



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 89631

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 39/39

A61P 31/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

## (54) ВАКЦИНА

1

(21) a200610518  
(22) 24.03.2005  
(24) 25.02.2010  
(86) PCT/IB2005/000804, 24.03.2005  
(31) 60/559,677  
(32) 05.04.2004  
(33) US  
(46) 25.02.2010, Бюл.№ 4, 2010 р.  
(72) ДОМІНОВСКИ ПОЛ ДЖОЗЕФ, US, КЛОУС ПАМЕЛА КЕЙ, US, КРЕБС РІЧАРД ЛІ, US, МАННАН РАМАСАМІ МАННАР, US  
(73) ПФАЙЗЕР ПРОДАКТС ІНК., US  
(56) WO A 9633739, 31.10.1996.  
US A1 2003095974, 22.05.2003.  
US A 5679354, 21.10.1997.  
US B1 6506386, 14.01.2003.  
WO 2004087204, 14.10.2004.  
WO A 2004067031, 12.08.2004.  
(57) 1. Вакцина, яка включає сапоніновий глікозид, стерол та антиген, яка відрізняється тим, що вказаний сапоніновий глікозид і вказаний стерол зв'язані один з одним з утворенням комплексів у формі спіральних міцел, причому вказаний антиген

2

присутній у вигляді домішки, але не інкорпорований всередину вказаних міцел.  
2. Вакцинна композиція за п. 1, яка відрізняється тим, що додатково включає придатний для ветеринарії носій.  
3. Вакцинна композиція за п. 2, яка відрізняється тим, що вказаний придатний для ветеринарії носій являє собою емульсію масло-у-воді.  
4. Вакцинна композиція за п. 1, яка відрізняється тим, що вказаний сапоніновий глікозид являє собою тритерпеноїд.  
5. Вакцинна композиція за п. 4, яка відрізняється тим, що вказаний тритерпеноїд являє собою Квіл-А.  
6. Вакцинна композиція за п. 1, яка відрізняється тим, що вказаний стерол являє собою холестерин.  
7. Вакцинна композиція за п. 1, яка відрізняється тим, що вказаний антиген включає вірусний антиген, бактеріальний антиген або комбінацію цих компонентів.  
8. Вакцинна композиція за п. 7, яка відрізняється тим, що вказаний антиген включає антиген бичачого вірусу вірусної діареї (БВД) типу 1 або типу 2.

Даний винахід загалом відноситься до галузі вакцин і, конкретно, стосується ад'ювантних композицій для підсилення імунної реакції у ветеринарних тварин. Конкретно, винахід стосується використання емульсії масло-у-воді як ад'юванту вакцини для підсилення імуногенності антигенів. Даний винахід забезпечує субмікронні композиції емульсії масло-у-воді, композиції вакцин, які містять антиген, інкорпорований в такі емульсії, а також способи виготовлення емульсій та вакцин. Даний винахід також забезпечує композиції, які містять комплекси, утворені сапоніновим глікозидом і стеролом, придатними для використання у вакцинах.

Бактеріальні, вірусні, паразитні та мікоплазматичні інфекції широко розповсюджені у ветеринарних тварин, таких як велика рогата худоба, свині та домашні тварини. Захворювання, спричинені такими інфекційними агентами, часто є резистентними до антимікробної терапії лікарськими засо-

бами, що не залишає ефективних засобів лікування. Тому вакцинологічний підхід все ширше застосовується для контролю інфекційного захворювання у ветеринарних тварин. Цілісний інфекційний патоген може бути зроблений придатним для використання в композиції вакцини після хімічної інактивації або придатної генетичної маніпуляції. Альтернативно, білкова субодиниця патогена може бути експресована в рекомбінантній системі експресії та очищена для використання в композиції вакцини.

В цілому термін "ад'ювант" стосується будь-якого матеріалу, який підсилює гуморальну та/або клітинну імунну реакцію на антиген. Традиційні вакцини складаються з сирого препарату вбитих патогенних мікроорганізмів, і домішки, пов'язані з культурами патологічних мікроорганізмів, можуть діяти як ад'ювант для підсилення імунної реакції. Однак, якщо в ролі антигенів для вакцинації застосовують гомогенні препарати патологічних мікроо-

(13) C2

(11) 89631

(19) UA

організмів або очищені білкові субодиниці, імунітет, спричинений такими антигенами, є слабким і, таким чином, необхідне додавання певних екзогенних матеріалів як ад'юванту. Крім того, виробництво синтетичних та субодиничних вакцин є дорогим. Таким чином, при використанні ад'юванту для стимуляції імунної реакції може бути потрібна менша доза антигену, що дозволяє зменшити собівартість виробництва вакцин.

Відомо, що ад'юванти здійснюють свою дію для підсилення імунної реакції численними різноманітними шляхами. Багато ад'ювантів модифікують цитокінну мережу, пов'язану з імунною реакцією. Такі імуномодулювальні ад'юванти можуть здійснювати свою дію навіть якщо вони не поєднані з антигенами. В цілому імуномодулювальні ад'юванти спричиняють загальну регуляцію вгору деяких цитокінів і супутню регуляцію вниз інших, що веде до клітинної Th1 та/або гуморальної Th2 реакції.

Деякі ад'юванти володіють здатністю зберігати конформаційну суцільність антигену таким чином, що антиген може бути ефективно представлений відповідним імунним ефекторним клітинам. В результаті такого збереження конформації антигену ад'ювантною композицією вакцина буде мати збільшений термін придатності, як це продемонстровано для імуностимулювальних комплексів (ISCOMs). Ozel M., et. al.; Quarternary Structure of the Immunestimulating Complex (Iscom), J. of Ultrastruc. and Molec. Struc. Res. 102, 240-248 (1989).

Деякі ад'юванти володіють здатністю утримувати антиген як депо в місці ін'єкції. В результаті такого депо-ефекту не відбувається швидкої втрати антигену шляхом печінкового кліренсу. Алюмінієві солі та емульсії масло-у-воді діють шляхом такого депо-ефекту для препаратів з короткою тривалістю дії. Наприклад, можна одержати депо тривалої дії з використанням повного ад'юванту Фрейнда (ПФА, FCA), що являє собою емульсію масло-у-воді. ПФА типово залишається в місці ін'єкції до тих пір, поки біологічне розкладання дозволяє вилучення антигену антигенпредставляючими клітинами.

На базі своєї фізичної природи ад'юванти можуть бути згруповані в дві дуже широкі категорії, а саме корпускулярні (корпускулярні) ад'юванти та некорпускулярні (некорпускулярні) ад'юванти. Корпускулярні ад'юванти існують у вигляді мікрочастинок. Імуноген здатний або поєднуватися (інкорпороватися) або зв'язуватися з мікрочастинами. Прикладами корпускулярних ад'ювантів є алюмінієві солі, емульсії вода-у-маслі, емульсії масло-у-воді, імуностимулювальні комплекси, ліпосоми, а також нано- і мікрочастинки. Некорпускулярні ад'юванти загалом являють собою імуномодулятори і звичайно їх використовують в поєднанні з корпускулярними ад'ювантами. Прикладами некорпускулярних ад'ювантів є дипептид мурамілу (компонент з активністю ад'ювантного пептидоглікану, екстрагованого з мікобактерій), неіонні блок-співполімери, Сапоніни (комплексні суміші тритерпеноїдів, екстрагованих з кори дерева *Quillaja saponaria*, Ліпід А (дисахарид глюкозаміну з двома фосфатними залишками і п'ятьма або шістьма

ланцюгами жирних кислот, загалом, довжиною від C12 до C16), цитокіни, вуглеводні полімери, похідні полісахаридів, а також бактеріальні токсини, такі як токсин холери і лабільний токсин (ЛТТ) *E. coli*.

Деякі з добре відомих ад'ювантів являють собою комбінації некорпускулярних імуномодуляторів і корпускулярних матеріалів, які можуть надавати ад'ювантній композиції депо-ефекту. Наприклад, ПФА поєднує імуномодулювальні властивості компонентів *Mycobacterium tuberculosis* разом з короткостроковим депо-ефектом масляних емульсій.

Масляні емульсії використовують протягом тривалого часу як ад'юванти для вакцин. Le Moignic та Pinoy в 1916р. виявили, що суспензія вбитих мікроорганізмів *Salmonella typhimurium* в мінеральному маслі підсилює імунну реакцію. Далі в 1925р. Ramon описав крохмальну олію (starch oil) як одну з речовин, що підсилюють антитоксичну реакцію на дифтерійний анатоксин. Однак масляні емульсії не набували поширення до 1937р., коли Фрейнд ввів у використання свою ад'ювантну композицію, відому як Повний Ад'ювант Фрейнда (ПФА). ПФА являє собою емульсію вода-у-маслі, яка складається з мінерального (парафінового) масла, змішаного з вбитими мікобактеріями та Арлацелом А (Arlacel A). Арлацел А являє собою, в основному, маніту моноолеат і використовується як емульгуючий агент. Хоча ПФА володіє чудовими властивостями з точки зору викликання імунної реакції, його введення спричиняє сильний біль, утворення абсцесу, гарячку та гранулематозне запалення. Для уникнення таких небажаних побічних реакцій було створено Неповний Ад'ювант Фрейнда (НАФ). За складом НАФ подібний до ПФА, за винятком відсутності мікобактеріальних компонентів. НАФ діє шляхом утворення депо в місці ін'єкції і повільного вивільнення антигену із стимуляцією продукуючих антитіла клітин.

Інший підхід до вдосконалення ПФА базувався на спостереженнях щодо того, що заміна мінерального масла на біологічно сумісне масло допомагає усунути пов'язані з ПФА реакції в місці ін'єкції. Також вважалося, що емульсія повинна бути швидше типу масло-у-воді, ніж вода-у-маслі, оскільки остання утворює депо довгострокової дії в місці ін'єкції. Hilleman із співавт. описали ад'ювант на базі масла "Ад'ювант 65" ("Adjuvant 65"), який складається з 86% арахісового масла, 10% Арлацела А як емульгатора і 4% алюмінію моностеарату як стабілізатора. Hilleman, 1966, Prog. Med. Virol. 8: 131-182; Hilleman and Beale, 1983, в New Approaches to Vaccine Development (Eds. Bell, R. and Torrigiani, G.), Schwabe, Basel. У людей Ад'ювант 65 був безпечним і потужним, але виявляв менш виражені ад'ювантні властивості, ніж НАФ. В будь-якому випадку, використання Ад'юванту 65 було припинено внаслідок реактогенності певних серій вакцин у людей і зниження ад'ювантних властивостей при використанні очищеного або синтетичного емульгатора замість Арлацела А. У Патентах США 5,718,904 та 5,690,942 вказано, що мінеральне масло в емульсії масло-у-воді може бути замінено на масло, яке піддається метаболізму, з метою покращення профілю безпечності.

Окрім ад'ювантних властивостей і безпечності важливою з комерційної точки зору властивістю є зовнішній вигляд емульсії. Зовнішній вигляд залежить від стабільності емульсії. Відшаровування, осадження та злиття є показниками нестабільності емульсії. Відшаровування виникає, коли масляна і водна фази емульсії мають різну питому вагу. Відшаровування також виникає, коли початковий розмір краплинок емульсії є великим і краплинки емульсії не приймають участі в броунівському русі. Якщо розмір краплинок є великим, існує тенденція до міжфазового розриву і краплинки зливаються у частинки великого розміру. Стабільність емульсії визначається численними факторами, такими як природа та кількість використаного емульгатора, розмір краплинок в емульсії та різниця в щільності між масляною і водною фазою.

Емульгатори сприяють стабілізації диспергованої краплинки шляхом зменшення вільної міжфазової поверхневої енергії та створення фізичних або електростатичних бар'єрів до з'єднання краплинок. Як емульгатори використовують неіонні, а також іонні детергенти. Неіонні емульгатори орієнтовані до межі фаз та утворюють відносно об'ємисті структури, які ведуть до стеричного ухилення диспергованих краплинок. Аніонні або катіонні емульгатори індукують утворення подвійного електростатичного шару шляхом притягнення протіонів; відштовхувальні сили подвійного шару примушують краплинки при зближенні відштовхувати одна одну.

Окрім використання емульгаторів стабільність емульсії також може бути досягнута шляхом зменшення розміру краплинки емульсії механічними засобами. Для виробництва емульсій типово використовують пропелерні міксери, турбінні ротори, колоїдні млини, гомогенізатори та ультразвукові апарати. Мікрофлюїдизація являє собою інший шлях підвищення гомогенності розміру краплинок в емульсії. Мікрофлюїдизація може утворювати витончену, фізично стабільну емульсію з систематичним розміром частинок в субмікронному інтервалі. Окрім підвищення стабільності емульсії процес мікрофлюїдизації дозволяє здійснити кінцеву фільтрацію, яка є переважним шляхом забезпечення стерильності кінцевого продукту. Більше того, субмікронні частинки масла можуть проходити від місця ін'єкції в лімфатичну систему і далі до лімфатичних вузлів дренажного ланцюга, кров та селезінку. Це зменшує ймовірність утворення масляного депо в місці ін'єкції, яке може спричинити місцеве запалення і значну реакцію в місці ін'єкції.

На сьогоднішній день мікрофлюїдизатори є комерційно доступними. Утворення емульсії здійснюється у мікрофлюїдизаторі з використанням двох флюїдизованих потоків, які взаємодіють на високих швидкостях в камері взаємодії. Робота мікрофлюїдизатора здійснюється за рахунок повітря або азоту і він може працювати при значеннях внутрішнього тиску з надлишком 20000 фунт/дюйм<sup>2</sup>. Патент США 4,908,154 розкриває використання мікрофлюїдизатора для одержання емульсій, істотною мірою вільних від емульгуючих агентів.

Численні субмікронні ад'ювантні композиції масло-у-воді розкриті в літературі. Патент США

5,376,369 розкриває субмікронну ад'ювантну композицію у вигляді емульсії масло-у-воді, відому як Ад'ювантна Композиція Синтакс (Syntax Adjuvant Formulation, САК). САК містить як масляний компонент сквален або сквалан, і придатний для утворення емульсії кількості Pluronic L121 (поліоксипропілен-поліоксиетилен) блок-співполімера та імунопотенціювальну кількість дипептиду мурамілу. Сквален являє собою лінійний вуглеводневий прекурсор холестерину, знайдений в багатьох тканинах, особливо в печінці акул та інших риб. Сквалан одержують шляхом гідрогенізації сквалену і він являє собою повністю насичену сполуку. Сквален і сквалан можуть метаболізуватися і демонструють сприятливі показники по результатам токсикологічних досліджень. Емульсії сквалену або сквапану використовували в протиракових вакцинах для людини, які продемонстрували легкі побічні ефекти і бажану ефективність. Див., наприклад, Anthony C. Allison, 1999, Squalene and Squalane emulsions as adjuvants, Methods 19:87-93.

У Патенті США 6,299,884 та міжнародній патентній заявці WO 90/14837 вказано, що поліоксипропілен-поліоксиетилен блок-співполімери не є суттєвими для утворення субмікронної емульсії масло-у-воді. Більше того, вказані посилення розкривають використання нетоксичного масла, яке метаболізується, та виразно виключають використання в розкритих рецептурах емульсій мінерального масла і токсичних масел, одержаних в результаті перегонки нафти.

Патент США 5,961,970 розкриває іншу субмікронну емульсію масло-у-воді для застосування в ролі ад'юванту вакцини. В емульсії, описаній в даному патенті, гідрофобний компонент вибирають з групи, яка складається з тригліцеридного масла з середньою довжиною ланцюга, рослинної олії та їхньої суміші. Включена до цієї емульсії поверхнево-активна речовина може бути природною біологічно сумісною поверхнево-активною речовиною, такою як фосфоліпід (наприклад, лецитин), або фармацевтично прийнятною синтетичною поверхнево-активною речовиною, такою як Твін-80. Вказаний патент також розкриває інкорпорування антигену в емульсію під час утворення емульсії, на протилежність змішуванню антигену з емульсією після того, як емульсія була незалежно та зовнішньо утворена.

В Патенті США 5,084,269 вказано, що ад'ювантна композиція, яка містить лецитин в комбінації з мінеральним маслом, спричиняє зменшення подразнення у тварини-хазяїна і одночасно індукує підвищений системний імунітет. Ад'ювантна композиція за Патентом США 5,084,269 застосовується на комерційних засадах у ветеринарних вакцинах під торгівельною назвою Амфіген (AMPHIGEN®). Рецепт Амфігену утворена міцелами - масляними краплинками, оточеними лецитином. Вказані міцели дозволяють приєднання більшої кількості антигенів суцільних клітин, ніж традиційні ад'юванти на базі масла. Більше того, комбінації вакцин на базі Амфігену містять малу кількість масла (2,5-5% мінерального масла) в порівнянні з іншими препаратами вакцин, які містять масляні ад'юванти, де вміст масла типово становить від 10% до 20%. Низький вміст масла

веде до зменшення подразнення тканин в місці ін'єкції таким вакцинним препаратом на базі ад'юванту, що веде до меншої кількості уражень і меншого TRIM AT SLAUGHTER. Крім того, лецитинове покриття, яке оточує масляні краплинки, додатково зменшує реакції в місці ін'єкції, що дозволяє одержати вакцину, яка є безпечною і водночас ефективною.

Препарат Амфіген використовується як ад'ювант в численних ветеринарних вакцинах, і, таким чином, існує потреба у збереженні зовнішнього вигляду вакцинного продукту під час короткочасних і тривалих періодів зберігання, а також під час розбавлення. Крім того, ліофілізований антиген змішують з попередньою виготовленою ад'ювантною композицією безпосередньо перед ін'єкцією. Така практика не завжди забезпечує однорідний розподіл антигену в емульсії масло-у-воді, внаслідок чого зовнішній вигляд емульсії може бути незадовільним. Крім того, при стоянні може відбуватися розділення фаз попередньо гомогенізованої емульсії. Таким чином, існує потреба у стабільній ад'ювантній композиції, в якій при тривалому зберіганні не відбувається розділення фаз. Одним із способів запобігання розділенню фаз є зменшення розміру краплинок та збільшення гомогенності частинок в емульсії. Хоча спосіб мікрофлюїдизації емульсійних препаратів на базі масла, що метаболізується, описаний, до цього часу мікрофлюїдизація емульсій масло-у-воді, таких як препарат Амфіген, не здійснювалася.

В даному винаході мікрофлюїдизація застосовується для створення оточених лецитином краплинок мінерального масла субмікронних розмірів. Винахідниками було несподівано виявлено, що мікрофлюїдизація композицій вакцин з ад'ювантом у вигляді емульсії масло-у-воді, що включає суміш лецитину і масла, не тільки покращує зовнішній вигляд препаратів, але також підсилює імунізуючу дію препаратів. Мікрофлюїдизовані препарати також характеризуються покращеним профілем безпечності.

Винахідниками було несподівано виявлено, що ад'ювантна активність і профіль безпечності емульсій масло-у-воді на базі масла, що не метаболізується, можуть бути покращені шляхом мікрофлюїдизації. Антигени, інкорпоровані у мікрофлюїдизовані емульсії, є стабільними навіть, якщо антигени внутрішньо введені в емульсії до мікрофлюїдизації.

Відповідно, в одному варіанті даний винахід забезпечує препарат субмікронної емульсії масло-у-воді, корисний як ад'ювант для вакцини. Субмікронні емульсії масло-у-воді за даним винаходом складаються з масла, що не метаболізується, що-найменше однієї поверхнево-активної речовини і водного компонента, причому масло дисперговане у водному компоненті з середнім розміром краплинки масла в субмікронному інтервалі. Переважним маслом, що не метаболізується, є легке мінеральне масло. Переважні поверхнево-активні речовини включають лецитин, Твін-80 (TWEEN®-80) і Спан-80 (SPAN®-80).

Переважаюча емульсія масло-у-воді за даним винаходом має рецептуру препарату Амфіген.

Емульсії масло-у-воді за даним винаходом можуть включати додаткові компоненти, які є придатними і бажаними, в тому числі консерванти, осмотичні агенти, біоадгезивні молекули та імуностимулювальні молекули. Переважні імуностимулювальні молекули включають, наприклад, Квіл-А (Quil A), холестерин, GPI-100, диметилдіоктадециламонію бромід (DDA).

В іншому варіанті даний винахід забезпечує способи одержання субмікронної емульсії масло-у-воді. У відповідності до даного винаходу різні компоненти емульсії, в тому числі масло, одну або більше поверхнево-активних речовин, водний компонент та будь-який інший компонент, придатний для використання в емульсії, змішують разом. Суміш піддають процесу первинного емульгування з утворенням емульсії масло-у-воді, яку далі пропускають крізь мікрофлюїдизатор з одержанням емульсії масло-у-воді, що містить краплинки діаметром менше 1мкм, переважно з середнім розміром краплинки менше 0,5мкм.

В іншому варіанті даний винахід забезпечує композиції вакцин, які містять антиген та субмікронну емульсію масло-у-воді, раніше описану в даному описі. Антиген введений в емульсію зовнішньо або внутрішньо, переважно, внутрішньо.

Антиген, який може бути включений в композиції вакцин за даним винаходом, може бути бактеріальним, грибовим або вірусним антигеном, або їхньою комбінацією. Антиген може набувати форми інактивованої суцільної клітини або її частини або препарату вірусу або форми антигенних молекул, одержаних шляхом традиційного очищення білку, генно-інженерними способами або хімічним синтезом.

Ще в одному варіанті даний винахід забезпечує способи одержання вакцинних композицій, які містять антиген або антигени, поєднані з субмікронною-емульсією масло-у-воді.

В процесі виготовлення вакцинних композицій за даним винаходом антиген(и) може бути поєднаний внутрішньо (наприклад, до мікрофлюїдизації) або зовнішньо (наприклад, після мікрофлюїдизації) з компонентами емульсії масло-у-воді. Переважно, антиген поєднують з компонентами емульсії масло-у-воді внутрішньо.

В іншому варіанті даний винахід забезпечує вакцинні композиції, які містять мікроінкапсульований антиген і субмікронну емульсію масло-у-воді, описану вище в даному описі, де мікроінкапсульований антиген поєднаний з емульсією зовнішньо.

Також несподівано було виявлено, що сапонін і стерол при поєднанні в розчині зв'язуються один з одним з утворенням комплексів у формі спіральних міцел. У відповідності до даного винаходу вказані спіральні міцели здійснюють імуностимулювальну дію і є особливо корисними як ад'юванти у композиціях вакцин.

Відповідно, даний винахід забезпечує композиції вакцин, які містять сапонін і стерол, де сапонін і стерол утворюють комплекси у формі спіральних міцел. Даний винахід також забезпечує композиції з вмістом сапоніну, стеролу та антигену, де сапонін і стерол утворюють комплекси у формі спіральних міцел і де антиген попередньо

змішаний із спіральними міцелами, але не інкорпорований в них.

На Фігурі 1 зображено процес виготовлення серії не мікрофлюїдизованих композицій вакцин. В цьому процесі різні компоненти вакцини додають в судину для додавання (зліва) і, кінець кінцем, за допомогою насоса перекачують в судину для змішування, де компоненти змішуються за допомогою простих механічних засобів.

На Фігурі 2 зображено процес виготовлення мікрофлюїдизованих композицій вакцин, які містять внутрішньо інкорпорований антиген. Різні компоненти вакцини додають до судини для додавання і переміщують у вузол для перед-емульсійного змішування для змішування за допомогою простих механічних засобів. Далі емульсію пропускають крізь мікрофлюїдизатор та збирають в пост-мікрофлюїдизаційній камері.

На Фігурі 3 зображено розподіл розміру краплинок не мікрофлюїдизованої вакцини на базі препарату Амфіген, мікрофлюїдизованої вакцини на базі препарату Амфіген, а також апаратного перемішування (bench blend) препарату/виготовлення вакцини.

Фігура 4 демонструє відсутність розділення фаз в мікрофлюїдизованому препараті вакцини.

На Фігурі 5 зображено порівняння стабільності антигенів, внутрішньо інкорпорованих в мікрофлюїдизований препарат вакцини на базі препарату Амфіген (A907505) і трьох контрольних, не мікрофлюїдизованих препаратах вакцин на базі препарату Амфіген (A904369, A904370 та A904371). Всі чотири препарати вакцин зберігали при 4°C протягом двох років. В різні періоди зберігання (0, 6, 12 і 24 місяці) всі чотири препарати використовували для вакцинації корів віком 3 місяці. Вакцинацію здійснювали в дні 0 і 21 з введенням 2мл вакцини та сироватку збирали через 2 тижні після другої вакцинації. Титр нейтралізуючих антитіл до вірусу БВД типу II визначали в кожному із зразків сироватки. Дані представлені як геометричне середнє значення для 5 тварин.

На Фігурі 6 представлені визначені за методом найменших квадратів середні значення ректальної температури великої рогатої худоби до і після введення мікрофлюїдизованих і не мікрофлюїдизованих вакцин. T01: група плацебо, одна доза; T02: група плацебо - подвійна доза; T03: не мікрофлюїдизований препарат - одна доза; T04: не мікрофлюїдизований препарат - подвійна доза; T05: мікрофлюїдизований препарат - одна доза; T06: мікрофлюїдизований препарат - подвійна доза.

На Фігурі 7 показані виміряні за методом найменших квадратів середні значення обсягу реакції в місці ін'єкції, яка спостерігалася у великої рогатої худоби після введення не мікрофлюїдизованих і мікрофлюїдизованих вакцинних препаратів. T03: не мікрофлюїдизований препарат - одна доза; T04: не мікрофлюїдизований препарат - подвійна доза; T05: мікрофлюїдизований препарат - одна доза; T06: мікрофлюїдизований препарат - подвійна доза.

На Фігурі 8 показані геометричні середні значення титрів IgG для рекомбінантного антигену PauA з *Streptococcus uberis* після вакцинації різни-

ми препаратами вакцин, які містили рекомбінантний антиген PauA і антиген суцільних клітин *E. coli*.

На Фігурі 9 показані геометричні середні значення титрів IgG для антигену суцільних клітин *E. coli* з *Streptococcus uberis* після вакцинації різними препаратами вакцин, які містили рекомбінантний антиген PauA і антиген суцільних клітин *E. coli*.

На Фігурі 10A і 10B показаний розподіл розміру частинок в препараті мікрофлюїдизованого Амфігену після виготовлення (Фігура 10A) і через 22 місяці після виготовлення (Фігура 10B).

Фігура 11 являє собою фотографію, зроблену за допомогою електронного мікроскопу, на якій показані спіральні міцели, утворені довгими міцелами Квіл-А і кристалами холестерину.

Фігура 12 являє собою фотографію, зроблену за допомогою електронного мікроскопу, на якій показані спіральні імуногенні комплекси, утворені Квіл-А і холестерином на поверхні антигену БВД типу I.

Винахідниками несподівано було виявлено, що мікрофлюїдизація препаратів вакцин, які містять ад'ювант у вигляді емульсії масло-у-воді, що включає суміш лецитину і мінерального масла, не тільки покращує зовнішній вигляд препаратів вакцин, але також підсилює імунізувальну дію препаратів вакцин. Мікрофлюїдизовані препарати вакцин також характеризуються покращеним профілем безпечності.

На базі вказаних відкриттів даний винахід забезпечує субмікронні емульсії масло-у-воді, корисні як ад'юванти в композиціях вакцин. Також забезпечуються способи виготовлення вказаних субмікронних емульсій масло-у-воді з використанням мікрофлюїдизатора. Крім того, даний винахід забезпечує субмікронні композиції вакцин, в яких антиген поєднаний із субмікронною емульсією масло-у-воді. Також забезпечені способи виготовлення таких композицій вакцин. Даний винахід також забезпечує композиції вакцин, які містять мікроінкапсульовані антигени, поєднані з субмікронною емульсією масло-у-воді, і способи виготовлення таких вакцин.

З метою ясності розкриття, а не з метою обмеження, детальний опис винаходу розділений на наступні підрозділи, які описують або ілюструють деякі особливості, варіанти або застосування винаходу.

Субмікронні емульсії масло-у-воді

В одному варіанті даний винахід забезпечує препарати субмікронних емульсій масло-у-воді, корисні як ад'юванти вакцин. Субмікронні емульсії масло-у-воді за даним винаходом підсилюють імуногенність антигену у вакцинних композиціях, є безпечними для введення тваринам і стабільними в процесі зберігання.

Субмікронні емульсії масло-у-воді за даним винаходом складаються з масла, яке не піддається метаболізму, щонайменше однієї поверхнево-активної речовини та водного компонента, причому масло дисперговане у водному компоненті із середнім розміром краплинок масла в субмікронному інтервалі.

Термін "субмікронний" означає, що розмір краплинок є меншим за 1мкм (мікрон) і середній розмір краплинок масла є меншим за 1мкм. Переваж-

но середній розмір краплинок в емульсії менше 0,8мкм; більш переважно менше 0,5мкм; і навіть більше переважно, менше 0,4мкм або знаходиться в інтервалі приблизно 0,1-0,3мкм.

"Середній розмір краплинок" визначається як Середній Об'ємний Діаметр (СОД) розміру частинок в об'ємі розподілу розмірів частинок. СОД розраховується шляхом помноження діаметру кожної частинки на об'єм всіх частинок такого розміру з наступною сумацією. Далі одержане число ділять на загальний об'єм всіх частинок.

Термін "масло, яке не піддається метаболізму" в даному описі означає масла, що не можуть бути метаболізовані організмом тварини, якій вводять емульсію.

Терміни "тварина і тваринний суб'єкт" в даному описі стосуються всіх не-гуманоїдних тварин, в тому числі, наприклад, великої рогатої худоби, овець та свиней.

Масла, які не піддаються метаболізму, придатні для використання в емульсіях за даним винаходом, включають алкани, алкени, алкіни та відповідні кислоти і спирти, їхні ефіри та естери та суміші вказаних компонентів. Переважно, окремі сполуки в маслі являють собою легкі вуглеводневі сполуки, тобто, компоненти, які включають 6-30 атомів вуглецю. Масло може бути одержане синтетичним шляхом або очищене з продуктів нафтопереробки. Переважні масла, які не піддаються метаболізму, для використання в емульсіях за даним винаходом включають, наприклад, мінеральне масло, парафінове масло і циклопарафіни.

Термін "мінеральне масло" означає суміш рідких вуглеводнів, одержаних з нафти за допомогою техніки перегонки. Термін є синонімічним до терміну "рідкий парафін", "рідкий вазелін" та "біле мінеральне масло". Термін також охоплює "рідке мінеральне масло", тобто масло, яке одержують простою перегонкою вазеліну, але яке має дещо меншу питому вагу, ніж біле мінеральне масло. Див., наприклад Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Edition (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1990, стор. 788 та 1323). Мінеральне масло може бути отримане з різних комерційних джерел, наприклад J. T. Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH).

Переважне мінеральне масло являє собою легке мінеральне масло, комерційно доступне під назвою Дракеол (DRAKEOL®).

Типово, масляний компонент субмікронних емульсій за даним винаходом присутній в кількості від 1% до 50% по об'єму; переважно, в кількості від 10% до 45%; більш переважно, в кількості від 20% до 40%.

Емульсії масло-у-воді за даним винаходом типово включають щонайменше одну (тобто, одну або більше) поверхнево-активних речовин. Поверхнево-активні речовини являють собою емульгатори, причому в даному описі зазначені терміни застосовуються взаємозамінним чином і є агентами, які стабілізують поверхню краплинок масла та підтримують бажаний розмір краплинок масла.

Поверхнево-активні речовини, придатні для використання в емульсіях за даним винаходом, включають природні біологічно сумісні поверхнево-активні речовини і синтетичні поверхнево-

активні речовини, які не зустрічаються у природі. Біологічно сумісні поверхнево-активні речовини включають фосфоліпідні сполуки або суміші фосфоліпідів. Переважними фосфоліпідами є фосфатидилхоліні (лецитин), наприклад, соєвий або яєчний лецитин. Лецитин може бути одержаний у вигляді суміші фосфатидів і тригліцеридів шляхом промивання водою сирих рослинних олій та відокремлення і сушки утворених гідратованих смол. Очищений продукт може бути одержаний шляхом фракціонування суміші на нерозчинні в ацетоні фосфоліпіди та гліколіпіди, які залишаються після витягання тригліцеридів та рослинної олії шляхом промивання ацетоном. Альтернативно, лецитин може бути одержаний з різних комерційних джерел. Інші придатні фосфоліпіди включають фосфатидилгліцерин, фосфатидилінозитол, фосфатидилсерин, фосфатидинову кислоту, кардіоліпін і фосфатидилетаноламін. Фосфоліпіди можуть бути виділені з природних джерел або синтезовані за традиційними методиками.

Синтетичні поверхнево-активні речовини, які не зустрічаються в природі, придатні для використання в субмікронних емульсіях за даним винаходом, включають неіонні поверхнево-активні речовини на базі сорбітану, тобто, поверхнево-активні речовини на базі сорбітану, заміщеного жирними кислотами (комерційно доступні під назвою Спан (SPAN®) або Арлацел (ARLACEL®)), естери жирних кислот і поліетоксильованого сорбіту (Твін, TWEEN®), естери поліетиленгліколю та жирних кислот з таких джерел, як рицинова олія (EMULFOR), поліетоксильовані жирні кислоти (наприклад, стеаринова кислота, доступна під назвою SIMULSOL M-53), поліетоксильований полімер ізооктилфенолу/формальдегіду (TYLOXAPOL), поліоксietiленові ефіри жирних спиртів (BRIJ®), нонфенілові ефіри поліоксietiлену (TRITON® N), ізооктилфенілові ефіри поліоксietiлену (TRITON® X). Переважні синтетичні поверхнево-активні речовини являють собою поверхнево-активні речовини, присутні на ринку під назвою SPAN® та TWEEN®.

Переважні поверхнево-активні речовини для використання в емульсіях масло-у-воді за даним винаходом, являють собою, не обмежуючись ними, лецитин, Твін-80 і Спан-80.

Загалом кажучи, поверхнево-активна речовина або комбінація поверхнево-активних речовин, якщо використовують дві або більше поверхнево-активних речовин, присутня в емульсії в кількості від 0,01% до 10% по об'єму, переважно, від 0,1% до 6,0%, більш переважно, від 0,2% до 5,0%.

Водний компонент включає безперервну фазу емульсії і може являти собою воду, буферизований сольовий розчин або будь-який інший придатний водний розчин.

Емульсії масло-у-воді з даним винаходом можуть включати додаткові компоненти, які є придатними і бажаними, в тому числі консерванти, осмотичні агенти, біоадгезивні молекули та імуностимулювальні молекули.

Вважається, що біоадгезивні молекули можуть підсилювати доставку і приєднання антигенів до цільової поверхні слизової оболонки або крізь неї, забезпечуючи імунітет слизової оболонки. Прик-

лади придатних біоадгезивних молекул включають кислотні полімери, які не зустрічаються в природі, такі як поліакрилова кислота і поліметакрилова кислота (наприклад, CARBOPOL® CARBOMER); кислотні синтетично модифіковані природні полімери, такі як карбоксиметилцелюлоза; нейтральні синтетично модифіковані природні полімери, такі як (гідроксипропіл)метилцелюлоза; основні полімери, які несуть аміногрупи, такі як хітозан; кислотні полімери, одержані з природних джерел, такі як альгінова кислота, гіалуронова кислота, пектин, трагакантова камедь і камедь карайї; а також нейтральні полімери, які не зустрічаються в природі, такі як полівініловий спирт; або комбінації вказаних компонентів.

Фраза "імуностимулювальні молекули" в даному описі означає такі молекули, які підсилюють захисну імунну реакцію, спричинену антигенним компонентом у вакцинних композиціях. Придатні імуностимулювальні матеріали включають компоненти стінки бактеріальної клітини, наприклад, похідні N-ацетил-мураміл-L-аланіл-D-ізоглутаміну, такі як мурабітид, треоніл-MDP і мурамилу трипептид; сапонінові глікозиди та їхні похідні, наприклад, Квіл-А, QS 21 і GPI-0100; холестерин; і четвертинні амонієві сполуки, наприклад, диметилдіоктадециламонію бромід (ДДА) та N,N-діоктадецил-N,N-біс-(2-гідроксиетил)-пропандіамін ("авридин").

Сапоніни являють собою глікозидні сполуки, які утворюються як вторинні метаболіти в різноманітних видах рослин. Хімічна структура сапонінів обумовлює широкий спектр фармакологічної та біологічної активності, в тому числі деякі потужні та ефективні види імунологічної активності.

З структурної точки зору сапоніни складаються з аглікона, приєднаного до одного або більше ланцюгів цукрів. Сапоніни можуть бути класифіковані у відповідності до складу аглікона: тритерпенові глікозиди, стероїдні глікозиди і стероїдно-апкалоїдні глікозиди.

Сапонін може бути виділений з кори *Quillaja saponaria*. Довгий час сапонін був відомий як імуностимулятор. Dalsgaard, K., "Evaluation of its adjuvant activity with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease", *Acta. Vet. Scand.* 69: 1-40, 1978. Сирі екстракти рослин, які містять сапонін, підсилюють потужність вакцин проти захворювання на ящури. Однак, сирі екстракти при застосуванні у вакцинах супроводжувалися небажаними побічними ефектами. Отже, Dalsgaard частково очищував ад'ювантний активний компонент від сапоніну шляхом діалізу, іонного обміну та гел'фільтраційною хроматографією. Dalsgaard, K. et al., "Saponin adjuvants III. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Molina with adjuvant activity in foot-and-mouth disease vaccines", *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 44: 243-254, 1974. Ад'ювантний активний компонент, очищений таким способом, відомий як Квіл-А ("Quil A"). В перерахунку на масу Квіл-А демонстрував підвищену потужність та демонстрували зменшення місцевих реакцій в порівнянні з сирим сапоніном. Квіл-А широко застосовується у ветеринарних вакцинах.

Подальший аналіз Квіл-А за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) ви-

явив гетерогенну суміш тісно споріднених сапонінів і призвів до відкриття QS21, який був потужний ад'ювантом із зниженою або мінімальною токсичністю. Kensil C.R. et al., "Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex," *J. Immunol.* 146: 431-437, 1991. На відміну від більшості інших імуностимуляторів, QS21 є водорозчинним і може використовуватися у вакцинах з препаратами емульсійного типу або без них. Показано, що QS21 викликає реакцію типу Th1 у мишей, стимулюючи вироблення антитіл IgG2a та IgG2b, а також індукованих антиген-специфічних CD8+CTL (MHC клас I) у відповідь на субодиночні антигени. Клінічні дослідження за участю людей показали його ад'ювантні властивості з прийнятним токсикологічним профілем. Kensil, C.R. і інші, "Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21. In Vaccine Design: the subunit and Adjuvant Approach," Eds. Powell, M.F. and Newman, M. J. Plenum Publishing Corporation, New York. 1995, pp. 525-541.

Патент США 6,080,725 розкриває способи виготовлення та застосування сапонін-ліпофільного кон'югату. У вказаному сапонін-ліпофільному кон'югаті ліпофільний залишок, такий як ліпід, жирна кислота, поліетиленгліколь або терпен ковалентно приєднаний до не-ацильованого або деацильованого тритерпенового сапоніну через карбоксильну групу, присутню на 3-О-глюкуроновій кислоті тритерпенового сапоніну. Приєднання ліпофільного залишку до 3-О-глюкуронової кислоти сапоніну, такого як деацилсапонін *Quillaja*, люціозид Р або сапонін з *Gypsophila saponaria* та *Acanthophyllum* підсилює їхні ад'ювантні властивості по відношенню до гуморального та клітинно-опосередкованого імунітету. Крім того, приєднання ліпофільного фрагмента до залишку 3-О-глюкуронової кислоти неацильованого або деацильованого сапоніну дає сапоніновий аналог, який краще піддається очищенню, є менш токсичним, більш стабільним з хімічної точки зору і володіє рівними або більш вираженими ад'ювантними властивостями, ніж початковий сапонін.

GPI-0100 являє собою сапонін-ліпофільний кон'югат, описаний в Патенті США 6,080,725. GPI-0100 утворюють шляхом додавання аліфатичного аміну до деацилсапоніну через карбоксильну групу глюкуронової кислоти.

Четвертинні амонієві сполуки. Численні аліфатичні азотисті основи запропоновані до застосування як імунологічні ад'юванти, в тому числі аміни, четвертинні амонієві сполуки, гуанідини, бензамідини і тіоуронії. Конкретно такі сполуки включають диметилдіоктадециламонію бромід (ДДА) і N,N-діоктадецил-N,N-біс-(2-гідроксиетил)пропандіамін ("авридин").

Патент США 5,951,988 розкриває ад'ювантний препарат з вмістом четвертинних амонієвих солей, таких як ДДА, в поєднанні з масляним компонентом. Такий препарат є корисним в поєднанні з відомими імунологічними речовинами, наприклад, вірусними або бактеріальними антигенами у вакцинній композиції, з метою підсилення імуногенної відповіді. Композиція також є корисною без інкор-

порованого антигену, як неспецифічний імуностимулювальний препарат.

В Патенті США 4,310,550 описано застосування N,N-вищого алкіл-N,N'-біс(2-гідроксиетил)-пропандіаміну та N,N-вищих алкіл-ксилілендіамінів, поєднаних з жирною або ліпідною емульсією як ад'ювантом вакцини. Спосіб викликання або підсилення імуногенної реакції на антиген у людини або тварини шляхом парентерального введення ад'ювантного препарату описано в Патенті США 4,310,550.

В переважному варіанті даний винахід забезпечує субмікронну емульсію масло-у-воді, корисну як ад'ювант вакцини, яка складається з препарату Амфіген з краплинками розміром менше 1мкм і середнім розміром краплинок приблизно 0,25мкм.

Термін "препарат Амфіген" в даному описі означає розчин, утворений шляхом змішування лецитиново-масляного розчину Дракеол (DRAKEOL®) (Hydronics, Lincoln, NE) з сольовим розчином в присутності Твіну-80 і Спану-80. Типовий препарат Амфіген містить 40% легкого мінерального масла (об./об.), приблизно 25% (мас./об.) лецитину, приблизно 0,18% Твіну 80 (об./об.) і приблизно 0,08% Спану 80 (об./об.).

Способи виготовлення субмікронних емульсій масло-у-воді

В іншому варіанті даний винахід забезпечує способи виготовлення описаних вище субмікронних емульсій масло-у-воді.

У відповідності до даного винаходу різні компоненти емульсії, в тому числі масло, одна або більше поверхнево-активних речовин, водний компонент та будь-який інший компонент, придатний для використання в емульсії, поєднують і змішують.

Утворену суміш піддають емульгації, типово шляхом пропускання один або більше разів через один або більше гомогенізаторів або емульгаторів з утворенням емульсії масло-у-воді, яка має однорідний зовнішній вигляд та середній розмір краплинок приблизно 0,5мкм. Для цієї мети може бути використаний будь-який присутній на ринку гомогенізатор або емульгатор, наприклад, емульгатор Ross (Hauppauge, NY), гомогенізатор Gaulin (Everett, MA).

Утворену таким чином емульсією далі піддають мікрофлюїдизації для доведення розміру краплинок до субмікронних значень. Мікрофлюїдизація може бути здійснена шляхом використання комерційного мікрофлюїдизатора, такого як модель номер 110Y, доступна від Microfluidics, Newton, Mass; модель Gaulin 30CD (Gaulin, Inc., Everett, MASS); і Rainnina Minilab тип 8,30H (Micro Atomizer Food and Dairy, Inc., Hudson, Wis.). Вказані мікрофлюїдизатори здійснюють свою дію, примушуючи рідину проходити крізь малі отвори під високим тиском, таким чином, що два струмені рідини взаємодіють при високих швидкостях в камері взаємодії з утворенням емульсії з краплинками субмікронного розміру.

Розмір краплинок може бути визначений за допомогою різноманітних способів, відомих з рівня техніки, таких як лазерна дифракція, шляхом використання присутніх на ринку інструментів для визначення розміру. Розмір може варіювати в за-

лежності від типу поверхнево-активної речовини, співвідношення поверхнево-активна речовина/масло, робочого тиску, температури і т. п. Спеціаліст в даній галузі може визначити бажану комбінацію зазначених параметрів для одержання емульсії з бажаним розміром краплинок без зайвого експериментування. Краплинки емульсії за даним винаходом мають діаметр менше 1мкм, переважно, з середнім розміром краплинки менше 0,8мкм і, більш переважно, з середнім розміром краплинки менше 0,5мкм, і навіть більш переважно, з середнім розміром краплинки менше 0,3мкм.

В переважному варіанті даного винаходу масляний розчин лецитину Дракеол, який є комерційно доступним від Hydronics (Lincoln, NE) і містить 25% лецитину в легкому мінеральному маслі, поєднують і змішують з сольовим розчином, а також поверхнево-активними речовинами Твін-80 і Спан-80 з утворенням "розчину Амфіген" або "препарату Амфіген". Далі розчин Амфіген емульгують за допомогою емульгатора Ross® (Hauppauge, NY 11788) при швидкості приблизно 3400об./хв для утворення емульсії масло-у-воді. Далі емульсію пропускають один раз крізь мікрофлюїдизатор з робочими значеннями тиску приблизно 4500±500фунт/дюйм<sup>2</sup>. Розмір краплинок в мікрофлюїдизованій емульсії масло-у-воді є меншим за 1мкм, із середнім розміром краплинок приблизно 0,25мкм.

Вакцинні композиції з вмістом антигенів, введених в субмікронні емульсії масло-у-воді

В іншому варіанті даний винахід забезпечує вакцинні композиції, які містять антиген(и) і описану вище субмікронну емульсію масло-у-воді. Вказані вакцинні композиції характеризуються підсиленою імуногенною дією та покращеним зовнішнім виглядом (наприклад, після тривалого періоду зберігання не відбувається розділення фаз). Крім того, вакцинні композиції за даним винаходом є безпечними при введенні тваринам.

У відповідності до даного винаходу антиген може бути поєднаний з емульсією зовнішньо або, переважно, внутрішньо. Термін "внутрішньо" стосується процесу, коли антиген поєднують з компонентами емульсії до стадії мікрофлюїдизації. Термін "зовнішньо" стосується процесу, коли антиген додають до емульсії після мікрофлюїдизації емульсії. Зовнішньо доданий антиген може бути вільним антигеном або він може бути інкапсульований у мікрочастинки, як буде додатково описано нижче.

Термін "антиген" в даному описі означає будь-яку молекулу, сполуку або композицію, яка є імуногенною для тварини і включена у вакцинну композицію для викликання захисної імунної реакції у тварини, які вводять вакцинну композицію.

Термін "імуногенний", якщо він використовується в зв'язку з антигеном, стосується здатності антигену викликає імунну реакцію проти антигену у тварини. Імунна реакція може являти собою клітинну імунну реакцію, опосередковану, головним чином, цитотоксичними Т-клітинами, або гуморальну імунну реакцію, опосередковану, головним чином, хелперними Т-клітинами, що, в свою чергу, активує В-клітини і приводить до вироблення антитіл.



"Захисна імунна реакція" визначається як будь-яка імунна реакція, реалізована за допомогою антитіл або опосередкована клітинами імунна реакція, або обидві, які виникають у тварини та запобігають або значною мірою зменшують зустрічальність або усувають або значною мірою зменшують силу, або значною мірою сповільнюють швидкість прогресу розладу або захворювання, спричиненого антигеном або патогеном, який містить антиген.

Антигени, які можуть бути включені у вакцинну композицію за даним винаходом, включають антигени, одержані з патогенних бактерій, таких як *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Manheimia hemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma galanaceum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, види *Clostridial*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Erysipelothrix rhusopathiae*, види *Campylobacter*, *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli*, сероваріанти *Salmonella enterica*, види *Leptospira*; патогенних грибів, таких як *Candida*; найпростіших, таких як *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, види *Eimeria*; гельмінтів, таких як *Ostertagia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Fasciola*, у формі інактивованого препарату цільної клітини або її частин, або у формі антигенних молекул, одержаних шляхом традиційного очищення білка, генно-інженерних технік або хімічного синтезу. Додаткові антигени включають патогенні віруси, такі як бичачі герпесвіруси 1,3,6, бичачий вірус вірусної діареї (БВВД) типу 1 і 2, бичачий вірус парагрипу, бичачий респіраторний синцитіальний вірус, бичачий вірус лейкозу, вірус чуми великої рогатої худоби, вірус ящуру, сказу, вірус свиней гарячки, вірус африканської свиней гарячки, свиний парвовірус, вірус PRRS, свиний цирковірус, вірус грипу, вірус везикулярної хвороби свиней, вірус TECHEN гарячки, вірус псевдосказу, у формі інактивованого препарату цільного вірусу, клітини або їхніх частин, або у формі антигенних молекул, одержаних шляхом традиційного очищення білка, генно-інженерних технік або хімічного синтезу.

Кількість антигену повинна бути такою, щоб антиген, який в комбінації з емульсією масло-у-воді, ефективно викликає захисну імунну реакцію у тварини. Точна ефективна кількість антигену залежить від природи, активності чистоти антигену і може бути визначена спеціалістом в даній галузі.

Присутня у вакцинних композиціях кількість емульсії масло-у-воді повинна бути достатньою для потенціювання імуногенності антигену(ів) у вакцинних композиціях. Якщо це є доцільним та придатним, додаткові кількості поверхнево-активної речовини або речовин можуть бути додані до вакцинної композиції на додаток до поверхнево-активної речовини або речовин, що містяться в емульсії масло-у-воді. Загалом кажучи, масляний компонент присутній в кінцевому об'ємі вакцинної композиції в кількості від 1,0% до 20% (об.); переважно, в кількості від 1,0% до 10%; більш переважно, в кількості від 2,0% до 5,0%. Поверхнево-активна речовина або комбінація поверхнево-

активних речовин, якщо використовуються дві або більше поверхнево-активних речовин, присутня в кінцевому об'ємі вакцинної композиції в кількості від 0,1% до 20% (об.), переважно, від 0,15% до 10%, більш переважно, від 0,2% до 6,0%.

На додаток до антигену(ів) та емульсії масло-у-воді, вакцинна композиція може включати інші компоненти, які є придатними і бажаними, такі як консерванти, осмотичні агенти, біоадгезивні молекули та імуностимулювальні молекули, наприклад, Квіл-А, холестерин, GPI-0100, диметилдіоктадециламонію бромід (ДДА), як описано вище в зв'язку з емульсією масло-у-воді.

Вакцинні композиції за даним винаходом також можуть включати придатний для ветеринарії носій. Термін "придатний для ветеринарії носій" включає будь-який або всі розчинники, дисперсійне середовище, покриття, ад'юванти, стабілізуючі агенти, розбавлювачі, консерванти, антибактеріальні та протигрибкові агенти, ізотонічні агенти, агенти, що затримують абсорбцію і т. п. Розбавлювачі можуть включати води, сольовий розчин, декстрозу, етанол, гліцерин і т. п. Ізотонічні агенти можуть включати, серед іншого, натрію хлорид, декстрозу, маніт, сорбіт і лактозу. Стабілізатори, серед іншого, включають альбумін.

В переважному варіанті даний винахід забезпечує вакцинну композицію, яка включає щонайменше один з антигенів БВВД типу I або БВВД типу II, введений внутрішньо в емульсію масло-у-воді, яка містить краплинки розміром менше 1мкм, переважно із середнім розміром краплинок менше 0,8мкм, більш переважно, менше 0,5мкм, і навіть більш переважно, з середнім розміром краплинок приблизно 0,5мкм. Антиген БВВД типу I та/або II переважно знаходиться у формі препарату інактивованого вірусу. Субмікронна емульсія масло-у-воді переважно складається з препарату Амфіген (тобто, препарату, який містить легке мінеральне масло, лецитин, Твін-80 і Спан-80). Вакцинна композиція також переважно включає Квіл-А, холестерин і тимеросал.

В іншому переважному варіанті даний винахід забезпечує вакцинну композицію, яка включає антиген *Leptospira* і щонайменше один з антигенів БВВД типу I або типу II в емульсії масло-у-воді. Антигени, переважно у формі препарату інактивованих клітин або вірусу, введені внутрішньо в емульсію масло-у-воді, яка містить краплинки розміром менше 1мкм, переважно із середнім розміром краплинок менше 0,8мкм, більш переважно, менше 0,5мкм, і, навіть більш переважно, з середнім розміром приблизно 0,5мкм. Субмікронна емульсія масло-у-воді переважно складається з препарату Амфіген (тобто, препарату, який містить легке мінеральне масло, лецитин, Твін-80 і Спан-80). Переважно вакцинна композиція також включає одну або більше імуностимулювальних молекул, вибраних з Квіл-А, холестерину, ДДА, GPI-100 та алюмінію гідроксиду (Al(OH)).

В ще одному переважному варіанті даний винахід забезпечує вакцинну композицію, яка включає щонайменше один бактеріальний антиген, наприклад, рекомбінантний білок *Streptococcus uberis* PauA або препарат клітин *E. coli*, або комбінацію обох компонентів в емульсії масло-у-воді.

Антиген(и) поєднані внутрішньо з емульсією масло-у-воді, яка містить краплинки розміром менше 1мкм, переважно із середнім розміром краплинок менше 0,8мкм, більш переважно, менше 0,5мкм, і навіть більш переважно, з середнім розміром приблизно 0,25мкм. Субмікронна емульсія масло-у-воді переважно складається з препарату Амфіген (тобто, препарату, який містить легке мінеральне масло, лецитин, Твін-80 і Спан-80). Переважно вакцинна композиція також включає одну або більше імуностимулюючих молекул, вибраних з Квіл-А, ДДА та GPI-100.

Вакцинні композиції за даним винаходом можуть вводитися тварині відомими способами, в тому числі перорально, інтраназально, через слизову оболонку, місцево, трансдермально і парентерально (наприклад, внутрішньовенно, внутрішньочеревинно, підшкірно або внутрішньом'язово). Введення можна здійснювати з використанням комбінації способів, наприклад, введення першої дози парентеральним шляхом з подальшим введенням крізь слизову оболонку.

Способи виготовлення вакцинних композицій

В іншому варіанті даний винахід забезпечує способи виготовлення вакцинних композицій, які містять антиген або антигени та субмікронну емульсію масло-у-воді.

При виготовленні вакцинних композицій за даним винаходом антиген(и) може бути поєднаний внутрішньо або зовнішньо з компонентами емульсії масло-у-воді. Переважно, антиген поєднують з компонентами емульсії масло-у-воді внутрішньо.

Антиген може бути поєднаний з різними компонентами емульсії, в тому числі маслом, однією або більше поверхнево-активних речовин, водним компонентом та будь-яким іншим придатним компонентом, з утворенням суміші. Суміш піддають процесу первинного змішування, типово пропускаючи один або більше разів крізь один або більше гомогенізаторів або емульгаторів, з утворенням емульсії масло-у-воді, яка містить антиген. Для цієї мети може бути використаний будь-який присутній на ринку гомогенізатор або емульгатор, наприклад, емульгатор Ross (Hauppauge, NY), гомогенізатор Gaulin (Everett, MA) або Microfluidics (Newton, MA). Альтернативно, різні компоненти ад'ювантної емульсії, в тому числі масло, одну або більше поверхнево-активних речовин та водний компонент можуть бути спочатку поєднані з утворенням емульсії масло-у-воді з використанням гомогенізатора або емульгатора; далі до одержаної емульсії додають антиген. Середній розмір краплинок емульсії масло-у-воді після первинного змішування становить приблизно 1,0-1,2 мікрон.

Далі емульсію, яка містить антиген, піддають мікрофлюїдизації для доведення розміру краплинок до субмікронного. Мікрофлюїдизація може здійснюватися шляхом використання комерційного мікрофлюїдизатора, такого як модель номер 110Y, доступна від Microfluidics, Newton, Mass; модель Gaulin 30CD (Gaulin, Inc., Everett, MASS); та Rainnie Minilab Type 8.30H (Micro Atomizer Food-anef Dairy, Inc., Hudson, Wis.).

Розмір краплинок може бути визначений за допомогою різноманітних способів, відомих з рівня техніки, наприклад, лазерна дифракція, шляхом

використання присутніх на ринку інструментів для визначення розміру. Розмір може варіювати в залежності від типу поверхнево-активної речовини, співвідношення поверхнево-активна речовина/масло, робочого тиску, температури і т. п. Спеціаліст в даній галузі може визначити бажану комбінацію зазначених параметрів для одержання емульсії з бажаним розміром краплинок. Краплинки емульсії за даним винаходом мають діаметр менше 1мкм, переважно з середнім розміром краплинок менше 0,8мкм, більш переважно, з середнім розміром краплинок менше 0,5мкм, і навіть більш переважно, з середнім розміром краплинок приблизно від 0,1 до 0,3мкм.

В переважному варіанті даного винаходу масляний розчин лецитину Дракеол, який містить 25% лецитину в легкому мінеральному маслі, поєднують і змішують з поверхнево-активними речовинами Твін-80 і Спан-80, а також з сольовим розчином з утворенням суміші, яка містить 40 % легкого мінерального масла, лецитин, 0,18% Твіну-80 і 0,08% Спану-80. Далі суміш емульгують за допомогою емульгатора Ross® (Hauppauge, NY 11788) приблизно при швидкості 3400об./хв для утворення емульсійного продукту, який також називають "препарат Амфіген" або "розчин Амфіген". Далі бажаний антиген(и) поєднують з розчином Амфіген та будь-якими іншими придатними компонентами (наприклад, імуностимулювальні молекули) за допомогою емульгатора, наприклад, гомогенізатор Ross, з утворенням емульсії масло-у-воді, яка містить антиген(и). Таку емульсію один раз пропускають крізь мікрофлюїдизатор При робочих значеннях тиску приблизно 10000±500фунт/дюйм<sup>2</sup>. Розмір краплинок в мікрофлюїдизованій емульсії масло-у-воді є меншим за 1мкм, із середнім розміром краплинок приблизно 0,25мкм.

В іншому переважному варіанті перед поєднанням емульсії масло-у-воді (наприклад, препарату Амфіген) з бажаним антигеном(ами), антиген(и) поєднують з сапоніновим глікозидом, наприклад Квіл-А, з утворенням суміші. Суміш антиген(и)-сапонін піддають гомогенізації, наприклад, в судині для гомогенізації. Далі до гомогенізованої суміші антиген(и)-сапонін додають стерол, наприклад, холестерин. Після цього суміш, яка містить антиген(и), сапонін і стерол піддають подальшій гомогенізації. Гомогенізовану суміш антиген(и)-сапонін далі поєднують з емульсією масло-у-воді (наприклад, препарат Амфіген) за допомогою гомогенізатора, наприклад, Гомогенізовану емульсію масло-у-воді, яка містить антиген(и), сапонін і стерол, далі піддають гомогенізації в умовах високого тиску, наприклад, мікрофлюїдизації.

Вакцинні композиції, які містять мікроінкапсульовані антигени у субмікронній емульсії масло-у-воді та способи їх виготовлення

Ще в одному варіанті даний винахід забезпечує вакцинні композиції, які містять антиген, інкапсульований в мікрочастинки (або "мікроінкапсульований антиген"), де мікроінкапсульований антиген зовнішньо введений в субмікронну емульсію масло-у-воді, описану вище.

Способи абсорбування або захоплення антигенів конкретними носіями відомі з рівня техніки.

Див., наприклад, *Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications* (Justin Hanes, Masatoshi Chiba and Robert Langer. *Polymer microspheres for vaccine delivery*. In: *Vaccine design. The subunit and adjuvant approach*. Eds. Michael F. Powell and Mark J. Newman, 1995 Plenum Press, New York and London). Конкретні носії можуть представляти множинні копії вибраного антигену імунній системі тваринного суб'єкта та сприяти захопленню і утриманню антигенів в місцевих лімфатичних вузлах. Частинки можуть бути фагоцитовані макрофагами і можуть підсилювати представлення антигену через вивільнення цитокіну. Конкретні носії також описані в рівні техніки і включають, наприклад, одержані з поліметилметакрилатних полімерів, а також одержані з полі(лактидів) і полі(лактид-спів-глікозидів), відомі як ПЛГ. Поліметилметакрилатні полімери не піддаються біодеградації, хоча частинки ПЛГ можуть біодеградувати шляхом випадкового неферментного гідролізу естерних зв'язків до молочних та гліколевих кислот, які виводяться нормальними метаболічними шляхами.

Біодеградуєчі мікросфери також використовувалися для досягнення контрольованого вивільнення вакцин. Наприклад, може бути досягнуте безперервне вивільнення антигену протягом подовженого періоду часу. В залежності від молекулярної маси полімеру і співвідношення молочна кислота/гліколева кислота в полімері, полімер ПЛГА (PLGA) може мати швидкість гідролізу від кількох днів або тижнів до кількох місяців або років. Повільне, контрольоване вивільнення може приводити до утворення високого рівня антитіл, подібного до того, який утворюється в результаті множинних ін'єкцій. Альтернативно, може бути досягнуте пульсуюче вивільнення антигенів вакцини шляхом вибору полімерів з різною швидкістю гідролізу. Швидкість гідролізу полімеру типово залежить від молекулярної маси полімеру і співвідношення молочна кислота/гліколева кислота в полімері. Мікрочастинки, виготовлені з двох або більше різних полімерів з різною швидкістю вивільнення антигену, забезпечують пульсуюче вивільнення антигенів та імітують багатодозові режими вакцинації.

У відповідності до даного винаходу, антиген, в тому числі будь-який з описаних вище, може абсорбуватися конкретним полімерним носієм, переважно полімером ПЛГ, з використанням будь-якої методики, відомої з рівня техніки (такої, як представлена в Прикладі 17), з утворенням препарату мікроінкапсульованого антигену. Препарат мікроінкапсульованого антигену далі змішують з субмікронною емульсією масло-у-воді, яка була описана вище, та диспергують в ній, з утворенням вакцинової композиції.

В переважному варіанті даний винахід забезпечує вакцину композицію, яка містить антиген, інкапсульований в полімер ПЛГ, причому мікроінкапсульований антиген зовнішньо диспергують у мікрофлюїдизованій емульсії масло-у-воді, яка складається з легкого мінерального масла, лецитину, Твіну-80, Спану-80 і соляного розчину та містить краплинки із середнім розміром менше 1,0мкм.

Комплекси, утворені сапоніном і стеролом

В одному варіанті даний винахід забезпечує композиції з вмістом сапоніну і стеролу, причому сапонін і стерол утворюють комплекси у формі спіральних міцел. У відповідності до даного винаходу вказані комплекси здійснюють імуностимулювальну дію.

"Імуностимулювальний" означає, що комплекси можуть підсилювати імунну реакцію, викликану антигенним компонентом, або що комплекси можуть викликати імунну реакцію незалежно від окремого антигенного компонента.

У відповідності до даного винаходу переважний сапонін для використання в композиції за даним винаходом являє собою Квіл-А.

Переважні стероли для використання в ад'ювантних композиціях за даним винаходом включають бета-ситостерол, стигмастерол, ергостерол, ергокальциферол і холестерин. Вказані стероли добре відомі з рівня техніки, наприклад, холестерин розкритий в Merck Index, 11<sup>th</sup> Edn. page 341, як природний стерол, виявлений у тваринному жирі. Найбільш переважно стерол являє собою холестерин.

Співвідношення сапонін: стерол у композиції типово становить порядку від 1:100 до 5:1 (мас.). Переважно, співвідношення становить 1:1.

В іншому варіанті даний винахід забезпечує вакцинні композиції з вмістом сапоніну, стеролу та антигену, причому сапонін і стерол утворюють комплекси у формі спіральних міцел та антиген попередньо змішаний із спіральними міцелами, але не інкорпорований в них.

Нижче наведені приклади конкретних варіантів для здійснення даного винаходу. Приклади наведені виключно з метою ілюстрування і в будь-якому разі не призначені обмежувати межі даного винаходу.

#### Приклад 1

Виготовлення препарату Амфіген

Препарат Амфіген виготовляють шляхом двостадійного процесу. На першій стадії 80л розчину лецитину в маслі Дракеол, 116л розчину правцевого анатоксину в соляному розчині, 1,2л Спану-80 і 2,8л Твіну-80 змішують та емульгують з використанням емульгатора Ross. Масляний розчин лецитину Дракеол містить 25% соєвого лецитину і 75% мінерального масла. Емульгований продукт рециркулюють крізь емульгатор Ross мінімум до 5 об'ємів або протягом як мінімум 10хв. Емульгований продукт зберігають при 2-7°C протягом максимум 24год до подальшої обробки. Емульсією з танка емульгатора Ross переносять до гомогенізатора Gaulin і гомогенізують протягом 20хв при тиску 4500фунт/дюйм<sup>2</sup>. Одержаний 40% розчин лецитину в маслі Дракеол (далі має назву "Препарат Амфіген" або "розчин Амфіген") після цього розливають в стерильні карбоксиполіпропіленові контейнери. Розливання здійснюють за допомогою розливної кришки класу 100, розташованого в приміщенні з контрольованим середовищем класу 10000. Контейнери зберігають при 2-7°C. Препарат Амфіген використовують в експериментах, описаних нижче, якщо не вказано інше.

#### Приклад 2

Первинне змішування шляхом гомогенізації вакцини БВД перемішуванням з обдуванням гарячим повітрям

Апарат, який використовують для вказаного процесу гомогенізації, показано на Фігурах 1. З використанням асептичної техніки або парових хрестоподібних клапанів пляшку, яка містить антиген БВД типу I (препарат інактивованого вірусу БВД типу I) приєднують до бічного порту для пляшок на судині для змішування. Після закінчення переміщення потрібного об'єму антигену БВД типу I пляшку БВД типу I замінюють на пляшку, яка містить препарат інактивованого вірусу БВД типу II (препарат інактивованого вірусу БВД типу II). Після закінчення переміщення необхідної кількості препарату інактивованого вірусу БВД типу II гомогенізатор Ross приєднують до переносної судини і починають рециркуляцію при максимальній швидкості (3300об./хв). Підтримують перемішування вмісту судини на середній швидкості.

З використанням асептичної техніки або парових перехресних клапанів парових хрестоподібних клапанів пляшку, яка містить Квіл-А з концентрацією 50мг/мл, приєднують до порту лінії гомогенізатора для пляшок на судині для змішування. Необхідну кількість розчину Квіл-А пропускають в судину крізь лінію всмоктування. Після закінчення переміщення розчину Квіл-А пляшку забирають. Таким же чином в судину для змішування переміщують необхідну кількість розчину холестерину в етанолі (18мг/мл). Далі у судину для змішування додають необхідну кількість препарату Амфіген, 10% розчину тимеросалу і базове модифіковане середовище Ігла (BMI), розчини наповнювача.

Після закінчення додавання перемішування продовжують ще протягом 15хв. одержаний препарат розділяють на аліквоти (دوزи) по 2мл і він являє собою не мікрофлюїдизовану БВД вакцину на базі препарату Амфіген. Кожна доза вакцини містить 500мкг Квіл-А, 500мкг холестерину, 2,5% препарату Амфіген і 0,009% тимеросалу. Концентрацію антигену для двох різних штамів БВД визначають в значеннях титру ELISA за gp53.

#### Приклад 3

Вторинне змішування шляхом мікрофлюїдизації

Фігура 2 ілюструє процес, який використовують для вторинного змішування шляхом мікрофлюїдизації. Мікрофлюїдизатор стерилізують паром. Спершу у модулі встановлюють модуль камери для допоміжної обробки та в друге положення для камери встановлюють холосту камеру. Судину, яка містить БВД вакцину з повним складом, готують, як описано в Прикладі 2, приєднують до мікрофлюїдизатора шляхом приєднання перехідної лінії від клапану дренажу постачальної судини до вхідного отвору мікрофлюїдизатора. Лінію подачі газоподібного азоту приєднують до фільтру вхідного отвору для постачання судини повітря і тиск в судині доводять до  $20 \pm 5$  фунт/дюйм<sup>2</sup>. Дренажний клапан судини для збирання приєднують до перехідної лінії від вихідного отвору мікрофлюїдизатора. Після здійснення всіх необхідних з'єднань клапани відкривають і розпочинають мікрофлюїдизацію з робочим тиском  $10000 \pm 500$  фунт/дюйм<sup>2</sup>. Повну кількість вакцини

пропускають крізь мікрофлюїдизатор один раз і збирають в пост-мікрофлюїдизаційній камері. Одержаний препарат розділяють на аліквоти дози по 2мл і він представляє собою мікрофлюїдизовану БВД вакцину на базі препарату Амфіген.

#### Приклад 4

Виготовлення вакцинної композиції шляхом апаратного перемішування (bench blend)

Препарат Амфіген, виготовлений, як описано в Прикладі 1, розбавляють до 2,5% додаванням БВД антигенів та наповнювача. Одержаний розчин перемішують на апараті з використанням мішалки замість гомогенізатора. Склад кінцевого препарату: антигени БВД типу I і типу II, 2,5% препарату Амфіген (який містить масло, лецитин, Спан і Твін, як описано в Прикладі 1) і сольовий розчин. Твін-80 і Спан-80 присутні в кінцевому препараті вакцини в концентрації 0,18% і 0,08% (об.), відповідно.

#### Приклад 5

Порівняння розподілу розміру краплинок у не мікрофлюїдизованому і мікрофлюїдизованому препаратах вакцини на базі препарату Амфіген

Не-мікрофлюїдизовану вакцину на базі препарату Амфіген виготовляють, як описано в Прикладі 2, мікрофлюїдизовану вакцину на базі препарату Амфіген виготовляють, як описано в Прикладі 3, і препарат виготовляють шляхом апаратного перемішування (bench blend), як описано в Прикладі 4, використовують для порівняння розміру краплинок у вакцинних препаратах. Два мілілітри зразка кожного препарату додавали у лазерний дифрактометр Malvern 2000 і визначали розподіл розміру краплинок. Як показано на Фігурі 3, результати демонструють, що мікрофлюїдизована вакцина на базі препарату Амфіген має максимальний об'єм розподілу частинок близько 0,1мкм, тоді як не мікрофлюїдизована вакцина на базі препарату Амфіген має максимальний об'єм розподілу частинок близько 1мкм.

#### Приклад 6

Зменшення розділення фаз вакцини

Три різних препарати вакцин: не мікрофлюїдизована вакцина на базі препарату Амфіген, виготовлена, як описано в Прикладі 2, мікрофлюїдизована вакцина на базі препарату Амфіген, виготовлена, як описано в Прикладі 3, і препарат вакцини, виготовлений шляхом апаратного перемішування (bench blend), як описано в Прикладі 4, порівнювали бік-о-бік для визначення властивостей розділу фаз при тривалому зберіганні. Всі вказані препарати зберігали при 4°C протягом приблизно одного місяця і контролювали розділення фаз за появою кремоподібного шару у верхній частині вакцинних препаратів. Як показано на Фігурі 4, в мікрофлюїдизованому препараті на базі препарату Амфіген не відбувалося розділення фаз в порівнянні з двома іншими препаратами.

#### Приклад 7

Виготовлення мікрофлюїдизованої і не мікрофлюїдизованої вакцини для крупної рогатої худоби проти бичачого вірусу вірусної діареї

Вірусний антиген бичачої вірусної діареї був внутрішньо інкорпорований в препарат Амфіген шляхом мікрофлюїдизації. Термін "внутрішньо інкорпорований" стосується процесу, коли антиген додають до препарату Амфіген перед мікрофлюї-

дизацією. Антиген обробляють, застосовуючи фізичні сили процесу мікрофлюїдизації, разом з компонентами ад'ювантного препарату. В контрольній не мікрофлюїдизованій групі препарат антигену диспергували в препараті Амфіген шляхом змішування.

Кінцевий склад контрольного і мікрофлюїдизованого препаратів був наступним: БВД типу I з титром ELISA після інактивації 2535 відносних одиниць на дозу для gr53, БВД типу II з титром ELISA після інактивації 3290 відносних одиниць на дозу для gr53, Квіл-А в концентрації 1,25мг/дозу, холестерин в концентрації 1,25мг/дозу, препарат Амфіген в кінцевій концентрації 2,5% і тимеросап в кінцевій концентрації 0,009%. Доза вакцини становила 5мл.

#### Приклад 8

Стабільність внутрішньо інкорпорованих БВД-вірусних антигенів в мікрофлюїдизованому препараті вакцини на базі препарату Амфіген

Даний експеримент проводили з метою визначення стабільності внутрішньо інкорпорованого антигену під час тривалого зберігання. Антиген вбитого вірусу БВД типу II був внутрішньо інкорпорований в препарат Амфіген під час процесу мікрофлюїдизації з одержанням мікрофлюїдизованого препарату вакцини (A907505). Три інших вакцинних препарати, які містили однаковий антиген в не мікрофлюїдизованому препараті Амфіген (A904369, A904370 і A904371), служили контролем. В не мікрофлюїдизованих препаратах антиген змішували з препаратом Амфіген і перемішували з використанням гомогенізатора Ross. Всі чотири вакцинних препарати зберігали при 4°C протягом двох років. В різні моменти часу протягом зберігання (0, 6, 12 або 24 місяці), всі чотири препарати застосовували для вакцинації корів віком 3 місяці.

В дні 0 і 21 здійснювали вакцинацію корів віком 3 місяців шляхом підшкірного введення 2мл вакцинного препарату. Сироватку вакцинованих тварин збирали на 35-й день і серологічну реакцію на вакцину вимірювали з визначення титру антитіл за допомогою BVDV-E2 ELISA. Як показано на Фігурі 5, мікрофлюїдизований вакцинний препарат демонстрував більш високий титр антитіл у всі досліджені моменти часу (0, 6, 12 і 24 місяці), вказуючи на те, що стабільність антигенного препарату не втрачається під час внутрішнього інкорпорування антигену під час процесу мікрофлюїдизації. Більше того, також було несподівано виявлено, що мікрофлюїдизований вакцинний препарат викликає підсилену імунну реакцію у всі періоди часу.

#### Приклад 9

Зменшення спричиненого вакциною підвищення ректальної температури після мікрофлюїдизації

Мікрофлюїдизовані і не мікрофлюїдизовані вакцинні препарати, виготовлені, як описані у Прикладі 7, застосовували для вакцинації великої рогатої худоби в день 0 і контролювали ректальну температуру протягом періоду від одного дня до вакцинації до 4 днів після вакцинації. Доза вакцини становила 2мл. Групи вакцинували однією або двома дозами вакцини. Ректальну температуру вимірювали і реєстрували щоденно в дні 1-4 вклю-

чно. Ректальну температуру в день 0 вимірювали до введенням досліджуваного продукту.

Як показано на Фігурі 6, результати демонструють різке збільшення ректальної температури протягом приблизно 24год після вакцинації у тварин, вакцинованих однією або двома дозами не мікрофлюїдизованого вакцинного препарату. Однак, у тварин, вакцинованих мікрофлюїдизованими формами вакцини, збільшення ректальної температури після вакцинації було мінімальним і значно меншим, ніж у тварин, вакцинованих не мікрофлюїдизованим препаратом (Фігурі 6).

#### Приклад 10

Обсяг реакції в місці ін'єкції зменшувався швидше при вакцинації мікрофлюїдизованими вакцинними препаратами

Мікрофлюїдизовані і не мікрофлюїдизовані вакцинні препарати, виготовлені як описано в Прикладі 7, застосовували для вакцинації великої рогатої худоби в день 0. Тварини, включені в це дослідження, були гібридними телятами м'ясної худоби. В кожній з груп, що одержували плацебо (T01 і T02), було по три тварини. В кожній з груп від T03 до T06 було по 6 тварин. Доза вакцини становила 2мл і групи вакцинували однією або двома дозами вакцини в день 0. В день 0 досліджуваний препарат вводили в праву частину шиї. Тваринам, які одержували подвійну дозу (4мл) досліджуваного препарату (T02, T04 і T06), вводили подвійну дозу у вигляді однієї ін'єкції в одне місце. Спостереження за місцями ін'єкції, в тому числі оцінку величини реакції в місці ін'єкції, здійснювали на правому боці шиї в дні 0-4, включно, а також в дні 6, 9 і 14. В день 0 місця ін'єкцій оглядали перед введенням досліджуваного продукту. Тварини в групах, які вакцинували однією або двома дозами плацебо, не демонстрували значного збільшення обсягу реакції в місці ін'єкції, тому відповідні дані на Фігурі 7 не наведені. У випадку не мікрофлюїдизованого вакцинного препарату спостерігалось пропорційне збільшення вираженості реакції в місці ін'єкції для одно-дозової і дво-дозової вакцинації. З іншого боку, у випадку мікрофлюїдизованого вакцинного препарату, хоча перша доза спричиняла більш виражену реакцію в місці ін'єкції, введення другої дози не спричиняло подальшого збільшення. Більше того, у випадку ін'єкції тваринам мікрофлюїдизованого вакцинного препарату, обсяг реакції в місці ін'єкції зникав швидше в порівнянні з тваринами, вакцинованими не мікрофлюїдизованим вакцинним препаратом. Дані результати наведені на Фігурі 7.

#### Приклад 11

Виготовлення мікрофлюїдизованих вакцинних препаратів на базі препарату Амфіген з внутрішньо інкорпорованими антигенами вірусу БВД і *Leptospira* та імуностимулювальними молекулами, такими як Квіл-А і ДДА

Інактивованій формаліном штам *Leptospira hardjo-bovis* CSL вводять в придатний ад'ювант в прямих кількостях приблизно  $1,4 \times 10^9$  мікроорганізмів на дозу 5мл. Інактивованій формаліном штам *Leptospira romona* T262 вводять в кількості приблизно 2400 нефаломерних одиниць на дозу 5мл. Нефаломерні одиниці обчислювали на базі нефалометричного вимірювання попередньо обробле-

ної ферментаційної рідини. Вірус БВД типу I вводять з титром E2 ELISA приблизно 3000 відносних одиниць на дозу 5мл. Вірус БВД типу II вводять з титром E2 ELISA приблизно 3500 відносних одиниць на дозу 5мл. Відносну одиницю обчислювали на базі титру E2 ELISA в нерозфасованій рідині після активації перед збиранням вакцини. Квіл-А і холестерин використовували в концентрації 0,5мг на дозу. Тимеросал і препарат Амфіген використовували в кінцевій концентрації 0,009% і 2,5%, відповідно. Алюмінію гідроксид (Rehydragel LV) застосовували у кінцевій концентрації 2,0%. Якщо ДДА використовували як імуномодулятор, ДДА включали в препарат Амфіген. Препарат Амфіген (тобто, запасний 40% розчин лецитину Дракеол), містить 1,6мг/мл ДДА і, при відповідному розбавленні, кінцевий препарат вакцини містить 2,5% препарату Амфіген та 0,1мг/мл ДДА.

При виготовленні різних вакцинних препаратів фракції БВД, Leptos, Квіл-А, холестерин, тимеросал, препарат Амфіген і сольовий розчин як наповнювач додавали у гомогенізатор Silverson і змішували протягом 15хв при 10000±500об./хв. Далі здійснювали мікрофлюїдизацію компонентів крізь сито 200 мікрон при 10000фунт/дюйм<sup>2</sup>.

Якщо вакцинний препарат містить алюмінію гідроксид, мікрофлюїдизацію здійснюють без алюмінію гідроксиду. Після закінчення мікрофлюїдизації додають алюмінію гідроксид і перемішують за допомогою мішалки протягом ночі при 4°C.

#### Приклад 12

Виготовлення вакцини вірусу БВД для дослідження вірусного навантаження

Вакцинний препарат, який використовували в даному експерименті, містив антигени вірусу БВД типу I і типу II. Антиген BVD1-5960 використовували з титром ELISA після інактивації 2535 відносних одиниць на дозу для gr53. Антиген BVD1-890 використовували з титром ELISA після інактивації 3290 відносних одиниць на дозу для gr53. Квіл-А і холестерин використовували з концентрацією 0,5мг/мл. Тимеросал і препарат Амфіген використовували в кінцевій концентрації 0,009% і 2,5%, відповідно. Якщо ДДА використовували як імуномодулятор, ДДА включали в препарат Амфіген. Запасний розчин Амфіген (40% розчин лецитину Дракеол) містив різні кількості ДДА і при відповідному розбавленні кінцева концентрація у вакцинному препараті становить 2,5% препарату Амфіген і ДДА в концентрації від 0,5мг/дозу до 2,0мг/дозу. Гель алюмінію (Rehydragel-LV) використовували в фінальній концентрації 2%. GPI-2000 використовували в інтервалі 2, 3 і 5 мг/дозу.

Всі компоненти додавали в гомогенізатор Silverson і змішували протягом 15хв при 10500об./хв і далі здійснювали мікрофлюїдизацію пропусканням крізь камеру 200 мікрон з тиском 10000фунт/дюйм<sup>2</sup>. Якщо вакцинний препарат містив алюмінію гідроксид, мікрофлюїдизацію здійснювали без алюмінію гідроксиду. Після закінчення мікрофлюїдизації додавали алюмінію гідроксид і змішували за допомогою мішалки протягом ночі при 4°C.

#### Приклад 13

Захист від навантаження Leptospira після вакцинації мікрофлюїдизованим вакцинним препаратом Амфігену з антигенами Leptospira

Таблиця 1

Групи лікування

Група лікування	Склад ад'юванту
T01	Сольовий розчин
T02	Квіл-А, холестерин, препарат Амфіген (ПА)
T03	Квіл-А, холестерин, препарат Амфіген, АІОН
T04	ДДА, холестерин, препарат Амфіген
T05	ДДА, холестерин, препарат Амфіген та АІОН (ДДА-АІОН)

В табл. 1 показано склад ад'ювантних препаратів у вакцинних препаратах, які вивчали в даному дослідженні. Вакцинні препарати готували, як описано в Прикладі 11. В кожній групі було 6 тварин. В даному дослідженні використовували гібридних телиць м'ясної худоби віком приблизно сім місяців. Вакцинацію здійснювали в день 0 і день 21 шляхом підшкірної ін'єкції об'єму вакцини 5мл. Навантаження здійснювали за допомогою штаму L

hardjobovis 203 від NADC (National Agricultural Disease Center). Навантаження здійснювали протягом днів 57-59 інюкуляцією 1мл. Навантаження водили кон'юнктивально в око та інтравагінально. Матеріал навантаження містив 5,0x10<sup>6</sup> лептоспір/мл. Зразки сечі збирали щотижня для культивування лептоспір, FA і ПЛР. Зразки нирок брали в дні 112 і 113.

Таблиця 2

Результати дослідження навантаження *Leptospira*

Лікування	Відсоток телят, позитивних на <i>Leptospira</i> в сечі і нирках за даними культури	Відсоток телят, позитивних на <i>Leptospira</i> в сечі і нирках за даними FA	Відсоток телят, позитивних на <i>Leptospira</i> в сечі і нирках за даними ПЛР	Відсоток телят, позитивних на <i>Leptospira</i> в сечі і нирках сумарно за всіма пробами
Сольовий розчин	100	83,3	83,3	100
ПА	0	0	0	0
ПА/АІОН	0	50,0	0	50,0
ДДА	0	0	0	0
ДДА/АІОН	0	33,3	16,7	50,0

В табл. 2 показані дані дослідження навантаження *Leptospira*. У визначенні відсотка інфекції *Leptospira* у тварини з навантаженням використовували наступні критерії. Якщо культура нирок була позитивною тільки для одного зразка, тварину вважали позитивною на *Leptospira*. Якщо тварина була позитивною тільки за одним зразком за (FA або ПЛР), тварину вважали негативною. Якщо результати були позитивним (FA і ПЛР) тільки для одного зразка, тварину вважали позитивною на *Leptospira*.

Результати, наведені в табл. 2, показують значно меншу тривалість виділення патогенів з сечею у всіх групах вакцинації на базі всіх трьох аналізів. Як тільки розглядалося колонізація сечових шляхів і нирок, ефективність ПА- і ДДА-вмісних препаратів без АІОН була приблизно однаковою. АІОН не покращував і навіть зменшував ефективність ПА- і ДДА-вмісних вакцин в даному дослідженні навантаження.

Таблиця 3

Інтервал титру мікроскопічної аглютинації  
в день пікового значення геометричного середнього титру перед навантаженням (день 35)

Лікування	L Hardjo	L. pomona
Сольовий розчин	<20	<20
ПА	160-640	1280-10240
ПА/АІОН	160-2560	80-10240
ДДА	40-1280	320-2560
ДДА/АІОН	320-640	1280-5120

Серологічні реакції проти обох антигенів *Leptospira* у вакцинному препараті визначали у вакцинованої тварини і пік реакції відзначали на день 35. Не виявлено кореляції між серологічною реакцією і захистом проти навантаження. Присутністю гелю алюмінію в препараті вакцини зменшувала рівень захисту, хоча серологічна реакція підсилювалася в присутності гелю алюмінію у вакцинні.

## Приклад 14

Виявлення імунної реакції на вірусний антиген БВД і захист проти навантаження вірусом БВД

типу 2 після імунізації мікрофлюїдизованим вакцинним препаратом з вмістом препарату Амфіген і ДДА

В даному експерименті використовували серонегативних телят віком 4-7 місяців. В дослідженні приймали участь 6 різних груп, по 10 тварин в кожній групі (табл. 4). В день 0 і день 21 кожна тварина одержувала одну дозу вакцини 2мл підшкірно або плацебо в латеральну частину шиї, приблизно посередині між лопаткою та головою.

Таблиця 4

## Групи лікування

Група лікування	Склад ад'юванту
T01	Сольовий розчин
T02	Квіл-А, препарат Амфіген (ПА) та холестерин
T03	Препарат Амфіген, холестерин, ДДА (0,5мг/дозу), АІОН
T04	Препарат Амфіген, холестерин, ДДА (0,5мг/дозу)
T05	Препарат Амфіген, холестерин, ДДА (1,0мг/дозу)
T06	Препарат Амфіген, холестерин, ДДА (2,0мг/дозу)

Дозу навантаження вірусним препаратом 5мл (приблизно 2,5мл в кожну ніздрю) вводили інтраназально у день 44 дослідження. В даному дослідженні як штам навантаження використовували не-цитопатичний вірус БВД тип II, штам #24515 (Ellis Strain), серія #46325-70. Зразки матеріалу навантаження, що залишилися, титрували (кожне титрування в подвійному повторенні) в період, коли розпочинали навантаження, а також негайно після його завершення. Середній титр живих вірусів на дозу 5мл становив  $5,3 \log_{10}$  FAID<sub>50</sub>/5мл перед початком навантаження та  $5,4 \log_{10}$  FAID<sub>50</sub>/5мл після навантаження (FAID еквівалентний TCID<sub>50</sub>).

Стан тварин контролювали щоденно в дні 3-58. Для кожної тварини в дні 42-58 встановлювали кількість клінічних балів захворювання 0, 1, 2 або 3 на базі клінічних ознак, властивих інфекції БВД II. Бали в день 44 реєстрували до початку навантаження. У кожної тварини в дні 0, 21, 35, 44 та 58 відбирали зразки крові (дві пробірки для відокремлення сироватки по 13мл, SST) для визначення титру антитіл, що нейтралізують вірус, до БВД типу I і БВД типу II в сироватці.

У кожної тварини відбирали зразки крові в дні 42-58, включно, і визначали присутність вірусу БВД в клітинах, вкритих лейкоцитарною плівкою. В день 44 зразки відбирали перед початком навантаження.

Для визначення кількості білих кров'яних клітин у кожної тварини відбирали зразки крові (одна ЕДТА пробірка об'ємом 4мл) в дні 42-58, включно. В день 44 зразки відбирали перед початком навантаження.

Лейкопенію визначали як зменшення кількості білих кров'яних клітин на 40% або більше в порівнянні з початковими значеннями (середнє значення кількості білих кров'яних клітин перед навантаженням за два дні до початку навантаження і в день навантаження).

Бали клінічного захворювання використовували для визначення стану захворювання наступним чином; якщо кількість балів дорівнює 1, це означає відсутність захворювання; якщо кількість балів >2, це означає присутність захворювання.

Як показано в табл. 5 і 6, в групах тварин, вакцинованих вакцинами з вмістом вірусних антигенів

БВД разом з препаратом Амфіген, Квіл-А або ДДА та мікрофлюїдизованих, спостерігалася сероконверсія із значними титрами нейтралізуючих вірус антитіл у сироватці проти вірусів БВД типу I і БВД типу II. В таких групах також спостерігалася значне зменшення відсотка тварин з віремією після навантаження, тоді як в контрольній групі 100% тварин були віремічними (табл. 7). Крім того, у тварин вакцинованих груп частоти захворювання також була значно зменшеною (табл. 8). Подібним чином, відсоток тварин з лейкопенією також зменшувався у вакцинованих групах і зменшення лейкопенії також було більш вираженим в групі ДДА, ніж в групі, яка одержувала Квіл-А (табл. 9). В контрольній групі спостерігалася значне зменшення швидкості збільшення ваги в порівнянні з групами вакцинованих тварин (табл. 10).

#### Серологія

Перед вакцинацією в день 0 всі тварини в дослідженні були серонегативними (нейтралізуючі вірус антитіла <1:2) щодо антитіл до вірусу БВД типу I та II (дані не показані). Через 14 днів після другої вакцинації (день 35) всі тварини, яким вводили плацебо (T01) залишалися серонегативними щодо антитіл до вірусу БВД типу I та II; і всі тварини, вакциновані досліджуванним препаратом антигену (T02, T03, T04, T05 і T06) були серопозитивними (нейтралізуючі вірус антитіла ≥1:8) щодо антитіл до вірусу БВД типу I та II. Одна тварин, якій вводили вакцину з препаратом Амфіген як ад'ювантом в кількості 2мг/дозу, мала титр нейтралізуючих вірус антитіл 3 для антитіл до вірусу БВД типу II в день 35 (табл. 11 і 12).

Перед навантаженням в день 44 всі контрольні тварини (T01), за винятком однієї були серонегативними (нейтралізуючі вірус антитіла <1:2) щодо антитіл до вірусу БВД типу I та II (дані не показані). Одна тварина в контрольній групі (#2497) була серопозитивною (нейтралізуючі вірус антитіла=10) щодо антитіл до вірусу БВД типу I і серонегативною щодо антитіл до вірусу БВД типу 2. Через 14 днів після навантаження всі тварини в дослідженні були серопозитивними щодо антитіл до вірусу БВД типу I та II.

Таблиця 5

Геометричне середнє значення титру нейтралізуючих вірус антитіл до вірусу БВД типу I

Лікування		Геометричне середнє значення титру нейтралізуючих вірус антитіл до вірусу БВД типу I в день дослідження				
		0	21	35	44	58
T01	Сольовий розчин	<2	<2	<2	<2	23,9
T02	Амфіген, Квіл-А	<2	39,1	19824,5	14018,2	27554,5
T03	Амфіген, 0,5мг ДДА, AI	<2	51,8	32204,8	22381,1	23170,4
T04	Амфіген, 0,5мг ДДА	<2	27,0	14512,4	8932,0	21996,2
T05	Амфіген, 1,0мг ДДА	<2	26,7	11585,2	8194,6	20882,0
T06	Амфіген, 2,0мг ДДА	<2	23,5	8778,7	6769,3	16961,1



Таблиця 6

Геометричне середнє значення титру нейтралізуючих вірус антитіл до вірусу БВД типу II

Лікування		Геометричне середнє значення титру нейтралізуючих вірус антитіл до вірусу БВД типу II в день дослідження				
		0	21	35	44	58
T01	Сольовий розчин	<2	<2	<2	<2	522,0
T02	Амфіген, Квіл-А	<2	8,9	2272,4	2048,2	24833,6
T03	Амфіген, 0,5мг ДДА, AI	<2	9,5	3565,7	2702,2	20881,8
T04	Амфіген, 0,5мг ДДА	<2	4,1	1260,7	989,1	18496,2
T05	Амфіген, 1,0мг ДДА	<2	6,4	1398,8	1453,9	30047,8
T06	Амфіген, 2,0мг ДДА	<2	7,7	1673,2	1428,9	16384,0

Таблиця 7

Виділення вірусу після навантаження

Лікування		Виділення вірусу БВД		
		дні дослідження	зустрічальність тварин з віремією (%)	LS середня кількість днів з віремією
T01	Сольовий розчин	47-58	10/10(100,0)	10,4
T02	Амфіген, Квіл-А	50-53	1/10(10,0)	0,4
T03	Амфіген, 0,5мг ДДА, AI	-	0/10(0,0)	0,0
T04	Амфіген, 0,5мг ДДА	48, 50-52, 57	3/10(30,0)	0,5
T05	Амфіген, 1,0мг ДДА	49-51	2/10(20,0)	0,4
T06	Амфіген, 2,0мг ДДА	48-52	2/10(20,0)	0,5

Таблиця 8

Клінічні ознаки захворювання БВД після навантаження

Лікування		Частота розвитку захворювання (%)	Частота виявлення клінічних ознак захворювання БВД (%)				Всього обстежено
			0	1	2	3	
T01	Сольовий розчин	9/10 (90,0)	75 (46)	63 (37,5)	29 (17,3)	1 (0,6)	168
T02	Амфіген, Квіл-А	1/10 (10,0)	105 (61,8)	63 (37,1)	2 (1,2)	0 (0)	170
T03	Амфіген, 0,5мг ДДА, AI	2/10 (20,0)	99 (58,2)	67 (39,4)	4 (2,4)	0 (0)	170
T04	Амфіген, 0,5мг ДДА	0/10 (0,0)	118 (69,4)	52 (30,6)	0 (0)	0 (0)	170
T05	Амфіген, 1,0мг ДДА	0/10 (0,0)	101 (59,4)	69 (40,6)	0 (0)	0 (0)	170
T06	Амфіген, 2,0мг ДДА	0/10 (0,0)	104 (61,2)	66 (38,8)	0 (0)	0 (0)	170

Таблиця 9

Лейкопенія після навантаження

Лікування		Лейкопенія	
		Доля тварин з лейкемією (%)	LS Середня кількість днів з лейкемією
T01	Сольовий розчин	10/10 (100,0)	7,8
T02	Амфіген, Квіл-А	6/10 (60,0)	1,2
T03	Амфіген, 0,5мг ДДА, AI	2/10 (20,0)	0,2
T04	Амфіген, 0,5мг ДДА	4/10 (40,0)	0,8
T05	Амфіген, 1,0мг ДДА	3/10 (30,0)	0,9
T06	Амфіген, 2,0мг ДДА	2/10 (30,0)	0,5

Таблиця 10

Маса тіла і збільшення маси тіла протягом дослідження

Лікування		Середня маса тіла (фунт) в день дослідження				Збільшення маси тіла (фунт)
		-1	43	50	58	
T01	Сольовий розчин	378,0	484,9	491,0	476,9	98,9
T02	Амфіген, Квіл-А	428,0	526,5	546,7	579,0	151,0
T03	Амфіген, 0,5мг ДДА, AI	410,5	514,4	534,2	579,0	168,5
T04	Амфіген, 0,5мг ДДА	373,7	472,3	492,6	538,1	164,4
T05	Амфіген, 1,0мг ДДА	358,9	451,4	478,9	507,1	148,2
T06	Амфіген, 2,0мг ДДА	408,0	513,3	533,9	560,3	151,6

## Виділення вірусу

Як показують дані табл. 13, під час періоду навантаження (дні 44-58) всі 10 тварин в контрольній групі (T01) були віремічними (вірус БВД був виділений в один або більше днів). В групах, яким вводили досліджуваний препарат антигену частота віремії становила 1, 0, 3, 2 і 2 тварини з 10 в кожній групі (T02, T03, T04, T05 і T06, відповідно). Різниця між контрольною групою і групами, в яких тваринам вводили досліджувані препарати антигену, була статистично значущою ( $P \leq 0,05$ ). Середнє квадратичне значення кількості днів з віремією також було значно вищим (10,4 дні) в контрольній групі в порівнянні з групами, в яких тваринам вводили досліджувані препарати антигену (від 0,0 до 0,5 днів).

## Клінічне захворювання

Тварини з балами клінічного захворювання 2 або 3 вважалися такими, що виявляють ознаки захворювання БВД. Як показано в табл. 14, частота виникнення клінічних ознак вірусного захворювання БВД у тварин становила 9 з 10 в контрольній групі (T01) і 1, 2, 0, 0 і 0 з 10 тварин в кожній з груп, в яких тваринам вводили досліджувані препарати антигену (T02, T03, T04, T05 і T06, відповідно). Різниця між контрольною групою і групами, в яких тваринам вводили досліджувані препарати антигену, була статистично значущою ( $P \leq 0,05$ ).

## Лейкопенія

Як показано в табл. 15, під час періоду навантаження (дні 44-58) всі 10 тварин в контрольній групі (T01) були лейкопенічними (зменшення кількості білих кров'яних клітин на 40% в порівнянні з початковими значеннями, дні 42-44). Доля тварин

з лейкопенією становила 6, 2, 4, 3 і 2 з 10 тварин в кожній з груп, в яких тваринам вводили досліджувані препарати антигену (T02, T03, T04, T05 і T06, відповідно). Різниця між контрольною групою і групами, в яких тваринам вводили вакцину з ад'ювантом у вигляді препарату Амфіген в дозі 0,5мг/дозу та алюмінію гідроксидом (T03) була статистично значущою ( $P \leq 0,05$ ). Середнє квадратичне значення кількості днів з лейкопенією також було значно вищим (7,8 днів) в контрольній групі в порівнянні з групами, в яких тваринам вводили досліджувані препарати антигену (від 0,2 до 1,2 днів).

## Приклад 15

Виявлення імунної реакції на вірусний антиген БВД і захист проти навантаження вірусом БВД типу II після імунізації мікрофлюїдизованим вакцинним препаратом, який містить GPI-0100

Дане дослідження проводили за експериментальних умов, описаних в Прикладі 14, та здійснювали безпосереднє порівняння Квіл-А та GPI-0100. Як показано в табл. 11 і 12, тварини, вакциновані антигенами БВД у вигляді мікрофлюїдизованого препарату на базі препарату Амфіген з вмістом Квіл-А або GPI-0100, мали значний титр антитіл проти вірусів БВД типу I і типу II. Титр антитіл проти вірусу БВД типу I був набагато вищим за титр антитіл проти вірусу БВД типу II. Однак, наступне навантаження вірусом БВД типу II продемонструвало сильний захист із значним зменшенням частоти розвитку захворювання у телят, вакцинованих мікрофлюїдизованим препаратом на базі препарату Амфіген з вмістом GPI-0100.

Таблиця 11

Геометричне середнє значення титру нейтралізуючих вірус антитіл до вірусу БВД типу I

Лікування		Геометричне середнє значення титру нейтралізуючих вірус антитіл до вірусу БВД типу I в день дослідження				
		0	21	35	43	57
T01	Сольовий розчин	<2	<2	<2	<2	35,5
T02	Амфіген, Квіл-А	<2	98,7	20171,0	12203,4	44762,4
T03	Амфіген, 2мг GPI-0100, AIOH	<2	84,6	10998,5	7383,2	25709,2
T04	Амфіген, 2мг GPI-0100	<2	106,0	18179,2	8933,2	28526,2
T05	Амфіген, 3мг GPI-0100	<2	62,9	15024,3	8780,1	19824,4
T06	Амфіген, 5мг GPI-0100	<2	71,1	12203,3	7512,0	16670,2

Таблиця 12

Геометричне середнє значення титру нейтралізуючих вірус антитіл до вірусу БВД типу II

Лікування		Геометричне середнє значення титру нейтралізуючих вірус антитіл до вірусу БВД типу II в день дослідження				
		0	21	35	44	58
T01	Сольовий розчин	<2	<2	<2	<2	14,7
T02	Амфіген, Квіл-А	<2	12,9	2312,0	1692,5	1663,4
T03	Амфіген, 2мг GPI-0100, АІОН	<2	13,2	1663,5	1116,8	1562,3
T04	Амфіген, 2мг GPI-0100	<2	20,5	2610,2	1978,2	2478,7
T05	Амфіген, 3мг GPI-0100	<2	11,4	1752,8	1305,2	2435,4
T06	Амфіген, 5мг GPI-0100	<2	12,0	3158,4	2120,2	1845,6

Таблиця 13

Виділення вірусу БВД після навантаження

Лікування		Виділення вірусу БВД	
		зустрічальність тварин з віремією (%)	LS середня кількість днів з віремією
T01	Сольовий розчин	10/10 (100,0)	8,4
T02	Амфіген, Квіл-А	3/10 (30,0)	0,3
T03	Амфіген, 2мг GPI-0100, АІОН	0/10 (0,0)	0,0
T04	Амфіген, 2мг GPI-0100	1/10 (10,0)	0,1
T05	Амфіген, 3мг GPI-0100	3/10 (30,0)	0,3
T06	Амфіген, 5мг GPI-0100	2/10 (20,0)	0,2

Таблиця 14

Клінічні ознаки захворювання БВД після навантаження

Лікування		Частота розвитку захворювання (%)	Частота виявлення клінічних ознак захворювання БВД (%)			Всього обстежено
			0	1	2	
T01	Сольовий розчин	5/10 (50,0)	103 (60,6)	55 (32,4)	12 (7,1)	170
T02	Амфіген, Квіл-А	5/10 (50,0)	115 (67,6)	48 (28,2)	7 (4,1)	170
T03	Амфіген, 2мг GPI-0100, АІОН	0/10 (0,0)	128 (75,3)	42 (24,7)	0 (0)	170
T04	Амфіген, 2мг GPI-0100	0/10 (0,0)	124 (72,9)	46 (27,1)	0 (0)	170
T05	Амфіген, 3мг GPI-0100	0/10 (0,0)	104 (61,2)	66 (38,8)	0 (0)	170
T06	Амфіген, 5мг GPI-0100	0/10 (0,0)	128 (75,3)	42 (24,7)	0 (0)	170

Таблиця 15

Лейкопенія після навантаження

Лікування		Лейкопенія	
		Доля тварин з лейкемією (%)	LS Середня кількість днів з лейкемією
T01	Сольовий розчин	9/10 (90,0)	8,7
T02	Амфіген, Квіл-А	6/10 (60,0)	1,6
T03	Амфіген, 2мг GPI-0100, АІОН	7/10 (70,0)	2,6
T04	Амфіген, 2мг GPI-0100	4/10 (40,0)	1,5
T05	Амфіген, 3мг GPI-0100	7/10 (70,0)	2,6
T06	Амфіген, 5мг GPI-0100	8/10 (80,0)	2,9

Таким чином, продемонстровано безпечність кожної з вакцин за відсутності побічних реакцій або смертності серед вакцинованих тварин. Потужність кожної вакцини продемонстровано за сероконверсією (титри нейтралізуючих вірус антитіл проти БВД-1 і БВД-2 >1:8) у 100% вакцинованих тварин. Задовільна опірність навантаженню про-

демонстрована при використанні вакцини з додаванням всього 2мг GPI-0100 як ад'юванта.

Приклад 16

Вакцинний препарат з вмістом мікроінкапсульованого антигену в мікрофлюїдизованій емульсії масло-у-воді

3г трегалози (Fluka) додавали у воду для одержання запасного розчину трегалози з концентрацією 333мг/мл. Рекомбінантний антиген PauA, розчинність якого підвищували введенням в 0,8% розчин SDS (SDS/rPauA), додавала до розчину трегалози з одержанням кінцевої концентрації 494мкг rPauA/мл. На наступній стадії 10г полілактидгліколевої кислоти (PLG-Resomer RE 503 H, Boehringer Ingelheim) розчиняли в 200мл метиленхлориду (MeCl<sub>2</sub>). Одержаний розчин ПЛГ/MeCl<sub>2</sub> поєднували з сумішшю SDS-rPauA та розчину трегалози, виготовленою на першій стадії. Поєднаний розчин обробляли мікрофлюїдизацією з використанням Microfluidizer від Microfluidics Model M110EH та мікрофлюїдизований препарат висушували розпиленням з використанням Tetsco Spray Dryer Model SD-05. Висушений розпиленням матеріал збирали з використанням сита 500 мікрон.

Концентрацію rPauA в одержаному матеріалі, висушеному розпиленням, визначали з використанням вестерн-блотингу. 1,04мг висушеного розпиленням матеріалу розчиняли в 50мкл ацетону і центрифугували при 13200об./хв при кімнатній температурі протягом 10хв. Супернатант видаляли. Супернатант і гранульовані фракції сушили в ковпаку біологічної безпеки протягом 2,5год. Гранулу ресуспендували в 47,43мкл розчину зразка (25мкл буферу зразка+10мкл відновлюючого агента+65мкл води). Висушену фракцію супернатанта ресуспендували в 20мкл розчину зразка. В ході вестерн-блотингу використовували очищений PauA як стандарт для кількісного визначення вмісту rPauA у висушеному розпиленням матеріалі.

Готували 20% запасний розчин маніту шляхом розчинення 100г маніту (Sigma) в 500мл води для

ін'єкцій (ВДІ). Розчин нагрівали до 40°C за допомогою гарячої пластини/мішалки та охолоджували до 30°C. Розчин обробляли фільтрацією в стерильних умовах крізь стерильний фільтр з розміром отворів 0,22мкм (Millipore). Готували 2,5% розчин карбоксиметилцелюлози шляхом розчинення 12,5г карбоксиметилцелюлози (Sigma) в 500мл ВДІ та перемішували протягом ночі при 4°C. Розчин обробляли в автоклаві при 121°C.

Порошок, одержаний розпилювальною сушкою, відновлювали в розчині з вмістом 5% маніту, 0,3% карбоксиметилцелюлози і 1:5000 тимерасалу. Відбирали аліквоти кінцевого розчину в у флакони об'ємом 3мл та ліофілізували з використанням Lyophilizer (USIFROID). Ліофілізований порошок являє собою мікроінкапсульований rPauA. Мікроінкапсульований субодиничний білковий антиген ресуспендували в 2мл мікрофлюїдизованої емульсії масло-у-воді з вмістом препарату Амфіген (такої, як мікрофлюїдизована емульсія, описана в Прикладі 20) і використовували як вакцину.

#### Приклад 17

Виготовлення мікрофлюїдизованого препарату вакцини з вмістом бактеріального цільноклітинного антигену і рекомбінантного білкового антигену в емульсії масло-у-воді

Виготовляли два препарати вакцин, які містили рекомбінантний білок PauA *Streptococcus uberis* та клітини бактерій *Escherichia coli* та додавали внутрішньо до емульсії масло-у-воді, описаних в прикладах 2 і 3. Концентрація рекомбінантного антигену PauA становила 100мкг на дозу, а кінцева кількість клітин *E. coli* становила  $4 \times 10^8$  на дозу. Склад ад'ювантної емульсії для двох препаратів вакцин наведено в табл. 16.

Таблиця 16

Препарати вакцин, які містять рекомбінантний білок та суцільні клітини *E. coli*

Лікування	Антиген	Ад'ювант
T01	Плацебо	Сольовий розчин
T02	Pau A/ <i>E. coli</i>	SEAM-14
T03	Pau A/ <i>E. coli</i>	2,5% Амфігену, 0,5мг GPI-0100, 0,5мг холестерину
T04	Pau A/ <i>E. coli</i>	2,5% Амфігену, 0,5мг диметилдіоктадециламонію броміду (ДДА), 0,5мг холестерину

#### Приклад 18

Імунна реакція на мікрофлюїдизовану вакцину, яка містить rPauA та цільноклітинні бактеріальні агенти в емульсії масло-у-воді

В даному експерименті використовували зрілих молочних корів. На момент початку дослідження тварини знаходилися в кінці першого або другого періоду лактації. 2мл кожного препарату вакцини вводили підшкірно тричі, один раз в момент запускання (день 0, D-0), через 28 днів (день 28, D-28) і знову через 4-10 днів після отелення (C+4-C+10). Першу і третю дозу вводили в лівий бік шиї, другу дозу вводили в правий бік шиї. Зразки крові відбирали перед вакцинацією і приблизно через 14 днів та через 32 дні після введення третьої дози вакцини. Титр антитіл проти *E. coli* і антигену rPauA визначали за допомогою ELISA. Як показано на Фігурі 8, результати показують, що

титр антитіл проти rPauA був вищим в групі, в якій тварин вакцинували препаратом вакцини з вмістом GPI-0100 як імуностимулятора та піком на 70-й день після введення першої дози вакцини. Титр антитіл проти антигену *E. coli* показаний на Фігурі 9. Титр антитіл проти антигену *E. coli* був подібним для обох препаратів вакцин, хоча присутність GPI-0100 як імуностимулятора приводила до відносно більш високого титру антитіл в порівнянні з препаратом, який містив ДДА як імуностимулятор.

#### Приклад 19

Аналіз вірицидної активності мікрофлюїдизованих вакцинних препаратів на базі препарату Амфіген

З метою визначення можливості інактивації вірусу в процесі мікрофлюїдизації, визначали вірицидну активність трьох мікрофлюїдизованих препаратів вакцин на базі препарату Амфіген. Три

препарати, які містили три різні інфекційні бичачі віруси, а саме бичачий вірус герпеса (BHV), вірус парагрипу 3 (PI3) і бичачий респіраторно-синцитіальний вірус (BRSV).

Визначення вірицидної активності в трьох препаратах вакцин здійснювали у відповідності до вимог USDA 9CFR.113.35.

Результати, наведені в табл. 17, показують, що мікрофлюїдизація препаратів вакцин на базі препарату Амфіген не спричиняє суттєвої інактивації вакцинного препарату.

Таблиця 17

Аналіз вірицидної активності мікрофлюїдизованих вакцин

Серійний номер	BRSV	BHV	PI3
A	0	0,2	0
AM200	-0,2	0	-0,2
AM75	0	-0,3	-0,3
AM75@37C	0,1	-0,3	-0,2
B	0	-0,1	-0,2
BM200	0	0	-0,2
BM75	-0,2	-0,5	0
BM75@37C	0,5	-0,5	0
C	0,1	-0,1	-0,2
CM200	-0,2	-0,1	-0,2
CM75	0,1	0,5	-0,2
CM75@37C	0,5	0,5	-0,2

A=холестерин добавляли зі швидкістю 650мл/хв

B=холестерин добавляли зі швидкістю 28мл/хв

C=холестерин добавляли зі швидкістю 5мл/хв  
M200=мікрофлюїдизація з використанням сита з розміром отворів 200мкм

M75=мікрофлюїдизація з використанням сита з розміром отворів 75мкм

M75@37C=рідини нагрівали до 37°C перед мікрофлюїдизацією

Значення близько 0,7 вказує на вірицидну дію.

#### Приклад 20

Виготовлення мікрофлюїдизованого препарату Амфіген

Препарат Амфіген готували шляхом поєднання масляного розчину лецитину Дракеол (легке мінеральне масло з вмістом 25% лецитину) і Твіну 80 (з кінцевою концентрацією 0,18%) і Спану 80 (з кінцевою концентрацією 0,08%), змішуючи протягом 8-22 год при 36±1°C. Масляну суміш далі додавали до сольового розчину за допомогою емульгатора Ross® (Hauppauge, NY 11788) при швидкості приблизно 3400об./хв. Далі суміш один раз пропускають крізь мікрофлюїдизатор з камерою для взає-

модію 200мкм при тиску 4500±500фунт/дюйм<sup>2</sup>. На Фігурі 10A і 10B показано стабільність мікрофлюїдизованого препарату Амфіген. Розподіл розміру частинок, виміряний за допомогою лазерної дифракції, в початковій точці часу (Фігура 10A) був майже ідентичним до розподілу розміру частинок через 22 місяці зберігання при 4°C (Фігура 10B).

#### Приклад 21

Електронно-мікроскопічний аналіз імуногенного комплексу Квіл-А/холестерин

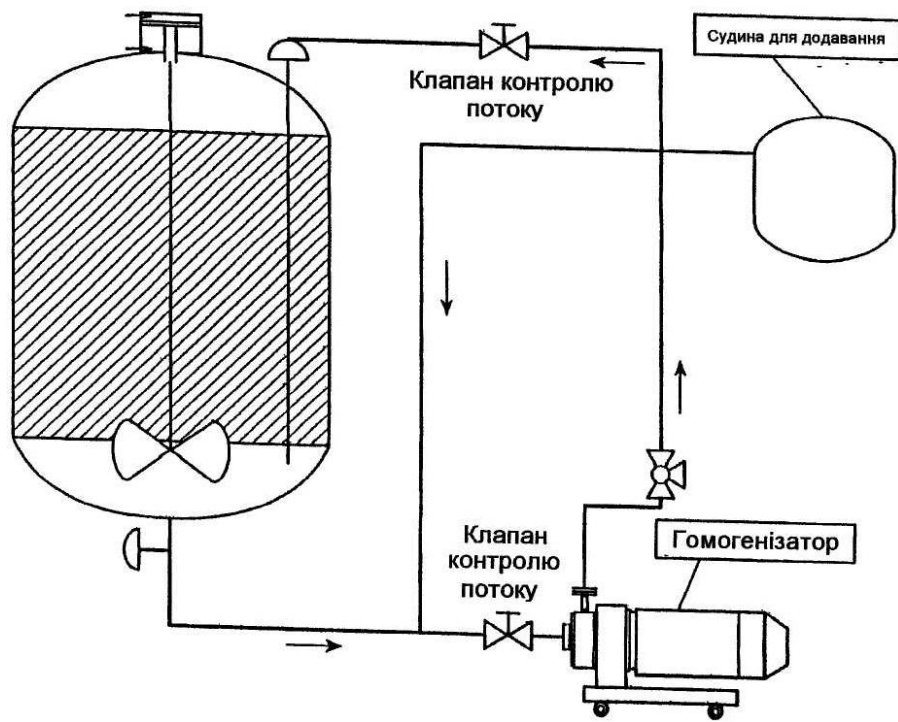
З метою визначення природи імуногенного комплексу, утвореного Квіл-А і холестеринном, виготовляли суміш вказаних компонентів в присутності або за відсутності антигену.

В ступку, яка містила 50мл буфера KR-Hals, додавали антиген БВД типу I при перемішуванні розчину магнітною мішалкою. Після цього по краплях додавали концентрований запасний розчин Квіл-А (50мг/мл) при перемішуванні розчину до одержання кінцевої концентрації 50мкг/мл. За додаванням Квіл-А здійснювали додавання запасного розчину холестерину в етанолі (18мг/мл) до кінцевої концентрації 50мкг/мл.

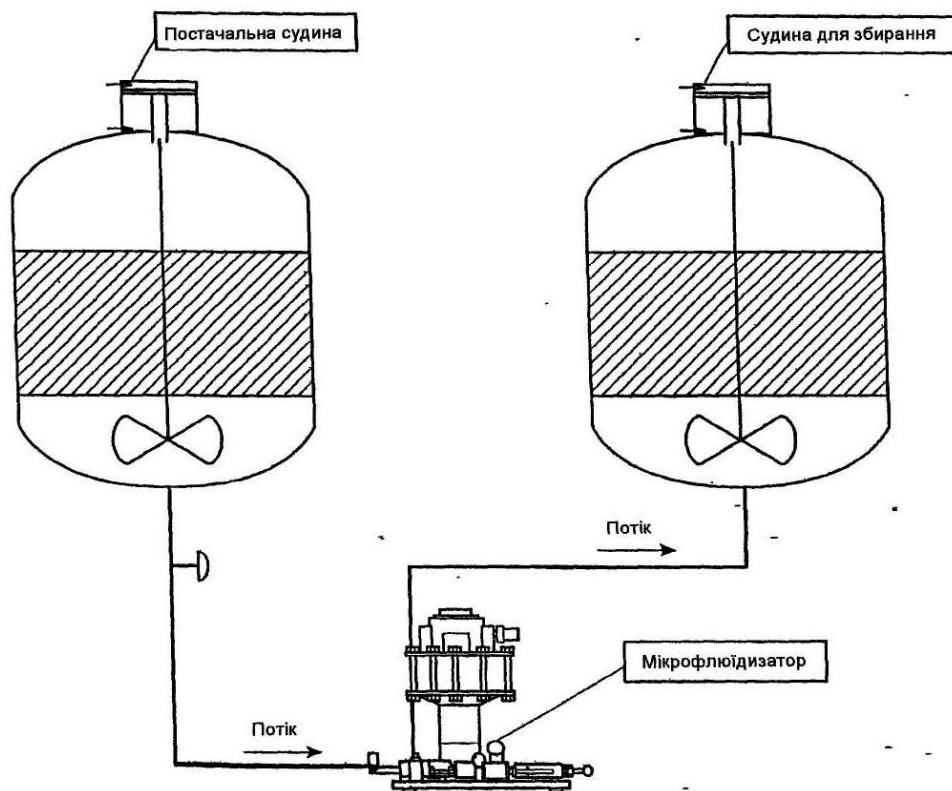
В другу ступку таким же чином додавали Квіл-А і холестерин до 50мл буферу без антигену БВД типу I.

Для трансмісійної електронної мікроскопії 10мкл кожного зразка адсорбували на мідні решітки 400меш з підтримуючою платформою з полівінілформальдегіду (формвар)/вуглецю (Electron Microscopy Sciences, Inc., Fort Washington, PA). Здійснювали негативне забарвлення зразків з використанням 10мкл фільтрованого 2% розчину фосфотунгстової кислоти з pH 5,2 як контрастного агента. Зразки досліджували з використанням трансмісійного електронного мікроскопу JEOL 1230 (JEOL Inc., Токіо, Японія) з прискорюючим вольтажем 80кВ. Цифрове формування зображень здійснювали за допомогою камери Gatan BioScan 792. Мікроскопію плівки здійснювали на плівці 4489 EM та друк здійснювали на папері Kodabrome II RC F3 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY.).

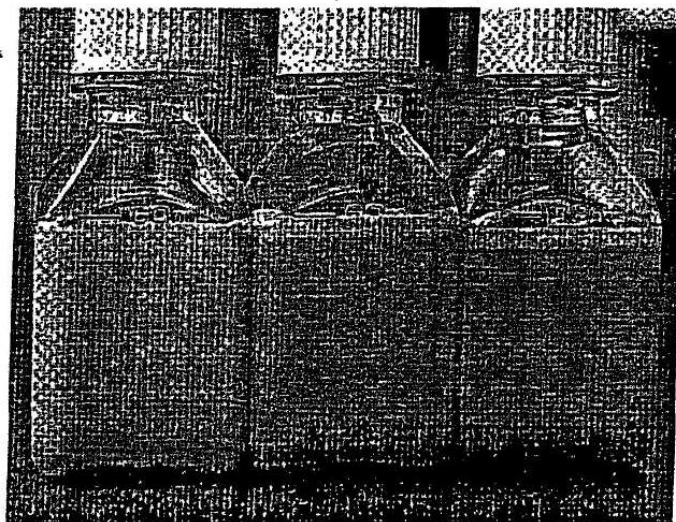
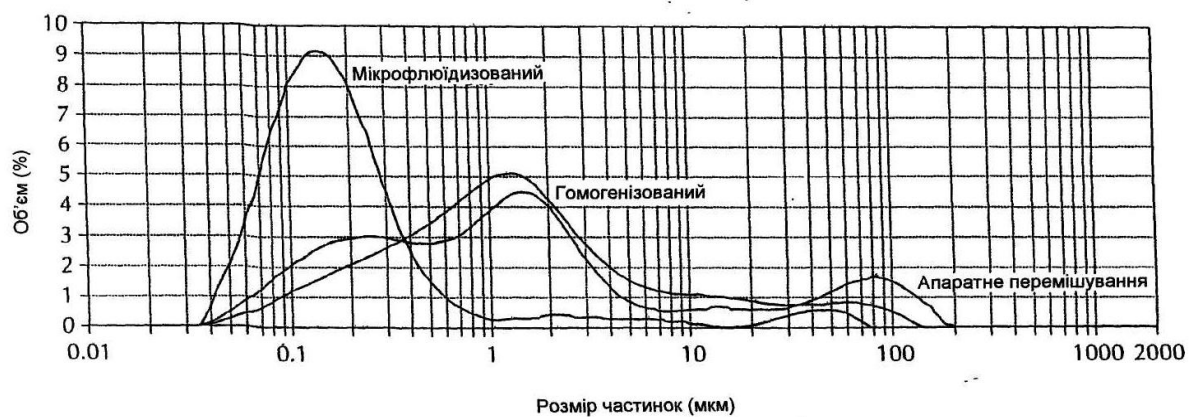
В розчині, який містив тільки холестерин і Квіл-А без антигену БВД типу I, виявляли спіральні міцели разом з міцелами Квіл-А і кристалами холестерину (Фігура 11). Спіральні міцели були переплетеними і виглядали подібними до сита. У зразку, який містив антиген БВД типу I, було виявлено, що спіральні міцели випадковим чином оточують певні щільні області (Фігура 12). Щільні області являють собою антиген БВД типу I і спіральний імуногенний комплекс, який є результатом зв'язування Квіл-А та холестерину, був адсорбований на поверхні антигену БВД типу I.



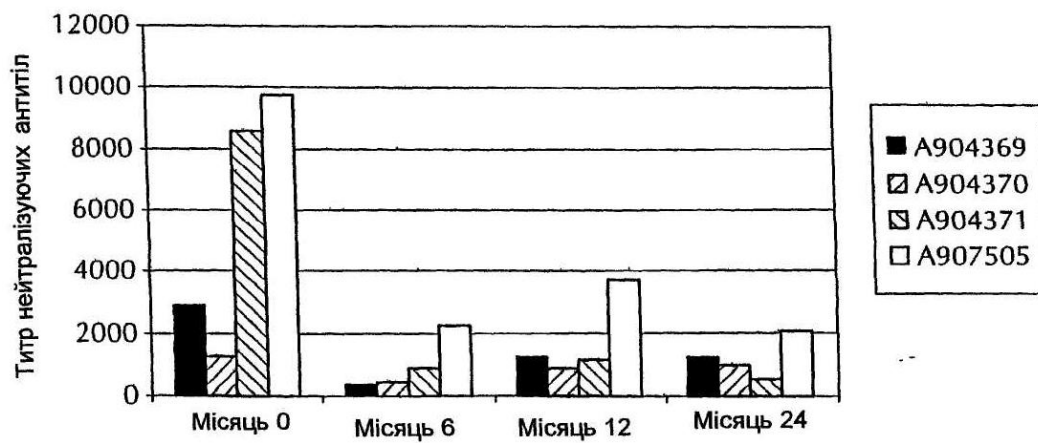
ФІГУРА 2



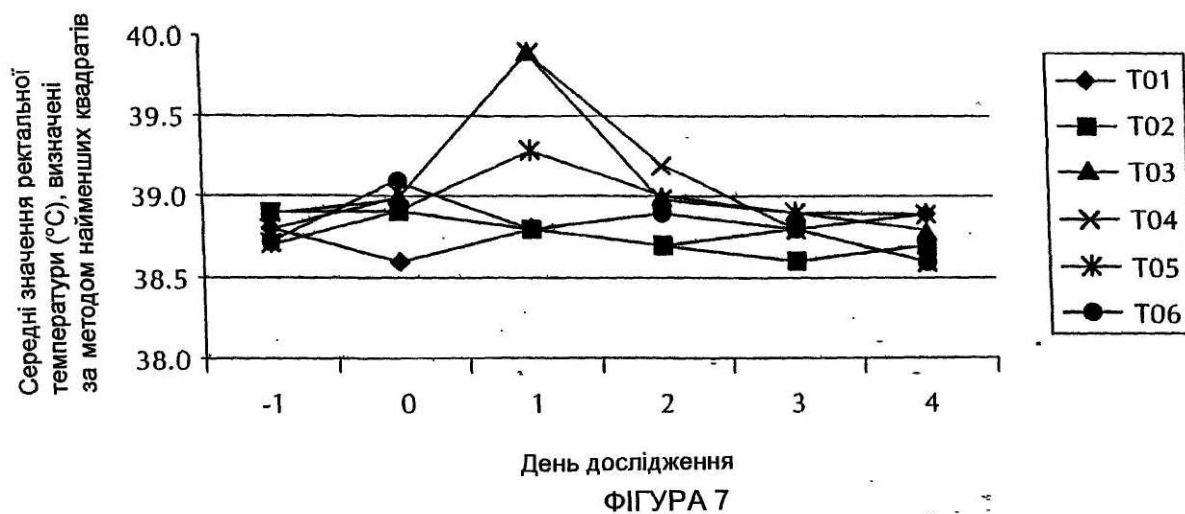
ФІГУРА 3



ФІГУРА 4  
ФІГУРА 5

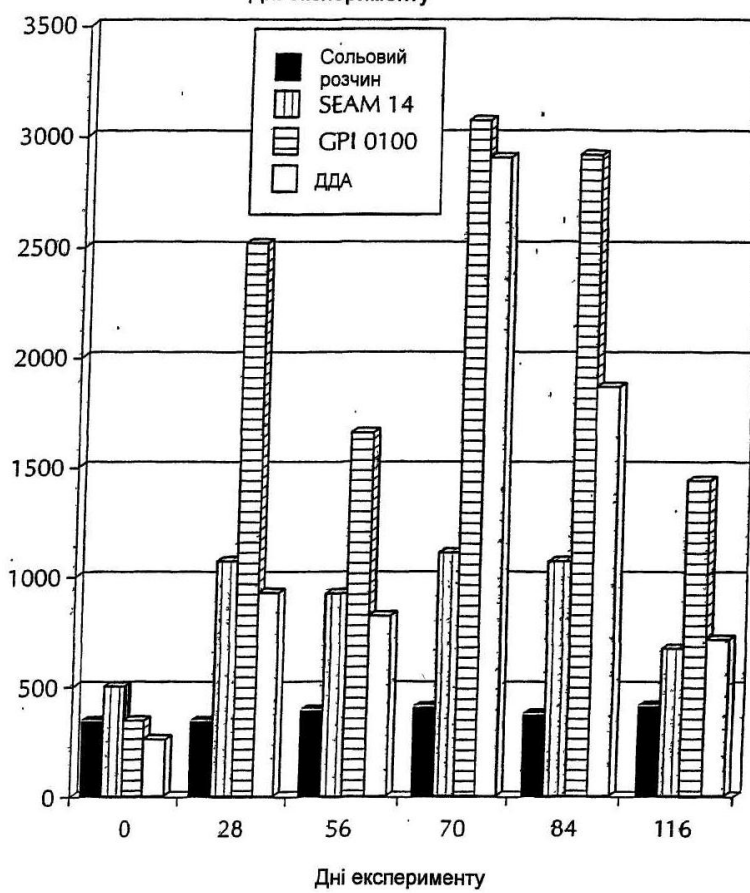
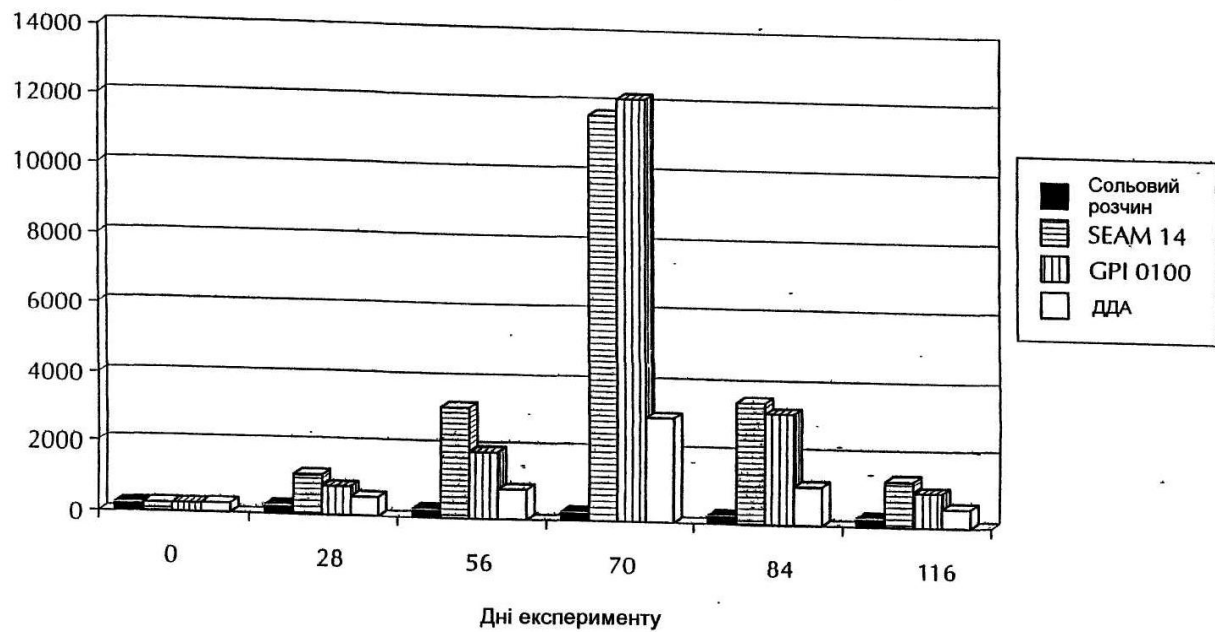


ФІГУРА 6



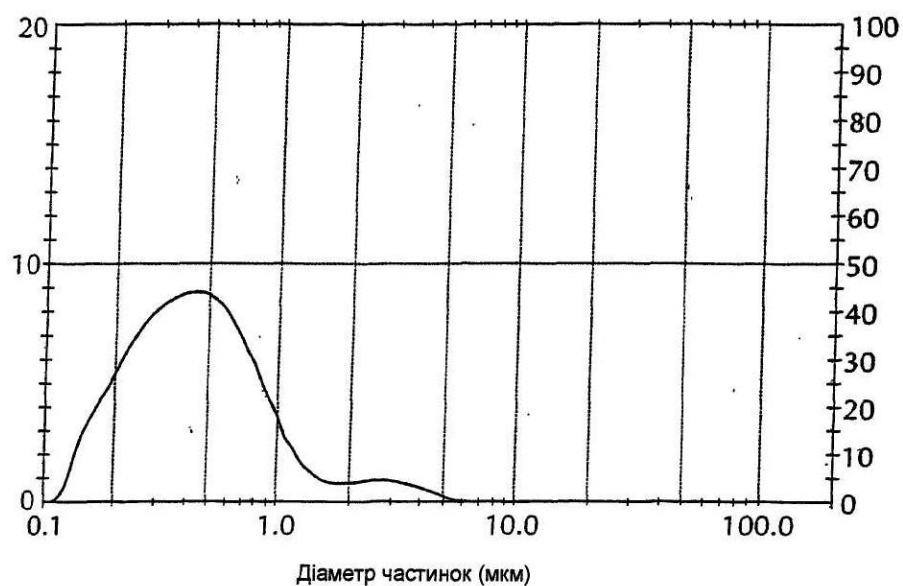


ФІГУРА 8



ФІГУРА 9

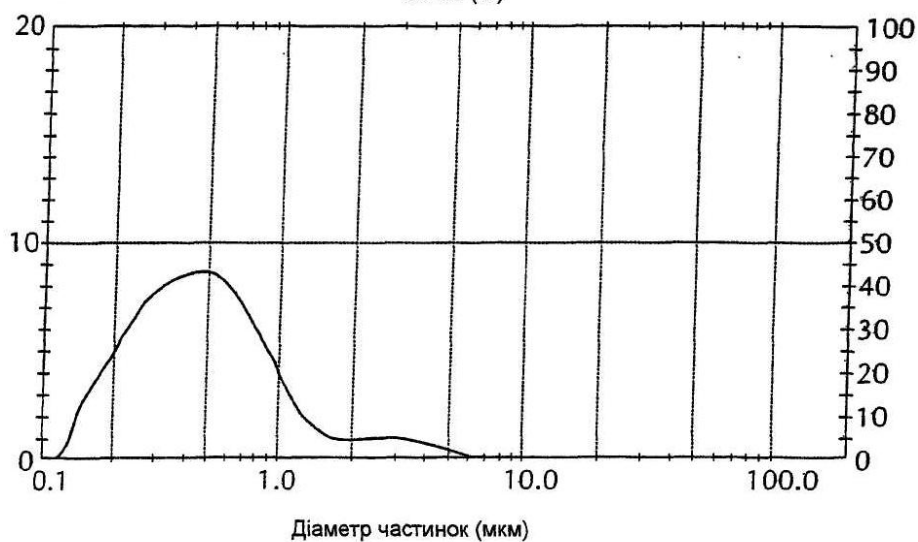
Об'єм (%)



Діаметр частинок (мкм)

ФІГУРА 10А

Об'єм (%)

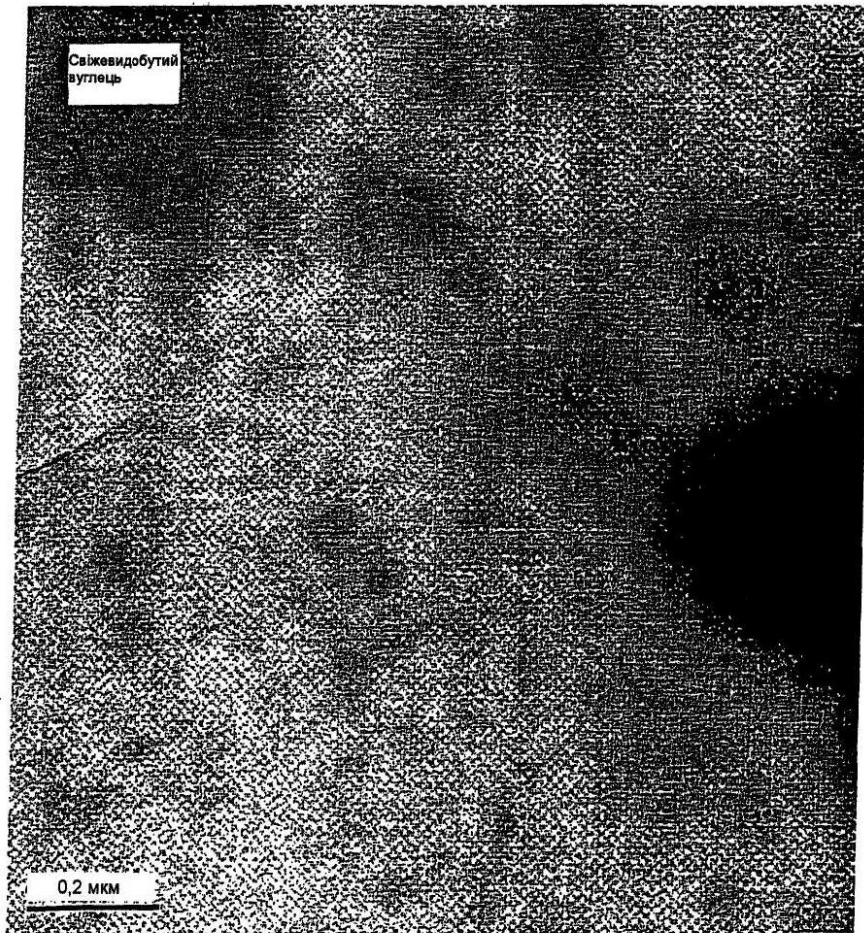


Діаметр частинок (мкм)

ФІГУРА 10В



ФІГУРА 11



ФІГУРА 12