200-мікронну камеру обмеженого розміру при 10000 +/- 500 фунтів на квадратний дюйм.

35 Ад'ювантні композиції, що описано тут можуть бути разом гомогенізованими та мікрофлюїдованими. У одному втіленні, антиген було додано до відповідного буферу. Розчин збовтували, та сапонін було повільно додано до розчину антигену. Далі повільно додали стерол до розчину антиген/сапонін, після цього до розчину антиген/сапонін/стерол повільно додавали четвертинну сполуку амонію. Отримана композиція була гомогенізована, та далі

40 мікрофлюїдована. Після мікрофлюїдизації до мікрофлюїдованої композиції було додано полімер. У залежності від використаних компонентів, порядок цих кроків може бути змінений для покращення приготування композиції.

Ад'ювантні композиції, що описано тут можуть бути використані у виробництві імуногенних та вакцинних композицій. Для вакцинних або імуногенних композицій, кожна доза містить

45 терапевтично ефективну кількість антигену, або антигенів, що можуть змінюватися у залежності від віку та загального стану суб'єкту, способу введення, походження антигену, та інших факторів. Кількості та концентрації інших компонентів вакцин або імуногенні композицій можуть бути відрегульовані зміненням фізичних та хімічних властивостей композиції, та можуть швидко бути визначені фахівцями. Переважною ознакою ад'ювантних композицій є те, що вони здатні

50 повністю змінювати конфігурацію у залежності від бажаної характеристики композиції. Наприклад, якщо бажаною буде побільшена Th1 відповідь, то кількість стимулятора Th1 може бути збільшена. Відповідно, якщо бажаною буде побільшена Th2 відповідь, то кількість стимулятора Th2 може бути збільшена. Також може бути досягнута збалансована Th1/Th2 відповідь. Імуногенні та вакцинні композиції можуть також бути гомогенізовані або

55 мікрофлюїдовані як описано вище.

Розміри доз композицій звичайно є у межах приблизно 1 мл - 5 мл, включно, у залежності від суб'єкту та антигену. Наприклад, для собак або кішок, звичайно використовують дози приблизно 1 мл, в той час як для великої рогатої худоби звичайно використовують дози

60 приблизно 2-5 мл. Проте, ці ад'юванти також можуть бути приготовані у мікродозах, де дози приблизно 100 мкл можуть бути використані.

Способи введення ад'ювантних композицій охоплюють парентеральний, пероральний, ороназальний, інтраназальний, інтратрахеальний, місцевий, та введення у яйце. Будь-який придатний пристрій може бути використаний для введення композиції, в тому числі шприци, крапельниці, безголкові пристрої для ін'єкцій, пластирі, тощо. Спосіб та пристрій, відібраний для використання буде залежати від ад'ювантної композиції, антигену, та суб'єкту, та вони є добре відомими фахівцям.

Одною з вимог для будь-якого приготування ад'юванту вакцини для комерційного використання є створення стабільності розчину ад'юванту на довгий строк зберігання. Надані тут ад'ювантні препарати є легкими у виробництві та стабільними щонайменше 18 місяців. У одному втіленні, препарати є стабільними приблизно 18 місяців. У іншому втіленні, препарати є стабільними у межах 18-24 місяців. У іншому втіленні, препарати є стабільними приблизно 24 місяців. Способи прискореного тестування також показують, що препарати, які описані тут, є стабільними.

Корисною рисою даних композицій ад'ювантів є те, що вони можуть бути безпечно та ефективно введені широкому ряду суб'єктів. У цієї галузі очікується, що комбінації ад'ювантів будуть показувати більшу реактогенність ніж індивідуальні компоненти. Проте, композиції, що описані тут, показують зменшену реактогенність порівняльно з композиціями, у яких будь-який один або два компонента були використані, в той час як зберігалася дія ад'юванту. Також було несподівано знайдено, що ад'ювантні композиції, описані тут показують безпечні поліпшення, порівняно з іншими композиціями ад'ювантів.

Ад'ювантні композиції, що описані тут є корисними для продукування бажаної імунної відповіді у суб'єкті. Вони є дієздатними у численних видах. Придатним суб'єктом є будь-яка тварина, для якої є бажаним введення ад'ювантної композиції. Цей термін охоплює ссавців та не-ссавців, в тому числі приматів, домашню худобу, домашніх тварин, лабораторних дослідних тварин, спійманих диких тварин, птиць (в тому числі яйця), рептилій, та рибу. Отже, цей термін охоплює без обмежень мавп, людей, свиней; велику рогату худобу, баранів, кіз, коней, мишей, щурів, морських свинок, хом'яків, кролів, кішок, собак, курчат, індиків, качок, іншу свійську птицю, жаб, та ящірок.

Ад'юванти, що описано тут можуть бути використані для того, щоби показати серологічну різницю між інфікованими та вакцинованими тваринами. Отже, вони може бути використані у маркерній вакцині, де антиген у вакцині викликає у вакцинованих тварин інші типи антитіл, ніж подібні при інфекції вірусом дикого типу. Маркерну вакцину головним чином використовують у поєднанні з супутнім діагностичним тестом, який показує різницю у типах антитіл та демонструє, які тварини були вакцинованими та які тварини є інфіковані вірусом дикого типу. Така технологія є корисною у контролі та у знищенні вірусів популяції суб'єкту.

Наступні приклади присутні тут як ілюстративний матеріал, але не повинні бути використані для обмежень обсягу винаходу. Багато змінень, варіацій, модифікацій, та інших використань та додатків цього винаходу будуть очевидні для фахівців.

Приклади

Приклад 1. Розчини Quil A/холестерин (QC).

Quil A (Superfos) був розчинений у воді та був приготований 50 мг/мл базовий розчин. Холестерин, (Fabri Chem Inc.) був розчинений у етанолі та був приготований 18 мг/мл базовий розчин. Базовий розчин холестерину далі був відфільтрований з застосуванням 0.2-мікронового фільтру.

Концентрації Quil A та холестерину у різних препаратах були як низькі, як 1/1 мкг/мл Quil A до холестерину, так і високі, як 1000/1000 мкг/мл. Для приготування базового 50/50 мкг/мл розчину Quil A/холестерину, базовий розчин Quil A був розбавлений водою до концентрації 50 мкг/мл. Поки цей розчин перемішувався, було повільно додано базовий розчин холестерину до кінцевої концентрації 50 мкг/мл.

Приклад 2. Розчини DDA (D).

Диметил діоктадецил амонію бромід (DDA; Fluka Analytical), був розчинений у етанолі, та був приготований 18 мг/мл базовий розчин. Базовий розчин DDA був відфільтрований з застосуванням 0.2-мікронового фільтру.

Приклад 3. Розчини Quil A /холестерин/DDA (QCD).

Базовий розчин Quil A/холестерин був приготований відповідно до Прикладу 1 до бажаної концентрації. Базовий розчин DDA був приготований відповідно до Прикладу 2 та повільно доданий до базового розчину Quil A/холестерин. Розчини були змішані до досягнення бажаної кінцевої концентрації. PH розчину був відрегульований з NaOH або HCl у кількості, яке було необхідно для досягнення бажаного pH, що головним чином був у межах приблизно 6.9-7.5.

Приклад 4. Розчини CARBOPOL® (C).

CARBOPOL® (Noveon, Mexico) був розчинений у деіонізованій воді та був приготований 1.5 % базовий розчин. У іншому втіленні, CARBOPOL® був розчинений у деіонізованій воді та був приготований 0.75 % базовий розчин.

Приклад 5. Розчини DDA/CARBOPOL® (DC).

Був приготований базовий розчин DDA відповідно до Прикладу 2. Був приготований базовий розчин 0.75 % CARBOPOL® відповідно до Прикладу 4. Розчини були змішані до досягнення бажаної кінцевої концентрації.

Приклад 6. Розчини Quil A/Холестерин/DDA/CARBOPOL® (QCDC).

Був приготований базовий розчин Quil A/Холестерин/DDA відповідно до Прикладу 3. Був приготований базовий розчин 0.75 % CARBOPOL® відповідно до Прикладу 4. Базовий розчин CARBOPOL® був повільно доданий до базового розчину Quil A/Холестерин/DDA до досягнення бажаної кінцевої концентрації. РН розчину був відрегульований з NaOH або HCl у кількості, що було необхідно для досягнення бажаного рН, який головним чином був у межах приблизно 6.9-7.5.

Приклад 7. Розчини Bay R1005® (R).

Для приготування базового розчину Bay R1005®, глюколіпід N-(2-деокси-2-L-лейциламіно-β-D-глюкопіранозил)-N-октадецилдодеканоїламід був розчинений у етанолі (60 об %). Далі додали Tween 20 та крижану оцтову кислоту. У одному прикладі, 3.49 г N-(2-деокси-2-L-лейциламіно-β-D-глюкопіранозил)-N-октадецилдодеканоїламід був розчинений у 44.64 мл суміші етанол/вода (60 об %). Це було поєднано з 1.12 мл Tween 20 та 0.68 мл крижаної оцтової кислоти.

Приклад 8. Розчини Quil A/Холестерин/DDA/CARBOPOL®/Bay R1005® (QCDCR).

Базовий розчин Quil A/холестерин/DDA/CARBOPOL® був приготований відповідно до Прикладу 6. Базовий розчин Bay R1005® був приготований відповідно до Прикладу 7. Розчин Bay R1005® був повільно доданий до розчину Quil A/Холестерин/DDA/CARBOPOL® до досягнення бажаної кінцевої концентрації. РН розчину був відрегульований NaOH або HCl у кількості, що було необхідно для досягнення бажаного рН, який головним чином був у межах приблизно 6.9-7.5.

Приклад 9. Розчини DEAE декстрану (X).

Базовий розчин DEAE декстрану (X) був приготований розчиненням 200 мг/мл DEAE декстрану у воді. Розчин може бути нагріто у автоклаві приблизно 20 хвилин при 120° Centigrade (C).

Приклад 10. Розчини Quil A/холестерин/DDA/DEAE (QCDX).

Базовий розчин Quil A/холестерин/DDA був приготований відповідно до Прикладу 3. Базовий розчин DEAE був приготований відповідно до Прикладу 9. Розчини були поєднані додаванням їх безпосередньо у гомогенізатор. При змішуванні був застосований спосіб швидкого змішування з використанням поперечного зсуву більш ніж 1000 сек-1. Змішування було проведено додаванням водного розчину безпосередньо у олійну фазу, яка містила неполярні ад'юванти та антигенні компоненти та змішувалася, доки не була досягнута гомогенна стабільна суміш. Як правило, це може тривати як мінімум кілька хвилин або більше, в залежності від бажаного розміру частинок.

Приклад 11. Олійні композиції (O).

Був приготований базовий розчин олії шляхом комбінування мінеральної олії Drakeol з Tween 85 та Span 85, нагріванням до приблизно 55 °C та далі охолодженням та стерильною фільтрацією. Ця суміш, таким чином, складається з олійної фази основного компонента з носієм у олійній фазі. Якщо холестерин та/або DDA були відібрані у якості співпрацюючих імуномодуляторів для однієї з цих композицій, вони також повинні бути додані до цієї суміші перед фільтрацією, так як вони розчиняються у олійній фазі.

Приклад 12. Quil A/холестерин/DDA/DEAE/олійні композиції (QCDXO).

Базовий розчин Quil A/холестерин/DDA/DEAE був приготований відповідно до Прикладу 10. Олійна базова композиція була приготована відповідно до Прикладу 11. Розчини були поєднані з Quil-A, DEAE-декстраном та водою для досягнення кількості при вказаних концентраціях. Ця водна фаза була змішана постійним збовтуванням реакції протягом декілька хвилин або довше при кімнатній температурі або вище та далі була стерильно відфільтрована та зберігалася для додавання до олійної фази. Водна фаза була повільно додана до олійної фази, яку постійно змішували.

Приклад 13. Приготування імуногенних композицій або вакцинних композицій.

Для приготування імуногенної композиції або вакцинної композиції, що містить антиген та один з ад'ювантів, що описані вище, бажаний антиген був доданий до відповідного буферу. Далі компоненти бажаного ад'юванту були додані, як описано вище. Отриманий розчин був доведений до кінцевого обсягу з буфером.

Приклад 13а. Антиген, Quil A, Холестерин, DDA, CARBOPOL® Для приготування імуногенної композиції або вакцинної композиції, що містить антиген, Quil A, холестерин, DDA, та CARBOPOL®, бажаний антиген був доданий до відповідного буферу. Був приготований базовий розчин Quil A відповідно до Прикладу 1 та повільно доданий до розчину антигену. Був приготований базовий розчин холестерину відповідно до Прикладу 1 та повільно доданий до розчину антиген/Quil A. Був приготований базовий розчин DDA відповідно до Прикладу 2 та повільно доданий до розчину антиген/Quil A/холестерин. Розчин Антиген/Quil A/холестерин/DDA був гомогенізований та мікрофлюїдований. Був приготований 0.75 % розчин CARBOPOL® відповідно до Прикладу 4. Після мікрофлюїдування, розчин CARBOPOL® (0.05 об %) був доданий до мікрофлюїдованої композиції та рН був відрегульований з NaOH або HCl до 6.9-7.5.

Приклад 13b. Антиген, Quil A, Холестерин, DDA, CARBOPOL®, Bay R1005®.

Для приготування імуногенної композиції або вакцинної композиції, що містить антиген, Quil A, холестерин, DDA, CARBOPOL®, та Bay R1005®, бажаний антиген був доданий до відповідного буферу. Був приготований базовий розчин Quil A відповідно до Прикладу 1 та повільно доданий до розчину антигену. Був приготований базовий розчин холестерину відповідно до Прикладу 1 та повільно доданий до розчину антиген/Quil A. Був приготований базовий розчин DDA відповідно до Прикладу 2 та повільно доданий до розчину антиген/Quil A/холестерин. Розчин антиген/Quil A/холестерин/DDA далі був гомогенізований та мікрофлюїдований. 0.75 % розчин CARBOPOL® був приготований відповідно до Прикладу 4. Після мікрофлюїдування, розчин CARBOPOL® (0.05 об %) був доданий до мікрофлюїдованої композиції та рН був відрегульований з NaOH або HCl-6.9-7.5. Був приготований базовий розчин Bay R1005® відповідно до Прикладу 7. Компонент Bay R1005® був додано до водної фази додавання DDA.

Приклад 13с. Антиген, Quil A, Холестерин, DDA, DEAE декстран.

Для приготування імуногенної композиції або вакцинної композиції, що містить антиген, Quil A, холестерин, DDA, та DEAE декстран, бажаний антиген був доданий до відповідного буферу. Був приготований базовий розчин Quil A відповідно до Прикладу 1 та повільно доданий до розчину антигену. Композиція була гомогенізована. Був приготований базовий розчин холестерину відповідно до Прикладу 1 та повільно доданий до розчину антиген/Quil A розчину впродовж гомогенізації. Був приготований базовий розчин DDA відповідно до Прикладу 2 та повільно доданий до розчину антиген/Quil A/холестерин впродовж гомогенізації. Розчин DEAE декстрану був приготований відповідно до Прикладу 9. Впродовж гомогенізації, було додано розчин DEAE декстрану та отримана композиція була доведена до кінцевого обсягу.

Приклад 13d. Антиген, Quil A, Холестерин, DDA, DEAE декстран, олія.

Для приготування імуногенної композиції або вакцинної композиції, що містить антиген, Quil A, холестерин, DDA, DEAE декстран, та олію, бажаний антиген було додано до відповідного буферу. Був приготований базовий розчин Quil A відповідно до Прикладу 1 та повільно доданий до розчину антигену. Композиція була гомогенізована. Був приготований базовий розчин холестерину відповідно до Прикладу 1 та повільно доданий до розчину антиген/Quil A впродовж гомогенізації. Був приготований базовий розчин DDA відповідно до Прикладу 2 та повільно доданий до розчину антиген/Quil A/холестерин впродовж гомогенізації. Був приготований розчин DEAE декстрану відповідно до Прикладу 9 та доданий впродовж гомогенізації. Олійна композиція була приготована відповідно до Прикладу 11. Впродовж гомогенізації, олійна композиція була додана додаванням водної фази у олійну фазу під час гомогенізації та отримана композиція була доведена до кінцевого обсягу.

Приклад 14. Вакцини вірусу кошачої лейкемії (FeLV).

Тварини були випадково розподілені по групам лікування з застосуванням схеми рандомізованих повних блоків. Таблиця 1 показує план досліджень. Групи були сформовані на основі дати народження та окоту. Тварини були відсортовані по даті народження та потім по окоту. Були використані блоки по чотири тварини. У межах блоку, тварини були випадково розподілені для лікування. Для стадії вакцинації, два консекитивних блоки були об'єднані зі створенням групи з восьми тварин. Групи тварин були випадково розподілені до двох кімнат, так, що у кожній кімнаті містилося п'ять груп (10 блоків) тварин. У межах групи, тварини були випадково розподілені до чотирьох кліток, розміщених рядом таким чином, що кожна клітка містила дві тварини з однаковим лікуванням. Для фази інфікування, тварини з однієї кімнати вакцинації були випадково розподілені до будь-якої однієї або двох кімнат інфікування. З однієї кімнати вакцинації тварини відбиралися у дві кімнати інфікування, взагалі мали п'ять блоків, випадковим чином відібраних до кожної кімнати інфікування (2. 5 груп; 20 тварини). Інші кімнати інфікування містили 10 блоків (5 груп; 40 тварини). У межах кімнати інфікування, тварини у однаковому блоку були випадково розподілені до чотирьох кліток, розміщених поруч.

Вакцини для цих досліджень були приготовані відповідно до Прикладу 13 за виключенням того, що був використаний базовий розчин 1.5 % CARBOPOL®. Особливо, була приготований LEUKOCCELL® 2 (Pfizer, Inc.) шляхом поширення FeLV, субгрупи А, В, та С, у FeLV-трансформованих лімфоїдних клітинах. Вірусні антигени були хімічно інактивовані, поєднані з стерильним ад'ювантом для посилення імунної відповіді, та розфасовані у вигляді рідини. Був
 5 приготований дослідний ветеринарний продукт (IVP), який містив вірус кошачої лейкемії та 25 мкг Quil A/ алюмінію гідроксид (ALHYDROGEL®) у загальній кількості 100 мл. Всього 94.5 мл 1.106×10^5 нг/мл FeLV базового розчину повільно перемішувалося протягом 15 хвилин. РН був відрегульований до 5.9-6.1 за допомогою 4N HCl або 18 % NaOH, у разі необхідності. Впродовж
 10 перемішування, до розчину антигену було додано 0.5 мл 5.0 мг/мл розчину Quil A. Далі, було повільно додано 5.0 мл 100 об % ALHYDROGEL®. Композиція перемішувалася мінімум 2 години при 4 °C РН був відрегульований до 7.0-7.3 за допомогою 18 % NaOH або 1N HCl у разі необхідності.

IVP, що містив вірус кошачої лейкемії та 37.5 мкг Quil A/ алюмінію гідроксид (ALHYDROGEL®) був приготований таким самим чином, як для 25 мкг Quil A IVP, але до розчину антигену було додано 7.5 мл базового розчину Quil A. Взагалі було приготовано 350 мл дослідного ветеринарного продукту (IVP), який містив вірус кошачої лейкемії Quil A, холестерин, DDA, та CARBOPOL®. Впродовж перемішування 349.3 мл 1.106×10^5 нг/мл базового розчину FeLV, до розчину антигену було повільно додано 0.14 мл 50.0 мг/мл розчину Quil A. Далі, було
 20 повільно додано 0.39 мл 18 мг/мл розчину холестерин/етанол. Композиція була гомогенізована протягом трьох хвилин при 10000 об/хв. Взагалі було додано 0.19 мл 18.0 мг/мл розчину DDA/етанол до композиції впродовж перемішування. Взагалі було повільно додано 5.0 мл 1.5 % розчину CARBOPOL® до 145.0 мл композиції вірусу кошачої лейкемії, Quil A, холестерину, та DDA. РН був відрегульований до 7.0-7.3 за допомогою 18 % NaOH або 1N HCl у разі
 25 необхідності.

Таблиця 1

План досліджень

Група лікування	IVP ^a	№ тварини	Фаза вакцинації			Фаза інфікування			Відбір проб
			День вакцинації	Доза (мл)	Шлях введення	День інфікування	Доза (мл)	Шлях введення	День
T01	Фізіологічний розчин	20	0,21	1.0	SC ^c	37, 40, 42 ^d , 44	1,0	ON ^e	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155
T02	LEUKOCELL® 2 25 мкг Quil A / Al(OH) ^b	20	0,21	1.0	ПШ	37, 40, 42 ^d , 44	1,0	ОН	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155
T03	LEUKOCELL® 2 37.5 мкг Quil A / Al(OH) ^b	20	0,21	1.0	ПШ	37, 40, 42 ^d , 44	1.0	ОН	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155
T04	Перероблений LEUKOCELL® 2 20 мкг Quil A / Холестерин / DDA / CARBOPOL® ^b	20	0,21	1.0	ПШ	37, 40, 42 ^d , 44	1.0	ОН	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155

^aДослідний ветеринарний продукт^bЗмішаний, що має відносну імуногенність порівняльно до зразкової вакцини (FeLV зразок Lot No. 12)^cSC = Підшкірно^dДеро-Medrol®: Доба 42 (приблизно 5.0 мг/кг) внутрішньом'язово^eON = Ороназально

Quil A - Холестерин = Сапонін, ад'ювант Quil A, включений у ліпідні частини холестерину.

CARBOPOL® = Карбомер

DDA = Диметилдіоктодециламонію бромід.

Всі тварини вдень спостерігалися та спостереження записувалися. Температура тіла була поміряна та записана у всіх тварин крізь вушний канал у першу добу перед першим введенням дози вакцини та у 20 добу перед другим введенням дози вакцини. Пробу крові (1.0-2.0 мл) було зібрано у кожної тварини проколом з яремної вени у другу добу. Седативні дози TELAZOL® (Fort Dodge Animal Health) були введені відповідно до маси тіла (приблизно 5.0 мг/кг), внутрішньом'язево, у намаганні зменшити стрес у тварин та ухилитися від пошкоджень персоналу під час відбору крові. Кров була зібрана у туби для розділення сироватки (SST) та оброблена для розділення сироватки. Сироватку зберігали при -20 °C або ще холодніше до випробування.

Плацебо або вакцини FeLV були введені кошенятam підшкірно у дозі 1.0 мл. Перша вакцинація була проведена у нульову добу та друге введення вакцини було проведено у 21 добу. Всі тварини спостерігалися приблизно одну годину після першої та другої вакцинації для спостереження негайних місцевих больових реакцій (реакцій гострого болю). Спостереження були документально зафіксовані. Температура тіла всіх тварин були виміряна крізь вухо у 1 та 2 добу після першого введення дози вакцини, та у 22 та 23 добу після другого введення дози вакцини. Реакції у місці ін'єкції (опухлості) були також визначені у першу добу після першої вакцинації та у 22 та 23 добу після другої вакцинації. Проби крові (1.0-2.0 мл) були зібрані з кожної тварини проколом з яремної вени у 35 добу, оброблені для розділення сироватки, та зберігали при -20 °C або холодніше, до випробування.

У 35 добу, тварини були розміщені у індивідуальних ізольованих клітках. Вірусом для інфікування був вірулентний вірус кошкової лейкемії (FeLV), штам Rickard, з приблизним титром $10^{6.1}$ TCID₅₀/мл. Препарат для інфікування FeLV був розморожений та зберігався у вологому льоді перед введенням. Тварини були інфіковані на 37, 40, 42, та 44 добу, назальним введенням 1.0 мл нерозбавленого препарату. 1 мл туберкуліновий шприц, без голки, був наповнений препаратом введення. Кожному кошеняті було введено приблизно 0.5 мл у ніздрю. У 42 добу, інфікування було проведено приблизно за 5 годин після введення DEPO-MEDROL®. Після кожної доби інфікування, зберігалася проба препарату введення для підтверджувального титрування.

Після інфікування, пробу крові (1.0-2.0 мл) було зібрано з кожної тварин проколом з яремної вени, у 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, та 155 добу. Седативні дози TELAZOL® (Fort Dodge) були введені, як описано вище. Кров був зібрано у туби для розділення сироватки (SST), приготувані для розділення сироватки, та зберігалася при -20 °C або нижче до випробування. Проби сироватки були перевірені на присутність FeLV p27 антигену (маркер FeLV інфекції) від ELISA (IDEXX; Westbrook, ME). Кінцеві результати були оцінені по інтенсивності розповсюдження кольору та на спектрофотометрі при оптичній щільності 405/490 нм. Для чинного тесту, позитивний контроль оптичної щільності спадає між 0.131-2.999 та негативний контроль повинен був мати оптичну густину нижче або дорівнювати 0.0039.

Виділення вірусу було проведено з застосуванням проб сироватки, зібраних у 2 та 35 добу. Проби сироватки 127-155 доби були розглядані для оцінки ефективності вакцини FeLV. Проби сироватки 127 доби (тиждень 12), 134 доби (тиждень 13), 141 доби (тиждень 14), 148 доби (тиждень 15) та 155 доби (тиждень 16) були перевірені на присутність FeLV p27 антигену. Тварина вважалася тривало інфікованою, якщо вона мала три або більше позитивних тесту на FeLV p27 антиген протягом 127 доби (тиждень 12) до 155 доби (тиждень 16).

Температури були проаналізовані з застосуванням змішаної моделі лінійних повторних вимірювань, та були зроблені попарні порівняння між групами лікування T01 та T02, T03, та T04 у кожному моменті часу, якщо прояви у загальному лікуванні та/або у лікуванні у моменті часу були істотні. Квадратні мінімуми означають 95 % довірчі інтервали, мінімуми та максимуми були обчислені для кожного лікування у кожному моменті часу.

Частотні розподіли присутності реакцій гострого болю були обчислені для кожного лікування та дані моменті часу були зібрані. Частотні розподіли присутності опухлостей місця ін'єкції були обчислені для кожного лікування та дані на момент часу були зібрано. Частотні розподіли присутності пост-вакцинаційних системних реакцій були обчислені для кожного лікування.

Негайні реакції не спостерігали у будь-якої з груп лікування протягом першої та другої вакцинації. Шкідливі реакції не спостерігалися у будь-якої з груп лікування протягом приблизно однієї години після першої та другої вакцинації. Ні пірексія (температура тіла ≥ 39.5 °C) ні гіпотермія (температура тіла < 37.0 °C) не спостерігалися у будь-якої з груп лікування після першої та другої вакцинації. Не було істотних відмінностей у середній температурі тіла між групами лікування у будь-який момент часу ($p > 0.08$). Опухлості у місці ін'єкції не спостерігалися у будь-якої з груп лікування після першої та другої вакцинації.

Кінцеві результати з 12 тижня до 16 тижня пост-інфікування показали, що 16 з 19 тварин (84 %) що отримали плацебо (T01 група) були тривало віремичні до FeLV. 13 з 19 тварин (68 %) у групі T02 були захищені від вірулентного інфікування FeLV. Рівень захисту був статистично значним ($p=0.0004$) порівняно до кошенят, вакцинованих плацебо. 12 з 19 тварин (63 %) у групі T03 були захищені від вірулентного інфікування FeLV. Рівень захисту був статистично значним ($p=0.0013$) порівняно до кошенят, вакцинованих плацебо. 19 з 20 тварин (95 %) у групі T04 були захищені від вірулентного інфікування FeLV. Рівень захисту був статистично значним, ($p=0.0001$) порівняно до кошенят, вакцинованих плацебо.

Отже, всі вакцини, що були введені групам T02, T03 та T04 продемонстрували безпечність у кошенят мінімального віку, при введенні у дводозовому режимі, три тижні по окремі. На додаток, вакцини, введені цим групам були також здатні до суттєвого зниження рівню FeLV тривалої віремії у кошенят мінімального віку, коли вони введені при введенні у дводозовому режимі, три тижні по окремі. Було статистично значне скорочення у створенні тривалої віремії FeLV кошенят у групах T02, T03 та T04. На додаток, була статистично важлива різниця між T04 та іншими вакцинованими групами (T02, T03). Було несподівано та неочікуване те, що вакцини, який містить новий препарат ад'юванту виявилися більш ефективними, ніж ті, які містять компоненти ад'юванту, що звичайно використовують у кішок.

Приклад 15. Вакцини вірусу кошачої лейкемії.

Кошенята були акліматизовані 16 діб після прибуття. Тварини були далі випадково розподілені до кімнати, та у межах кімнати, були випадково розподілені на лікування (1 тварина на лікування у кожній кімнаті). Пробу крові (1.0-2.0 мл) було зібрано у кожній тварині проколом з яремної вени у - 1 добу досліджень. Седативні дози TELAZOL® (Fort Dodge Animal Health) були введені відповідно до маси тіла (приблизно 5.0 мг/кг) внутрішньом'язево у намаганні зменшити стрес у тварин та ухилитися від пошкоджень персоналу під час відбору крові. Кров було зібрано у туби для розділення сироватки та оброблено для розділення сироватки. Всі тварини також спостерігалися протягом доби, та спостереження були записані.

Вакцини були приготовані відповідно до Прикладу 13 за виключенням того, що був використаний 1.5 % базовий розчин CARBOPOL®. LEUKOCELL® 2 був приготований шляхом поширення FeLV, субгрупи A, B, та C, у FeLV-трансформованих лімфоїдних клітинах. Вірусні антигени були хімічно інактивовані, поєднані з стерильним ад'ювантом для посилення імунної відповіді, та розфасовані у вигляді рідини. Загальна кількість 500.0 мл IVP, що містить вірус кошачої лейкемії з відносною ефективністю (BI) - 2, а також Quil A, холестерин, та DDA був приготований наступним способом. 20.7 мл базового розчину FeLV (50.0 BI/мл, де 1 BI=3,624 нг/мл антигену) було додано до 478.2 мл 0.063 % PBS буферу. Впродовж перемішування, 0.21 мл 50.0 мг/мл розчину Quil A було повільно додано до розчину антигену. Далі, було повільно додано 0.58 мл 18 мг/мл розчину холестерин/етанол. Далі до композиції впродовж перемішування був повільно доданий розчин 0.29 мл 18.0 мг/мл DDA/етанол. Композиція була гомогенізована три хвилини при 10000 об/хв. Композиція була далі мікрофлюїдована одним проходом крізь 200-мікронуву камеру з обмеженим розміром при 10000 (+500) фунтів на квадратний дюйм. Впродовж перемішування, 10.0 мл 1.5 % розчину CARBOPOL® було повільно додано до 290.0 мл композиції вірусу кошачої лейкемії, Quil A, холестерину, та DDA. PH був відрегульований до 7.0-7.3 додаванням 18 % NaOH або 1N HCl у разі необхідності.

IVP, який містить вірус кошачої лейкемії з BI - 5 був приготований таким само чином, як IVP з BI - 2, з застосуванням 51.7 мл базового розчину FeLV та 447.2 мл 0.063 % PBS буфера, кількості інших компонентів залишаються незмінними.

IVP, який містить вірус кошачої лейкемії з BI - 10 був приготований таким само чином, як IVP з BI - 2, з застосуванням 93.1 мл базового розчину FeLV, 355.9 мл 0.063 % PBS буферу, 0.19 мл розчину Quil A, 0.52 мл розчину холестерину, та 0.26 мл розчину DDA (загальний обсяг 450 мл). Далі, 8.3 мл 1.5 % розчин CARBOPOL® був повільно доданий до 241.7 мл композиції вірусу кошачої лейкемії, Quil A, холестерину, та DDA.

IVP, який містить вірус кошачої лейкемії з BI - 15 був приготований таким само чином, як IVP з BI - 10 з застосуванням 139.7 мл базового розчину FeLV та 309.4 мл 0.063 % PBS буферу, кількості інших компонентів залишаються незмінними.

IVP який містить вірус кошачої лейкемії з BI - 20 був приготований таким само чином, як IVP з BI - 2 з застосуванням 206.9 мл базового розчину FeLV та 292.0 мл 0.063 % PBS буферу, кількості інших компонентів залишаються незмінними.

Для введення 0.5 мл дози, 300.0 мл IVP, який містить вірус кошачої лейкемії з BI - 5, Quil A, холестерин, DDA, та CARBOPOL® був приготований наступним способом. 21.7 мл базового розчину FeLV (35.8 BI/мл, де 1 BI=1,864 мкг/мл антигену) було додано до 277.7 мл 0.063 % PBS буферу. Впродовж перемішування, 0.12 мл 50.0 мг/мл розчину Quil A було повільно додано до

розчину антигену. Далі, було повільно додано 0.35 мл 18 мг/мл розчину холестерин/етанол. Загалом до композиції впродовж перемішування було повільно додано 0.17 мл 18.0 мг/мл розчину DDA/етанол. Композиція була гомогенізована три хвилини при 10000 об/хв. Далі композиція була мікрофлюїдована одним проходом крізь 200-мікронуву камеру з обмеженим розміром при 10000 (+500) фунтів на квадратний дюйм. Впродовж перемішування, 3.3 мл 1.5 % розчин CARBOPOL® було повільно додано до 96.7 мл композиції вірусу кошачої лейкемії, Quil A, холестерину, та DDA. PH був відрегульований до 7.0-7. З додаванням 18 % NaOH або 1N HCl, у разі потреби.

IVP для введення а 1.0 мл дози вірусу кошачої лейкемії з BI - 5, Quil A, холестерином, DDA, та CARBOPOL® був приготований таким само чином, як для 0.5 мл дози з відповідно відрегульованими кількостями.

Взагалі було приготовано 300.0 мл IVP, який містить вірус кошачої лейкемії з BI - 10 та CARBOPOL®. 62.1 мл базового розчину FeLV (50.0 BI/мл, де 1 BI=3,624 мкг/мл антигену) було додано до 237.9 мл 0.063 % PBS буферу. Композиція була гомогенізована три хвилини при 10000 об/хв. Далі композиція була мікрофлюїдована одним проходом крізь 200-мікронуву камеру з обмеженим розміром при 10000 (+500) фунтів на квадратний дюйм. Впродовж перемішування, 3.3 мл 1.5 % розчин CARBOPOL® було повільно додано до 96.7 мл композиції вірусу кошачої лейкемії. PH був відрегульований до 7.0-7. З додаванням 18 % NaOH або 1N HCl у разі необхідності.

Плацебо та вакцини FeLV (Таблиця 2) були введені кошенятм підшкірно з застосуванням голки 22 калібру x 3/4" та 3 cc шприцу у 0 та 20 добу досліджень. Групі лікування T01 був введений плацебо вакцини з дозою 1.0 мл. Групам лікування T02, T04, T05, T06, T07, T08 та T09 були введені вакцини FeLV з дозою 1.0 мл. Групі лікування T03 було введено вакцину FeLV з дозою 0.5 мл. Групі лікування T10 було введено FeLV пташиного вірусу (sapagurox) вакцину (Merial) внутрішньошкірно з застосуванням внутрішньошкірного пістолетного ін'єктора.

Таблиця 2

План досліджень

Група лікування	тварини	Цільова відносна ефективність	Шлях введення	Вакцина	Ад'ювант	Середа культури клітин
T01	10	N. A.	ПШ	PBS	No ад'юванту	Нормальний фізіологічний розчин
T02	10	5 BI	ПШ	Інактивований FeLV	Quil A Холестерин DDA CARBOPOL®	RPMI
T03	10	5 BI	ПШ/0.5 мл	Інактивований FeLV	Quil A Холестерин DDA CARBOPOL®	RPMI
T04	10	20 BI	ПШ	Інактивований FeLV	Quil A Холестерин DDA CARBOPOL®	Cellgro
T05	10	15 BI	ПШ	Інактивований FeLV	Quil A Холестерин DDA CARBOPOL®	Cellgro
T06	10	10 BI	ПШ	Інактивований FeLV	Quil A Холестерин DDA CARBOPOL®	Cellgro
T07	10	5 BI	ПШ	Інактивований FeLV	Quil A Холестерин DDA CARBOPOL®	Cellgro
T08	10	2 BI	ПШ	Інактивований FeLV	Quil A Холестерин DDA CARBOPOL®	Cellgro
T09	10	10 BI	ПШ	Інактивований FeLV	CARBOPOL®	Cellgro
T10	10	Живий rFeLV (Merial)	ID	Живий rFeLV (Merial)	Без ад'юванту	Приватний (Merial)

Всіх тварин спостерігали після першої вакцинації (0 доба досліджень) та другої вакцинації (20 доба досліджень) для спостереження ознак болю під час введення тестової вакцини, в тому числі застосування голосу, дряпання/кусання, проявів агресії та спроб втечі. Також був документально зафіксований пост-вакцинаційний стан тварин (нормальний або ненормальний). Всі тварини спостерігалися приблизно одну годину після введення вакцини у 0 добу досліджень та 20 добу досліджень для спостережень розвитку шкідливих систематичних реакцій. Спостереження були документально зафіксовані. Місця вакцинації були пальповані, та записані випадки болю у місці ін'єкції, почервоніння у місці ін'єкції, опухлості у місці ін'єкції та розмір опухлості у місці ін'єкції. Спостереження були проведені на 2, 5 та 9 добу досліджень після першої вакцинації, та на 25, 28 та 32 добу досліджень після другої вакцинації. Спостереження були документально зафіксовані.

Пробу крові (1.0-2.0 мл) було зібрано з кожної тварини проколом з яремної вени на 32 добу досліджень (пре-інфікування). Тварини були інфіковані на 34, 36, 39, та 41 добу досліджень назальним введенням 1.0 мл нерозбавленого препарату введення. 1 мл туберкуліновий шприц, без голки, був наповнений препаратом введення. Кожне кошеня отримало приблизно 0.5 мл у ніздрю. Препарат для інфікування FeLV мав середній титр $10^{6.1}$ TCID₅₀/мл. Пробу крові (1.0-2.0 мл) далі було зібрано з кожній тварини проколом з яремної вени на 61, 83, 106, 126, 133, 138, 146, та 152 добу досліджень.

Протягом першої (0 доба досліджень) вакцинації, три тварини у групі лікування T09 показали негайну реакцію типу гострого болю. Протягом другої вакцинації (20 доба досліджень), одна тварина з групі лікування T05, чотири з групі лікування T08, та дві з групі лікування T09 продемонстрували негайні реакції типу гострого болю.

Протягом першої вакцинації, три тварини у групі лікування T09 продемонстрували слабке застосування голосу. У тварин, які відчували біль при першій вакцинації також у той час спостерігалось слабке застосування голосу. Протягом другої вакцинації, одна тварина у групі лікування T05, чотири у групі лікування T08, та дві у групі лікування T09 продемонстрували слабке застосування голосу. У тварин, які відчували біль при другій вакцинації також у той час спостерігалось слабке застосування голосу. Протягом першої вакцинації, три тварини у групі лікування T09 продемонстрували агресивну поведінку/спробу до втечі. Протягом другої вакцинації, одна тварина у групі лікування T05, чотири у групі лікування T08, та дві у групі лікування T09 продемонстрували агресивну поведінку/спробу до втечі.

Жодна з груп лікування не проявила випадків дряпання/кусання у місці ін'єкції під час першої або другої вакцинації. Реакції у місці ін'єкції не спостерігалися у жодної з груп лікування після першої або другої вакцинації. Шкідливі реакції також не спостерігалися у жодної з груп лікування.

Всі тварини були негативними на FeLV p27 антиген перед вакцинацією, як свідчать проби сироватки, що були зібрані у - 1 добу.

Всі тварини також виявилися негативними на FeLV p27 антиген перед інфікуванням, як свідчать проби сироватки, що були зібрані у добу 32.

Загальні результати з 12 тижня по 16 тиждень після інфікування (Таблиця 3) показали, що 9 з 10 тварин (90 %) у групі лікування T01 (плацебо) були тривало віремичні до FeLV. Результати того ж самого періоду показали, що 6 з 10 тварин (60 %) у групі лікування T02 були захищені від вірулентного інфікування FeLV; цей рівень захисту не був статистично значим ($p=0.0573$), порівняно до кошенят, вакцинованих плацебо. 9 з 10 тварин (90 %) у групі лікування T03 були захищені від вірулентного інфікування FeLV; цей рівень захисту був статистично значим ($p=0.0011$) порівняно до кошенят, вакцинованих плацебо. 10 з 10 тварин (100 %) у групі лікування T04 були захищені від вірулентного інфікування FeLV; цей рівень захисту був статистично значим ($p=0.0001$), порівняно до кошенят, вакцинованих плацебо. 10 з 10 тварин (100 %) у групі лікування T05 були захищені від вірулентного інфікування FeLV; цей рівень захисту був статистично значим ($p=0.0001$), порівняно до кошенят, вакцинованих плацебо. 7 з 10 тварин (70 %) у групі лікування T06 були захищені від вірулентного інфікування FeLV; цей рівень захисту був статистично значим ($p=0.0198$), порівняно до кошенят, вакцинованих плацебо. 10 з 10 тварин (100 %) у групі лікування T07 були захищені від вірулентного інфікування FeLV; цей рівень захисту був статистично значим ($p=0.0001$), порівняно до кошенят, вакцинованих плацебо. 8 з 10 тварин (80 %) у групі лікування T08 були захищені від вірулентного інфікування FeLV; цей рівень захисту був статистично значим ($p=0.0055$), порівняно до кошенят, вакцинованих плацебо. 5 з 10 тварин (50 %) у групі лікування T09 були захищені від вірулентного інфікування FeLV; цей рівень захисту не був статистично значим ($p=0.1409$), порівняно до кошенят, вакцинованих плацебо. Зрештою, 6 з 10 тварин (60 %) у групі

лікування T10 були захищені від вірулентного інфікування FeLV; цей рівень захисту не був статистично значним ($p=0.0573$), порівняно до кошенят, вакцинованих плацебо.

Таблиця 3

Резюме рівню захисту

Група лікування	відносна ефективність вакцини	Рівень захисту	Профілактичне розділення
T01	NA	10 %	
T02	4.58	60 %	55.6 %
T03	4.58	90 %	88.9 %
T04	26.32	100 %	100 %
T05	18.58	100 %	100 %
T06	11.16	70 %	66.7 %
T07	4.77	100 %	100 %
T08	1.64	80 %	77.8 %
T09	11.12	50 %	44.4 %

- 5 Вакцини, що було використано у групах лікування T02, T03, T04, T06 та T07 продемонстрували задовільний рівень безпечності протягом першої вакцинації, так як у цей час ніяких реакцій не було спостережено. Одна тварина у групі лікування T05 продемонструвала негайну реакцію (більш при введенні, слабке застосування голосу та агресивні прояви/спробу втечі) при другій вакцинації. Ця подія більш може бути пов'язана з ускладненою відповіддю на вакцинацію для конкретної тварини, ніж до проблем препарату вакцини. Всі вакцини продемонстрували задовільний рівень безпечності протягом пост-вакцинації, так як ніяких місцевих реакцій або шкідливої дії, пов'язаних з вакцинацією не спостерігалися.

- 10 Вакцини FeLV, введені до груп лікування T03, T04, T05, T07 та T08 продемонстрували задовільну ефективність, оскільки після інфікування вірулентним FeLV був досягнутий ≥ 80 % захист (≥ 75 % превентивної частки). Ця вакцина, яку отримала група T07 забезпечила 100 % захист, що було несподівано та неочікуване, так як тварини у цій групі отримали 25 % та 33 % від дози антигену тварин у групах T04 та T05, відповідно. Явною перевагою ад'ювантів, виявлених та перевічених тут є те, що вони дозволяють застосовувати менші дози антигену, в той же час повністю викликаючи захисну імунну відповідь. Вакцини, введені групам лікування T02, T06 та T09 продемонстрували дещо пониженою ефективністю (< 80 % захист; профілактичне розділення < 75 %) після інфікування вірулентним FeLV. Понижена ефективність вакцини, введеної до групи лікування T02 можливо спричинена наявністю тварин зі слабкою відповіддю у цій групі.

Приклад 16. Вакцинація у яйце проти *Eimeria* у курчат.

- 25 Пташиний кокцидіоз - кишкова хвороба, головним чином спричинена protozoa з роду *Eimeria*, яка являє серйозну всесвітню проблему для птахівництва. Паразити проковтуються під час годування та локалізуються у кишковому тракті, де вони викликають серйозне пошкодження кишкових та підлеглих тканин. Результатом є дуже істотні економічні втрати у птахівництві, оскільки порушується кормоотдача та збільшення ваги як у бройлерів, так і у несучок. Загальні підсумки стану у цій галузі, у тому числі спроби вакцинації проти *Eimeria*, наприклад, використання рекомбінантного білка *Eimeria* у якості антигену та безліч ад'ювантних систем, є описаними у наступних публікаціях, на які є посилання в цьому документі, (1) H. S. Lillehoj et al., J. Parasitol., 91(3), 2005, pp. 666-673; (2) H. S. Lillehoj et al., Avian Diseases, 49 2005, 112-117; and (3) R. A. Dalloul et al., Expert Rev. Vaccines, 5(1), 2006, pp. 143-163. Присутній приклад є спрямованим до використання нових композицій вакцин, що застосовують ад'ювантні компоненти, які забезпечують дуже високу ефективність у контексті кокцидіозу.

- 40 Високоєфективні ад'юванти цього винаходу можуть бути використані у комбінації з антигенним матеріалом всіх видів *Eimeria*, в тому числі з їх очищеними або частково очищеними екстрактами білків, або з їх од ним чи багатьма рекомбінантно експресованими білками, або з фрагментами будь-якого та всіх цих білків, таким чином, щоб включати антигенні матеріали, надані з *Eimeria acervulina*, *Eimeria ahsata*, *Eimeria bovis*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria fraterculae*, *Eimeria maxima*, *Eimeria meleagridis*, *Eimeria mitis*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox*, *Eimeria stiedae*, *Eimeria tenella*, та *Eimeria zurnii*, серед інших.

- 45 Посилена ад'ювантами вакцина винаходу може бути надана проти будь-якого білка або макромолекули, що виробляється на одному чи на декількох етапах життєвого циклу protozoan,

що охоплює, без обмежень, ооцист (спорулентний або неспорулентний), спороцист, спорозоїт, шизонт, мерозоїт, чоловічі або жіночі клітини - гамети. У бажаному прикладі, білки, що виводяться з калом у значних кількостях на стадії ооцисту є бажаними речовинами, що виступають в якості джерела рекомбінантного білкового антигену, або частково або повністю очищені зразки такого білка очищають за допомогою звичайних засобів.

Додаткові приклади білків *Eimeria*, які корисні у якості джерел антигену у препараті даних вакцин охоплюють такі, як описані Karkhanis et al. *Infection and Immunity*, 1991, pp. 983-989, в тому числі запобіжні антигени, як описано тут, що мають масу у діапазоні приблизно 20-30 кДа. Додаткові приклади охоплюють білок *Eimeria* 23 кДа 3-1E, та білок Etp100, наприклад, отриманий з *E. tenella*.

Високоєфективні ад'юванти цього винаходу можуть бути використані у комбінації з антигенним матеріалом з *Neurospora caninum*.

На додаток, високоєфективні ад'юванти цього винаходу можуть бути використані у комбінації з будь-яким з наступних патогенів protozoa, як-то: *Cryptosporidium parvum* (криптоспорідіоз), *Cyclospora cayentanensis* (циклоспоріаз), *Isospora belli* (ізоспоріаз), *Toxoplasma gondii* (токсоплазмоз), *Plasmodium* (малярія), *Babesia* spp. (бабесіоз), та від споріднених protozoa, головним чином групи Apicomplexa, що спричинює ці або споріднені хвороби.

Ефективність постачання вакцини, що містить окремі ад'ювантні системи у яйце була оцінена таким чином:

Рекомбінантний білок *E. maxima* (білок 3-1E) був експресований у *E. coli* та очищений шляхом адсорбційної хроматографії. Зроблене грубе приготування цілих клітинних макромолекул *E. maxima* (розчинених з детергентом зі зруйнованих клітин), що також були використані у якості антигену (далі іменується як "EM"). У бажаному прикладі, ад'ювант був таким, як описано у Прикладі 8 вище, та був приготований, як це передбачено згідно з протоколом прикладу (див. стор. 41). Отже, у типовому прикладі, кожний ембріон буде отримувати ін'єкцію у амніон (тобто, з включенням амніотичного простору та рідини) приблизно 50-100 мкл розчину вакцини, який містить на кожен свій 1 мл: приблизно 50 або 100 мкг рекомбінантного 3-1E білка, або інші види білка, або, замість того, приблизно 50 або 100 мкг сирого клітинного екстракту "EM"; приблизно 20 мкг Quil A; приблизно 20 мкг холестерину; приблизно 0.075 об% CARBOPOL; приблизно 10 мкг DDA; та приблизно 250 мкг R1005, все постачається у, наприклад, 20 мМ PBS.

У зв'язку з обранням сапоніну для використання тут, наступна додаткова інформація є корисною. Визначений термін "сапонін" стосується рослинних похідних глікозидів, деякі з яких були вивчені задля їх біологічних властивостей (Plant Glycosides, McIlroy, R. J., Edward Arnold та со., London, 1951). Сапоніни, які використовують найбільшою мірою в цій галузі для виробництва вакцини, отримані з рослин *Quillaja saponaria molina*, *Aesculus hippocastanum* або *Gyophilla struthium*. Екстракти кори *Quillaja saponaria molina*, як відомо, мають ад'ювантну активність, наприклад, Quil A. Також були описані чисті фракції Quil A, які зберігають ад'ювантну активність, але менш токсичні, ніж Quil A, наприклад QS21. QS21 також описаний у Kensil et al. (1991. *J. Immunology*, vol 146, 431-437). При змішуванні з іншими ад'ювантними інгредієнтами даного винаходу, як подали, так і надалі описаними, такі речовини, що містять сапонін стають високоєфективними. Додаткові ефективні препарати охоплюють такі, що використовують Ескін, який є описаним у Merck index (12th ed: entry 3737) як суміш сапонінів з насіння кінського каштану. У бажаному втіленні даного винаходу, сапонін стосується "Quil-A", що продається у Сполучених Штатах від E. M Sergeant company.

Більш того, треба розуміти, що екстракти сапоніну можуть бути використані як суміші, або очищені індивідуальні компоненти, як-то такі фракції/продукти, що містять QS-7, QS-17, QS-18, та QS-21 від Antigenics Company, Massachusetts, USA, або подібні очищені, фракціоновані, або у сирому вигляді продукти сапоніну, що пропонує Isconova Company of Sweden. У одному втіленні Quil A має чистоту щонайменше 85 %. У інших втіленнях, Quil A є щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % чистоти.

Яйця були придбані у Moyers Hatchery, Quakertown, PA. Для імунізації у яйце, яйця бройлерів були інкубовані 18 діб, перевірені на світло для відбору (при 18-денній ембріонації) родючих яєць, та далі були ін'єцировані 20 мМ PBS та одним з двох ад'ювантів, або ад'ювантом, зробленим з рекомбінантного білка 3-1E або препаратом "EM". Ін'єкції були зроблені на "Intelliject" у ово ін'єкторі (Avitech, Hebron, MD) відповідно до інструкцій виробника. Кожне яйце отримало 100 мкл у амніотичну порожнину з застосуванням голки 17.5 см-довжини та 18-калібру, отриманою від Avitech (Hebron, MD). 50 мкл дози є також серед тих, які можна застосувати у реалізації даного винаходу.

Як тільки курчата - бройлери проклюнулися (приблизно 21-22 доби), вони були перевезені до лабораторії з застосуванням одноразових картонів для перевезення курчат (Frederick Packaging, Inc., Milwaukee, WI) та далі вони були розміщені у спеціальних поміщеннях (Petersime units) та забезпечені їжею та водою без обмежень.

Птахи зберігалися у секціях брудера у середовищі, вільному від *Eimeria* та далі були переведені у великі висячі клітини у окремих місцях, де вони були інфіковані живими ооцитами *Eimeria maxima* та зберігалися там до кінця експериментального періоду.

У дослідженнях було використано USDA BARC, штам *Eimeria maxima* #41, який зберігався у Animal Parasitic Diseases Laboratory-BARC та був розмножений відповідно встановлених процедур у лабораторії Dr. Lillehoj's. Тільки-но вироблені ооцити з штаму *E. maxima* (Beltsville #41) були очищені флотацією у 5 % натрію гіпохлориті, тричі промиті PBS, та життєздатність була перерахована трипановим синім з застосуванням гемоцитометру.

Птахам у віці сім діб були зроблені мітки на крилах та птахи всіх експериментальних груп за виключенням неінфікованої контрольної групи були щеплені у стравохід *E. maxima* з застосуванням голки для щеплення, та були далі розміщені у клітинах для збирання ооцитів.

Масу тіла кожної птахи було визначено у 0 добу (неінфікованої), та у 6 та 10 добу після інфекції *E. maxima*.

Доглядачі тварин були інструктовані не прибирати клітки, та фекалії були зібрані. Лотки для збирання були розміщені під кожною клітиною на 5 діб, починаючи з шостої доби після інфекції, та фекальні речовини були зібрані у великі пластикові банки (2 л). Фекалії були занурені у водопровідну воду у кожній банці та далі були подрібнені у блендері з більшою кількістю води (загальним обсягом 3 л), та дві 40 мл випадкові проби були відібрані з кожної проби та зберігалися у холодильнику, доки вони не були підраховані. Для підрахування ооцитів кокцидії, спочатку були зроблені різні розведення для визначення оптимального розведення для перерахування ооцистів для кожного зразка. Ооцисти були підраховані під мікроскопом з застосуванням лічильної камери McMaster з використанням способу флотації цукрози, що був розроблений у лабораторії Dr Lillehoj's. Загальна кількість випорожнених ооцистів на курча було обчислено з застосуванням формули: загальні ооцисти/птицю = (підраховані ооцисти x фактор розведення x обсяг фекальної проби/обсяг лічильної камери)/кількість птахів у клітці.

Кров була зібрана на шосту добу після дати інфекції, та була визначена відповідь сироваткових антитіл. Проби крові були отримані з окремих птахів (N=4-5/групу), давали згорнутися 4 год. при 4 °C, та було зібрано сироватку. Проби сироватки були перевірені на анти-*Eimeria* антитіла з застосуванням ELISA. Стисло кажучи, на титраційні мікропланшети були нанесені протягом ночі 10 мкг/лунку рекомбінантних кокцидійних антигенів Ea3-1E, EtMIF або EtMIC2, промитих PBS-0.05 % Tween, та блокованих PBS-1 % BSA. Далі були додані розведення сироватки (1:20, 1:40, 1:80, 1:160; 100 мкл/лунку), все було інкубовано з безперервним м'яким струшуванням, промито, та зв'язані антитіла були виявлені сполученням з пероксидазою кролячим анти-курячим IgG (Sira) та специфічним до пероксидази субстратом. Оптична густина (OD) була визначена при 450 нм читачем мікропланшетів (Bio-Rad, Richmond, CA).

Тканини кишечника були зібрані у виводку на 6 та 10 добу відповідно, та перевірені на продукування цитокину (IFN- γ , IL-2) з застосуванням RT-PCR у реальному часі для вимірювання Th1 стимуляції.

Загальна РНК була отримана з кишкової IELs з застосуванням TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). П'ять мкг РНК були оброблені 1.0 U ДНКази I та 1.0 мкл 10X реакційного буферу (Sira), та інкубовані 15 хв. при кімнатній температурі, 1.0 мкл стоп-розчину було додано до інактивованої ДНКази I, та суміш була нагріта при 70 °C 10 хвилин. РНК була зворотно-транскрибована з застосуванням системи для синтезу першого ланцюгу StrataScript (Stratagene, La Jolla, CA) відповідно до рекомендацій виробника. Кількісні RT-PCR праймери олігонуклеотидів для інтерферон- γ (IFN- γ) курчат та GAPDH контроль перелічені у Таблиці 4. Були проведені ампліфікація та визначення з застосуванням еквівалентної кількості загальної РНК з кишкової IELs з застосуванням системи Mx3000P та Brilliant SYBR Green QPCR master mix (Stratagene). Стандартні криві були зроблені з застосуванням \log_{10} розведеної стандартної РНК та рівні індивідуальних транскриптів були нормалізовані GAPDH та проаналізовані за допомогою програми Q-gepe. Кожен аналіз був зроблений тричі. Для нормалізації рівнів РНК між пробами у межах експерименту, були обчислені обсяги середнього порогу циклу (C_t) для продуктів ампліфікації шляхом об'єднання значень з усіх зразків у цьому експерименті.

Таблиця 4

Олігонуклеотидні праймери, що були використані для кількісної RT-PCR IFN- γ курчат та GAPDH

РНК ціль	Праймерні послідовності	Розмір PCR продукту (пар основ)
GAPDH	Зразок No. K01458	264
Передня	5'-GGTGGTGGCTAAGCGTGTAT-3'	SEQ ID NO:1
Зворотна	5'-ACCTCTGTCATCTCTCCACA-3'	SEQ ID NO:2
IFN- γ	Зразок No. Y07922	259
Передня	5'-GCTGACGGTGGACCTATTATT-3'	SEQ ID NO:3
Зворотна	5'-GGCTTTGCGCTGGATTC-3'	SEQ IDNO:4
IL-1 β	Зразок No. Y15006	244
Передня	5'-TGGGCATCAAGGGCTACA-3'	SEQ IDNO:5
Зворотна	5'-TCGGGTTGGTTGGTGATG-3'	SEQ IDNO:6
IL-15	Зразок No. AF139097	243
Передня	5'-TCTGTTCTTCTGTTCTGAGTGATG-3'	SEQ IDNO:7
Зворотна	5'-AGTGATTTGCTTCTGTCTTTGGTA-3'	SEQ ID NO:8

Селезінку було зібрано перед щепленням *E. maxima* та на десяту DPI (доба після інфекції) для аналізу проліферації спленоцитів. Селезінки були розміщені у чашках Петрі з 10 мл збалансованого фізіологічного розчину Ханка (HBSS), доповненого 100 U/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (Sira, St. Loue, MO). Суспензії одиничних клітин лімфоцитів селезінки були приготовані та була проведена проліферація лімфоцитів. Стисло кажучи, спленоцити були відрегульовані до 5×10^6 або 1×10^7 клітин/мл у середі IMDM (Sira), що була доповнена 10 % бичачої ембріональної сироватки (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 100 U/мл пеніциліну, та 100 мкг/мл стрептоміцину (Sira), яка далі буде називатися 10 % доповненою IMDM середою. Спленоцити (100 мкл/лунку) були інкубовані у 96-луночні планшети з плоским дном при 41 °C у вологому інкубаторі (Forma, Marietta, OH) з 5 % CO₂ та 95 % повітря на 48 годин. Клітинна проліферація була визначена 2-(2-метокси-4-нітрофеніл)-3-(4-нітрофеніл)-5-(2,4-дісульфофеніл)-2Н-тетразолій, моноклатрією сіллю (WST-8, Cell-Counting Kit-8®, Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD). Оптична густина (OD) був поміряна при 450 нм з застосуванням мікропланшетного спектрофотометру (BioRad), Richmond, CA).

Результати показали, що птахи-бройлери, вакциновані 100 мкл ад'ювантного препарату (тобто 100 мкл, що містить рекомбінантний 3-1E білок відповідно до раніше визначених доз) отримали приблизно 45-85 грам додаткової маси тіла порівняно до птахів, не вакцинованих, але інфікованих *E. maxima*.

Вакцини винаходу також показали чіткі прояви клітинно-опосередкованого імунітету, який був виміряний мітогенними аналізами проліферації лімфоцитів: Результати проліферації лімфоцитів селезінки при 1×10^7 клітин/мл, інкубованих із Con A 48 годин показали, що спленоцити з *E. max/ma*-інфікованих курчат, імунізованих ад'ювантом Pfizer з антигеном або без антигену взагалі показують вищі рівні проліферації лімфоцитів, особливо коли була використана 50 мкг доза. Істотне збільшення виробництва IL-1B, IFN- γ , та IL-15, в особливості у селезінці було помічено після введення ад'ювантних вакцинних композицій винаходу. Таким чином, ці результати ясно показують вплив даного ад'юванту на цитокінову відповідь та підтримку його дії на підсилення клітинно-опосередкованої, а не гуморальної імунної відповіді.

Вакцини винаходу також показали чіткий вплив на фекальний вихід ооцистів. У неінфікованих контрольних птахів не була відмічена наявність будь-яких ооцистів. Після інфекції *E. maxima*, були істотні скорочення виходу фекальних ооцистів у групах, які були оброблені тільки ад'ювантами Pfizer. Птахи, вакциновані у яйце необробленими *Eimeria maxima* та ад'ювантом продемонстрували набагато менший вихід фекальних ооцистів порівняно до груп, щеплених тільки препаратом необроблених *Eimeria maxima* (ЕМ груп).

Слід зауважити, що, хоча очищений рекомбінантний білок 3-1E *E. maxima* використовується у практиці вищезначених експериментів, використання рекомбінантних Ea3-1E, EaMIF, та EtMIC2 антигенів, або сингулярно, або у комбінації з 3-1E, або одного з іншим, або у будь-якій комбінації будь-якого з них, є також бажаним втіленням винаходу, та головним чином всі білкові антигени *Eimeria* є діючими у практичному використанні даного винаходу, до того часу, як вони будуть змішані з ад'ювантами даного винаходу.

Приклад 17. Оцінка штаму J5 бактерину *Escherichia coli* у великій рога́тій худоби.

Метою досліджень є оцінка імунологічної відповіді у великої рогатої худоби до антигену *Escherichia coli* (J-5 штам) при введенні у різних нових препаратах. Комерційний J5 бактерин є у продажу як превентивна вакцина проти кишкового маститу у молочній великій рогатій худоби та є помірно ефективним у даному препараті. Перед вакцинацією, тварини, як було визначено, мали низький титр антитіл до *E. coli* J5, відповідно до аналізів зразків сироватки крові, відібраних перед вакцинацією.

Експериментальні вакцини були зроблені з застосуванням інактивованого *E. coli* J5 бактерину у якості антигену, та були зроблені відповідно до Прикладу 13 вище. Кожна група лікування спочатку містила сім тварин (Таблиця 5). Одній групі лікування давали фізіологічний розчин (T01) та іншій групі дали комерційну вакцину J5 (T02-Enviracog™ Pfizer J-5 *Escherichia coli* бактерин). Інші групи лікування отримали різні препарати, які містили ад'юванти, визначені у Таблиці 5. Всі вакцинації були введені шляхом підшкірної ін'єкції у 0 та 21 добу досліджень. Обсяг дозування був 5 мл.

Таблиця 5

Групи вакцини - корови

Tmt група	# тварини	Лікування	Доба	Дозування (мл)	Шлях введення
T01	7	Фізіологічний розчин	0,21	5.0	ПШ
T02	7	<i>Escherichia coli</i> бактерин, J-5 штам	0,21	5.0	ПШ
T03	7	QCDCR	0,21	5.0	ПШ
T04	7	QCDO	0,21	5.0	ПШ
T05	7	QCDX	0,21	5.0	ПШ
T06	7	QCDXO	0,21	5.0	ПШ

У Таблиці 5, QC-QuilA/холестерин, D-DDA, C - Carbopol, R-R1005, X – DEAE - декстран та O - олія.

Базові розчини були приготовані, як у Прикладах 1-13 вище для наступного: *E. coli* було додано у концентрації приблизно $4-5 \times 10^9$ організмів на дозу, що було визначено прямим рахуванням на світловому мікроскопі. Quil A у воді дорівнював 50 мг/мл, холестерин у етанолі - 17 мг/мл, DDA у етанолі - 17 мг/мл, R1005 у 20 мМ фосфатному буфері - 5 мг/мл, DEAE-декстран у воді - 200 мг/мл, TLR-агоніст у TE буфері - 20 мг/мл та ISCOMatrix у воді - 5. 4 мг/мл. Індивідуальні компоненти були додані з співвідношенням за об'ємом у в порядку літерних символів зліва направо. Наприклад, QCDC означає, що до відповідного обсягу Quil A було спочатку додано холестерин, далі DDA та зрештою Carbopol. Коли препарати містили олію, окремі компоненти були додані змішуванням та далі була зроблена емульсія у суміші мінеральної олії Drakeol® 5 LT з або Span 80 та Tween 80 (QCDO) або Span 85 та Tween 85 (QCDXO). Drakeol® є комерційно доступною легкою мінеральною олією.

Проби крові були зібрані у 0, 21 та 49 добу досліджень для серологічного аналізу. Титри антитіл до *E. coli* J5 у пробах сироватки були визначені за допомогою J5-специфічного, непрямого ELISA аналізу. Ізотипи антитіл IgG були визначені баранячими-анти-бичачими кон'югатами антитіл (Bethyl Labs). Титри були визначені та показані у вигляді їх геометричних середніх значень.

Серологічні результати досліджень наведені у Таблицях 6-8. Високі титри антитіл головним чином пов'язані з кращим захистом вакцин. Загальний JS-специфічний титр IgG наведений у Таблиці 6. Деякі з препаратів цього винаходу створюють титри значно вищі, ніж у комерційного продукту, навіть якщо ці препарати мали подібну кількість доданого J5 антигену. Препарати QCDO, QCDX, та QCDXO були особливо ефективними у створенні значної імунної відповіді у цієї великої рогатої худоби.

Таблиця 6

Титри IgG антитіл

Tmt група	Лікування	Геометричний середній титр IgG до J5 у добу		
		0	21	48
T01	Фізіологічний розчин	1573	3135	2795
T02	Escherichia coli бактерин	1402	7011	55524
T03	QCDCR	1573	13975	49494
T04	QCDO	1764	62289	391951
T05	QCDX	993	22135	110672
T06	QCDXO	2221	69877	620779

- 5 Ізотипи JS-специфічних IgG1 антитіл були визначені. Ці результати наведені у Таблиці 7. Знову, QCDO, QCDX, та QCDXO препарати були особливо ефективними у створенні значної імунної відповіді у цієї великої рогатої худоби. Ці препарати дали більш вищі титри з навіть одиничною вакцинацією, ніж комерційні вакцини, що вводилися двома ін'єкціями.

Таблиця 7

Титри IgG1 антитіл

Tmt група	Лікування	Геометричний середній титр IgG до J5 у добу		
		0	21	48
T01	Фізіологічний розчин	1250	1250	627
T02	Escherichia coli бактерин	1114	11105	22135
T03	QCDCR	1250	12458	22135
T04	QCDO	1980	31250	139281
T05	QCDX	789	35057	62289
T06	QCDXO	1573	247472	439702

- 10 Титри антитіл IgG2 наведені у Таблиці 8. Цей ізотип антитіл є часто пов'язаний з кращим фагоцитозом нейтрофілами у молоці та захистом для тварин. Препарати QCDO, QCDX, та QCDXO були особливо ефективними у створенні значної імунної відповіді у цієї великої рогатої худоби.

Таблиця 8

Титри IgG2 антитіл

Tmt група	Лікування	Геометричний середній титр IgG до J5 у добу		
		0	21	48
G01	Фізіологічний розчин	199	396	396
G02	Escherichia coli бактерин	280	855	3136
T03	QCDCR	1114	1402	4966
T04	QCDO	558	573	6250
T05	QCDX	176	3947	9899
T06	QCDXO	559	8824	87940

- 15 Експериментальні вакцини були приготовані з застосуванням інактивованого бактерину E. coli J5 як антигену, та були зроблені відповідно до Прикладу 13 вище. Кожна група лікування спочатку містила сім тварин. (Таблиця 9). Одна група лікування отримала фізіологічний розчин (T01) та інші групи отримали комерційну вакцину J5 (T02-Enviracor™ Pfizer J-5 Escherichia coli бактерій). Інші груп лікування отримали різні препарати, які містили ад'юванти, що визначені у Таблиці 9. Всі вакцинації були введені шляхом підшкірної ін'єкції у 0 та 21 добу досліджень. Обсяг дозування був 5 мл.
- 20

Таблиця 9

Групи вакцини - молочні корови

Tmt група	# тварини	Лікування	Доба	Доза (мл)	Шлях введення
T01	7	Фізіологічний розчин	0,21	5.0	ПШ
T02	7	Escherichia coli бактерин, J-5 штам	0,21	5.0	ПШ
T03	7	QCDCR	0,21	5.0	ПШ
T04	7	QCDO	0,21	5.0	ПШ
T05	7	TXO	0,21	5.0	ПШ

У Таблиці 9, QC-QuilA/холестерин, D-DDA, C - Carbopol, R-R1005, X-DEAE-декстран, T- TLR-агоніст (CpG-ODN), та O - олія. Базові розчини були приготовані, як вказано далі; E. coli було додано у концентрації $4-5 \times 10^9$ організмів на дозу, що було визначено прямим рахуванням на світловому мікроскопі. Quil A у воді дорівнював 50 мг/мл, холестерин у етанолі - 17 мг/мл, DDA у етанолі - 17 мг/мл, R1005 у 20 мМ фосфатному буфері - 5 мг/мл, DEAE-декстран у воді - 200 мг/мл, TLR-агоніст у TE буфері - 20 мг/мл. Індивідуальні компоненти були додані з співвідношенням за об'ємом у в порядку літерних символів зліва направо. Наприклад, QCDC означає, що до відповідного обсягу Quil A було спочатку додано холестерин, далі DDA та зрештою Carbopol. Коли препарати містили олію, окремі компоненти були додані змішуванням та далі була зроблена емульсія у суміші мінеральної олії Drakeol® 5 LT з або Span 80 та Tween 80 (TXO, QCDO), або Span 85 та Tween 85.

Проби крові були зібрані у 0, 21 та 49 добу дослідження для серологічного аналізу. Титри антитіл до E. coli J5 у пробах сироватки були визначені за допомогою J5-специфічного, непрямого ELISA аналізу. Ізотипи антитіл IgG були визначені баранячими-анти-бичачими кон'югатами антитіл (Bethyl Labs). Титри були визначені та показані у вигляді їх геометричних середніх значень.

Серологічні результати досліджень наведені у Таблиці 10. Високі титри антитіл головним чином є пов'язані з кращим захистом вакцин. Загальний JS-специфічний титр IgG показаний у Таблиці 10. Деякі з препаратів цього винаходу створюють титри значно вищі, ніж у комерційного продукту, навіть якщо ці препарати мали подібну кількість доданого J5 антигену. Препарати QCDO, TXO та QCDOXO були особливо ефективними у створенні значної імунної відповіді у цієї великої рогатої худоби.

Таблиця 10

Титри IgG антитіл

Tmt група	Лікування	Геометричний середній титр IgG до J5 у добу		
		0	21	48
T01	Фізіологічний розчин	50	60	110
T02	Escherichia coli бактерин	175.2	275	245
T03	QCDCR	106.5	202.7	209
T04	QCDO	55.9	328.3	245
T05	TXO	90.6	328.3	889

Були визначені JS-специфічні IgG1 ізотипи антитіл. Ці результати наведені у Таблиці 10. Знову, QCDO, TXO та QCDOXO препарати були особливо ефективним у створенні значної імунної відповіді у цієї великої рогатої худоби. Ці препарати дали більш вищі титри після навіть

одиночної вакцинації ніж комерційна вакцина, яку зробили двома ін'єкціями. Цей ізотип антитіл є часто пов'язаний з кращим фагоцитозом та захистом тварин через нейтрофіли у молоці. Препарат QCDOXO був особливо ефективним у створенні значної імунної відповіді у цієї великої рогатої худоби.

Приклад 18. Дослідження вакцини вірусу вірусного проносу корів

Це дослідження порівнює безпечність, ефективність та перехресний імунітет двох вакцин вбитих вірусів вірусного проносу корів типу 1 та типу 2 (BVDV-1 та BVDV-2 або BVD-1/2) та

одного BVDV-1 та -2 екстракту вакцини виготовленого з ад'ювантами винаходу з одним негативним (фізіологічний розчин) та двома позитивними контролями (вакцина модифікованих живих BVDV-2, та вакцина вбитих BVDV-1/2, що зараз є доступною) порівняно з інфікуванням невакцинованих телят BVDV-1. Таблиця 11 відображає план досліджень. Ці дослідження також

показали, що ад'юванти винаходу можуть бути використані для розрізнення тварин, вакцинованих композиціями вакцин цього винаходу від тварин, природно незахищених від дії BVDV.

Для досліджень були використані здорові відлучені телята обох статей у віці між 7-15 місяців, що були серонегативні до BVDV-1 та BVDV-2.

Таблиця 11

План досліджень

Група	Вакцина	Ад'ювант	Доза	Діб	# Тварини	Доба інфікування	Шлях введення	Доза
T01	Фізіологічний розчин	Без ад'юванту	2мл, ПШ ліва шия	0 & 21	10	42	IN	5 мл
T02	BVD-2 мLV	Без ад'юванту	2мл, ПШ ліва шия	0	10	42	IN	5 мл
T03	BVD-1/2 неактивн	PreZent-A	2мл, ПШ ліва шия	0 & 21	10	42	IN	5 мл
T04	BVD-1/2 неактивн	QCDC	2мл, ПШ ліва шия	0 & 21	10	42	IN	5 мл
T05	BVD-1/2 неактивн	QCDCR	2мл, ПШ ліва шия	0 & 21	10	42	IN	5 мл
T06	BVD-1/2 неактивн екстракт	QCDC	2мл, ПШ ліва шия	0 & 21	10	42	IN	5 мл

QC-QuilA/холестерин, D-DDA, C - Carbopol®, R-Bay R1005®

У 0 та 21 добу досліджень, тварини (N=10 / група) були вакциновані, як описано у Таблиці 11. Антиген (BVDV) був доданий як 5500 відносних одиниць імуногенності (RU) на дозу, що було визначено ELISA аналізом. Телята у групі T01 були контрольною групою. Вони отримали 0. 9 % стерильний розчин хлориду натрію. Телята у групах T02-T06 отримали експериментальні BVDV 1/2 вакцини з ад'ювантом, як наведено у Таблиці 11. Група T02 отримала тільки одну вакцинацію (0 доба досліджень). Вона отримала вакцину модифікованого живого вірусу (MLV) BVDV-2, що не містить ад'ювант. Група T03 отримала вакцину вбитого вірусу BVDV-1/2, яка містила ад'юванти у вигляді 2. 5 % емульсії олія-у-воді (Амфіген) та Quil A/холестерин (PreZent A®). Група T04 отримала вакцину вбитого вірусу BVDV-1/2 який містить Quil A/холестерин, DDA, та Carbopol. Група T05 отримала вакцину вбитого вірусу BVDV-1/2, яка містила Quil A/холестерин, DDA, Carbopol, та R1005. Група T06 отримала екстракт вакцини вбитого вірусу BVDV-1/2 з високим титром, який містить Quil A, холестерин, DDA, та Carbopol у 0 добу досліджень, та подібний екстракт вакцини з низьким титром у 21 добу. Всі ліки були введені підшкірно у одиничних 2 мл дозах у 0 та 21 добу досліджень, за виключенням групи 2.

QCDC +/- R містив 100 мкг Quil A, 100 мкг холестерину, 50 мкг DDA, та 0. 075 % Carbopol та 1 000 мкг R1005 - все на 2 мл, як описано раніше.

У 42 добу всі тварини були інфіковані інтраназально приблизно 4 мл (приблизно 2 мл у ніздрю) нецитопатичного штаму BVDV-1(LUTaMNY-1; CVB, USDA, Ames, IA) з концентрацією 5. 4 log₁₀ TCID₅₀ на 5 мл.

Спостереження місця ін'єкції записувалися у 0 (перед вакцинацією), 1, 2, 3, 7 та 21 добу досліджень, перше місце ін'єкції (ліва шия). Спостереження для другого місця ін'єкції (також ліва шия) були записані у 21 (перед вакцинацією), 22, 23, 24, 28 та 35 добу досліджень. Всі відчутні на дотик реакції у місці ін'єкції були виміряні (довжина x ширина x висота, см). Ректальні температури були записані у 1 та 0 добу досліджень (перед вакцинацією), 1, 2 та 3 добу досліджень первинної вакцинації. Температури при вторинної вакцинації були записані у 20, 21 (перед вакцинацією), 22, 23 та 24 добу досліджень.

Проби крові були зібрані у кожної наявної тварини з застосуванням туб для розділення сироватки (SST) у 1, 20, 34 та 49 добу досліджень. Проби крові були зібрані з застосуванням EDTA туб з 33 по 35 (перед інфікуванням) та з 36 по 49 добу досліджень. Проби крові були зібрані з застосуванням туб для клітинних препаратів (CPT) у 34 (перед інфікуванням) та з 36 по 49 добу досліджень.

Таблиця 12 показує середній (геометричний спосіб найменших квадратів (GLSM)) нейтралізуючий титр антитіл сироватки до вірусу BVD, отриманий аналізом гемаглютинації у добу досліджень. Результати показують, що ад'юванти винаходу забезпечили збільшення титрів проти обох BVDV-1 та BVDV-2 вірусів. Прийнятним титром для USDA є титр вище 8. Ці результати демонструють титри вище 5 000, які вказують на сильне виробництво антитіл, що здатне зупинити живий вірус, коли він проникає у тварину з можливістю виникнення інфекції та хвороби.

Таблиця 12

Нейтралізуючий титр антитіл сироватки

Група (вакцина, ад'ювант)	BVDV-1				BVDV-2			
	Доба -1 Середня	Доба 21 GLSM	Доба 41 GLSM	Доба 56 GLSM	Доба -1 Середня	Доба 21 GLSM*	Доба 41 GLSM*	Доба 56 GLSM*
Група T01 (фізіологічний розчин)	1.00 (1-1)	1.00 (1-1)	1.00 (1-1)	21.38 (11-54)	1.00 (1-1)	1.01 (1-1)	1.01 (1-1)	371.98 (128-861)
Група T02 (BVDV-2 мл V)	1.00 (1-1)	1.00 (1-1)	2.75 (1-27)	13.27 (1-45)	1.00 (1-1)	2.14 (1-10)	45.21 (1-1024)	454.09 (91-1218)
Група T03 (BVDV-1/2, PreZent-A)	1.00 (1-1)	1.60 (1-6)	35.59 (1-181)	486.49 (91-2048)	1.00 (1-1)	6.40 (1-38)	877.75 (38-3444)	8950.83 (1024-77936)
Група T04 (BVDV-1/2, QCDC)	1.00 (1-1)	1.20 (1-3)	12.66 (5-91)	1772.17 (512-16384)	1.00 (1-1)	8.71 (5-16)	329.56 (54-861)	11611.44 (4096-16384)
Група T05 (BVDV-1/2, QCDCR)	1.00 (1-1)	1.12 (1-3)	18.92 (5-91)	2477.87 (861-6889)	1.00 (1-1)	5.30 (2-13)	692.34 (152-2048)	10517.89 (3444-46341)
Група T06 (BVDV-1/2 екстракт, QCDC)	1.00 (1-1)	1.07 (1-2)	4.60 (1-23)	922.95 (256-4096)	1.00 (1-1)	2.43 (1-7)	239.87 (64-1448)	9956.50 (4096-55109)

Таблиця 13 показує дані по лейкопенії у 43-56 добу досліджень. Дані по лейкопенії у добу досліджень доводять, що вакцина MLV (T02) попереджає ураження специфічним вірусом інфікування. Вимірювання лейкопенії є критерієм USDA для ліцензування продукту MLV. Проте, для інактивованої вірусної лейкопенії нема критерію USDA, тому що дані свідчать про те, що ад'юванти винаходу викликають лейкопенію тільки у до 20 % тварин, у той час як більшість інактивованих вірусних вакцин дають 100 % лейкопенію. Це свідчить, що ад'юванти винаходу здатні приводити до сильної Th1 відповіді з інактивованим антигеном. Це важко зробити, та це рідко зустрічається у інактивованих продуктах.

Таблиця 13

Лейкопенія по добам досліджень

Доба досліджень	T01 Фізіологічний розчин	T02 Модифіковані живі	T03 PreZent A	T04 QCDC	T05 QCDCR	T06 QCDC Екстракт
Доба 43	0	0	0	0	0	0
Доба 44	0	0	0	0	0	0
Доба 45	0	0	0	0	0	0
Доба 46	2	0	0	0	0	0
Доба 47	5	0	1	1	1	3
Доба 48	5	0	1	2	2	3
Доба 49	8	0	1	2	2	6
Доба 50	8	0	1	0	1	3
Доба 51	6	0	0	0	0	0
Доба 52	2	0	0	0	0	0
Доба 53	2	0	0	0	0	0
Доба 54	2	0	0	0	0	0
Доба 55	2	0	0	0	0	0
Доба 56	2	0	0	0	0	0

Таблиця 14 показує титри нейтралізації сироватки у 41 добу (20 діб після другої вакцинації, перед інфікуванням). Модифікований живий вірус здатен тільки до розвитку відповідей антитіл до конкретного вірусу вакцини. Цей можна побачити у групі T02, яка демонструє захист тільки проти BVDV-2. Проте, T03 (PreZent-A), T04 (QCDC), та T05 (QCDCR) інактивовані вакцини разом з ад'ювантами породжують сильну відповідь антитіл на початку імунітету та впродовж всього життя у фазі дослідження тварини до серологічно різноманітної панелі BVDV. Це показує, що ці ад'юванти мають здатність до забезпечення безпечності та ефективності у моделі інфікування для захисту великої рогатої худоби у не тільки для гомологічному, а також гетерологічному інфікуванню.

Таблиця 14

Титри нейтралізації сироватки у добу 41

Перехресний захист групи серологічного титрування. Титр, антитіл Log 2	T01 Фізіологічний розчин	T02 Модифіковані живі	T03 PreZent A	T04 QCDC	T05 QCDCR	T06 QCDC Екстракт
Середнє число BVDVla	<1	0,8	4,0	2,5	2,9	1,9
Середнє число BVDVlb	<1	0,7	3,9	2,4	2,9	1,5
Середнє число BVDV2	<1	4,5	8,8	8,1	8,0	6,5

Присутні тут результати, які показали ад'юванти винаходу, можуть бути використані для розрізнення тварин, вакцинованими композиціями вакцин цього винаходу від тварин, природно підданих дії BVDV. У цьому можна переконатися шляхом визначення профілю відмінностей антитіл між структурними та не структурними генетичними продуктами вірусу. Маркерна активність була виявлена переміщенням гелю з застосуванням радіоімунопреципітатного аналізу (Фіг. 1). Відповідь антитіл до NS2/3 та E2 білків BVDV є дуже чіткою у тварин, вакцинованих MLV вакциною або тварин, природно підданих дії¹ BVDV або вакцині PreZent-A, інактивованою та обробленою ад'ювантами. Проте, ад'юванти винаходу продемонстрували відповідь антитіл тільки до E2 білка та не до NS2/3 білка. Тому тварини, що вакциновані інактивованою вакциною BVDV, що містить ад'юванти даного винаходу можуть бути відрізненими від таких самоприродно інфікованих тварин, або тварин, що вакциновані MLV або PreZent-A. Це може бути розглянуто у якості вакцини-маркеру, що є цінним для викорінення цих типів хвороб у тваринних популяціях.

Приклад 19. *Mycoplasma hyopneumonia* у оточенні свині.

Свиняча мікоплазмова пневмонія (MPS) або ензоотична пневмонія є поширеною, хронічною хворобою, яка характеризується кашлем, затримкою у рості, та втратою апетиту. Етіологічним агентом є *M. hyorheumoniae*; проте, хвороба, що природно трапляється часто є результатом комбінації бактеріальної та мікоплазмової інфекції.

5 MPS викликає значні економічні втрати у всіх галузях свинарства. Обстеження, проведені у різних місцях світу вказують на ураження, типові для MPS, що трапляються у 30 %-80 % від забійній маси свині. Так як мікоплазмові ураження можуть щезнути перш ніж свиня досягне своєї забійній маси, то фактична захворюваність може бути вище. Переважаюча частка інфекції *M. hyorheumoniae* у хронічній свинячій пневмонії може бути у межах 25 % - 93 %. Свині будь-якого віку є сприйнятливими до MPS, але хвороба більшим чином поширена у підростаючих та старих свиней. Сучасні дані вказують на те, що *M. hyorheumoniae* передається повітряно-крапельним шляхом або прямим контактом з виділеннями дихального тракту інфікованої свині. Передача від свиноматки в свиню протягом лактації також є можливою. Колись виявлена, MPS трапляється рік за роком у інфікованих стадах з різним ступенем важкості, у залежності від таких екологічних факторів, як сезон, вентиляція та концентрація свиней.

Метою досліджень було порівняння ефективності вакцини *M. hyorheumoniae*, приготованої з новими ад'ювантами винаходу з ефективністю експериментального серійного комерційно доступного бактерину *M. hyorheumoniae* після внутрішньотрахеального інфікування вірулентним легеневім гомогенатом *M. hyorheumoniae*.

20 Для досліджень було використано 66 клінічно здорових, кросбред свиней віком приблизно 17 діб без історій хвороб, спричинених *M. hyorheumoniae* та PRRSV, або вакцинацій проти вказаних організмів. Перед відправкою до місця досліджень, та протягом 2 діб після прибуття, свиням було введено Naxcel® внутрішньом'язове, у задню ногу, згідно з інструкціями, для запобігання захворювань, пов'язаних зі стресом, таких як *Streptococcus suis*. Тварини були розміщені по групах та приміщенням випадковим відбором. План досліджень показаний у Таблиці 15.

Таблиця 15

План досліджень

Група лікування	Лікування	Но. тварин	Вакцинація	Шлях введення	Інфікування
T01	Негативний Контроль 63464-70	12	Доба 0 Доба 14	Внутрішньом'язове	<i>M. hyo</i> легеневій гомогенат
T02	DDA/Carbopol/R1005 (DCR)	12	Доба 0 Доба 14	Внутрішньом'язове	<i>M. hyo</i> легеневій гомогенат
T03	QAC/DDA/Carbopol (QCDC)	12	Доба 0 Доба 14	Внутрішньом'язове	<i>M. hyo</i> легеневій гомогенат
T04	QAC/DDA/Carbopol/R1005 (QCDCR)	12	Доба 0 Доба 14	Внутрішньом'язове	<i>M. hyo</i> легеневій гомогенат
T05	<i>M. hyo</i> Бактерин	12	Доба 0 Доба 14	Внутрішньом'язове	<i>M. hyo</i> легеневій гомогенат
NTX	Жодна	6	N/A	N/A	N/A

QAC-QuilA/холестерин,

30 Антигени та дослідницькі ветеринарні продукти (IVP) наведені у Таблиці 16. Вакцини для груп лікування T02, T03, та T04 (всі, за виключенням T05) були приготовані відповідно до Прикладу 13 з застосуванням концентрації компонентів, яка вказана у Таблиці 16 нижче. Компоненти були додано у порядку, зазначеному у таблиці.

Добавку фізіологічного розчину було додано до камери та була розпочата гомогенізація, яка тривала впродовж приготування.

Інактивовану *M. hyorheumoniae* була приготована зі змішаного обсягу 75 літрів ферментату на 800 літрів кінцевого зробленого продукту та була додана до концентрації 0. 09375 мл на дозу. Quil A був доданий до концентрації, що вказана у Таблиці 16. Далі був доданий розчин холестерин/етанол. Розчин DDA/етанол був доданий слідом за додаванням гліколіпідного розчину Bay R1005. Далі був доданий Carbopol та розчин був приведений до кінцевого обсягу добавкою фізіологічного розчину.

Вакциною для групи лікування T05 (препарат вакцини на основі амфігену) був комерційно доступний продукт RespiSure® (Pfizer, Inc).

Таблиця 16

Дослідницькі ветеринарні продукти (IVP)

IVP	Група лікування	Доза антигену	Ад'ювант на дозу	# доз	Обсяг / дозу
Негативний Контроль Фізіологічний розчин	T01	N/A	N/A	24	2 мл
DDA/Carbopol/R1005	T02	M. hyo	Mhyo+DDA/R1005/Carbopol (50/1000мкг/дозу/0. 075 мас/об%)	24	2 мл
QAC/ DDA/ Carbopol	T03	M. hyo	Mhyo+ QuilA/холестерин/DDA/Carbopol (100/100/50 мкг/дозу/0. 075 об%)	24	2 мл
QAC/DDA/ Carbopol/R1005	T04	M. hyo	Mhyo+QuilA/холестерин/DDA/Carbopol /R1005 ад'ювант розчинник (100/100/50 мкг/дозу/0. 075 об%/1000мкг/дозу)	24	2 мл
M. hyo бактерин	T05	M. hyo	5 % Амфіген	24	2 мл

Тварини у групі лікування NTX не були вакцинованими або інфікованими. У віці приблизно 3 тижнів (Доба 0 - права шия) та 5 тижнів (Доба 14 - ліва шия), тварини у групах T01, T02, T03, T04 та T05 були вакцинованими внутрішньом'язове, 2 мл на дозу, кваліфікованим персоналом, що не мав інформації про групу лікування.

Тварини у групах T01 - T05 були інфіковані інтратрахеально через 3 тижня після другої вакцинації (у віці приблизно 8 тижнів - на 35 добу досліджень). Тварини були інфіковані 5 мл розведеним 1:50 у середі Friis 10 % замороженим легеневи́м гомогенатом *M. hyo* штамі 1 (LI36).

У -1 або 0 добу (перед першою вакцинацією), 13 або 14 добу (перед другою вакцинацією), 34 або 35 добу (перед інфікуванням) та у 63 добу (перед розтином), зразки крові (приблизно 5-10 мл у тубах для відділення сироватки) були зібрані у всіх свиней для серології *M. hyorheumoniae* (ELISA-IDEXX). Всі тварини були зважені при прибутті з метою розподілення, у 34 або 35 добу (перед інфікуванням), та у 62 або 63 добу (перед розтином).

У 63 добу, всі тварини, що вцілили були піддані евтаназії відповідно до сайт-специфічних процедур. Легені оцінювали головним чином по характерним ураженням, обумовленим інфекцією *M. hyorheumoniae* та були взяті для оцінки уражень, пов'язаних з інфікуванням *M. hyorheumoniae*. Оцінки уражень легенів були записані у вигляді відсотків ураження легенів для кожної частини легені. Відсоткова доля затвердінь для кожної частини (ліва краніальна, ліва середня, ліва каудальна, права краніальна, права середня, права каудальна, та додаткові) були полічені як фактичний обсяг між 0-100 %.

Відсоток для кожної частини легені був використаний у ваговій формулі для вирахування загальних відсотків ураження легенів. Шість (6) NTX тварин були розтіані у 34 або 35 добу перед інфікуванням, та ураження їх легенів були полічені.

Відсотки від загального ураження легенів були обчислені з застосуванням наступної формули: Відсоток від загального ураження легенів = $100 \times \{ (0.10 \times \text{ліва краніальна}) + (0.10 \times \text{ліва середня}) + (0.25 \times \text{ліва каудальна}) + (0.10 \times \text{права краніальна}) + (0.10 \times \text{права середня}) + (0.25 \times \text{права каудальна}) + (0.10 \times \text{додаткові}) \}$. Квадратний корінь перетворення арксинуса був застосований до відсотків від загального числа легенів з ураженнями перед аналізом. Трансформовані легеневи́ ураження були піддані аналізу з лінійною змішаною моделлю. Лінійні комбінації параметрів оцінки були використані в апріорних контрастах після перевірки дії лікування. Зворотно трансформовані значення способом найменших квадратів середні відсотки

$zP \leq 0,10$ загальної кількості легенів з ураженнями, стандартні похибки, та їх 90 % довірчі інтервали, а також мінімуми і максимуми було обчислено.

Як свідчать результати у Таблиці 17 нижче, ад'юванти винаходу діяли так само, як і ад'юванти у обробленій ад'ювантами з олією групі лікування T05, що містила ад'ювант Amphigen®. Типовий рахунок ураження легенів приблизно 3 вважається наданим ефективністю вакцинного лікування. Всі комбінації ад'ювантів винаходу відповідають цьому критерію та QCDCR був найкращим по підрахункам та серед індивідуальних тварин.

Таблиця 17

Відсоток легенів з ураженнями

	Сигнал: Позитивний (S/P) Серологічне співвідношення Доба 34	LSM	Діапазон
T01 - Плацебо	0.00	8.4	0-25.55
T02-DRC	0.28	2.4	0-20.13
T03-QCDC	0.15	2.1	0-23.18
T04 QCDCR	0.23	0.5	0-2.7
T05-RespiSure	0.46	0.6	0-2.33

N=12 на групу, за виключенням T05 де N=11

10 Приклад 20. Кошачий вірус пташиного грипу (FAIV)

Ці дослідження оцінюють ефективність вакцини грипу з застосуванням ад'ювантів винаходу у кішок шляхом інфікування вірулентним штамом вірусу пташиного грипу.

15 Перед вакцинацією, тварини, що, як визначено, були негативні як до вірусу грипу, так і до антитіл до вірусу грипу на основі відповідно до ротоглоткових мазків та аналізу проб сироватки крові, відібраних перед вакцинацією.

Експериментальні вакцини були зроблені з застосуванням інактивованого патогенного вірусу пташиного грипу та очищеного гемаглютиніну (HA). Кожна група лікування спочатку містила шість тварин (Таблиця 18). Дві групи лікування отримали експериментальні FAIV вакцини (вакцинним антигеном T01 був очищений H5 HA білок; та вакцинним антигеном T02 був інактивованій H5N2 штам), одна група лікування отримала вакцину інактивованого модифікованого вірусного штаму H5N1 (T03), одна контрольна група плацебо отримала тільки ад'ювант (T04) та одна група негативного контролю отримала тільки фізіологічний розчин (T05). Всі вакцинації були введені підшкірною ін'єкцією у 0 та 21 доби досліджень. Обсяг дозування був 1 мл. Після вакцинації тварини постійно спостерігалися, доки вони не одужали та були здатні сидіти у вертикальному положенні, що гарантувало відсутність шкідливих проявів. Спостереження впродовж приблизно однієї години після вакцинації були записані та будь-які інші ускладнення, що спостерігалися після вакцинації були також записані.

30 Ад'ювантна композиція була раніше описана вище на прикладі QCDC з застосуванням Quil A (20 мкг), холестерину, (20 мкг), DDA (10 мкг) та Carbopol (0.05 %) на дозу. Антигеном був інактивованій цілий вірус, або очищений H5 HA білок.

Тварини були оцінені на предмет реакції у місці ін'єкції та серологічну відповідь на вакцину. Три тварини (дві у T02 групі - інактивованій H5N2, та один у T05 групі - фізіологічний розчин) були піддані евтаназії через природжену гіпероксалурію перед інфікуванням. На 49 добу досліджень, всі кішки, що вціліли були інфіковані внутрішньотрахеально штамом H5N1 A/Vietnam/1194/04 для оцінки ефективності вакцин-кандидатів. Тварини були інфіковані 5.0 мл препарату, який містив 10^5 TCID₅₀, який був випущений трохи вище розгалуження за допомогою невеликого катетера, який був введений в трахею з використанням трахеоскопу. Тварини спостерігалися та проби відбиралися протягом п'яти діб після інфікування. У 54 добу досліджень, всі тварини, що вціліли, були піддані евтаназії та проведено розтин кожної з них.

40

Таблиця 18

Вакциновані групи

Група лікування	Вакцина	Доза	Шлях введення	Доба досліджень	Тварини
T01	Вакцина очищеного рекомбінантного білка гемаглютинину (НА) (25, 600 НА одиниць/дозу)	1.0 мл	Підшкірне	0 та 21	6
T02	Вакцина інактивованого модифікованого вірусу H5N2 (25, 600 НА одиниць/дозу)	1.0 мл	Підшкірне	0 та 21	6
T03	Вакцина інактивованого модифікованого вірусу H5N1 (25, 600 НА одиниць/дозу)	1.0 мл	Підшкірне	0 та 21	6
T04	Плацебо - тільки ад'ювант	1.0 мл	Підшкірне	0 та 21	6
T05	Плацебо тільки фізіологічний розчин	1.0 мл	Підшкірне	0 та 21	6

Проби крові були зібрані у 14 добу досліджень перед вакцинацією, та у 0, 21 та 49 добу досліджень для серологічної перевірки. У 49 та 54 добу досліджень, проби крові були зібрано для вірологічної перевірки. У 42 добу досліджень, непланова проба крові була відібрана у вцілілих тварин для перевірки функції нирок у сироватці перед інфікуванням.

Ротоглоткові мазки були зібрані у всіх тварин у 14 та 49 добу досліджень перед інфікуванням та з 50 до 54 доби досліджень. Ректальні мазки були зібрано у всіх тварин у 49 добу досліджень перед інфікуванням з 50 до 54 доби досліджень. Відбір мазків був зроблений безпосередньо перед інфікуванням у 49 добу досліджень.

Протягом розтину, всі легеневі частини були асептичне видалені, зважені та грубо оцінені на предмет характерних уражень, властивих FAIV інфекції. Отримані відсотки були використані для визначення ступеню затвердіння легенів. Ліва легеня була зафіксована у 10 % формаліні у нейтральному буфері для гістопатології. Права легеня була відібрана та з неї була взята проба для вірологічної перевірки. На додаток до легенів були відібрано проби нирок та будь-яких тканин з великою патологією, та вони зберігалися у 10 % формаліні у нейтральному буфері для гістопатології.

Вірусні титри у пробах крові, ротоглоткових та ректальних мазках, та пробах легеневої тканини були визначені за допомогою H5N1-специфічної TaqMan PCR. Стисло кажучи, РНК була виділена з застосуванням системи MagnaPure LC з MagnaPure LC Total nucleic acid isolation kit (Roche Diagnostics; Almere, Netherlands), та вірус грипу А був виявлений з застосуванням RT-PCR аналізу у реальному часі. Дані були зображені у вигляді одиниць контрольного розведення (CDU). CDU були визначені за стандартною кривою, яка була зроблена з базового вірусу, що був серійно розбавлений, з кожного розведення була зроблена екстракція нуклеїнової кислоти та TaqMan PCR ампліфікація, так само, як і для тестових проб.

RT-PCR- позитивні ротоглоткові мазки та проби легеневої тканини були також досліджені виділенням вірусу та титрацією у клітинах собачої нирки Madine Darby (MDCK). Результати були відображені як \log_{10} 50 % інфективної дози культури клітин на мл або грам зразка ($\text{ID}_{50}/\text{мл}$ або $\text{ID}_{50}/\text{г}$).

Проби плазми були досліджені вірусною нейтралізацією та інгібіцією гемаглютинації. Для аналізу інгібіції гемаглютинації (HI), суспензія вірусу грипу штаму Vietnam 1194/04 (H5N1, clade 1) або Indonesia 05/2005 (H5N1, clade 2) була інкубована з серійними (2-кратними) розведеннями зразку сироватки, заздалегідь обробленого холерним фільтратом (отриманим з культури *Vibrio cholerae*). Потім до розведень були додані еритроцити та після інкубації максимальне розведення агентів показало повну інгібіцію гемаглютинації, що була визначена як титр HI.

Аналіз вірусної нейтралізації (VN) має у основі титрацію кінцевої точки сироватки. Стисло кажучи, постійна кількість вірусу була змішана з серійним (2-кратним) розведенням зразку сироватки. Нейтралізація вірусу була прочитана з застосуванням клітин MDCK у якості індикаторних та була наочно представлена аглютинацією еритроцитів. VN титри були полічені

прийняттям найвищого розведення сироватки у якій 50 % щепленої культури клітин показали аглютинацію еритроцитів.

Ліву легеню зібрали під час розтину та зафіксували у 10 % формаліні у нейтральному буфері для гістопатології. Після фіксації, тканини були зафіксовані у парафіні, зрізи тканин були
5 приготовані та оброблені гематоксиліном та еозином для гістологічної перевірки. Спостережені опис та ступінь патологічних змін, були записані.

Жодна тварина у п'яти групах лікування не виявила будь-якого болю або опухлості у місці ін'єкції після першої та другої вакцинації. Більш того, у місцях ін'єкції не було зафіксовано ніяких шкірних аномалій. Після вакцинації та перед інфікуванням, не було знайдено істотних
10 відмінностей при 0. 1 рівні значимості у температурах тіла між групами лікування, що було доведено аналізом лінійної змішаної моделі. Одна T01 тварина була у гарячці (2 40 °C) перед першою вакцинацією у 0 добу та після протягом декількох днів. Спорадично температура тіла підвищувалася у окремих тварин до 40 °C або вище, що було записано після вакцинації (0 та 21 доба). Протягом досліджень не спостерігалися прояви порушень здоров'я, пов'язані з
15 вакцинацією. Три тварини (дві у T02-H5N2, та одна у T05-фізіологічний розчин) були піддані евтаназії через природжену гіпероксалурію перед інфікуванням. Деякі тварини з усіх груп лікування отримали ускладнення у вигляді поранень після імплантації реєстратора температури. Збіжні лікування не проводилися від 0 доби до завершення дослідження.

Вакциновані тварини T01, T02 та T03 показали менше клінічних ознак та відсутність смертності після інфікування порівняно до контрольних T04 та T05 тварин. У T01, одна тварина проявляла депресію та підвищені дихальні зусилля за дві доби після інфікування. Жодна з залишившихся п'яти T01 тварин не показала будь-яких проявів порушень здоров'я після інфікування. У T02 (n=4) та T03 (n=6), всі тварини залишилися здоровими після інфікування. У T04 (n=6) перші ненормальні клінічні ознаки (депресія та підвищені дихальні зусилля) були
25 знайдені у двох тварин за дві доби після інфікування. За три доби після інфікування, всі шість тварин у T04 проявляли депресію та підвищені дихальні зусилля. Внаслідок цього, дві тварини були піддані евтаназії по причинах гуманності. За чотири доби після інфікування (Доба 53), одна тварина була знайдена мертвою та три T04 тварини, що залишилися проявляли депресію, підвищені дихальні зусилля, виступ третього віку та виділення з носу, та були піддані евтаназії
30 по причинах гуманності. У T05 (n=5), перші ненормальні клінічні ознаки у вигляді депресії та підвищених дихальних зусиль спостережені у однієї тварини за одну добу після інфікування. За дві доби після інфікування, більше двох тварин почали проявляти подібні ознаки. За три доби після інфікування, одна тварина був знайдена мертвою та чотири тварини, що залишилися, проявляли депресію, підвищені дихальні зусилля та виступ третього віку. Одна тварина була
35 потім піддана евтаназії по причинах гуманності. За чотири доби після інфікування, погіршилися дихальні зусилля у однієї з трьох тварин, що залишилися, та у інших тварини на додаток почалися виділення з носу. Всі три тварини, що залишилися, були піддані евтаназії по причинах гуманності за чотири доби після інфікування (доба 53).

Після інфікування, середні температури тіла залишалися нижче 40. 0 °C у вакцинованих тварин (T01, T02, та T03). Середні температури у контрольних тварин (T04 та T05) зросли до > 40. 0 °C, починаючи з однієї доби після інфікування. Відмінностей у середніх температурах тіла між групами лікування були істотними (p=0. 0001), що показав лінійний змішаний модельний аналіз. Дані окремих тварин показали, що у меншій частині тварин T01, T02 та T03, температура тіла зросла до 40. 0 °C та вище у спорадичні моменти часу у 53 добу. У групі T0,
45 дві тварини були у гарячці (між 40. 0 та 40. 1 °C) у один момент часу. У групі T02, дві тварини були у гарячці (між 40. 0 та 40. 3 °C) у один та у три моменти часу, відповідно. У T03, одна тварина була у гарячці (між 40. 0 та 40. 3 °C) у три моменти часу. У T04 та T05 всі тварини були у гарячці щонайменше дванадцять годин між 50 та 51 добою.

HI титри антитіл до грипу штаму Vietnam 1194/04 (H5N1, clade 1) та Indonesia 05/2005 (H5N1, clade 2) були визначені перед першою та другою вакцинаціями та перед інфікуванням. Нижня межа визначення була 5. Перед вакцинацією, титри у всіх 5 груп лікування були нижче нижньої межі 5. Після вакцинації всі вакциновані (T01, T02, та T03) тварини набули HI титри антитіл вище 5 та показали щонайменше шестиразове збільшення у титрах порівняно до обсягів перед вакцинацією. У T01 та T03, титри проти Vietnam 1194/04 були у межах 20-160 після першої
55 вакцинації, та 140-960 після другої вакцинації. У T02, титри проти Vietnam 1194/04 були нижчі ніж ті, що були у T01 та T03, у межах 5-30 після першої вакцинації, та 5-70 після другої вакцинації. HI титри антитіл проти Indonesia 05/2005 були подібні до титрів проти Vietnam 1194/04.

Проби плазми, відібрані перед та після інфікування були перевірені H5N1-специфічною RT-PCR у реальному часі для вірусного навантаження. Всі тварини мали віруснегативні проби
60

перед інфікуванням. Після інфікування, не було виявлено вірусу у плазмі T01 та T03 тварин. На відміну від цього, 25 % (1 з 4) T02 тварин, 67 % (4 з 6) T04 тварин та 60 % (3 з 5) T05 тварин були вірусопозитивними у плазмі після інфікування. Відмінності між групами лікування були істотними ($p=0.0247$), що показав лінійний змішаний модельний аналіз.

Розповсюдження вірусу після інфікування оцінювалося дослідженням RT-PCR у реальному часі проб мазків з горла та вірусною титрацією, та RT-PCR у реальному часі проб ректальних мазків. Розповсюдження вірусу у горлі у T01 тварин після інфікування виявлено не було. У T02, всі чотири тварини (100 %) мали поширення вірусу у одній точці після інфікування. У T03, у загальному, дві з шести тварин (33 %) мали поширення вірусу після інфікування. У T04, три з шести тварин (50 %) мали поширення вірусу після інфікування. У T05, чотири з п'яти тварин (80 %) мали поширення вірусу після інфікування. Ніяких проб не було відібрано від груп тварин T04 та T05 за п'ять днів після інфікування, так як всі тварини вже померли на той час. Проте, з метою статистичного аналізу, у тварин, що вмерли або були піддані евтаназії перед останньою добою досліджень, останні результати проб були перенесені на останню добу досліджень.

Проби з горлу з RT-PCR позитивним результатом (≥ 1.8 CDU) були також використані у аналізах титрації вірусу. Вірусною титрацією було підтверджено, що всі RT-PCR позитивні проби містили інфекційний вірус грипу (дані не показані). Інфекційні титри вірусу були нижчими у вакцинованих тварин (T02 та T03), ніж у контрольних тварин (T04 та T05). Ці відмінності були істотні три доби після інфікування, при порівнянні T02 або T03 з T04, та три, чотири та п'ять днів після інфікування при порівнянні T02 або T03 з T05. Титри у T02 та T03 тварин дорівнювали $0.5 \log_{10} \text{TCID}_{50}$.

Титри, що спостерігалися у T04 були у межах з 2.3 до 4.3 $\log_{10} \text{TCID}_{50}$. Титри, що спостерігалися у T05 були у межах з 1.5 до 3.8 $\log_{10} \text{TCID}_{50}$.

Розповсюдження у фекаліях, яке оцінювалося ректальними мазками, було виявлене у всіх груп лікування за виключенням T02 за три або чотири доби після інфікування. Кількості вірусу, виявлені RT-PCR були у межах 2. 2-2. 3 $\log_{10} \text{CDU}$ у T01, 3. 2 $\log_{10} \text{CDU}$ у T03, 2. 0-2. 7 $\log_{10} \text{CDU}$ у T04, та 2. 2 $\log_{10} \text{CDU}$ у T05. Не було істотних відмінностей у 0. 1 рівні значимості між групами лікування у будь-яку добу після інфікування.

Патологія легенів була менш сувора у вакцинованих (T01, T02, та T03), ніж у контрольних тварин (T04 та T05). Всі вакциновані тварини показали помірну, мультифокальну, підгостру бронхоміжтканинну пневмонію. Контрольні тварини показали як середню (дві T04 тварини та одна T05 тварина) або сувору (чотири T04 та чотири T05 тварини), підгостру бронхоміжтканинну пневмонію з мультифокальним поширенням у всіх за виключенням двох контрольних тварин, які (одна T04 та одна T05 тварина) показали дифузне поширення. Цілу легеню оцінювали за ступенем затвердіння, яка була виражена у відсотках від загального числа затвердіння легеневої тканини. У згоді зі знахідками легеневої патології, відсоток затвердіння був суттєво нижчим у вакцинованих тварин (T01, T02, та T03) ніж у контрольних тварин (T04 та T05).

Вірусне навантаження у легеневій тканині, зібраній під час смерті або евтаназії було оцінено вірусною титрацією та H5N1 RT-PCR. Легеневі тканини у вакцинованих тварин (T01, T02 та T03) мали суттєво нижчі середні вірусні титри, ніж подібні у контролів (T04 та T05). Не було істотних відмінностей між середніми титрами у легеневої тканині з вакцинованих тварин (T01, T02 та T03). Аналіз RT-PCR показав ті самі результати.

Після інфікування високопатогенним пташиним грипом штаму H5N1, клінічні ознаки що містять гарячку, смертність, наявність вірусів у крові, розповсюдженість вірусів з горла та у фекаліях, вірусну інфекцію легенів та патологію легенів, в тому числі затвердіння, спостерігалися у контрольних тваринах, які отримали або ад'ювант (T04) або фізіологічний розчин (T05).

Вакцинація з очищеним H5 HA білком (T01) запобігла розповсюдженню вірусів у крові, вірусних виділень з горла, та смертності у шести молодих кішок після інфікування високопатогенним пташиним грипом штаму H5N1. Більш того, вакцинація з очищеним H5 HA білком (T01) понизила клінічні ознаки, в тому числі гарячку, вірусне навантаження у легенях та патологію легенів, в тому числі затвердіння.

Вакцинація з інактивованим H5N2 штамом (T02) запобігла появленню клінічних ознак, розповсюдженості вірусів у фекаліях, та смертності у чотирьох молодих кішок після інфікування з високопатогенним пташиним грипом штаму H5N1. Більш того, вакцинація з інактивованим H5N2 штамом (T02) привела до зниження наявності вірусів у крові, гарячці, вірусних виділень з горла, вірусного навантаження у легенях та патологію легенів, в тому числі затвердіння.

Вакцинація з інактивованим H5N1 штамом (T03) запобігла появленню клінічних ознак, віремії та смертності у шести молодих кішок після інфікування з високопатогенним пташиним грипом штаму H5N1. Більш того, вакцинація з інактивованим H5N1 штамом (T03) привела до зниження

гарячці, вірусних виділень з горла, вірусного навантаження у легенях та патології легенів, в тому числі затвердінь.

Ніякі реакції у місці ін'єкції не спостерігалися з вакцинами, зробленими з або інактивованого або очищеного НА антигену з QC/DC ад'ювантом. Вакцини забезпечили повний захист від клінічної хвороби та смертності у вакцинованих кішок, суттєво знизивши вірусне навантаження у крові та тканинах, та суттєво знизивши розповсюдження вірусу.

Приклад 21. Рак

Це дослідження проводилося на імунodefіцитних та імунoкомпетентних щурах з застосуванням людських та щурячих клітин гепатоклітинної карциноми для створення гетеротопічних та ортотопічних моделей.

Голі (Crl: NIH-rnu) щури чоловічої статі віком 6-8 тижнів були придбані у Charles River (Wilmington MA). Щури були розміщені по парам у полікарбонатні мікро-ізоляторні клітки та забезпечені без обмежень водою зі зворотним осмосом та опроміненою стандартною щурячою їжею; вся вода та підстилки були оброблені у автоклаві. Масу тіла записували двічі на тиждень; тварини утримувалися приблизно 7 тижнів та були піддані евтаназії інгаляцією CO₂ у кінці експерименту.

План досліджень об'єднав дві фази. У фазі I, щури були випадково розподілені до двох груп на основі їх маси тіла. Щури у групі 1 не отримали ін'єкцію пухлин клітин, в той час як щури у групі 2 отримали підшкірно ін'єкцію пухлин клітин. За три тижні після ін'єкції пухлин, щури у групі 2 були випадково поділені (на основі розміру пухлин та take-rate - див. Таблиця 19) до двох груп для Фази II, одна з яких складалася з двох субгруп:

1) контролі, що не мали пухлин, які отримали фізіологічний розчин (контрольна група);

2) контролі, що мали пухлини, та отримали тільки ад'ювант (пухлинна група); та 3) суб'єкти, що мали пухлини (пухлинна оброблена), що отримали дози вакцини (дві підшкірні ін'єкції два тижня по окремі). Всі тварини були розтіяні на 14 діб після другого введення вакцини.

Вакцину було введено підшкірною ін'єкцією 0.2 мл на дозу.

Таблиця 19

Вакциновані групи

Група лікування	Опис	№ тварини	Типи пухлинної клітини (антиген)	Препарат	# вакцинацій	Доза/ шлях
Контроль Без пухлин	Негативний Контроль (фізіологічний розчин)	5	NA	0.63 % PBS плацебо	2	0.2 мл/ПШ
Пухлини (носії)	Носії без антигену	5	QCDC	0.63 % PBS плацебо	2	0.2 мл/ПШ
Пухлини (оброблені)	Гомогенізована на рідка доза носії + HepG2	5	QCDCR та 100 мкг інактивован антиген	0.63 % PBS плацебо	2	0.2 мл/ПШ

QC-QuilA/холестерин, D-DDA, C - Carbopol®, R-Bay R1005®,
PBS - буферований фосфатом фізіологічний розчин.

Вакцини були приготовані з застосуванням Quil-A (20 мкг/дозу), холестерину (20 мкг/дозу), DDA (10 мкг/дозу), Carbopol (0.05 %) з або без гліколіпиду Bay R1005® (1 000 мкг/дозу) та антигену. Композиція була змішана з застосуванням гомогенайзера та додана у такому порядку, як зазначено вище.

HepG2 клітини (клон HB-8065) були отримані у American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). HepG2 - це вічна клітинна лінія, яка є похідною від тканини печінки 15-річного кавказького чоловіка з добре диференційованою гепатоклітинною карциномою. Клітини були підпрошені у стандартних умовах для культури клітин, та підготовлені для ін'єкції з концентрацією 1×10^7 клітин/мл у Matrigel. Кожному щуру було зроблено ін'єкцією 0.5 мл клітинної суспензії, підшкірно у місце другого соску.

Розмір пухлин вимірювався двічі на тиждень протягом досліджень кронциркулем, де обсяг у $\text{см}^3 = \{[(W(\text{mm}) \times W(\text{mm}))/2 \times L(\text{mm})]/1000$. Кров було зібрано ретро-орбітальним способом для хімії сироватки та біомаркерних вимірювань. Тварини були піддані легкій анестезії з CO_2/O_2 протягом відбору крові. Хімічні критичні точки були досліджені з застосуванням Hitachi 917

5

автоаналізатора (Roche, Indianapolis, IN). Термінальна кров була відібрана під CO_2 - анестезією серцевим проколом. Критичні точки сироватки були оцінені з застосуванням комерційних ELISA аналізів: альфа-фето-протеїн (R & D Систем, Minneapolis, MN) та людський альбумін (Bethyl Laboratories, Montgomery TX). Тварини були піддані евтаназії CO_2 інгаляцією. Пухлини були видалені, зважені та розміщені у формаліні для гістології.

10

Непарний Т-тест Стюдента був використаний для порівняння різних параметрів між обробленими та контрольними групами щурів. Всі обсяги виражені у вигляді середнього \pm SD, та статистична значущість <0.05 була розглядана як статистично істотна.

Вимірювання маси тіла були виправлені відніманням пухлинної маси (в залежності від обсягу даних і припущення, що $1 \text{ см}^3 = 1 \text{ г}$). Дані були аналізовані двома способами: аналізом групи лікування, та тварин, що мали або не мали пухлини. При порівнянні мас тіла у тварин, що мали пухлини, до тварин, що їх не мали, спостерігалася істотна різниця між групами у кінцевий момент часу та не було різниці у відправній точці. Навіть якщо маси тіла суттєво не відрізнялися, при порівнянні по групі лікування, ймовірно, через коротку тривалість дослідження, було помітною тенденція до зниження маси тіла в обох групах тварин, що мали пухлини, відносно до контролів та позитивна тенденція до відновлення у тварин, які отримували вакцину при порівнянні з тваринами, що мали пухлини, та що отримали носій без антигену (Таблиця 20). Крім того, також було розумне співвідношення між відсотком змінення маси тіла протягом тривалості експерименту та обсягом пухлин ($r^2=0.72$) або масою (видаленою) у кінці експерименту ($r^2=0.73$).

15

20

25

Таблиця 20

Змінення маси тіла протягом часу між експериментальними групами.
Затінення вказують на дати, коли було введено вакцину

Доба	Маса тіла (г)		
	Контроль	Пухлини (носій)	Пухлини (оброблені)
0	242.7 \pm 11.4	260.0 \pm 16.3	245.0 \pm 12.1
6	263.9 \pm 13.5	278.1 \pm 17.5	258.6 \pm 14.6
9	270.1 \pm 14.0	280.6 \pm 19.2	260.1 \pm 15.1
13	280.6 \pm 16.2	290.3 \pm 20.2	262.0 \pm 15.1
16	283.8 \pm 15.0	289.0 \pm 18.5	261.1 \pm 15.3
20	292.6 \pm 16.1	284.1 \pm 17.3	259.2 \pm 14.6
23	299.8 \pm 15.6	283.2 \pm 17.0	252.7 \pm 14.2
27	298.7 \pm 14.0	276.1 \pm 15.5	259.4 \pm 14.4
30	307.6 \pm 15.9	274.2 \pm 3.4	260.9 \pm 14.5
34	317.8 \pm 16.2	262.6 \pm 14.6	267.8 \pm 15.1
37	318.1 \pm 16.6	263.1 \pm 15.0	268.4 \pm 14.8
41	323.4 \pm 15.3	264.4 \pm 14.7	274.9 \pm 15.2
44	328.5 \pm 16.6	262.5 \pm 14.6	278.3 \pm 15.1
48	331.2 \pm 17.0	263.0 \pm 14.1	281.6 \pm 15.0
49	330.5 \pm 17.1	262.6 \pm 14.4	281.2 \pm 14.3

Розмір пухлин у контрольних щурів було порівняно з розміром пухлин у щурів, оброблених вакциною протягом чотиритижневого періоду. Хоча статистично значних відмінностей не було знайдено між групами порівняння (у зв'язку з великими коливаннями у розмірах пухлин), була сильна тенденція до зниження загального обсягу пухлини (Таблиця 21), та також понижена середня маса видалених пухлин (Таблиця 22) у щурів, що отримали вакцину.

30

Таблиця 21

Змінення у розмірі пухлин між групою, обробленою носієм (Пухлини (носій)), та групою, обробленою вакциною (Пухлини (оброблені)). Затінення вказують на дати, коли було введено вакцину

Доба	Розмір пухлин (см ³)	
	Пухлини (носій)	Пухлини (оброблені)
6	4.6±2.1	4.7±2.0
9	4.9±2.0	4.8±1.8
13	4.6±1.8	5.0±2.2
16	12.2±2.7	12.3±2.5
20	22.6±3.8	13.4±2.6
23	33.3±4.8	14.1±2.8
27	34.5±4.6	13.8±2.8
30	35.6±4.6	13.5±3.4
34	37.7±8.0	14.1±2.9
37	38.6±10.2	13.7±2.3
41	44.5±12.1	12.5±2.1
44	52.9±13.9	13.0±2.1
48	61.7±15.1	16.9±2.9

Таблиця 22

Різниця у масі пухлин при розтині

	Експериментальна група	
	Пухлини (носій)	Пухлини (оброблені)
Маса пухлин (г)	5.14±6.08	1.24±2.21

Альфа-фето протеїн людини (AFP) був поміряний за допомогою ELISA у різні моменти часу протягом досліджень. Ці дані були використані у поєднанні з даними по масі тіла та розмірам пухлин до випадкового розподілення тварин до групі лікування. Дані цього дослідження та історичні дані вказують на те, що AFP виявляється тільки у тваринах, які мають пухлини. Порівняння поздовжніх даних AFP у контролях з пухлинами та обробленій групі вказують на те, що АФП знизився у піддослідних тваринах після першої ін'єкції вакцини, та був значно нижчим у оброблених щурів відносно до контролів з пухлинами у кінці досліджень; 4. 78±3. 2 нг/мл у щурів, оброблених носієм відносно до 0. 97±2. 5 нг/мл у щурів, оброблених вакциною, відповідно. На додаток, AFP продемонстрував кореляцію як до обсягу пухлин, так і до вилученої пухлинної маси.

Альбумін людини (pAI_B) був поміряний за допомогою ELISA у різні моменти часу протягом досліджень. Дані цього дослідження та історичні дані вказують на те, що hALB виявляється тільки у тваринах, які мають пухлини. Порівняння даних hALB у контрольній з пухлинами та у обробленій групах вказують на те, що hALB був нижче у оброблених щурів відносно до контролів з пухлинами у кінці досліджень (дані не показані). На додаток, hALB, подібно до AFP, продемонстрував кореляцію як до обсягу пухлин, так і до вилученої пухлинної маси (дані не показані).

Основа хімічного складу сироватки була досліджена у різних моментах часу протягом досліджень. Склад охоплював: AST, ALT, холестерин, алкалін фосфатазу, GGT, BUN, глюкозу, креатинін, загальний білірубін, загальний білок, альбумін, глобулін та мінеральні Ca, P, Na, K та Cl. Подібно до маси тіла, дані були аналізовані двома способами: аналізом обробленої групи та тварин, що мали, або не мали пухлини. Критичні точки, де спостерігалися відмінності, це - AST, ALT та холестерин. Згідно з обома порівняннями, не було істотних відмінностей між групами у вихідному моменті часу (дані не показані). При порівнянні хімічних показників у тварин з пухлинами до тварин, що не мали пухлини, була істотна різниця між групами у кінцевий момент часу з підвищенням AST, ALT та холестерину у тварин, що мали пухлини (дані не показані).

Наші дані, зібрані разом, доводять, що вага пухлин була зменшеною у тварини, оброблених вакциною, приготованою проти HerG2 пухлинної клітинної лінії, відносно до контрольної групи, що мала пухлини та отримала носій.

Приклад 22. CpG

Ад'юванти, що описані тут є потенціальною вакцинною ад'ювантною платформою, яка може бути посиленою застосуванням ORN/ODN (CpG) для підвищення імунної відповіді з застосуванням ад'ювантів у якості систем постачання для CpG.

5 У дослідженнях були використані миші C57Bl/6 жіночої статі (n=10 на групу) з масою тіла приблизно 18-20 г. Вони були імунізовані внутрішньом'язово (IM) ін'єкцією у лівий передній великогомілковий м'яз загальним обсягом 50 мкл у 0, 14 та 21добу досліджень.

Доза композиції містила, у різних комбінаціях, один або більше з наступних компонентів:

10 Буфер: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (229. 32 мг/л), NaCl (1168. 00 мг/л) та Na_2HPO_4 (1144. 00 мг/л), розчинений у WFI та стерильно відфільтрований крізь 0. 1 мкм фільтр.

Овальбумін. (OVA-Антиген): 10 мкг

CpG ODN: 10 мкг

Холестерин: 1мкг

Quil A: 1 мкг

15 DDA: 0. 5 мкг

Carbopol: 0. 0375 %

R1005: 50мкг

20 Буфер був розміщений у 50 мл колбу з мішалкою та перемішувався з постійною швидкістю протягом всіх наступних кроків. Компоненти були додано у наступному порядку: Антиген (OVA); CPG ODN; Quil A; холестерин (по краплям); DDA (по краплям); Carbopol®; та Bay R1005®. Композиція була змішана при кімнатній температурі (приблизно 25 °C) мінімум 30 хвилин, у захищеному від світла місті, покрита плівкою. Розчин був пропущений крізь 25G голку у шприц для перешкодження попадання будь-яких великих плаваючих частинок та отримання однорідної (непрозорої) суспензії та перенесений у стерильні скляні колби для зберігання.

25 Було зібрано наступні проби:

Плазма: 4 тижня після первинної вакцинації (1 тиждень після другої підсилювальної вакцинації)

Цитотоксичні Т-лімфоцити (CTL) (6 тижнів після первинної вакцинації (3 тижня після другої підсилювальної вакцинації)

30 Секреція цитокіну у супернатанті (4 тижня після первинної вакцинації

24-годинний супернатант (IL-2, IL-4, IL-10, TNF

72-годинний супернатант (IFN- γ

Тетрамер (4 тижнів після первинної вакцинації

Цитокін, що виробляють Т-клітини (6 тижнів після первинної вакцинації

35 Отримані результати є у вигляді відносної оцінки для кожного ад'юванту, що має ад'ювантні дії. Критичні точки є відносною шкалою, що базується на підсумуванні окремих відповідей цитотоксичних Т -лімфоцитів.

40 Як показано у Таблиці 23, композиція QCDCR+OVA дала більш сильніші CTL-відповіді ніж її субкомпоненти, проте загальні відповіді були низькі (<20 %). Комбінування QCDCR або її субкомпонентів з CPG суттєво поліпшило OVA-специфічні CTL відповіді. Взагалі QCDCR/CPG+OVA дала найвищу CTL відповідь, проте, не було істотній різниці у відповіді між цією групою та холестерин/CPG+OVA (у співвідношенні 25:1). Супернатанти культури з спленоцитів, стимульовані OVA (1 мг/мл) були досліджені на цитокіни на ELISA. Сама QCDCR або її субкомпоненти дали тільки дуже слабкі цитокінові відповіді. Комбінування QCDCR або її субкомпонентів з CPG- посиленою секрецією антиген - специфічних IL-2 та IFN- γ (Th1 - зміщені цитокіни). QCDCR та CpG є рівними по своїй ефективності для збільшення клітинної імунної відповіді. Об'єднання обох показує синергічність. Коли субкомпоненти QCDCR були досліджені з CpG, комбінація з Quil A дала найкращі відповіді слідом за втягненням холестерину з CpG.

Таблиця 23

Відносні CTL відповіді

Групи	CTL	IFN-g	Тетрамер	IL-2	Сума
QCDCR-CpG+OVA	18	16	18	18	70
QCDC-CpG+OVA	15	18	17	16	66
Ch+CpG+CR+OVA	12	14	15	17	58
Ch+CpG+DC+OVA	8	17	13	15	53
Ch+CpG+DCR+OVA	16	9	14	13	52
C+CpG+OVA	9	13	16	11	48
DCR+CpG+OVA	13	13	12	9	47
CR+CpG+OVA	10	10	11	8	39
DC+CpG+OVA	11	11	8	6	36
CpG+OVA	14	8	9	3	34
QCDCR+OVA	7	5	7	14	33
CR+OVA	5	7	4	7	23
QCDC+OVA	3	6	2	10	21
CR+OVA	4	3	5	4	16
DCR+OVA	6	2	6	2	16
DC+OVA	2	4	3	5	14
OVA	1	1	1	1	4

QC-QuilA/холестерин, Ch - холестерин, D-DDA, C - Carbopol®, R-Bay R1005®

Приклад 23. Межі собачого коронавірусу (CCV)

- 5 Для застосування собачого коронавірусу (CCV) та нових комбінацій ад'ювантів з метою оцінки дії ад'ювантів з обраним антигенним компонентом була використана мишача модель.

На кожну групу лікування було 10 мишей CF-1. Взагалі було введено по 0.2 мл підшкірно на тварину у кожній групі лікування.

- 10 Тестові препарати, надані у таблиці 24 були приготовані у вигляді польових доз обсягами 1.0 з концентрацією, що надана нижче. Кожній миші було введено тільки 0.2 мл вакцини.

Таблиця 24

Тестові препарати

Пункт #	Тестові препарати	Концентрація ад'юванту: мкг / 2мл(за виключенням Carbopol)	CCV /дозу
1	PBS	NA	на
2	Антиген	PBS	6,040
3	AbISCO-100	100	6,040
4	AbISCO-200	100	6,040
5	AbISCO-300	100	6,040
6	Quil-A/холестерин	100/100	6,040
7	R1005	1000	6,040
8	R1005/Carbopol	1000/0.075 %	12,079
9	DDA/R1005/Carbopol	50/1000/0.075 %	12,079
10	Quil-A/холестерин/RIOOS	100/100/1000	6,040
11	Quil-A/холестерин/DDA Carbopol	100/100/50/0.075 %	6,040
12	Quil-A/холестерин / R1005/Carbopol	100 / 100 / 1000 / 0.075 %	12,079
13	Quil-A/холестерин/DDA/ R1005/Carbopol	100/100/50/1000/0.075 %	12,079

Приготування вакцини для ад'ювантів винаходу описано у Прикладах 1-13 вище. Концентрації ад'ювантних компонентів надані у Таблиці 24. Ад'юванти були додані у порядку, зазначеному у таблиці.

Добавку фізіологічного розчину було додано до колби та гомогенізація була розпочата. Інактивованій CCV було додано до концентрації, яка показана у Таблиці 24. Quil A був додано у

концентрації, наведеній у Таблиці 24. Холестерин у розчині етанолу був далі доданий з продовженням гомогенізації. Розчин DDA/етанол був далі доданий впродовж гомогенізації. Суміш була мікрофлюїдована при 10 000 фунтів на квадратний дюйм. Carbopol був далі доданий зі змішуванням та рН був відрегульований до 6. 8-7. 2. Далі був доданий Bay R1005® глюколід

5

фізіологічного розчину. Вакцина для груп лікування, отримана з комерційно доступних продуктів AbISCO (Isconova, Sweden) була приготована відповідно до інструкцій на етикетці. Продукти AbISCO зроблені на основі сапонінів quillaja та ISCOM технології з застосуванням високоочищених сапонінів.

10

Сироватка була інактивована нагріванням при 56 С 30-40 хвилин. Серійні розведення кожної сироватки (нерозбавленої, 2, 4, 8...) були проведені у чистих, стерильних планшетах шляхом додавання 120 мкл до 120 мкл розчинника. Були зроблені щонайменше дві копії лунка / розведення. У разі необхідності, спочатку було використано розведення 1:16. Базовий робочий розчин для інфікування був приготований розведенням живого CCV до рівня, що містить приблизно 240 вірусних частин у 120 мкл. Далі, 120 мкл кожного розведення сироватки було поєднано з 120 мкл розчину вірусу для загального обсягу 240 мкл. Розчин був перемішаний та зберігався при кімнатній температурі (приблизно 25°) 30-60 хвилин для нейтралізації. Далі 120 мкл кожної серії було перенесено на непокриті моно шари клітин NLFK клітин, що були посаджені 7-12 діб раніше. CPE оцінювався за 4-6 діб пізніше. Зворотне титрування

15

20

Таблиця 25

Нейтралізація сироватки

Група лікування	Титри нейтралізації сироватки
Фізіологічний розчин	2
тільки антиген	64
AbISCO-100	256
AbISCO-200	23
AbISCO-300	11
Quil-A / холестерин	315
R	512
RC	11
DRC	630
QCR	1024
QCDC	630
QCRC	724
QCDCRC	1448

Поєднані прояви ад'ювантів, приготованих з CCV з урахуванням хімічних властивостей кожного компонента забезпечують чудові властивості для ад'юванту вакцини.

25

Серологічні результати досліджень наведені у Таблиці 25. Дуже високі титри антитіл, що нейтралізують сироватку зазвичай пов'язані з кращим захистом, який надається вакциною. Деякі з ад'ювантних препаратів винаходу виробили більш високі титри, ніж комерційні, підсилені ад'ювантами продукти, навіть коли ці препарати мали подібні кількості доданого антигену CCV. Препарати QCDC, QCR, DRC, QCRC, та QCDCRC були особливо ефективними у викликанні значної імунної відповіді у мишей.

30

Приклад 24. Рамки дії антигену ротавірусу корів.

Для застосування ротавірусу корів та нових комбінацій ад'ювантів винаходу з метою оцінки дії ад'ювантів з обраним антигенним компонентом була використана мишача модель.

На кожну групу лікування було 10 мишей CF-1. Взагалі було введено по 0. 2 мл підшкірно на тварину у кожній групі лікування.

35

Тестові препарати, надані у Таблиці 26 були приготовані у вигляді польових доз обсягами 2. 0 з концентрацією, що надана нижче. Кожній миші було введено тільки 2. 0 мл вакцини.

Таблиця 26

Тестові препарати

Пункт #	Тестові препарати	Концентрація ад'юванту: мкг / 2мл(за виключенням Carbopol)	РотавірусB223 /дозу
1	Фосфатний буфер	PBS	NA
2	Антиген	PBS	6.09 мкг
3	AbISCO-100	100	6.09 мкг
4	AbISCO-200	100	6.09 мкг
5	AbISCO-300	100	6.09 мкг
6	Quil-A / холестерин	100/100	6.09 мкг
7	Quil-A / холестерин/DDA Carbopol	100/100/50/0.075 %	6.09 мкг
8	R1005	1000	6.09 мкг
9	Quil-A / холестерин/K1005	100/100/1000	6.09 мкг
10	Quil-A / холестерин/DDA / R1005/Carbopol	100/100/50/1000 /0.075 %	6.09 мкг
11	Quil-A / холестерин / DDA / Carbopol	100/100/50/0.075 %	12.18 мкг
12	Quil-A/холестерин/Carbopol/RI 005	100/100/0.075 %/1000	12.18 мкг
13	Quil-A / холестерин / DDA / R1005/Carbopol	100 / 100 / 50 / 1000 / 0.075 %	12.18 мкг
14	DDA/R1005/Carbopol	50/1000/0.075 %	12.18 мкг
15	R1005/Carbopol	1000/0.075 %	12.18 мкг

Приготування вакцини для ад'ювантів винаходу описано у Прикладах 1-13 вище. Концентрації ад'ювантних компонентів надані у Таблиці 26. Ад'юванти були додані у порядку, зазначеному у таблиці.

Добавку фізіологічного розчину було додано до колби та гомогенізація була розпочата. Інактивовані ротавірус корів був доданий до концентрації, що наведена у Таблиці 26. Quil A був додано у концентрації, що наведена у Таблиці 26. Холестерин у розчині етанолу був далі доданий з продовженням гомогенізації. DDA/етанол розчин був далі доданий впродовж гомогенізації. Суміш був мікрофлюїдована при 10 000 фунтів на квадратний дюйм. Carbopol® був далі доданий з перемішуванням та pH був відрегульований до 6. 8-7. 2. Далі був доданий Bay R1005® гліколіпід зі змішуванням. Зрештою, композиція була доведена до кінцевого обсягу добавкою фізіологічного розчину.

Вакцина для груп лікування, отримана з комерційно доступних продуктів AbISCO (Isconova, Sweden) була приготована відповідно до інструкцій на етикетці. Продукти AbISCO зроблені на основі сапонінів quillaia та ISCOM технології з застосуванням високоочищених сапонінів.

Таблиця 27

Титри нейтралізації сироватки

Тестові препарати	Титри нейтралізації сироватки (SN)
Фізіологічний розчин	≤3
Тільки антиген	23
AbISCO-100	16
AbISCO-200	16
AbISCO-300	14
Quil-A / холестерин	14
QCDC	16
R	10
QCR	16
QCDCR	16
QCDC	3
QCCR	5

Тестові препарати	Титри нейтралізації сироватки (SN)
QCDCR	39
DRC	20
RC	3

QC-QuilA/холестерин, D-DDA, C - Carbopol®, R-Bay R1005®

Поєднані прояви ад'ювантів, приготованих з ротавірусом корів з урахуванням хімічних властивостей кожного компонента забезпечують чудові властивості для ад'юванту вакцини (див. Таблиця 27).

- 5 У той час як деякі з ад'ювантних препаратів забезпечили подібні рівні титрів антитіл, що нейтралізують сироватку, QCDCR ад'ювант надав найвищий рівень.

Приклад 25. Межі вірусу собачого грипу

План досліджень

- 10 Для застосування вірусу собачого грипу (CIV) та нових комбінацій ад'ювантів з метою оцінки дії ад'ювантів з обраним антигенним компонентом була використана собача модель.

- Ці дослідження проводилися за схемою рандомізованих повних блоків, (див. Таблиця 28) Тварини були відсортовані по даті народження для утворення 5 блоків. У межах блоку тварини були випадково розподілені до лікування. Тварини у однаковому блоці були випадково розподілені до клітин, розміщених поруч. Тварини були у доброму стані здоров'я без випадків гіперчутливості до комерційно доступних вакцин. Тварини не отримали вакцини проти CIV.

Таблиця 28

План досліджень

Trmt Група	# тварини	Лікування	Доба	Доза	Шлях введення
T01	8-10	Ад'ювант плацебо (негативний контроль)	0	1 мл	SQ
T02	8-10	досліджений препарат [позитивний контроль]	0	1 мл	SQ
T03	18-10	QCDC висока доза	0	1 мл	SQ
T04	8-10	QCDC середня доза	0	1 мл	SQ
T05	8-10	QCDC низька доза	0	1 мл	SQ

QC-QuilA/холестерин, D-DDA, C - Carbopol®

Таблиця 29

Композиція вакцини

T01	Ад'ювант плацебо, негативний контроль
Препарат	Quil A - холестерин - DDA-carbopol (20/20/10/. 075)
T02	
Загальне найменування	CIV серійний, позитивний контроль
Препарат	Iowa-05 штам грипу (H3N8) @ 760 HA, поєднаний з 5 % Rehydragel LV
T03	
Загальне найменування	CIV + висока доза QCDC
Препарат	Iowa-05 штам грипу (H3N8) @ 760 HA, поєднаний з Quil A - I холестерин - DDA-carbopol (20/20/10/. 075)
T04	
Загальне найменування	CIV + середня доза QCDC
Препарат	Iowa-05 штам грипу (H3N8) @ 760 HA, поєднаний з Quil A -холестерин - DDA-carbopol (10/10/10/. 075)
T05	
Загальне найменування	CIV + низький доз QCDC
Препарат	Iowa-05 штам грипу (H3N8) @ 760 HA, поєднаний з Quil A - холестерин - DDA-carbopol (5/5/10/. 075)

Приготування вакцини для ад'ювантів винаходу описано у Прикладах 1-13 вище. Концентрації ад'ювантних компонентів надані у Таблиці 29. Ад'юванти були додані у порядку, зазначеному у таблиці.

Добавку фізіологічного розчину було додано до колби та гомогенізація була розпочата. Інактивовані вірус собачого грипу був доданий до концентрації, що наведена у Таблиці 29. Quil A був додано у концентрації, наведеній у Таблиці 29. Холестерин у розчині етанолу був далі доданий з продовженням гомогенізації. Далі був доданий розчин DDA/етанол впродовж гомогенізації. Суміш був мікрофлюїдована при 10 000 фунтів на квадратний дюйм. Carbopol був далі доданий з подальшим перемішуванням та pH був відрегульований до 6. 8-7. 2. Зрештою, композиція була доведена до кінцевого обсягу добавкою фізіологічного розчину.

Серологічні дані оцінювалися з застосуванням аналізу інгібіції гемаглютинації (HAI) стандартним методом аналізу на USDA.

У Таблиці 30 викладені серологічні результати у 42 та 180 добу HAI Geo. середніх титрів.

Таблиця 30

HAI Титри

Лікування	HAI Geo. Середній Доба 42	HAI Geo. Середній Доба 180
T01(плацебо)	8	8
T02 (pos ctl., алюміній)	172	32
T03 (низька доза)	65	41
T04 (середня доза)	65	32
T05 (висока доз)	216	69

Поєднані прояви ад'ювантів, приготованих з вірусом грипу з урахуванням хімічних властивостей кожного компонента забезпечують чудові властивості для ад'юванту вакцини.

Підвищені титри антитіл головним чином пов'язані з кращим захистом вакцини. Головним чином, як алюміній, як ад'ювант (T02) так і ад'юванти винаходу (T03, T04, та T05) спричиняють підвищення у титрах HAI, але відповідь, спричинена ад'ювантами винаходу, була найкращою з найвищими титрами у 180 добу у групі з високою дозою(T05). Титри для низької та середньої

дози ад'юванту винаходу були еквівалентні до подібних у традиційній вакцині проти грипу, що містить алюміній. На додаток, оскільки ад'юванти винаходу забезпечують Т-хелперну 1 імунну відповідь, в той час як алюміній не може цього зробити, тривалість імунітету, як очікується, буде довше за механізмом швидкого відтворення.

5

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Dominowski, Paul J.
Mannan, Ramasamy M.
Krebs, Richard L.
Thompson, James R.
Childers, Tedd A.
Olsen, Mary K.
Yancey, Jr., Robert J.
Weeratna, Reini
Zhang, Shucheng
Bagi, Cedo M.

<120> НОВІ АД'ЮВАНТНІ КОМПОЗИЦІЇ

<130> PC33245A

<150> US 61/076, 232

<151> 2008-06-27

<150> US 61/214, 557

<151> 2009-04-24

<160> 8

<170> PatentIn version 3. 5

<210> 1

<211> 20

<212> ДНК

<213> жодна

<400> 1

ggtggtgcta agcgtgttat 20

<210> 2

<211> 20

<212> ДНК

<213> ЖОДНА

<400> 2

acctctgtca tctctccaca 20

<210> 3

<211> 22

<212> ДНК

<213> ЖОДНА

<400> 3

agctgacggt ggacctatta tt 22

<210> 4

<211> 17

<212> ДНК

<213> ЖОДНА

<400> 4

ggcttgcgc tggattc 17

<210> 5

<211> 18

<212> ДНК

<213> ЖОДНА

<400> 5

tggcatcaa gggctaca 18

<210> 6
<211> 18
<212> ДНК
<213> ЖОДНА

<400> 6
tcgggttggt tggatgatg 18

<210> 7
<211> 24
<212> ДНК
<213> ЖОДНА

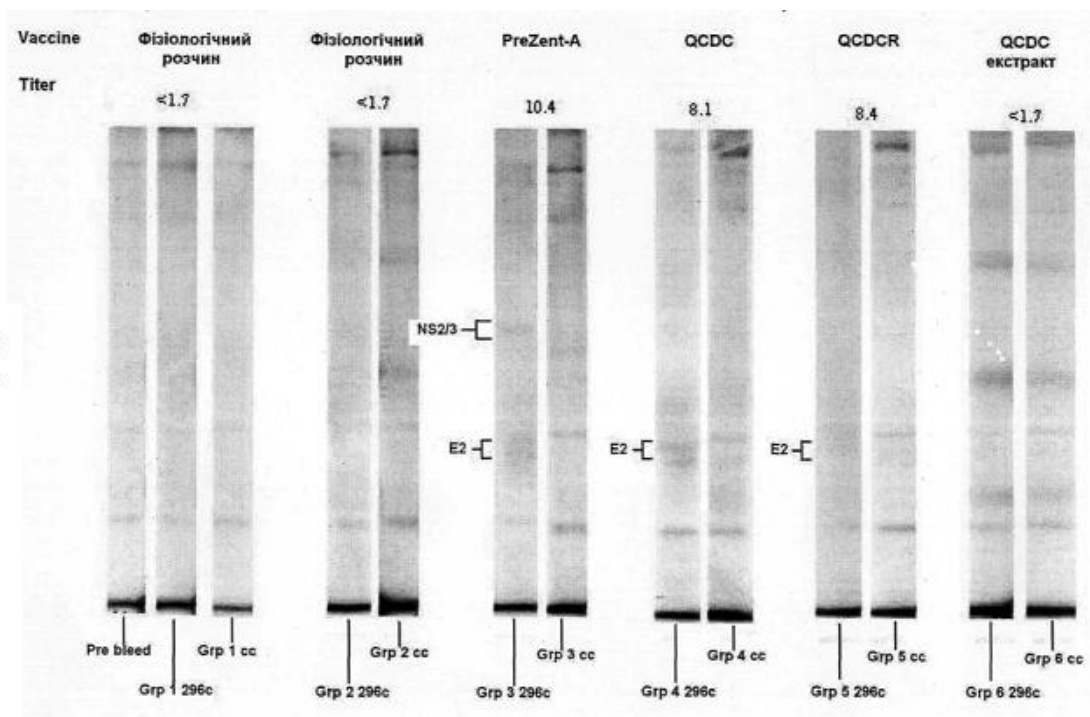
<400> 7
tctgtcttc tgtctgagt gatg 24

<210> 8
<211> 24
<212> ДНК
<213> ЖОДНА

<400> 8
agtgtttgc ttctgtctt ggta 24

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Вакцинна композиція, що включає ад'ювантну композицію та терапевтично ефективну кількість антигенного компонента, де ад'ювантна композиція містить сапонін, стерол, сполуку четвертинного амонію та поліакрилову кислоту та де антигенний компонент включає котячий вірус лейкемії або котячий вірус пташиного грипу.
- 10 2. Вакцинна композиція за п. 1, де сапонін є присутнім у кількості від приблизно 1 мкг до приблизно 5000 мкг на дозу, стерол є присутнім у кількості від приблизно 1 мкг до приблизно 5000 мкг на дозу, сполука четвертинного амонію є присутньою у кількості від приблизно 1 мкг до приблизно 5000 мкг на дозу та поліакрилова кислота є присутньою у кількості від приблизно 0,0001 об. % до приблизно 75 об. %.
- 15 3. Вакцинна композиція за п. 1, де сапонін являє собою Quil A або його очищену фракцію, стерол є холестерином, а сполука четвертинного амонію є DDA.
4. Вакцинна композиція за п. 1, яка додатково містить гліколіпід.
5. Вакцинна композиція за п. 4, де гліколіпід є N-(2-дезоксид-2-L-лейциламіно-β-D-глюкопіранозил)-N-октадецилдодеканамід ацетат.
6. Вакцинна композиція за п. 4, де гліколіпід є присутнім у кількості від приблизно 0,01 мг до
- 20 приблизно 10 мг на дозу.
7. Вакцинна композиція за п. 1, яка додатково містить олію.
8. Вакцинна композиція за п. 1, де антигенний компонент включає котячий вірус лейкемії.
9. Застосування вакцинної композиції за п. 8 для запобігання інфекції, спричиненої котячим вірусом лейкемії, у кішок.
- 25 10. Вакцинна композиція за п. 1, де антигенний компонент включає котячий вірус пташиного грипу.
11. Застосування вакцинної композиції за п. 10 для запобігання інфекції, спричиненої котячим вірусом пташиного грипу, у кішок.



Фіг. 1

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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