



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101385** (13) **C2**
(51) МПК
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2011 01661**
(22) Дата подання заявки: **19.08.2009**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.03.2013**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **2008904261, 61/092,091**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **19.08.2008, 27.08.2008**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **AU, US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **26.04.2011, Бюл.№ 8**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.03.2013, Бюл.№ 6**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2009/054285, 19.08.2009**
(72) Винахідник(и):
**Легрбач Філіп Ральф (AU),
Чешір Вілліам Джон (AU),
Сінь Цзісянь (AU)**
(73) Власник(и):
**ВАЙЕТ ЛЛК,
Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America (US)**
(74) Представник:
Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 98/17310 A, 30.04.1998
EP 0 295 749 A, 21.12.1988
DAY ET AL: "A kinetic study of histopathological changes in the subcutis of cats injected with non-adjuvanted and adjuvanted multi-component vaccines" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 25, no. 20, 24 April 2007 (2007-04-24), pages 4073-4084
HILGERS L A T ET AL: "Sulfolipo-cyclodextrin in squalene-in-water as a novel and safe vaccine adjuvant" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 17, no. 3, 1 February 1999 (1999-02-01), pages 219-228,
ROMERA S A ET AL: "Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalene-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 1, 15 August 2000 (2000-08-15), pages 132-141
DE LA FE ET AL: "Field trial of a combined vaccine against caprine contagious agalactia: Humoral immune response in lactating goats" VETERINARY JOURNAL, BAILLIERE TINDALL, LONDON, GB, vol. 174, no. 3, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 610-615
MOSCHOS S A ET AL: "Modulating the adjuvanticity of alum by co-administration of muramyl di-peptide (MDP) or Quil-A" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 24, no. 8, 20 February 2006 (2006-02-20), pages 1081-1086

(54) ІМУНОЛОГІЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО ЯК АД'ЮВАНТИ МІСТИТЬ СУЛЬФОЛІПО-ЦИКЛОДЕКСТРИН (SL-CD) ТА САПОНІН**(57) Реферат:**

Заявлений винахід стосується імунологічних композицій, що містять сульфоліпо-циклодекстрин (SL-CD) та сапонін, який є Quil A, та необов'язково принаймні один антиген. Винахід стосується способів та імунологічних композицій, що містять принаймні один антиген, який може бути ветеринарним антигеном. Ветеринарний антиген у способах та імунологічних композиціях винаходу може бути антигеном корів. Винахід стосується способів та імунологічних композицій, що містять рабдовірус корів (BEFV), вірус герпесу 1 корів (IBR) або вірус африканської катаральної лихоманки (BTV). Винахід стосується способу виявлення імунної відповіді проти

UA 101385 C2

BEFV, IBR або BTV у тварині, що полягає у введенні тварині композиції винаходу. У винаході, зокрема, імунна відповідь є захисною імунною відповіддю. Винахід стосується способу приготування імунологічної композиції, що полягає у додаванні Quil A до вірусу.

Ця заявка претендує на корисність заявки 35 U.S.C. § 119(a) попередньої австралійської заявки № 2008904261 від 19,08 2008 та попередньої заявки 35 U.S.C. § 119(e) США № 61/092091, від 27,08, 2008. Повний зміст їх включено тут як посилання.

Заявлений винахід стосується імунологічних композицій, що містять сульфоліпо-циклодекстрин (SL-CD), та сапонін або Quil A, та необов'язково щонайменш один антиген. Винахід також стосується способів приготування імунологічних композицій, що містять SL-CD, сапонін або Quil A, та антиген. Заявлений винахід також стосується способу застосування імуногенних композицій для виявлення імунної відповіді до рабдовірусу корів (BEFV), до вірусу герпесу 1 корів (IBR), або до вірусу африканської катаральної лихоманки (BTV). Заявлений винахід пропонує набори, що містять імунологічну композицію винаходу.

Сапонінові ад'юванти є відомим класом ад'ювантів, які комерційно застосовують у вакцинах для тварин. Сапоніни є класом вторинних метаболітів, знайдених у різних видах рослин. Вони є амфіпатичними глікозидами, феноменологічно згрупованими по милоподібному вспінюванню, яке вони створюють при перемішуванні у водних розчинах. Структурно, сапоніни складаються з одної або декількох гідрофільних глікозидних частин, комбінованих з ліпофільною тритерпеновою похідною. Комерційні сапоніни переважно виділяють з кори південноамериканського дерева *Quillaja Saponaria Molina* та рослини *Mohave Yucca*, рослини, що також має назву *Yucca schidigera*. Сапоніни є в наявності у декількох джерелах, наприклад, у *Berghausen Corporation* (Cincinnati, OH). Очищена форма сапоніну зазвичай має назву Quil A та наявна у продажу у декількох джерелах, в тому числі у *Berghausen Corporation*, *Sergeant Chemical Company* (Clifton, NJ), *Superfos a/s* (Vedbaek, Denmark), та *Brenntag Biosector* (Frederikssund, Denmark). Фізичні та хімічні характеристики Quil-A викладені у торгівельній літературі, що є в наявності від Superfos, під назвою "Очищений сапоніновий ад'ювант Quil-A. Quil-A хімічно характеризується вуглеводною частиною у глікозидному зв'язку тритерпенової квілаєвої кислоти.

Кілька патентів США стосуються обговорення Quil A у якості ад'юванту. Наприклад, U.S. Patent №№ 6,416,764 та 6,291,228 стосуються вакцин, де застосовано Quil A у якості ад'юванту та які містять нецитопатогенний штам вірусу діареї корів. U.S. patent No, 4,432,969 стосується аероалергенної композиції, що містить аероалерген та сапонін, або ад'ювант Quil A.

U.S. Patent № 4,900,549 описує процес приготування імуногенних комплексів, що містять Quil A.

U.S. Patent № 6,165,995 стосується приготування похідних SL-CD. U.S. Patent № 6,610,310 присвячений полііономим полімерам, таким як SL-CD, у якості ад'ювантів.

Ефемерна лихоманка великої рогатої худоби (BEF) є виснажливою вірусною хворобою, що уражує молочну та м'ясну худобу, особливо в північній Австралії. BEF також визнаний у більшості країн Азії, де розводять велику рогату худобу. BEF відомий як "трюхденна хвороба" може головним чином впливати на вихід коров'ячого молока та спричинює смертність молочної та м'ясної худоби (Walker, P.J., 2005, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 292: 57-80).

Агентом-збудником BEF є рабдовірус корів (BEFV). Цей вірус є рабдовірусом, що відносять до роду *Ephemerovirus*. Віріон BEFV має кулеподібну або конічну форму та містить негативний одонитчастий РНК - геном. Геном BEFV кодує нуклеопротеїн, білок, асоційований з полімеразою, білок матриксу, велику РНК-залежну РНК-полімеразу, та два глікобілка.

Модифікована жива вакцина BEF, яка вже багато років є у наявності в Австралії, додається у якості щорічного бустера перед сезоном BEF. Ця вакцина вимагає ветеринарного рецепту та є у наявності в сублімованому вигляді, що потребує відновлення з розчинником, який містить ад'ювант перед введенням. Тварини, що не отримували імуносупресивного лікування, потребують дві дози вакцини після щорічної ревакцинації.

PCT Publication No. WO/1994004685 стосується приготування вакцини BEFV, що містить поверхневий глікопротеїн BEFV.

Vanselow et al. (1995, Vet. Microbiol. 46:117-130) описує тестування різних вакцин BEF.

Hsieh et al. (2006, J. Vet. Med. Sci. 68: 543-548) має відношення до вакцини BEFV, де застосовано вірусні штами Tn88128 та Tn73. Ці вакцини були приготовані інактивацією вірусу шляхом додавання бінарного етиліміну та гідроксиду алюмінію або води: ад'ювантів олія:вода.

Рекомбінантна вакцина, що містить структурний глікопротеїн BEFV, клонований у вірусний вектор нодулярного дерматозу (тип SA-Neethling) описана у Wallace, D.B. та Viljoen G.J. (2005, Vaccine 23:3061-3067).

Chuang et al. (2007, J. Virol. Meth. 145:84-87) описують застосування інтерференції РНК та подавлення експресії гену поверхневого глікопротеїну BEFV.

Герпесвірус 1 корів є також відомий, як вірус інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. Він позначається, як BHV або IBR. Герпесвірус 1 корів є вірусом родини *Herpesviridae*,

що спричинює хвороби у великої рогатої худоби, які охоплюють ринотрахеїти, вагініти, баланопостити, викидень, кон'юнктивіти, та ентерити. BHV-1 є також впливовим фактором у транспортній лихоманці. Він розповсюджується шляхом статевого контакту, штучного запліднення, повітряно-крапельним шляхом. Подібно іншим герпесвірусам, BHV-1 спричинює довготривалу латентну інфекцію та розповсюдження вірусу. У наявності є вакцина, яка знижує суворість та ступінь хвороби. Респіраторна хвороба, спричинена BHV-1 є звичайно відома як інфекційний ринотрахеїт корів.

Вірус африканської катаральної лихоманки (BTV) є прототипом вірусу роду Orbivirus, що належить до родини Reoviridae з двохланцюговою РНК. BTV спричинює серйозні хвороби худоби, як-то овець, кіз, оленів та великої рогатої худоби. Як повідомлено у літературі, 24 серотипа спричинюють проблеми, починаючи від неявної інфекції до гострої швидкоплинної інфекції. Також є наявним хронічне, стійке розповсюдження вірусу великої рогатої худоби. У тваринництві існують вакцини, придатні для лікування африканської катаральної лихоманки.

Заявлений винахід стосується імунологічних композицій, що містять сульфоліпо-циклодекстрин (SL-CD), сапонін, та необов'язково щонайменш один антиген. У деяких втіленнях винаходу, сапоніном є Quil A. У деяких втіленнях винаходу, щонайменш один антиген є вибраним з бактерій, вірусів, пептидів, поліпептидів, нуклеїнових кислот, їх комбінацій. У деяких втіленнях винаходу, щонайменш один антиген є ветеринарним антигеном. У деяких втіленнях винаходу, ветеринарний антиген є антигеном корів. У деяких втіленнях винаходу, антиген є вірусним антигеном. У деяких втіленнях винаходу, вірусний антиген є вірусом герпесу 1 корів (IBR), вірусом африканської катаральної лихоманки (BTV), або рабдовірусом корів (BEFV). Вірусний антиген може бути живим, послабленим, рекомбінантним, вбитим, або інактивованим. У деяких втіленнях, винахід стосується імуногенної композиції, де антиген є живим послабленим вірусом. У деяких втіленнях винаходу, вірус є рабдовірусом корів (BEFV). У різних втіленнях винаходу, вірус є у замороженому стані, у підсушеному стані, у ліофілізованому або свіжому стані. У різних втіленнях сапонін є присутнім у імунологічній композиції винаходу у кінцевій концентрації приблизно 0,5 мг/мл. У різних втіленнях, Quil A є присутнім у імунологічній композиції винаходу у кінцевій концентрації приблизно від 0,1 мг/мл до 0,2 мг/мл. У деяких втіленнях, у імунологічній композиції винаходу, Quil A є присутнім у кінцевій концентрації приблизно 0,158 мг/мл. У різних втіленнях, у імунологічній композиції винаходу SL-CD є присутнім у кінцевій концентрації приблизно 0,2 мг/мл. У деяких втіленнях, імунологічні композиції винаходу, що містять сапонін та SL-CD або містять Quil A та SL-CD, також містять щонайменш один додатковий ад'ювант. У різних втіленнях винаходу, додатковий ад'ювант є вибраним з гідроксиду алюмінію, SP-олії, або карбополу. У деяких втіленнях винаходу, антиген є поліпептидом, який у деяких втіленнях є вірусною субодиницею. У деяких втіленнях винаходу, вірусна субодиниця є вибраною від BEFV, IBR, або BTV.

У одному втіленні, заявлений винахід стосується способу виявлення імунної відповіді проти ветеринарного антигену у тварині, що полягає у введенні тварині імуногенної композиції, що містить сапонін, SL-CD, та щонайменш один ветеринарний антиген. У одному втіленні, імунна відповідь є викликаною після введення одиничної дози імуногенної композиції. У одному втіленні, заявлений винахід стосується способу виявлення імунної відповіді проти IBR у тварині, що полягає у введенні тварині імуногенної композиції, що містить сапонін, SL-CD, та принаймні IBR у якості антигену. У одному втіленні, заявлений винахід стосується способу виявлення імунної відповіді проти BTV у тварині, що полягає у введенні тварині імуногенної композиції, що містить сапонін, SL-CD, та принаймні BTV у якості антигену.

У одному втіленні, заявлений винахід стосується способу виявлення імунної відповіді проти BEFV у тварині, що полягає у введенні тварині імуногенної композиції, що містить Quil A, SL-CD, та антиген. У одному втіленні, імунна відповідь є викликаною після введення одиничної дози імуногенної композиції. У одному втіленні, заявлений винахід стосується способу виявлення імунної відповіді проти IBR у тварині, що полягає у введенні тварині імуногенної композиції, що містить сапонін, SL-CD, та антиген. У одному втіленні, заявлений винахід стосується способу виявлення імунної відповіді проти BTV у тварині, що полягає у введенні тварині імуногенної композиції, що містить сапонін, SL-CD, та антиген. У деяких втіленнях винаходу, імунна відповідь викликана після введення імуногенної композиції винаходу є захисною імунною відповіддю.

У одному втіленні, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, приготованої об'єднанням Quil A та вірусу перед додаванням SL-CD. Вірус може бути послабленим живим, рекомбінантним, вбитим, або інактивованим. У деяких втіленнях винаходу, Quil A та вірус є змішаними при кімнатній температурі. У деяких втіленнях винаходу, Quil A та вірус є змішаними

протягом принаймні 15 хвилин. У деяких втіленнях винаходу, Quil A та вірус є змішаними протягом принаймні 120 хвилин.

У одному втіленні, заявлений винахід стосується набору, що містить імуногенну композицію винаходу для виявлення імунної відповіді у тварині.

5 У різних втіленнях, заявлений винахід стосується способу викликання імунної відповіді у великій рогатій худобі проти вірусної інфекції або ефемерної лихоманки великої рогатої худоби, спричиненої BEFV. Спосіб викликання імунної відповіді проти BEFV полягає у введенні великій рогатій худобі композиції, що містить BEFV, SL-CD, та Quil A.

10 У одному втіленні, заявлений винахід стосується імуногенної композиції або вакцини, що містить імунологічно ефективну кількість BEFV, SL-CD, та Quil A.

У різних втіленнях, заявлений винахід стосується способу викликання у великій рогатій худобі імунної відповіді проти інфекції вірусу герпеса або ринотрахеїту корів, спричиненої IBR. Спосіб викликання імунної відповіді проти IBR полягає у введенні великій рогатій худобі композиції, що містить IBR, SL-CD, та сапонін.

15 У різних втіленнях, заявлений винахід стосується способу викликання у великій рогатій худобі імунної відповіді проти вірусної інфекції або африканської катаральної лихоманки корів, спричиненої BTV. Спосіб викликання імунної відповіді проти BTV полягає у введенні великій рогатій худобі композиції, що містить BTV, SL-CD, та сапонін.

20 У одному втіленні, заявлений винахід надає імуногенну композицію або вакцина містить імунологічно ефективну кількість IBR, SL-CD, та сапоніну.

У одному втіленні, заявлений винахід забезпечує імуногенну композицію або вакцину, що містить імунологічно ефективну кількість BTV, SL-CD, та сапоніну.

25 Заявлений винахід базується, частково, на відкритті того, що імунологічна композиція, яка містить L-CD, та сапонін або Quil A, може підсилювати імуногенність щонайменш одного антигену. У різних втіленнях винаходу, щонайменш один антиген може бути обраним від бактерій, вірусів, пептидів, поліпептидів, нуклеїнових кислот або їх комбінацій.

У деяких втіленнях винаходу, щонайменш один антиген є ветеринарним антигеном. У різних втіленнях винаходу, ветеринарний антиген може бути антигеном корів.

30 У одному втіленні винаходу, ветеринарний антиген може бути вірусним антигеном. У деяких втіленнях винаходу, вірусний антиген містить, але без обмеження штам BEFV, IBR, або BTV. BEFV є рабдовірусом, що, як відомо, спричинює ефемерну лихоманку великої рогатої худоби у Австралії, Африці, Близькому Сході та Азії. Багато штамів BEFV є відомими, як-то, BB2271-919 та його батьківський штам (919), TN73, Tn88128, штамми 1-11 BEFV2001, або штамми 1-3 BEFV2004. Вибір штаму може змінюватись у залежності від країни, де застосовуються імуногенні композиції винаходу. Герпесвірус 1 корів, також позначений як BHV або IBR, є вірусом родини Herpesviridae, що спричинює хвороби у великій рогатій худобі, в тому числі ринотрахеїти, вагініти, баланопостити, викидень, кон'юнктивіти, та ентерити. BHV-1 є також впливовим фактором у транспортній лихоманці. Він розповсюджується шляхом статевого контакту, штучного запліднення, повітряно-крапельним шляхом. Подібно іншим герпесвірусам, 40 BHV-1 спричинює довготривалу латентну інфекцію та розповсюдження вірусу. У наявності є вакцина, яка знижує суворість та ступінь хвороби. Респіраторна хвороба, спричинена BHV-1 є звичайно відома як інфекційний ринотрахеїт корів.

45 Вірус африканської катаральної лихоманки (BTV) є прототипом вірусу роду Orbivirus, що належить до родини Reoviridae з двохланцюговою РНК. BTV спричинює серйозні хвороби худоби, як-то овець, кіз, оленів та великої рогатої худоби. Як повідомлено у літературі, 24 серотипа спричинюють проблеми, починаючи від неявної інфекції до гострої швидкоплинної інфекції. Також є наявним хронічне, стійке розповсюдження вірусу великої рогатої худоби. Африканська катаральна лихоманка спостерігається у Австралії, Північній Америці, Африці, Близькому Сході, Азії та Європі.

50 У різних втіленнях винаходу, вірус у імуногенній композиції може бути послабленим, живим, рекомбінантним, вбитим, або інактивованим. Спосіб приготування послабленого живого вірусу є добре відомим у літературі. Наприклад, вірус може бути послаблений шляхом його проходження крізь клітини стороннього хазяїна, як-то крізь культури тканин, ембріональні яйця або живі тварини. Послаблений BEFV може бути відібраний для прискореного зростання у некоров'ячих клітинах, та, в процесі відбору, стає менш здатним до росту у клітинах корів. 55 Оскільки ці послаблені штамми погано реплікуються у коров'ячому хазяїні, при переносі у велику рогату худобу вони спричинюють імунність, а не хворобу. Вірус, як вказано, є послабленим, якщо він має понижену вірулентність для нативного хазяїна та збільшує свою вірулентність для нового хазяїна. Деякі послаблені вірусні штамми можуть траплятися природним шляхом. Для 60 послаблення вірусів у визначеному напрямку може бути застосована генетична інженерія.

Способи приготування вбитих або інактивованих вірусів для застосування у імуногенних композиціях, вакцинах, та інших способах є відомими у цій галузі. У процесі хімічної інактивації, відповідний зразок вірусу, або зразок сироватки, що містить вірус, обробляється протягом є відповідного періоду часу з відповідною кількістю або концентрацією агента інактивації з
 5 відповідною високою (або низькою, в залежності від агент інактивації) температурою або рН для інактивації вірусу. Наприклад, вірус може бути оброблений агентами інактивації, як-то формаліном, бінарним етиленіміном (BEI), або гідрофобними розчинниками, кислоти, та ін. Вірус може бути інактивованим ультрафіолетовим випромінюванням або рентгенівськими променями, нагріванням, та ін. Інактивацію нагріванням проводять при температурі та протягом
 10 часу, достатнього для інактивації вірусу. Інактивацію випромінюванням проводять з застосуванням світла відповідної довжини або іншого джерела енергії протягом часу, достатнього для інактивації вірусу. У деяких втіленнях винаходу, імуногенна композиція містить живий послаблений вірус.

У деяких втіленнях винаходу, імуногенна композиція містить антиген, отриманий з замороженого стану, сухого стану, або є у свіжому стані. Якщо антиген є отриманим з сухого стану, він може бути отриманий з ліофілізованого стану. У деяких втіленнях, імуногенні композиції винаходу містять антиген з замороженого стану.

Сапоніни є стероїдними або тритерпеновими глікозидами, широко поширеними у царствах рослин та морських тварин. Сапоніни відрізняються формуванням колоїдних розчинів у воді, що
 20 піняться при струшуванні, та осаджуванням холестерину. Коли сапоніни знаходяться близько від клітинних мембран, вони створюють у мембранах структури, подібні порам, які спричинюють розрив мембрани. Сапоніни застосовують у якості ад'ювантів у вакцинах для тварин. Ад'ювантна та гемолітична активність окремих сапонінів широко вивчалася (Lacaille-Dubois and Wagner, 1996, A review of the biological and pharmacological activities of saponins" Phytomedicine vol 2 pp 363-386). Сапоніни є класом вторинних метаболітів, знайдених у різних видах рослин. Вони є амфіпатичними глікозидами, феноменологічно згрупованими по милоподібному
 25 вспінюванню, яке вони створюють при перемішуванні у водних розчинах. Структурно, сапоніни складаються з одного або декількох гідрофільних глікозидних частин, комбінованих з ліпофільною тритерпеновою похідною.

Комерційні сапоніни переважно видобувають з *Quillaja saponaria* Molina та *Yucca schidigera*. "Quil A" відноситься до очищеної форми сапоніну.

Сапонін може бути присутнім у імуногенних композиціях винаходу у кінцевій концентрації приблизно 0,4 мг/мл - 0,6 мг/мл. Сапонін може бути присутнім у імуногенних композиціях винаходу у кінцевій концентрації приблизно 0,5 мг/мл. Quil A може бути присутнім у імуногенних
 35 композиціях винаходу у кінцевій концентрації приблизно 0,1-0,2 мг/мл. Quil A може бути присутнім у імуногенних композиціях винаходу у кінцевій концентрації приблизно 0,12 мг/мл - 0,18 мг/мл. Quil A може бути присутнім у імуногенних композиціях винаходу у кінцевій концентрації приблизно 0,14 мг/мл - 0,16 мг/мл. Quil A може бути присутнім у імуногенних композиціях винаходу у кінцевій концентрації приблизно 0,158 мг/мл. У одному втіленні, Quil A є присутнім у імуногенних композиціях винаходу у кінцевій концентрації приблизно 0,158 мг/мл.

Сульфо-ліпо-циклодекстрин у емульсії сквалану у воді (SL-CD/сквалан) був застосований у приготуванні різних вакцин. SL-CD/сквалан може бути приготований, як описано у Hilgers et al. (Sulfolipo-cyclodextrin in squalane in-water as a novel and safe vaccine adjuvant. Vaccine 17 (1999), pp. 219-228; Fort Dodge Animal Health Holland, Weesp, The Netherlands).

SL-CD може бути присутнім у імуногенній композиції винаходу у кінцевій концентрації приблизно 0,09 мл/мл - приблизно 0,3мл/мл. SL-CD може бути присутнім у імуногенній композиції винаходу у кінцевій концентрації приблизно 0,1 мл/мл, близько 0,15 мл/мл, близько 0,17мл/мл, близько 0,2 мл/мл, або близько 0,25 мл/мл. Імуногенні композиції винаходу можуть, крім того, містити щонайменш один ад'ювант на додаток до Quil A та SL-CD. Подібний
 50 додатковий ад'ювант може бути обраним від будь-якого одного з відомих у цій галузі ад'ювантів, як тут більш докладно обговорюється.

У деяких втіленнях, винахід стосується способу виявлення імунної відповіді, що полягає у введенні тварині імунологічної композиції, що містить сапонін та SL-CD. У деяких втіленнях, спосіб полягає у введенні тварині імунологічної композиції, що містить сапонін, SL-CD, та
 55 щонайменш один антиген. У деяких втіленнях, щонайменш один антиген є ветеринарним антигеном. У деяких втіленнях винаходу, ветеринарний антиген є антигеном корів. У деяких втіленнях винаходу, ветеринарний антиген є вірусним антигеном. У деяких втіленнях, вірусний антиген є BEHV, IBR або BTV. У деяких втіленнях, вірус є послабленим живим, рекомбінантним, вбитим, або інактивованим. У деяких втіленнях, вірус є вбитим. У деяких втіленнях, антиген є
 60 отриманий з замороженого стану, сухого стану, або є у свіжому стані. Якщо антиген є

отриманим з сухого стану, він може бути отриманий з ліофілізованого стану. У деяких втіленнях, імуногенні композиції винаходу містять антиген з замороженого стану.

У деяких втіленнях, винахід стосується способу виявлення імунної відповіді, що полягає у введенні тварині імунологічної композиції, що містить Quil A та SL-CD. У деяких втіленнях, спосіб полягає у введенні тварині імунологічної композиції, що містить Quil A, SL-CD, та щонайменш один антиген. У деяких втіленнях, щонайменш один антиген, що є застосованим у способі, є ветеринарним антигеном. У деяких втіленнях, ветеринарний антиген, застосований у способі, є антигеном корів. У деяких втіленнях, антиген є вірусним антигеном. У деяких втіленнях, вірусний антиген є IBR, BEFV, або IBR. У деяких втіленнях, вірусний антиген є послабленим живим, рекомбінантним, вбитим, або інактивованим. У деяких втіленнях, вірус є послабленим живим. У деяких втіленнях, антиген є отриманий з замороженого стану, сухого стану, або є у свіжому стані. Якщо антиген є отриманим з сухого стану, він може бути отриманий з ліофілізованого стану. У деяких втіленнях, імуногенні композиції винаходу містять антиген з замороженого стану.

Імуногенні композиції винаходу можуть викликати імунну відповідь після введення декількох доз. У деяких втіленнях, імуногенні композиції винаходу можуть викликати імунну відповідь після введення двох доз. У деяких втіленнях, імуногенні композиції винаходу викликають імунну відповідь після введення одиничної дози. Імунна відповідь, що викликана імуногенними композиціями винаходу може бути захисною імунною відповіддю. Після введення початкової дози імуногенної композиції винаходу, бустерна доза може бути введена після періоду близько чотирьох тижнів для підсилення імуногенної відповіді. Також можуть бути введені додаткові бустерні дози.

У одному втіленні, винахід надає набір для виявлення імунної відповіді у тварині. У деяких втіленнях, набір містить імуногенну композицію, що містить сапонін та SL-CD, та, необов'язково, щонайменш один антиген. У деяких втіленнях, сапонін у наборі є Quil A. У деяких втіленнях, щонайменш один антиген у наборі є ветеринарним антигеном. У деяких втіленнях, ветеринарний антиген у наборі є антигеном корів. У деяких втіленнях, ветеринарний антиген у наборі є вірусним антигеном. У деяких втіленнях, вірусний антиген у наборі є BEFV, IBR, або BTV. У деяких втіленнях, антиген у наборі може бути послабленим живим, рекомбінантним, вбитим, або інактивованим. У деяких втіленнях, антиген у наборі є послабленим живим. У деяких втіленнях, антиген у наборі є вбитим. У деяких втіленнях, антиген у наборі може бути отриманим з замороженого стану, сухого стану, або є у свіжому стані. У деяких втіленнях, антиген у наборі є отриманий з замороженого стану.

Винахід надає набори, імунологічні композиції, та вакцини, що містять SL-CD та сапонін та/або Quil A, які можуть містити щонайменш один додатковий ад'ювант. Серед ад'ювантів, які можуть бути застосованими, можуть бути згадані у якості приклада гідроксид алюмінію, авридин, бромід диметилдіоктадециламмонію (також відомий як DDAB або DODAB), поліфосфазени, емульсії типу олива-у-воді, що базуються на мінеральній оливі, як-то SPT емульсія (див., наприклад Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, edited by Michael F. Powel and Mark J. Newman, Plenum Press, New York and London, pages 147-204), емульсії типу олія-у-воді, що базуються на олії, що перетворюється в ході обміну речовин, як описано у U.S. Patent No. 6,368,601, так само як і емульсії, що описані у U.S. Patent No. 5,422,109. Інші приклади прийнятних ад'ювантів охоплюють сквалан та сквален (або інші олії тваринного походження); блок-кополімери, як-то pluronic® (L121) сапонін; детергенти, як-то Tween®-80, мінеральні оливи, як-то DRAKEOL®, або Marcol®; рослинні олії, як-то арахісова олія; похідні від corynebacterium ад'юванти, як-то corynebacterium parvum; propionibacterium-похідні ад'юванти; Mycobacterium bovis (Bacillus Calmette та Guerinn, або BCG); інтерлейкіни як-то інтерлейкін 2 та інтерлейкін -12; монокіни як-то інтерлейкін 1; фактор некрозу пухлин; інтерферони як-то гамма - інтерферон; ліпосоми; іском - ад'ювант; екстракт клітинної стінки мікобактерій; синтетичні глікопептиди як-то мурамілові дипептиди або інші похідні; Авридин; ліпід А; декстрин сульфат; DEAE-декстран або DEAE-декстран з фосфатом алюмінію; карбоксиполіметилен, як-то Carborol®; EMA; акрилові кополімерні емульсії, як-то Neocryl® A640 (див. U.S. Patent No. 5,047,238); вакцинні або тваринні білки поксвірусу; субвірусні частинкові ад'юванти як-то орбівірус; холерний токсин; бромід диметидіоктедециламонію; або їх суміші. Інші ад'юванти можуть бути вибраним з сурфактантів (напр., гексадециламін, октадециламін, лізолецитин, бромід диметилдіоктадециламонію, N, N-діоктадецил-n'-N-біс(2-гідроксіетилпропандіамін), метоксигексадецилгліцерин, та плурононі поліолі); поліаніони (напр., піран, декстран сульфат, полі IC, поліакрилова кислота, карбопол), пептиди (напр., мураміл дипептид, диметилгліцин, туфтсин), олійні емульсії, галун, та їх суміші. Також є можливим обирати комбінації ад'ювантів.

У одному втіленні, винахід стосується імуногенної композиції, що приготована об'єднанням Quil A та антигену перед додаванням додаткового антигену, як-то SL-CD. Фахівцям буде зрозуміло, що комбінування вірусу з Quil A буде понижувати ефективний титр вірусу (Walker, P.J., 2005, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 292: 57-80). Об'єднання Quil A та антигену перед додаванням щонайменш ще одного іншого інгредієнту до імуногенної композиції може бути проведено у будь-який проміжок часу. Фахівцям буде зрозуміло, що імуногенні композиції винаходу можуть бути приготовані об'єднанням Quil A та антигену, перед додаванням щонайменш ще одного іншого інгредієнту до імуногенної композиції у різні проміжки часу. Наприклад, Quil A та антиген можуть бути об'єднаними від принаймні 5 хвилин до принаймні 200 хвилин. У деяких втіленнях, Quil A та антиген є об'єднаними протягом будь-якого проміжку часу, в тому числі від принаймні 10 хвилин до принаймні 190 хвилин. У деяких втіленнях, Quil A та антиген є об'єднаними протягом принаймні 15 хвилин. Фахівцям зрозуміло, що імуногенні композиції винаходу можуть бути приготовані об'єднанням Quil A та антигену при будь-якій одній з багатьох температур. Комбінації Quil A та антигену можуть бути приготовані при температурі нижче або вище ніж кімнатна температура доки отримана композиція є імуногенною. Quil A та антиген можуть бути об'єднаними при кімнатній температурі. У деяких втіленнях, антиген у імуногенній композиції, що приготована об'єднанням Quil A та антигену перед додаванням SL-CD є вірусом. У деяких втіленнях, вірус є BEFV. У деяких втіленнях, вірус може бути послабленим живим, рекомбінантним, вбитим, або інактивованим. У деяких втіленнях, антиген є послабленим живим. У деяких втіленнях, антиген може бути отриманий з замороженого стану, сухого стану, або бути у свіжому стані. У деяких втіленнях, антиген є отриманим з замороженого стану.

У одному втіленні, заявлений винахід надає імуногенну композицію для виявлення імунної відповіді, імуногенна композиція містить сапонін та SL-CD. У деяких втіленнях винаходу, імуногенна композиція для виявлення імунної відповіді містить сапонін та SL-CD; та принаймні один антиген. У деяких втіленнях винаходу, сапонін у імуногенній композиції для виявлення імунної відповіді є Quil A. У деяких втіленнях винаходу щонайменш один антиген у імуногенній композиції для виявлення імунної відповіді може бути вибраним з бактерій, вірусів, пептидів, поліпептидів, нуклеїнових кислот або їх комбінацій. У деяких втіленнях, у імуногенній композиції винаходу, щонайменш один антиген є ветеринарним антигеном. У деяких втіленнях, у імуногенній композиції винаходу, ветеринарний антиген є антигеном корів. У деяких втіленнях, у імуногенній композиції винаходу, антиген є вірусним антигеном. У деяких втіленнях винаходу вірусний антиген є принаймні штамом BEFV, BTV, або IBR. У деяких втіленнях, сапонін або Quil A є доданим до вірусного антигену перед додаванням SL-CD. У деяких втіленнях антиген може бути послабленим живим, рекомбінантним, вбитим, або інактивованим. У деяких втіленнях, антиген є послабленим живим. У деяких втіленнях, антиген є вбитим. У деяких втіленнях, антиген може бути отриманим з замороженого стану, сухого стану, або бути у свіжому стані. У деяких втіленнях, антиген є отриманим з замороженого стану.

Імунологічні композиції винаходу можуть бути приготовані з вірусних культур стандартним способом. Наприклад, вірус може бути поширеним у клітинній культурі тканин, наприклад, у клітинах епітелію нирки африканської зеленої мавпи (клітин Vero), диплоїдних фібробластах людини, MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney), або інших клітинах корів. Ріст вірусу контролюють стандартними способами (спостереженням цитопатичної дії, імуофлуоресценцією або іншими способами, що полягають у застосуванні антитіл), та вірус збирають при досягненні достатньо високого вірусного титру (як-то 10^6 TCID₅₀/мл). Вірусні вихідні розчини можуть бути додатково концентровані або ліофілізовані традиційним способом перед включенням у препарат вакцини. Також можуть бути застосовані інші способи приготування вірусних вихідних розчинів, як описано у Thomas, et al. (1986, Agri-Practice, 7 (5):26-30).

Імунологічні композиції винаходу можуть бути застосовані поодиночі, або в якості компоненту полівалентної імунологічної композиції, тобто, у комбінації з іншими імунологічними композиціями. Вірус у імуногенному препараті може бути живим або вбитим; як відомо, живий або вбитий вірус може бути ліофілізованим та, необов'язково, відтвореним. Імуногенні композиції можуть бути надані у наборах, які також можуть містити відповідне маркування та інструкції для введення імуногенної композиції до тваринного суб'єкту (наприкл., до свійських тварин, худоби, копитних) або птиці (напр., до свійської птиці).

Імуногенні композиції, що містять SL-CD, сапонін або Quil A; та щонайменш один вірусний антиген також можуть містити фармацевтично та ветеринарно прийнятні носії. Подібні носії є добре відомими фахівцям та охоплюють великі макромолекули, які повільно засвоюються, як-то білки, полісахариди, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти, полімерні амінокислоти, амінокислотні кополімери, та частинки інактивного вірусу. Фармацевтично та ветеринарно

прийнятні солі можуть також бути застосовані у вакцині, наприклад, мінеральні солі як-то хлориди, броміди, фосфати, або сульфати, а також солі органічних кислот, як-то ацетати, пропіонати, малонати, або бензоати. Вакцини також можуть містити рідину, як-то вода, фізіологічний розчин, гліцерин, етанол, а також субстанції, як-то агенти змочування, емульгатори, або рН буферні речовини. Ліпосоми також можуть бути застосовані у якості носіїв вбитого вірусу. (Див., наприклад, U.S. Patent No. 5,422,120, PCT publication No. WO 95/13796, PCT publication No. WO 91/14445, або European Patent No. 524,968 B1.)

Імуногенні композиції заявленого винаходу можуть бути введені внутрішньом'язово, підшкірно, інтраназально, внутрішньочеревно, внутрішньовенно, внутрішньошкірно, внутрішньобронхіально, або перорально. Імуногенні композиції винаходу можуть бути введені повітряним шляхом, щепленням у око, або скарифікацією. Іншим прийнятним способом доставки імуногенної композиції винаходу свавцям (наприкл., до свійських тварин, худоби, копитних) є пероральне введення (напр., з їжею або питною водою або приманкою). Це особливо зручно для підгодовування або змішування їжі з імуногенною композицією. Звичайно, великі тварини (наприкл., худоба/копитні. як-то велика рогата худоба) дозуються кількістю приблизно 10^6 TCID₅₀/мл - $10^{6.5}$ to 10^7 TCID₅₀ на дозу імуногенної композиції.

Для однодозового введення, імуногенна композиція повинна містити кількість BEFV відповідно від 10^4 до 10^7 TCID₅₀ /мл, переважно 10^6 TCID₅₀ /мл. Від 1 до 5 мл імуногенної композиції, переважно 2 мл, може бути введено тварині, внутрішньом'язово, підшкірно, або внутрішньочеревно.

Імуногенна композиція повинна містити кількість IBR відповідно до близько 6,8 log/мл. Від 1 до 5 мл імуногенної композиції, що містить IBR, переважно 2 мл, може бути введено тварині, внутрішньом'язово, підшкірно, або внутрішньочеревно.

Імуногенна композиція повинна містити кількість BTV відповідно від близько 106,7 TCID₅₀ BTV серотипу 1 та/або близько 107,3 TCID₅₀ BTV серотипу 8. Приблизно 1-5 мл імуногенної композиції, що містить BTV, переважно 2 мл, може бути введена тварині, внутрішньом'язово, підшкірно, або внутрішньочеревно.

Приготування імуногенних композицій відомо у літературі, наприклад у "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", що вказана вище, та "Vaccines" (2008, fifth edition, Plotkin, S.A. et al., editors, Saunders Elsevier).

Заявлений винахід стосується імунологічних композицій, що є особливо корисним для профілактики та лікування інфекцій BEF, IBR, або BTV у тварин. Таким чином, ще один аспект заявленого винаходу стосується способу для профілактики та лікування інфекцій BEF, IBR, або BTV у тваринах, який характеризується тим, що імуногенна композиція відповідно до заявленого винаходу є введеною тварині у потребі подібній профілактики або лікування. Імуногенна композиція заявленого винаходу може бути введена внутрішньом'язовою або підшкірною ін'єкцією або інтраназальним, внутрішньотрахеальним, пероральним, нашірним, крізьшкірним або внутрішньошкірним введенням. Переважно, вакцинація для BEFV, IBR, або BTV вакцини є підшкірною або внутрішньом'язовою, де внутрішньом'язова є більш бажаною. Живі вакцини для BEFV, IBR, або BTV переважно вводяться у віці шість місяців.

Винахід також забезпечує спосіб імунізації тварини, зокрема великої рогатої худоби, проти одного або різних інфекційних агентів одночасно, що містить пероральне, назальне, підшкірне, внутрішньошкірне, внутрішньочеревне, внутрішньом'язове, або аерозольне введення (або їх комбінації) вакцини, що містить імунологічно ефективну кількість композиції, що надана цим винаходом.

Терміни, що тут застосовані, мають значення, що визнане та відоме фахівцям, однак, для зручності та завершеності, окремі терміни та їх значення викладені нижче.

Як застосовано у цьому описі та у формулі винаходу, одиничні форми включають посилання на множину, якщо у змісті чітко не вимагається іншого. Отже, наприклад, посилання на "спосіб" включають один або декілька способів, та/або етапів описаного тут типу та/або які стануть очевидними для фахівців при читанні цього повідомлення та надалі.

Під терміном "близько" або "приблизно" мається на увазі статистично значущий діапазон оцінювання. Подібний діапазон може бути, як правило, в межах порядку звичайно 50 %, більш типово 20 %, ще більш типово 10 %, та навіть більш 5 % від заданого значення або діапазону. Допустимі варіації охоплюються термінами "близько" або "приблизно", що залежать від окремої досліджуваної системи, та можуть бути легко зрозумілими для фахівців.

"Інфекційна одиниця" BEFV є визначеною як кількість вірусу, що необхідна для зараження або знищення 50 % клітин культури тканин. Це може бути зображено у вигляді 50 % інфекційної дози культури тканин або TCID₅₀.

Вірус є послабленим, якщо він має пониженої вірулентності для нативного хазяїна. Вірус вважається інактивованим, якщо він є нездатним розповсюджуватися у клітині, що є придатною для вірусної інфекції.

Термін "антиген" означає молекулу, що іноді стимулює імунну відповідь. Антиген є будь-якою субстанцією, що може бути визнаною адаптивною імунною системою. Антигени звичайно є білками або полісахаридами. Антиген може бути частиною бактерії, вірусу, або іншого мікроорганізму, як-то оболонки, капсули, клітинної стінки, джгутика, пилусу, або токсину. Антиген може також бути ліпідом або нуклеїновою кислотою. Антиген, застосований у композиції може бути отриманий від а свіжої культури, замороженого стану, ліофілізованого стану, або від будь-якого іншого наявного стану. Якщо антиген є вірусом, він може бути інактивованим живим або послабленим.

"Ад'ювант" означає одну або декілька субстанцій, що підсилюють антигенність композиції, звичайно вакцинної композиції. Ад'ювант може служити у якості тканинного депо, що повільно випускає антиген та також як активатор лімфосистеми, що неспецифічно підсилює імунну відповідь (Hood, et al., Immunology, Second Ed., Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1984. p. 384). Часто, первинна вакцинація тільки антигеном, у відсутності ад'юванту, не може створити гуморальну або клітинну імунну відповідь. Також, в залежності від обставин, первинне введення в організм речовини, що провокує виділення антитіл тільки з антигеном, у відсутності ад'юванту, не може створити достатньої гуморальної або клітинної імунної відповіді. Група цитокінів або лімфокінів, що, як було показано, мають імуномодельючу активність, та отже є прийнятними у якості ад'ювантів. охоплює інтерлейкіни 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (див.,наприклад, U.S. Patent No. 5,723,127), 13, 14, 15, 16, 17 та 18 (та їх мутантні форми); інтерферони- α , β та γ ; гранулоцито-макрофаго-колонієстимулюючий фактор (GM-CSF) (див.,наприклад, U.S. Patent No. 5,078,996); колонієстимулюючий фактор макрофагів (M-CSF); колонієстимулюючий фактор гранулоцитів (G-CSF); та фактори некрозу пухлин α та β . Інші ад'юванти, що є прийнятними з імуногенними композиціями, описаними тут охоплюють хемокіни, в тому числі без обмеження, моноцитарний хемотаксичний фактор -1 (MCP-1), запальні білки макрофагів (MIP) наприклад, MIP-1 α та MIP-1 β , також відомі, як CCL-3 та CCL-4; та хемокін, що виділяється Т-клітинами при активації (RANTES); молекули адгезії, як-то селектин, наприклад, L-селектин, Р-селектин та Е-селектин; молекули, подібні до муцину, наприклад, CD34 (також відома, як сіалофорин, лейкозіалін, або SPN), GlyCAM-1 та MadCAM-1; члени родини інтегринів, як-то пов'язані з функцією лімфоцитів молекули LFA-1, 2, та 3, VLA-1, Mac-1 та p150,95; члени надродини імуноглобулінів, як-то молекули адгезії тромбоцитів ендотелію (PECAM), молекули адгезії інтерлейкіну, наприклад, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4, та ICAM-5, CD2 та LFA-3; ко-стимуляторні молекули, як-то CD40 та CD40L; фактори росту, що охоплюють васкулярний фактор росту, фактор росту нервових клітин, фактор росту фібробластів, епідермальний фактор росту, B7,2, PDGF, BL-1, та васкулярний ендотеліальний фактор росту; рецепторні молекули, що охоплюють Fas, TNF рецептор, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6; та каспазу (ICE).

Прийнятні ад'юванти, що застосовують для підсилення імунної відповіді, крім того охоплюють, але без обмеження, MPL™ (3-О-деацілований монофосфорил ліпід А, Corixa, Hamilton, MT), що описаний у U.S. Patent No. 4,912,094. Також прийнятними для застосування ад'ювантами є синтетичні аналоги ліпиду А або сполуки аміноалкіл глюкозамін фосфату (AGP), або їх похідні або аналоги, що є в наявності у Corixa (Hamilton, MT), та описані у United States Patent No. 6,113,918. Один подібний AGP є 2-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїламіно] етил 2-деокси-4-О-фосфоно-3-О-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїл]-2-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїл -аміно]-b-D-глюкопіранозидом, який є також відомий, як 529 (раніше відомий, як RC529). Цей 529 ад'ювант може бути приготованим у водному стані (AF) або у вигляді стійкої емульсії (SE).

Ще інші ад'юванти містять мураміл-пептиди, як-то N-ацетил-мураміл-L-треоніл-D-ізоглутамін (thr-MDP), N-ацетил-нормураміл-L-аланін-2-(1'-2" дипальмітоїл-sn-гліцеро-3-гідроксифосфорилокси)-етиламіні (MTP-PE); емульсії "олія у воді", як-то MF59 (International PCT Publication No. WO 90/14837) (містить 5 % сквален, 0,5 % Tween® 80, та 0,5 % Span 85 (необов'язково містить різні кількості MTP-PE), що оформлені у вигляді субмікронних частинок застосуванням мікрофлюїдизатора, як-то мікрофлюїдизатор Model 110Y (Microfluidics, Newton, MA)), та SAF (містить 10 % сквален, 0,4 % Tween 80, 5 % полімер, що блокує пліорон L121, та thr-MDP, також мікрофлюїдовані у субмікронну емульсію або перемішані на вортексі для створення емульсії частинок більшого розміру); неповний ад'ювант Фрейнда (IFA); солі алюмінію (галун), як-то гідроксид алюмінію, фосфат алюмінію, сульфат алюмінію; Амфіген; Аврідин; L121/сквален; D-лактид-полілактид/глікозид; пліурононі поліолі; вбиті Bordetella;

сапоніни, як-то Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), описані у U.S. Patent No. 5,057,540, ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), описані у U.S. Patent No. 5,254,339, та імуностимуляторні комплекси (ISCOMS); Mycobacterium tuberculosis; бактеріальні ліпополісахариди; синтетичні полінуклеотиди, як-то полінуклеотиди, що містять CpG- мотив, (напр., U.S. Patent No. 6,207,646); IC-31 (Intercell AG, Vienna, Austria), описані у European Patent Nos. 1,296,713 та 1,326,634; токсин коклюшу (PT) або його мутант, токсин холери або його мутант (напр., International PCT Publication Nos. WO00/18434, WO02/098368 та WO02/098369); або термолабільний токсин E. coli (LT), особливо LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; див.,наприклад, International PCT Publication Nos. WO 93/13302 та WO 92/19265.

Ад'юванти, що можуть бути доданими до композицій винаходу, можуть містити SL-CD, гідроксид алюмінію, SP-олію, або карбопол, або здатну до метаболізації олію, як-то один або декілька ненасичених терпенових вуглеводнів, наприклад сквален або сквалан, та поліоксоетиленовий-поліпропіленовий блокуючий кополімер, як-то Pluronic®

Термін "ссавці" охоплює однопрохідні (напр., качкодзьоб), сумчасті (напр., кенгуру), та плацентарні, що охоплюють живу худобу (домашні тварини, що вирощуються для отримання їжі, молока, або тканин, як-то свині, вівці, велика рогата худоба та коні) та свійські тварини (напр., собаки, коти). "Копитні" охоплюють, але без обмеження, велику рогату худобу (корови), водних буйволів, бізонів, баранів, свиней, оленів, слонів та яків, включаючи дорослі форми, та форми, що розвиваються (напр., телят, поросят, ягнят, та ін.). Імуногенна композиція винаходу може бути введена як дорослим ссавцям, так і ссавцям, що розвиваються, переважно до живої худоби.

"Імунологічно ефективна кількість" - це кількість антигену, що буде викликати імунну відповідь. Імунологічно ефективною кількістю рабдовирусу корів (BEFV) є кількість BEFV, що буде викликати імунну відповідь проти вірусу ефемерної лихоманки великої рогатої худоби. Імунологічно ефективною кількістю вірусу герпесу 1 корів (IBR) є кількість IBR, що буде викликати імунну відповідь проти IBR інфекції. Імунологічно ефективною кількістю вірусу африканської катаральної лихоманки (BTV) є кількість BTV, що буде викликати імунну відповідь проти BTV інфекції. "Імунологічно ефективна кількість" буде залежати від видів, породи, віку, розміру та стану здоров'я тварини-реципієнта. "Імунологічно ефективна кількість" буде залежати від попередньої обробки тварини одним або декількома штамми антигену де один або декілька штамів є вірулентним штамом або авірулентним штамом вірусу. Як прийнято тут, "імунологічно ефективна кількість" рабдовирусу корів (BEFV), при застосуванні в поєднанні з щонайменш одним прийнятим ад'ювантом, є такою кількістю BEFV, що є достатньою для підсилення імуногенності рабдовирусу корів, та, отже, забезпечує захисну імунність проти ураження вірулентним штамом рабдовирусу корів. У одному втіленні, імунологічно ефективна кількість BEFV є близько $10^{6,20}$ TCID₅₀ на мл композиції.

Як прийнято тут, "імунологічно ефективною кількістю" вірусу герпесу 1 корів (IBR), при застосуванні в поєднанні з щонайменш одним прийнятим ад'ювантом, є такою кількістю, якої є достатньо для підсилення імуногенності вірусу герпесу корів, та, отже, забезпечує захисну імунність проти ураження вірулентним штамом вірусу герпесу корів. У одному втіленні, імунологічно ефективна кількість IBR є близько 6,8 logs на мл композиції.

Як прийнято тут, "імунологічно ефективна кількість" вірусу африканської катаральної лихоманки (BTV), при застосуванні в поєднанні з щонайменш одним прийнятим ад'ювантом, є такою кількістю, якої є достатньо для підсилення імуногенності вірусу африканської катаральної лихоманки та яка, отже, забезпечує захисну імунність проти ураження вірулентним штамом африканської катаральної лихоманки. У одному втіленні, імунологічно ефективна кількість BTV є близько 106,7 TCID₅₀ BTV серотипу 1 та/або близько 107,3 TCID₅₀ BTV серотипу 8 на мл композиції.

У деяких втіленнях винаходу, вірусний антиген може бути принаймні штамом інфекційного вірусу герпесу 1 корів (також позначеного як вірус ринотрахеїту корів, або IBR), вірусу парагрипу, респіраторно-синцитіальним вірусом корів, вірусом проносу корів, вірусом ящуру, вірусом африканської катаральної лихоманки, вірусом ефемерної лихоманки великої рогатої худоби, парвовірусом собак, вірусом чуми собак, аденовірусом собак, вірусом парагрипу собак, корона вірусом собак, вірусом сказу, вірусом чуми котів, кальцивірусом котів, вірусом ринотрахеїту котів, вірусом інфекційного перитоніту котів, вірусом лейкої котів, вірусом котячого імунодефіциту, західнонільським вірусом, вірусом конячого енцефаломієліту, вірусом конячого грипу, вірусом конячого герпесу (ринопневмоніту), вірусом конячого артеріїту, парвовірусом свиней, ціковірусом свиней, вірусом свинячого репродуктивно-респіраторного синдрому, ротавірусом свиней, вірусом свинячого грипу, вірусом псевдосказу, вірусом інфекційного бурситу, вірусом хвороби Марека, вірусом хвороби Ньюкасла, вірусом

інфекційного бронхіту, вірусом інфекційного ларинготрахеїту, вірусом пташиного енцефаломієліту, пташиним реовірусом, вірусом пташиного грипу.

Як прийнято тут, термін "вірусна субодиниця" означає частину віріону. наприклад, субодиниця рабдовірусу корів (BEFV) може бути принаймні частиною віріону BEFV, принаймні частиною геному BEFV, принаймні частиною білку, що кодується BEFV, як-то BEFV ядерний білок, BEFV - пов'язаний з полімеразою білок, BEFV білок матриксу, BEFV РНК – залежна РНК - полімераза, або BEFV глікобілок.

Як прийнято тут, термін "імуногенний" означає те, що композиція є здатною до проявлення гуморальної та/або клітинної імунної відповіді. Імуногенний штам є також антигенним. Імуногенна композиція є такою композицією, що викликає гуморальну та/або клітинну імунну відповідь при введенні тварині.

Термін "імуногенна композиція" стосується будь-якої фармацевтичної композиції, що містить антиген, наприклад, мікроорганізм, композиція якого може бути застосована для викликання імунної відповіді у тварини. Імунна відповідь може охоплювати Т- клітинну відповідь, В - клітинну відповідь, або як Т- клітинна, так і В- клітинна відповідь. Композиція може служити для підвищення чутливості ссавців шляхом подання асоціації з молекулами МНС клітинної поверхні. На додаток, антиген -специфічні Т- лімфоцити або антитіла можуть бути генеровані для забезпечення майбутнього захисту імунізованого хазяїна. "Імуногенна композиція" може містити живий, послаблений, або інактивований/вбитий антиген. Антиген може бути цілим мікроорганізмом, або імуногенною частиною, що отримана від того, що викликає імунну відповідь. Імуногенна композиція може захищати тварину від одного або декілька симптомів, пов'язаних з інфекцією мікроорганізму, або може захистити тварину від смерті від такої інфекції.

Термін "парентеральне введення", як прийнято тут, означає введення іншим шляхом, ніж через шлунково-кишковий тракт, особливо стосовно введення субстанцію до організму внутрішньовенною, підшкірною, внутрішньом'язовою, або інтрамедулярною ін'єкцією, за винятком інших не пероральних та не назальних шляхів введення як-то внутрішньочеревна ін'єкція або місцеве застосування.

Терміни "вакцина" або "вакцинна композиція", тут застосовують взаємозамінно стосовно фармацевтичних композицій, що містять щонайменш одну імуногенну композицію, яка викликає імунну відповідь у тварині. Вакцина або вакцинна композиція може захистити тварину від хвороби або можливої смерті, спричиненої інфекцією, та може або не може включати один або декілька додаткових компонентів, що підсилюють імунологічну активність активного компоненту. Вакцина або вакцинна композиція може додатково містити додаткові компоненти, які є типовими для фармацевтичних композицій. Додаткові компоненти можуть містити, наприклад, один або декілька ад'ювантів або імуномодуляторів. Імуногенно активний компонент вакцини може містити повні живі організми навіть у їх оригінальному вигляді, або у вигляді послаблених організмів у модифікованій живій вакцині, або організмах, що є інактивованими відповідними способами у вбитій або інактивованій вакцині, або субодиниці вакцини, що містить один або декілька імуногенних компонентів вірусу, або спорудженою способами генетичної інженерії, мутованої або клонованої вакцини, що приготована з застосуванням способів, відомих фахівцям. Вакцина або вакцинна композиція може містити один або одночасно більш ніж з елементів, описаних вище.

Відповідно, у цьому доповненні, можуть бути застосовані традиційні способи молекулярної біології, мікробіології та імунології, відомі фахівцям. Подібні способи є більш докладно наведені у літературі. Див.,наприклад, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

Приготування вірусу ефемерної лихоманки великої рогатої худоби /Quil A.

Живий вірусний антиген ефемерної лихоманки великої рогатої худоби (BEF) був отриманий у замороженому стані. Після відтаювання при кімнатній температурі, вірус був поєднаний з Quil A перед додаванням інгредієнтів, що залишилися, для вакцини.

Порошок Quil A, вироблений Brenntag, був отриманий від APS (A division of Nuplex Industries, Australia), код продукту No. 04307503.

Базовий розчин Quil A був приготований розчиненням у воді до 10 мг/мл.

Стикло, 149,96 мл живого базового BEF антигену ($1,38 \times 10^7$ TCID₅₀/мл) було розведено з 36,34 мл 9,643 г/мл NaCl та 20,70 мл 10 мг/мл Quil A було додано до 1 мг/мл. Суміш перемішувалася протягом 2,5 годин при кімнатній температурі.

Приклад 2

Приготування вакцини BEFV.

Для приготування вакцини BEFV, наступні інгредієнти були додані у наступному порядку з перемішуванням суміші протягом 5 хвилин між додаваннями.

384,3 мл 8,5 г/мл NaCl

94,87 г суміші BEFV/QUIL A, що приготована як у Прикладі 1

120,00 мл 10 мг/мл базового SL-CD* до отримання 20 % (об%/ об%)

1,36 г Тіомерсал 9,9 % (мас/об%)

*SL-CD був приготований, як описано у Hilgers et al. (Sulpholipo-cyclodextrin in squalene-in-water as a novel and safe vaccine adjuvant. Vaccine 17 (1999), pp219-228.)

Після додавання всіх інгредієнтів, вакцина перемішувалася протягом 30 хвилин та pH був доведений до 7,18.

Вакцину перемішували протягом додаткових 30 хвилин та застосовували для наповнення помічених пакетів.

Приклад 3

Перевірка вакцини BEFV на тваринах:

Тести безпеки вакцини були проведені у Fort Dodge Australia, Penrith site. Безпека вакцини була проведена на великій рогатій худобі у відповідності з нормативами EP2002:0062.

10 морських свинок та 2 корови були щеплені вакциною, приготованою вище для визначення серологічної відповіді до фракції BEF антигену. Кожна з 10 морських свинок з вагою 250 г - 400 г були щеплені підшкірно 2,0 мл вакцини. У морських свинок були взяті зразки крові через 6 тижнів після щеплення. 2 корови молодше ніж 1 рік були щеплені підшкірно 4 мл вакцини. У корів були взяті зразки крові через 14 діб після щеплення. Сироватка, отримана від цих тварин була перевірена вірусною нейтралізацією (VN) згідно з наступним протоколом Biosecurity Sciences Laboratory, Department of Primary Industries and Fisheries Animal Research Institute, Queensland (Australia). Застосований перевірючий спосіб вірусної нейтралізації є у відповідності з "Australia standard diagnostic procedures."

Результати досліджень для партій вакцини наведені у Таблиці 1, нижче:

Таблиця 1

Результати безпечності з застосуванням одиничної дози вакцини.

ТЕСТ	СПЕЦИФІКАЦІЯ	Результати
		20 % SL-CD
Стерильність	Грибів або бактерій не виявлено	Pass
Водна фаза pH	6,5-7,5	7,25
Титр сироватки BEF	N/A	Морські свинки = 32 Корови = негативні
Корови безпечність	Не виявлено значної місцевої або системної реакції	Не виявлено значної місцевої реакції після вакцинації, але є подальше проявлення опухлості у місці ін'єкції на 14 день

Засновуючись на експериментах з застосуванням інактивованої вакцини BEF у дослідженнях на великій рогатій худобі та кролях, є дані, що свідчать про кореляцію між серологією лабораторних тварин та захистом великої рогатой худоби від BEFV. Отже, результати морських свинок, що наведені у таблиці 1 підтверджують, що імуногенні композиції винаходу забезпечують великій рогатій худобі захист від BEFV.

Однодозовий препарат вакцини BEF, приготований, як вказано вище, створив стабільну емульсію. Ця вакцина була перевірена на безпечність та спочатку не виявила місцевих реакцій у тесті безпечності великій рогатій худобі. Хоча системних або поведінкових реакцій не було помічено, вакцина створювала деякі місцеві реакції у місці ін'єкції протягом кінця періоду спостереження.

Таблиця 2, наведена нижче, зображує симптоми, що виникають у великій рогатій худобі після вакцинації одиничною дозою з 4 мл препаратом вакцини, переліченої вище.

Таблиця 2

Системна та місцева реакція

	Доба після щеплення	054,6 (20 %SLCD)	
		Корова #1	Корова #2
Системна реакція	1	Nil	Nil
	3	Nil	Nil
	5	Nil	Nil
	7	Nil	Nil
	10	Nil	Nil
	14	Nil	Nil
Місцева реакція - см	1	0	0
	3	Не вимірювали	Не вимірювали
	7	0	0
	14	2 × 9	2,5 × 13
Будь-яка значна місцева або системна реакція		Не відмічена	

В якості підсумку, використання імуногенної композиції, що містить сапонін (Quil A) та SL-CD у якості ад'ювантів у препараті, що містить BEFV створює ефективну вакцину BEFV, що є прийнятною у вигляді однодозової вакцини.

Приклад 4

Приготування суміші вакцин IBR.

Для відбору належного ад'юванту для майбутньої вакцини, вакцина вбитого рекомбінантного вірусу герпесу 1 корів, також відомого, як вірус інфекційного ринотрахеїту корів (IBR) готувалася шляхом змішування з різними ад'ювантами та результати оцінювалися. Вакцини з трьома різними ад'ювантними комбінаціями були приготовані з 1X титром 6,04 log/мл IBR(EU). Вакцина А містила AIOH (15 %) & сапонін; вакцина В містила 5 % SP олію; та вакцина С містила 20 % SL-CD & сапонін. Сапонін був отриманий від Berghausen Cat. NO# 603013.

Таблиця 3

Моновалентна вакцина rIBR (EU) А з ALOH (15 %) & сапонін у якості ад'юванту.

Компонент	Базовий фактор конц.	Кількість/Доза	Конц./Доза	Загальн.обсяг на 200 мл
rIBR Lot # rIBREU-02	9,8X=7,03 log ₁₀ /мл	6,8 log ₁₀ s	30,00 %	60,000 мл
Стерильний гель	2 %; з тіомерсалом		15,00 %	30,000 мл
Розчин сапоніну (100 мг/мл)	100 мг/мл	1 мг	0,50 %	1,000 мл
20 % NZ Амін AS	20 %	NA	5,00 %	10,000 мл
5 % Тіомерсал	5 %	NA	0,19 %	0,370 мл
Змішаний ділюент з гепесом w/o феноловий червоний			49,32 %	98,630 мл
20 % HCl				мл

Таблиця 4

Моновалентна вакцина rIBR (EU) В з SP-олією при 5 % у якості ад'юванту.

Компонент	Базовий фактор конц.	Кількість/Доза	Конц./Доза	Загальн.обсяг на 200 мл
rIBR Lot # rIBREU-02	9,8X=7,03 log ₁₀ /мл	6,8 log ₁₀ s	30,00 %	60,000 мл
20 %NZ Амін AS	20 %	NA	5,00 %	10,000 мл
SP - олія		5 %	5,00 %	10,000 мл

Продовження таблиці 4

Компонент	Базовий фактор конц.	Кількість/Доза	Конц./Доза	Загальн.обсяг на 200 мл
5 % Тіомерсал	5 %	NA	0,19 %	0,375 мл
Змішаний ділюент з гелесом w/o феноловий червоний			59,81 %	119,625 мл
20 % HCl				мл

Таблиця 5

Моновалентна вакцина rIBR (EU) C з SL-CD при 20 % & сапонін у якості ад'ювантів.

Компонент	Базовий фактор конц.	Кількість/Доза	Конц./Доза	Загальн.обсяг на 200 мл
rIBR Lot # rIBREU-02	9,8X=7,03 log ₁₀ /мл	6,8 log ₁₀ S	30,00 %	60,000
SL-CD*			20,00 %	40,000
Розчин сапоніну (100мг/мл)	100 мг/мл	1 мг	0,50 %	1,000
20 %NZ Амін AS	20 %	NA	5,00 %	10,000
5 % Тіомерсал	5 %	NA	0,20 %	0,400
Змішаний ділюент з гелесом w/o феноловий червоний			44,30 %	88,600
20 % HCl				

*SL-CD/сквалан був приготований, як описано у Hilgers et al. (Sulpholipo-cyclodextrin in squalene-in-water as a novel and safe vaccine adjuvant. Vaccine 17 (1999), pp219-228.).

5 Приклад 5

Перевірка вакцини IBR на тваринах:

Перевірки вакцини проводили в Айові. Взагалі 27 телят, у віці 5-6 місяців, були випадково розподілені по групам, як наведено у таблиці 6, нижче:

Таблиця 6

Тварини, перевірені вакциною IBR.

Група	# тварин	Вакцина	# вакцинацій
1	5	rIBR, Al(OH) ₃ /Сапонін	2
2	5	rIBR, SP - олія	2
3	5	rIBR, SL-CD/Сапонін	2
4	5	rIBR, SL-CD/Сапонін	1
5	5	немає	немає
6	2	немає	немає

- 10 За винятком телят від груп 4-6, телята були вакциновані двічі, підшкірно, з інтервалом 3 тижні. За два тижня після другої вакцинації (або три тижні після вакцинації для групи 4), всі телята (за виключенням двох телят від групи 6) були інфіковані інтраназально вірулентним вірусом IBR. Всі телята щоденно спостерігалися впродовж 14 днів після інфікування для виявлення клінічних ознак хвороби. Клінічні ознаки охоплювали, але без обмежень, слизово-гнійні виділення з носу, виділення з очей, задишка, поганий апетит (не споживання нормальної кількості корма), та депресію. Ректальну температуру також щоденно вимірювали протягом 15 днів після інфікування. У тварин періодично протягом досліджень брали зразки крові на сироватку та антитіла проти IBR визначали з застосуванням аналізу нейтралізації сироватки. Назальні мазки для виділення вірусу збирали щоденно, починаючи з двох днів перед 20 інфікуванням, та протягом 14 днів після інфікування. Був визначений титр вірусу, виділеного від

кожного теляти у кожен день. Одна тварина з групи 2 була відсунута від досліджень перед інфікуванням через поганий стан здоров'я.

- 5 Спостережені клінічні ознаки, що були пов'язані з інфікуванням IBR підсумовані у Таблиці 7, нижче, та результати розповсюдження вірусу наведені у Таблиці 8. Титри антитіл анти-IBR сировоткової нейтралізації перелічені у Таблиці 9.

Таблиця 7

Середня частота виникнення клінічних ознак, які спостерігали у тварин, інфікованих вірулентним IBR.

Група	Гарячка ^b	Слизово-гнійні виділення з носу	Кашель
rIBR, Al(OH) ₃ /Сапонін	1,8±1,5	0,4±0,5	1,2±0,8
rIBR, SP- олія	3,0±2,9	0,5±0,6	1,0±2,0
rIBR, SL-CD/Сапонін, дві дози	2,8±3,4	0,6±0,9	0,6±0,9
rIBR, SL-CD/Сапонін, одна доза	4,0±3,2	0,8±0,8	0,6±0,5
Контроль інфікування	5,2±1,8	1,0±1,0	2,2±3,3
Контроль навколишнього середовища	0	0	0
^a Значення виражено як середнє ± стандартне відхилення. ^b Ректальна температура ≥103,5°F та 1°F вище базової.			

Через малі розміри груп, відмінності, спостережені між вакцинованими тваринами та контролюми були не статистично різними. Однак, чисельні відмінності вказують на дію вакцинації, особливо для перших трьох груп.

10

Ступінь та титр вірусного виділення наведені у Таблиці 8, нижче:

Таблиця 8

Середні титри вірусного виділення та частота виникнення у тварин, інфікованих вірулентним IBR.

Група	Титр	Частота
rIBR, Al(OH) ₃ /Сапонін	6,1±0,6*	7,2±1,5*
rIBR, SP- олія	5,9±0,8*	7,3±0,5*
rIBR, SL-CD/Сапонін, дві дози	4,2±2,1	4,6±2,7
rIBR, SL-CD/Сапонін, одна доза	6,1±0,5*	6,2±1,1*
Контроль інфікування	6,6±0,4*	8,2±1,8*
Контроль навколишнього середовища	0	0

^aЗначення виражено як середній log₁₀ TCID₅₀ титр ± стандартне відхилення.

^bЗначення виражено як середнє ± стандартне відхилення.

*Вказане значення значно відрізняється від групи, вакцинованій двома дозами rIBR з SL-CD/сапонін ад'ювантом, p<0,05.

15

Результати вірусного виділення показують, що SL-CD + сапонін забезпечують найкращий захист за рахунок скорочення числа (принаймні у 100 разів) та ступінь вірусного виділення. Цей проявлений захист, ймовірно, виникає через значно високий титр антитіл впродовж часу експериментального інфікування, як наведено у таблиці 9, нижче:

Таблиця 9

Титри антитіл анти-IBR сировоткової нейтралізації^a
у тваринах, вакцинованих зі вбитою вакциною rIBR у різних ад'ювантах.

Груп	Титр
rIBR, Al(OH) ₃ /Сапонін	25±2*
rIBR, SP-олія	32±2*
rIBR, SL-CD/Сапонін, дві дози	63±4
rIBR, SL-CD/Сапонін, одна доза	4±3*

^aЗначення, виражені як геометричний середній титр ± стандартне відхилення. Проби сироватки були зібрані у день інфікування.

*Вказане значення значно відрізняється від подібного у групі, що вакцинована двома дозами rIBR з ад'ювантом SL-CD/ сапонін, p<0,05.

Результати цього дослідження показують, що, серед трьох оцінених ад'ювантів, комбінація SL-CD/ сапонін забезпечує найкращу продуктивність.

5 Приклад 6

Приготування вакцини вірусу африканської катаральної лихоманки.

П'ять різних інактивованих вакцин проти вірусу африканської катаральної лихоманки серотипу 1 та 8 були приготовані з різною концентрацією антигену BTV8 та з різними композиціями ад'ювантів. Титр BTV серотипу 1 (106,7 TCID₅₀) залишався постійним у всіх перевірених вакцинах. Телята отримали два щеплення два тижні окремо. Композиції вакцин E-43, E-44, E-45, E-47, та E-48 наведені у Таблицях 10-14, нижче:

Таблиця 10

Композиція вакцини E-43* BTV.

Компонент	Кількість
Інактивований BTV серотипу 1, штам ALG2006/01 E1	10 ^{6,7} TCID ₅₀
Інактивований BTV серотипу 8, штам BEL2006/02	10 ^{7,3} TCID ₅₀
3 % гель гідроксиду алюмінію	4 мг Al ³⁺
Сапонін	0,4 мг
Фізіологічний розчин	за необхідністю, 2,0 мл
Тіомерсал	0,2 мг

*Партія E-43 Zulvac® 1+8 Bov є вакциною, що зареєстрована у Іспанії (Emergency License).

Таблиця 11

Композиція вакцини E-44 BTV.

Компонент	Кількість
Інактивований BTV серотипу 1, штам ALG2006/01 E1	10 ^{6,7} TCID ₅₀
Інактивований BTV серотипу 8, штам BEL2006/02	10 ^{7,5} TCID ₅₀
3 % гель гідроксиду алюмінію	4 мг Al ³⁺
Сапонін	0,4 мг
Фізіологічний розчин	за необхідністю, 2,0 мл
Тіомерсал	0,2 мг

Таблиця 12

Композиція вакцини E-45 BTV.

Компонент	Кількість
Інактивований BTV серотипу 1, штам ALG2006/01 E1	$10^{6,7} \text{TCID}_{50}$
Інактивований BTV серотипу 8, штам BEL2006/02	$10^{7,3} \text{TCID}_{50}$
3 % гель гідроксиду алюмінію	4 мг Al^{3+}
Сапонін	1,0 мг
Фізіологічний розчин	за необхідністю, 2,0 мл
Тіомерсал	0,2 мг

Таблиця 13

Композиція вакцини E-47 BTV.

Компонент	Кількість
Інактивований BTV серотипу 1, штам ALG2006/01 E1	$10^{6,7} \text{TCID}_{50}$
Інактивований BTV серотипу 8, штам BEL2006/02	$10^{7,3} \text{TCID}_{50}$
SL-CD*	20 %
Сапонін **	1,0 мг
Фізіологічний розчин	за необхідністю, 2,0 мл
Тіомерсал	0,2 мг

*SL-CD/сквалан приготований, як описано у Hilgers et al. (Supra).

**Brenntag Catalog No. 27031012600

Таблиця 14

Композиція вакцини E-48 BTV.

Компонент	Кількість
Інактивований BTV серотипу 1, штам ALG2006/01 E1	$10^{6,7} \text{TCID}_{50}$
Інактивований BTV серотипу 8, штам BEL2006/02	$10^{7,0} \text{TCID}_{50}$
SLCD	20 %
Сапонін	1,0 мг
Фізіологічний розчин	за необхідністю, 2,0 мл
Тіомерсал	0,2 мг

5 Приклад 7

Результати нейтралізації сироватки.

Титри нейтралізуючих антитіл були виміряні у всіх телят за один тиждень (+28) та за два тижні (+35) після вакцинації. Результати нейтралізації сироватки наведені у таблицях 15-20, нижче. Наявність нейтралізуючих антитіл є показником захисту, але тварини без

10

нейтралізуючих антитіл також можуть бути захищеними через клітинну відповідь.

Таблиця 15

Результати, отримані з вакциною E-43
BTV-1= $10 \exp^{6,7}$ BTV-8= $10 \exp^{7,3}$

Теля	+28		+35	
	BTV 1	BTV 8	BTV 1	BTV 8
79	1,4	1,4	4	4
243	1	2	16	5,7
349	4	2,8	32	11,3
365	2	1	16	2,8

Продовження таблиці 15

Теля	+28		+35	
	BTV 1	BTV 8	BTV 1	BTV 8
524	1,4	5,7	22,6	4
638	1,4	2,8	22,6	22,6
660	11,3	1	22,6	5,7
695	8	2,8	22,6	8
720	4	1,4	16	4
841	8	1,4	32	5,7
893	16	11,3	22,6	16
922	32	4	64	32
1027	11,3	4	45,3	11,3
1324	8	8	45,3	11,3
1327	8	4	64	22,6
1608	45,3	11,3	45,3	8
2039	11,3	16	128	16
2996	2	5,7	4	5,7
5371	5,7	8	8	8
6352	2,8	1,4	16	16
GM	5,4	3,4	23,4	8,9

Таблиця 16

Результати, отримані з вакциною Е-44.

Теля	+28		+35	
	BTV 1	BTV 8	BTV 1	BTV 8
287	2	1,4	4	2
332	22,6	8	128	11,3
346	45,3	32	32	16
502	8	2,8	16	16
539	11,3	4	90,5	8
608	4	1,4	16	1
628	16	2	32	16
630	2,8	1,4	22,6	1,4
647	45,3	16	128	32
887	22,6	2,8	128	5,7
1046	11,3	2	45,3	1,4
2881	45,3	4	16	32
3035	16	8	22,6	11,3
3046	16	5,7	16	8
3824	2,8	2	11,3	1
4341	22,6	4	11,3	4
4656	22,6	5,7	22,6	8
6927	8	1	8	4
6997	5,7	8	22,6	2
8097	1	5,7	2,8	5,7
GM	10,5	3,9	23,0	5,7

Таблиця 17

Результати, отримані з вакциною Е-45.

Теля	+28		+35	
	BTV 1	BTV 8	BTV 1	BTV 8
87	8	2	16	8
296	4	4	11,3	5,7
520	11,3	11,3	64	11,3
607	8	8	90,5	11,3
612	11,3	16	64	16
623	11,3	8	8	11,3
717	16	4	45,3	4
731	16	16	128	16
789	8	11,3	16	8
871	64	8	90,5	16
886	11,3	2,8	128	5,7
914	4	1	64	2
977	11,3	8	45,3	32
1024	32	8	90,5	32
1542	4	1,4	22,6	5,7
2654	4	2	16	5,7
2843	16	5,7	45,3	16
6772	11,3	5,7	45,3	4
8004	5,7	4	8	8
8327	4	4	22,6	32
GM	9,7	5,1	36,8	9,7

Таблиця 18

Результати, отримані з вакциною Е-47.

Теля	+28		+35	
	BTV 1	BTV 8	BTV 1	BTV 8
22	2	1,4	4	16
345	32	8	181	22,6
422	2,8	5,7	4	8
501	8	4	32	8
535	8	16	22,6	8
536	4	1	5,7	1,4
551	1	2	11,3	8
617	8	8	32	16
735	1	1	16	2
748	16	4	64	16
817	4	2,8	11,3	16
894	4	4	16	4
982	5,7	2	16	16
1009	1	4	11,3	11,3
1157	16	8	128	22,6
1187	5,7	8	45,3	11,3
5515	8	2,8	64	4
5982	5,7	2,8	11,3	2
6776	16	8	22,6	11,3
7797	4	1	32	8
GM	5,1	3,5	21,5	8,3

Таблиця 19

Результати, отримані з вакциною E-48.

Теля	+28		+35	
	BTV 1	BTV 8	BTV 1	BTV 8
130	4,0	2	45,3	2
316	5,7	2	16	4
344	2,8	1	16	2,8
428	5,7	2,8	8	2,8
442	1,4	2,8	16	1
514	22,6	2,8	64	8
645	64,0	5,7	128	4
740	32,0	5,7	181	5,7
787	1,0	2,8	45,3	8
790	5,7	2	32	1
836	2,8	1		
890	8,0	2,8	32	5,7
1278	16,0	4	32	8
1789	11,3	4	90,5	16
3654	1,4	1,4	1,4	4
6783	4,0	1	16	1,4
7085	32,0	4	22,6	4
9872	16,0	1,4	32	4
40552	5,7	2,8	8	1
80552	8	1,4	5,7	2
GM	7,0	2,3	24,3	3,4

Таблиця 20

Контролі.

Теля	+28		+35	
	BTV 1	BTV 8	BTV 1	BTV 8
295	1	1	1	1
377	1	1	1	1
537	1	1	1	1
548	1	1	1	1
643	1	1	1	1
659	1	1	1	1
671	1	1	1	1
679	1	1	1	1
724	1	1	1	1
733	1	1	1	1
778	1	1	1	1
1079	1	1	1	1
1221	1	1	1	1
1791	1	1	1	1
2117	1	1	1	1
2568	1	1	1	1
3659	1	1	1	1
3931	1	1	1	1
5523	1	1	1	1
8287	1	1	1	1
GM	1,0		1,0	1,0

Присутність віремії для BTV1 та BTV8 була визначена на 4, 5, та 8 добу після інфікування у тваринах, вакцинованих вакцинами E-43: ZULVAC 1+8 (BTV1: 106,7+BTV8: 107,3) (AI3+ +

сапонін: актуальний препарат) та E-47: ZULVAC 1+8 (BTV1 106,7+BTV8: 107,3) (SLCD+2,5x сапонін: новий ад'ювант).

Вакцина E-43: ZULVAC 1+8 (BTV1: $10^{6,7}$ +BTV8: $10^{7,3}$) (Al^{3+} + сапонін: актуальний препарат)

100 % запобігання віремії для BTV1 (0/8)

5 87,5 % запобігання віремії для BTV8 (1/8)

Вакцина E-44: ZULVAC 1+8 (BTV1 $10^{6,7}$ +BTV8: $10^{7,5}$) (Al^{3+} + сапонін: 1,58 більш антигену BTV8 ніж актуальний препарат)

100 % запобігання віремії для BTV1 (0/8)

87,5 % запобігання віремії для BTV8 (1/8)

10 Результати, наведені вище, свідчать, що підвищення BTV серотипу 8 у вакцині by1,58 X не викликає кращий захист.

Вакцина E-47: ZULVAC 1+8 (BTV1 $10^{6,7}$ +BTV8: $10^{7,3}$) (SLCD+2,5 X сапонін: новий ад'ювант)

100 % запобігання віремії для BTV1 (0/8)

100 % запобігання віремії для BTV8 (0/8)

15 Вакцина E-45: ZULVAC 1+8 (BTV1 106,7+BTV8: 107,3) (Al^{3+} + 2 X сапонін: 2x більш сапоніну ніж актуальний препарат)

100 % запобігання віремії для BTV1 (0/8)

100 % запобігання віремії для BTV8 (0/8)

Приклад 8

20 Виробництво гамма-інтерферону.

Для визначення гамма-інтерферону у клітинах крові був застосований тест Bovigam TB (Prionics). Стисло, мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) були приготовані, та були стимульовані, частина з VP7, та частина з VP2. Виробництво гамма-інтерферону було визначено тільки після стимуляції клітин крові з VP7.

25 Результати оцінки специфічного вироблення γ -IFN у тваринах, вакцинованих з вакцинами E-43 та E-47 наведені нижче. Перша вакцинація - (D+0); Друга вакцинація - (D+21); Інфікування - (D+45)

Загалом у дослідженнях приймали участь 30 трьохмісячних фризських телят без антитіл BTV. Стать телят до уваги не приймали. У дослідженнях приймали участь тільки нормальні та здорові тварини. Їх стан здоров'я був підтверджений після прибуття. Тварини були індивідуально ідентифіковані по вушним міткам. 30 серонегативних фризських телят були безсистемно розподілені на чотири групи лікування (з застосуванням програми Microsoft Excel), як вказано нижче:

Група 1: 10 телят, вакцинованих та ревакцинованих з вакциною E-43.

35 Група 2: 10 телят, вакцинованих та ревакцинованих з вакциною E-47.

Група 3: 10 контрольних телят, не вакцинованих.

Вакцинації проводилися внутрішньом'язово (i.m.), найбільш поширеним шляхом введення вакцини у велику рогату худобу, з застосуванням 2 мл вакцини.

40 Телята у групах 1 та 2 були вакциновані у 0 добу (D+0) та ревакциновані через 3 тижні (D+21).

Телята у групі 3 залишилися у якості невакцинованих контролів.

Кров була зібрана у телят у 0 добу (D+0), перед першою вакцинацією; перед ревакцинацією (або другою вакцинацією), через три тижні (D+21); та у 42 добу, перед інфікуванням (D+42). Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMCs) були приготовані від індивідуальних зразків.

45 Через 24 доби після другої вакцинації, телят перемістили до Fort Dodge Veterinaria's Challenge Facilities No. 3., де, через 24 доби після ревакцинації (D+45), 8 тварин від кожної групи були інфіковані BTV-1 або BTV-8. Кров була зібрана у тварин через 5 днів після інфікування, для оцінки специфічного вироблення γ -IFN проти VP7 та VP2.

50 Визначення γ -IFN.

Кров у присутності гепарину була зібрана від всіх тварин у експерименті у кожен день вакцинації, у день перед інфікуванням та 5 днів після інфікування. PBMC були екстраговані у градієнті густини (Histopaque 1077), промиті та ресуспендовані до кінцевої концентрації 5×10^6 клітин /мл у середі RPMI 1640, доповненій ембріональною телячою сироваткою. Клітини були розміщені у 96 – луночні планшети з одним з двох рекомбінантних білків VP2 та VP7 (1мкг/мл). У якості позитивного контролю був застосований конкавалін А (5мкг/мл). Планшети були інкубовані при 37°C 16-протягом ночі. Аналізи γ -IFN проводилися у супернатантах з застосуванням тесту на інтерферон корів (Bovigam TB, Prionics). Результати були виражені у одиницях A450 після субтракції не-стимулюючих значень кожної тварини.

Тільки рекомбінантний білок VP7 був здатним спричинювати специфічне виробництво γ -IFN у вакцинованих тваринах після другої вакцинації.

У день інфікування, 3 з 10 (30 %) телят, вакцинованих вакциною E-47 показали виробництво γ -IFN проти VP7. Через 5 днів після введення, співвідношення позитивних тварини збільшилося до 63 %. Тварини, вакциновані вакциною E-43 показали позитивне виробництво γ -IFN проти VP7 через 5 днів після інфікування (2 з 8, 25 %), але не у день інфікування.

Результати, наведені у таблиці 21 виражені як у одиницях A450, та як співвідношення позитивного вироблення γ -IFN ($>0,065$).

Таблиця 21

Статистики кожної групи лікування у день кожної вакцинації, день інфікування та 5 діб після інфікування.

Група лікув.		VP2_D0 V1	VP7_D0 V1	VP2_D0 V2	VP7_D0 V2	VP2D0 Ch	VP7D0 Ch	VP2D5 Ch	VP7D5 Ch
E-43	Середнє	,00180	,00060	,00156	,00600	,00130	,00980	,00200	,04400
	N	10	10	9	9	10	10	8	8
	Станд. відхил.	,004467	,001265	,002555	,010235	,002406	,020596	,002976	,078258
	Мін.	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
	Макс.	,014	,003	,007	,029	,007	,068	,007	,207
	Серед.	,00000	,00000	,00000	,00000	,00000	,00300	,00000	,00550
E-47	Середнє	,00300	,00100	,00911	,00489	,00220	,13830	,00800	,35600
	N	10	10	9	9	10	10	8	8
	Станд. відхил.	,009487	,003162	,012354	,007061	,002658	,267033	,015501	,356680
	Мін.	,000	,000	,000	,000	,000	,001	,000	,003
	Макс.	,030	,010	,033	,020	,008	,816	,045	,831
	Серед.	,00000	,00000	,00400	,00200	,00150	,00550	,00150	,30800
Контр.	Середнє	,00520	,00320	,00322	,01189	,00310	,00160	,00233	,00944
	N	10	10	9	9	10	10	9	9
	Станд. відхил.	,011124	,007315	,006320	,023385	,005195	,002221	,004000	,011727
	Мін.	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
	Макс.	,030	,022	,019	,069	,017	,007	,012	,031
	Серед.	,00000	,00000	,00000	,00000	,00150	,00100	,00000	,00400

У день інфікування, при застосуванні тесту Mann-Whitney, були знайдені відмінності між групами, вакцинованими E-43 та E-47 та контрольною групою: E-43 у порівнянні з контролями: $p=0,035$; E-47 у порівнянні з контролями: $P=0,003$.

Через 5 днів після інфікування, при застосуванні тесту Mann-Whitney, були знайдені значні відмінності між групами, вакцинованими E-43 та E-47 та контрольною групою: E-43 у порівнянні з E-47: $p=0,021$; E-47 у порівнянні з контролями: $p=0,006$.

Таблиця 22

Перехресна таблиця між двома вакцинами у день інфікування

			Лікування		Загальн.
			E-43	E-47	
VP7D+0Ch	Негативн.	Кількість	10	7	17
		% у межах лікування	100,0 %	70,0 %	85,0 %
	Позитивн.	Кількість	0	3	3
		% у межах лікування	,0 %	30,0 %	15,0 %

Продовження таблиці 22

			Лікування		Загальн.
			Е-43	Е-47	
	Загальн.	Кількість	10	10	20
		% у межах лікування	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Без значних відмінностей: $p=0,105$

Таблиця 23

Перехресна таблиця між двома вакцинами через 5 днів після інфікування.

			Лікування		Загальн.
			Е-43	Е-47	
VP7D+5Ch	Негативн.	Кількість	6	3	9
		% у межах лікування	75,0 %	37,5 %	56,3 %
		Кількість	2	5	7
	Позитивн.	% у межах лікування	25,0 %	62,5 %	43,8 %
	Загальн.	Кількість	8	8	16
		% у межах лікування	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Без значних відмінностей: $p=0,157$

Таблиця 24

Перехресна таблиця між вакциною Е-47 та контролями у день інфікування.

			Лікування		Загальн.
			Е-47	Контроль	
VP7D+0Ch	Негативн.	Кількість	7	10	17
		% у межах лікування	70,0 %	100,0 %	85,0 %
	Позитивн.	Кількість	3	0	3
		% у межах лікування	30,0 %	,0 %	15,0 %
	Загальн.	Кількість	10	10	20
		% у межах лікування	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Без значних відмінностей: $p=0,105$.

Таблиця 25

Перехресна таблиця між вакциною Е-47 та контролями через 5 днів після інфікування.

			Лікування		Загальн.
			Е-47	Контроль	
VP7D+5Ch	Негативн.	Кількість	3	9	12
		% у межах лікування	37,5 %	100,0 %	70,6 %
	Позитивн.	Кількість	5	0	5
		% у межах лікування	62,5 %	,0 %	29,4 %
	Загальн.	Кількість	8	9	17
		% у межах лікування	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Значні відмінності: $p=0,009$

Перехресна таблиця між вакциною Е-47 та контролями через 5 днів після інфікування.

			Лікування		Загальн.
			Е-43	Контроль	
VP7D+5Ch	Негативн.	Кількість	6	9	15
		% у межах лікування	75,0 %	100,0 %	88,2 %
	Позитивн.	Кількість	2	0	2
		% у межах лікування	25,0 %	,0 %	11,8 %
	Загальн.	Кількість	8	9	17
		% у межах лікування	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Висновки.

- Телята, вакциновані ZULVAC 1+8, партія Е-47 (BTV1: 106,7+BTV8: 107,3) (SLCD+2,5хсапонін: новий ад'ювант) показали найвищий рівень γ -IFN у день інфікування (3 тижні після другої вакцинації) та через 5 днів після інфікування, ніж контролі та ніж телята, що були вакциновані ZULVAC 1+8 (BTV1: 106,7+BTV8: 107,3) (AI3+ + сапонін: актуальний препарат).
- Телята, вакциновані з вакциною Е-43 (актуальний препарат) не показали продукування γ -IFN проти VP7 до 5 днів після інфікування. Його значення були значно меншими ($p=0,021$), ніж подібні, що були викликані вакциною Е-47 (новий ад'ювант).
- Тільки рекомбінантний білок VP7 був здатним викликати кількості γ -IFN, що піддаються визначенню, внаслідок чого VP7 може бути підсилювачем клітинного імунітету.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Імунологічна композиція, що містить сульфоліпо-циклодекстрин (SL-CD) та сапонін.
2. Імунологічна композиція за п. 1, яка додатково містить принаймні один антиген.
3. Імунологічна композиція за п. 2, де принаймні один антиген є вибраним з бактерій, вірусів, пептидів, поліпептидів, нуклеїнових кислот, або їх комбінацій.
4. Імунологічна композиція за п. 3, в якій принаймні один антиген є ветеринарним антигеном.
5. Імунологічна композиція за п. 4, в якій принаймні один антиген є антигеном корів.
6. Імунологічна композиція за п. 3, в якій принаймні один антиген є вірусним антигеном.
7. Імунологічна композиція за п. 6, в якій вірусний антиген є рабдовірусом корів (BEFV); вірусом герпесу 1 корів (IBR), або вірусом африканської катаральної лихоманки (BTV).
8. Імунологічна композиція за будь-яким з пп. 1-7, в якій SL-CD є присутнім у кінцевій концентрації приблизно 0,2 мл/мл.
9. Імунологічна композиція за будь-яким з пп. 1-8, в якій сапонін є присутнім у кінцевій концентрації приблизно 0,5 мг/мл.
10. Імунологічна композиція за будь-яким з пп. 1-8, в якій сапоном є Quil A.
11. Імунологічна композиція за п. 10, де Quil A є присутнім у кінцевій концентрації приблизно від 0,1 мг/мл до 0,2 мг/мл.
12. Імунологічна композиція за пп. 10 або 11, в якій Quil A є присутнім у кінцевій концентрації приблизно 0,158 мг/мл.
13. Спосіб виявлення імунної відповіді у тварини, яка має в цьому необхідність, який полягає у введенні тварині імунологічної композиції за будь-яким з пп. 1-12.
14. Імунологічна композиція за п. 6, де вказана композиція одержана поєднанням сапоніну та вірусного антигену перед додаванням SL-CD.
15. Імунологічна композиція, одержана так, як описано в п. 14, що додатково містить принаймні один додатковий ад'ювант.
16. Імунологічна композиція, одержана так, як описано в п. 15, де принаймні один додатковий ад'ювант є вибраним з гідроксиду алюмінію, SP-олії або карбополу.
17. Імунологічна композиція, одержана так, як описано в п. 14, де сапонін є Quil A.
18. Імунологічна композиція, одержана так, як описано в п. 14, де SL-CD є присутнім у кінцевій концентрації приблизно 0,2 мл/мл.

19. Імунологічна композиція, одержана так, як описано в п. 17 або 18, де Quil A є присутнім у кінцевій концентрації від приблизно 0,1 мг/мл до приблизно 0,2 мг/мл.
20. Імунологічна композиція, одержана так, як описано в будь-якому з пп. 17-19, де Quil A є присутнім у кінцевій концентрації приблизно 0,158 мг/мл.
- 5 21. Імунологічна композиція, одержана так, як описано в будь-якому з пп. 14-20, де вірусний антиген є антигеном корів.
22. Імунологічна композиція, одержана так, як описано в будь-якому з пп. 14-21, де вірусний антиген є вибраним з BEFV, IBR та BTV.
- 10 23. Спосіб індукування імунної відповіді проти BEFV у тварині, що полягає у введенні тварині композиції за п. 22.
24. Спосіб за п. 23, де імунна відповідь є викликаною після введення одиначної дози композиції.
25. Спосіб за п. 23 або 24, де імунна відповідь є захисною імунною відповіддю.
26. Набір для індукування імунної відповіді у тварині, що містить імунологічну композицію за п. 1.
- 15 27. Набір за п. 26, де сапоніном є Quil A.
28. Набір за пп. 26 або 27, що додатково містить принаймні один антиген.
29. Набір за п. 28, де принаймні один антиген є вибраним з бактерій, вірусів, пептидів, поліпептидів, нуклеїнових кислот або їх комбінацій.
30. Набір за п. 29, де принаймні один антиген є вірусним антигеном.
- 20 31. Набір за п. 30, де вірусний антиген є вибраним з BEFV, IBR та BTV.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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

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