



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 39/12 (2020.02); A61P 31/00 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2017101091, 15.06.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.06.2015

Дата регистрации:
11.08.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
16.06.2014 US 14/305,329

(43) Дата публикации заявки: 16.07.2018 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 11.08.2020 Бюл. № 23

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 16.01.2017

(86) Заявка РСТ:
US 2015/035742 (15.06.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/195504 (23.12.2015)

Адрес для переписки:
109012, ООО "Союзпатент", Россия, 109012,
Москва, ул. Ильинка, 5/2

(72) Автор(ы):

РЮЛИНГ Роджер Х. (US),
ФОРД Брианна (US)

(73) Патентообладатель(и):

БАЙОУМЬЮН КОМПАНИ (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: Pandit S. et al. Enhancement of
immune response of HBsAg loaded poly (L-lactic
acid) microspheres against hepatitis B through
incorporation of alum and chitosan // J
Microencapsul., 2007, Sep;24(6):539-52, фиг.3, 4,
табл.1, 2. US 5817320 A, 06.10.1998. US 5622649
A, 22.04.1997.

(54) КОМПОЗИЦИИ ВАКЦИН С ДВОЙНЫМ АДЪЮВАНТОМ, ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно к ветеринарии, и может быть использована для получения вакцины, предназначенной для индуцирования иммунного ответа против сальмонеллы у кур. Вакцина включает эффективное количество по меньшей мере одного антигена и адъювантное соединение в эмульсии типа вода-масло-вода (WOW), в которой по меньшей мере один антиген представляет собой комбинацию бактерий Salmonella Enteritidis, Salmonella Kentucky и Salmonella Typhimurium. Адъювантное соединение представляет собой гидроксид алюминия,

эмульсия WOW содержит водные везикулы, заключенные в масляные частицы, причем указанные масляные частицы имеют размер меньше 20 мкм и диспергированы во внешней водной фазе, и по меньшей мере 60% (мас./мас.) от общего количества указанного по меньшей мере одного антигена в вакцине содержится в масляных частицах. Группа изобретений также относится к способу получения указанной вакцины и к способу вакцинации кур. Использование данной группы изобретений позволяет получить вакцину против сальмонеллы у кур, в частности, содержащую комбинацию

антигенов Salmonella Enteritidis, Salmonella
Kentucky и Salmonella Typhimurium и двойной

адъювант, обеспечивающую усиление иммунного
ответа. 3 н. и 12 з.п. ф-лы, 4 пр., 8 табл., 6 ил.

R U 2 7 2 9 6 4 6 C 2

R U 2 7 2 9 6 4 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/112 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A61K 39/12 (2020.02); A61P 31/00 (2020.02)

(21)(22) Application: **2017101091, 15.06.2015**

(24) Effective date for property rights:
15.06.2015

Registration date:
11.08.2020

Priority:

(30) Convention priority:
16.06.2014 US 14/305,329

(43) Application published: **16.07.2018 Bull. № 20**

(45) Date of publication: **11.08.2020 Bull. № 23**

(85) Commencement of national phase: **16.01.2017**

(86) PCT application:
US 2015/035742 (15.06.2015)

(87) PCT publication:
WO 2015/195504 (23.12.2015)

Mail address:
**109012, OOO "Soyuzpatent", Rossiya, 109012,
Moskva, ul. Ilinka, 5/2**

(72) Inventor(s):
**RUEHLING Roger H. (US),
FORD Brianna (US)**

(73) Proprietor(s):
BIOMUNE COMPANY (US)

(54) COMPOSITION OF VACCINES WITH DOUBLE ADJUVANT, PREPARATION AND USE

(57) Abstract:

FIELD: medicine; veterinary.

SUBSTANCE: group of inventions can be used to produce a vaccine for inducing an immune response against chicken salmonella. Vaccine comprises an effective amount of at least one antigen and an adjuvant compound in an emulsion of water-oil-water (WOW) type, wherein at least one antigen is a combination of bacteria Salmonella Enteritidis, Salmonella Kentucky and Salmonella Typhimurium. Adjuvant compound is aluminum hydroxide, WOW emulsion contains aqueous vesicles enclosed in oil particles, wherein said oil particles have size smaller than 20 mcm and are

dispersed in external aqueous phase, and at least 60 % (w/w) of the total amount of said at least one antigen in the vaccine is contained in the oil particles. Group of inventions also relates to a method for preparing said vaccine and to a method for chicken vaccination.

EFFECT: use of this group of inventions enables to obtain a chicken salmonella vaccine, in particular, containing a combination of antigens Salmonella Enteritidis, Salmonella Kentucky and Salmonella Typhimurium and a double adjuvant providing enhanced immune response.

15 cl, 4 ex, 8 tbl, 6 dwg

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к вакцинам, их получению и применению.

Конкретнее, изобретение относится к вакцинам с двойным адьювантом, включающим, по меньшей мере, один антиген в эмульсии типа вода-масло-вода (WOW) и дополнительный адьювант. Вакцины изобретения могут включать любой тип антигена, предпочтительно, бактериальные антигены, и, в особенности, подходят для применения в ветеринарии, например, для вакцинации кур.

Уровень техники

В состав вакцин обычно включают адьювант для усиления и повышения иммунного ответа, а именно чтобы продлить ответ антител. Например, адьювант Фрейнда (Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine, 1942, 49, §548-553), который соответствует раствору антигена, эмульгированному в минеральном масле, впервые был применен в качестве иммуностимулятора или в качестве иммуномодулятора.

Адьювант Фрейнда формирует эмульсию вода-в-масле (WO) и проявляет эффект адьюванта, существенным образом, за счет замедленного высвобождения антигена.

Для обеспечения эффективных вакцин была проведена оценка множества других адьювантных систем. Такие системы включают, например, хитозан, цитокины, олигонуклеотиды, липиды, токсины, гаптеновые носители или гидроксид алюминия. В связи с этим, Matsumoto et al. (Avian diseases, 1971, 15, 109-117) протестировали эффективность в вакцинах производного алюминия, такого как гель гидроксида алюминия и хром-алюминий. Blackall et al. (Avian Diseases, 1992, 36, 632-636) сравнили адьюванты гидроксида алюминия и эмульсии WO. Сквален, сапонин, Quil A, липоидный амин, гликан или авридин также добавляли в качестве адьювантов к вакцинам для повышения их эффективности.

EP 0 640 348 относится к вакцине, включающей WO-эмульсию и иммуностимулирующий гликан. US 2014/0099358 предлагает вакцину, включающую эмульсию вода-в-масле и алюминий или соединение алюминия или TiterMax (сквален). Однако дизайн комбинированной системы эмульсия-адьювант создает проблемы с безопасностью, из-за возможных побочных эффектов (Reid and Blackall, Avian Diseases, 1987, 31, 59-63). Кроме того, традиционные WO-эмульсии часто имеют высокую вязкость и их трудно получать или вводить с помощью инъекции.

Вакцины, основанные на WOW-эмульсиях, были протестированы в опытах по in ovo иммунизации птичьих эмбрионов (US 5,817,320) и против специфических вирусов, таких как вирус болезни Ньюкасла, вирус инфекционного бронхита (Cajavec et al., Acta Veterinaria Hungarica, 1998, 46, 25-34), и инфекционного насморка (Blackall, World's Poultry Science Journal, 1995, 51, 17-26).

Такие вакцины в WOW-эмульсии также были улучшены в терминах стабильности, в зависимости от природы и пропорции поверхностно-активных веществ, примененных для получения WOW-эмульсии. В данном контексте, Hunter и Bennet изучили влияние блок-сополимера полиоксипропилена и полиоксиэтилена, имевшего формулу $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_b(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_a(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_b$ на гидрофильно-липофильный баланс (HLB) ниже 2 (US 5,622,649). Они также протестировали такие WOW-эмульсии в способах вакцинации для инфекции гепатита и отметили их эффективность против столбняка, малярии, СПИДа, гриппа и пневмококковой пневмонии.

Jiao и Burgess (AAPS Pharm. Sci., 2003, 5, 1-12) оценили долгосрочную стабильность множественных WOW-эмульсий в отношении концентраций двух специфических поверхностно-активных веществ, Span 83 и Tween 80, и определили, что отношение концентраций, равное 20% Span 83 и 0,1% Tween 80, обеспечивает наилучшую

долгосрочную стабильность WOW-эмульсий. WOW-эмульсии, однако, не всегда дают удовлетворительный иммунный ответ. Кроме того, с WOW может быть связан ряд потенциальных недостатков, включая отсутствие в них однородности, например, в профиле распределения частиц по размерам и возможную вязкость гетерогенных композиций. Кроме того, не установлена приемлемость таких систем для крупных объектов, таких как клетки.

Соответственно, в данной области техники существует потребность в альтернативных, безопасных и усовершенствованных вакцинах, в особенности, для применения у животных.

10 Раскрытие изобретения

Изобретение обеспечивает новые вакцины, имеющие усовершенствованную эффективность. Изобретение, в особенности, раскрывает вакцину с системой двойного адьюванта, которая комбинирует WOW-эмульсии и адьювантное соединение. Изобретение проистекает из неожиданного сделанного авторами изобретения открытия, что такие системы с двойным адьювантом безопасны и дают усовершенствованный иммунный ответ *in vivo*. В особенности, изобретение показывает, что такие вакцины индуцируют мощные защитные иммунные ответы у животных, не относящихся к человеку, и особенно подходят для бактериальных антигенов, предпочтительно, включая бактерии с цельными клетками.

20 Цель изобретения, следовательно, относится к вакцине, включающей эффективное количество, по меньшей мере, одного антигена в эмульсии типа вода-масло-вода (WOW) и дополнительный адьювант.

Еще одна цель изобретения относится к вакцине, включающей эффективное количество, по меньшей мере, одного антигена и адьювантное соединение в эмульсии типа вода-масло-вода (WOW).

Еще одна цель изобретения представляет собой вакцину, как определена выше, для применения в индукции иммунного ответ против указанного антигена в животном, не относящемся к человеку.

30 Дополнительная цель изобретения относится к способу индуцирования иммунного ответ против антигена в животном, не относящемся к человеку, включающему введение в указанное животное композиции, включающей эффективное количество указанного, по меньшей мере, одного антигена в WOW-эмульсии и дополнительный адьювант.

Еще одна цель изобретения представляет собой способ получения вакцины, включающий:

- 35 - эмульгирование раствора, по меньшей мере, одного антигена в масляной основе, с формированием тем самым WO-эмульсию,
- добавление указанной WO-эмульсии к фазе диспергирования, с формированием тем самым WOW-эмульсии и, необязательно, дополнительное эмульгирование указанной WOW-эмульсии, и
- 40 - смешивание указанной WOW-эмульсии с дополнительным адьювантом, предпочтительно, в комбинации с дополнительным количеством указанного, по меньшей мере, одного антигена.

В конкретном воплощении, дополнительный адьювант представляет собой гидроксид алюминия.

45 В еще одном конкретном воплощении, по меньшей мере, один антиген представляет собой бактериальный антиген, предпочтительно, живую, ослабленную или инактивированную бактерию.

В конкретном аспекте изобретения, вакцина, как определена выше, включает

указанный антиген, заключенный в масляные частицы, предпочтительно имеющие размер от 1 до 40 мкм.

Как будет раскрыто далее, композиции изобретения, в особенности, подходят для вакцинации животных, не относящихся к человеку, в особенности, домашней птицы (например, кур, водоплавающих птиц) или диких птиц.

Краткое описание чертежей

Фигура 1. Представление WOW-эмульсии

Фигура 2А-2В. % защиты против инфекции *Salmonella Enteritidis* (SE) в курах, обработанных вакциной А подкожным путем (SQ, фигура 2А) и внутримышечным путем (IM, фигура 2В).

Фигура 3А-3В. % защиты против инфекции *Salmonella Typhimurium* (ST) в курах, обработанных вакциной А подкожным путем (SQ, фигура 3А) и внутримышечным путем (IM, фигура 3В).

Фигура 4. % защиты против инфекции *Salmonella Kentucky* (SK) в курах, обработанных вакциной А подкожным и внутримышечным путем.

Фигура 5А-5В. % защиты против инфекции *Salmonella Heidelberg* (SH) в курах, обработанных вакциной А подкожным (SQ, фигура 5А) и внутримышечным путем (IM, фигура 5В).

Фигура 6. Реакции в месте инъекции при внутримышечном введении для вакцины А у курочек.

Осуществление изобретения

Изобретение обеспечивает новые и усовершенствованные композиции вакцин, способы их получения и их применение. Изобретение, в особенности, раскрывает новые вакцины, включающие эффективное количество, по меньшей мере, одного антигена в WOW-эмульсии и дополнительно включающие адъювант. Изобретение проистекает из неожиданного сделанного авторами изобретения открытия, что такую систему с двойным адъювантом легко вводить с помощью шприца, она безопасна и обеспечивает более высокую эффективность (защитный иммунитет) по сравнению с вакцинами предшествующего уровня техники, в которых применяют другие адъювантные системы. В особенности, авторы изобретения продемонстрировали синергический эффект для вакцины изобретения, включающей, по меньшей мере, один антиген и систему с двойным адъювантом. Авторы изобретения также продемонстрировали усовершенствованную эффективность защиты таких вакцины против инфекции сальмонеллы *in vivo*, а также их безопасность.

Цель изобретения, следовательно, относится к вакцине или композиции, включающей эффективное количество, по меньшей мере, одного антигена в WOW-эмульсии и дополнительный адъювант.

Еще одна цель изобретения представляет собой вакцину или иммуногенную композицию, включающую антиген и дополнительный адъювант в WOW-эмульсии, в которой антиген включен в масляные частицы, включающие внутреннюю водную фазу и масляную фазу, и в которой дополнительный адъювант включен во внешнюю водную фазу, предпочтительно, в комплексе с антигеном.

Еще одна цель изобретения представляет собой вакцину или иммуногенную композицию, включающую цельные клетки в WOW-эмульсии, в которой, по меньшей мере, 90% масляных частиц в WOW-эмульсии имеют размер менее 20 мкм, OD600/мл композиции превышает 4, и, по меньшей мере, 60% клеток в композиции находятся в указанных масляных частицах.

Дополнительная цель изобретения представляет собой способ индуцирования

иммунного ответ против, по меньшей мере, одного антигена в животном, не относящемся к человеку, включающий введение животному вакцины или композиции, включающей эффективное количество указанного, по меньшей мере, одного антигена и адьювантное соединение в WOW-эмульсии.

5 Дополнительная цель изобретения представляет собой способ вакцинации животного, не относящегося к человеку, против патогена, включающий введение животному вакцины или композиции, включающей эффективное количество, по меньшей мере, одного антигена патогена и адьювантное соединение в WOW-эмульсии.

10 Дополнительная цель изобретения представляет собой композицию, включающую эффективное количество, по меньшей мере, одного антигена и адьювантное соединение в WOW-эмульсии для применения в индуцировании иммунного ответа против указанного, по меньшей мере, одного антигена в животном, не относящемся к человеку.

Антиген

15 Термин «антиген» относится к агенту, который при введении в организм животного, может быть распознан иммунной системой животного и вызвать иммунный ответ. При введении в организм животного, антигены, как правило, специфически взаимодействуют с распознающей антиген молекулой иммунной системы, такой как, например, иммуноглобулин (антитело) или антигенраспознающий рецептор Т-клеток (TCR), для того, чтобы вызывать иммунный ответ, ведущий к генерации клеточного ответа
20 (например, клетки памяти (например, В- и Т-клетки памяти) или цитотоксические клетки) и/или гуморального (антитело) ответа.

 Изобретение может быть применено с антигенами любого типа, такими как, без ограничений, цельные патогены (такие как клетки, вирусы) или их фрагменты или фракции (такие как белки, полипептиды, пептиды, нуклеиновые кислоты, липиды и
25 т.п.). Патоген может представлять собой любой агент, способный инфицировать животное, например, человека, птиц (например, кур, индеек, уток, голубей и т.д.), собак, кошек, крупный рогатый скот, свиней или лошадей. Предпочтительно, антиген представляет собой птичий патогенный агент, более предпочтительно, куриный. Антиген может представлять собой, например, цельный патоген, «поверхностный антиген»,
30 экспрессируемый в естественных условиях, например, на поверхности патогена, или инфицированной или больной (например, опухолевой) клетки.

 В частности, антиген может представлять собой любые патогенные, или непатогенные, микроорганизмы, такие как вирусы, бактерии, любые другие паразитирующие организмы, или антигены. Это могут быть живые, ослабленные,
35 инактивированные или убитые микроорганизмы, как цельные микроорганизмы, так и субъединицы микроорганизмов, инактивированные химерные или рекомбинантные микроорганизмы, разрушенные микроорганизмы, мутантные микроорганизмы, дефектные микроорганизмы или их комбинации. Антиген также может представлять собой или включать один или несколько эпитопов или антигенных частей цельной
40 структуры микроорганизма, например, вируса, бактерий или паразитического организма, таких как препараты антигенных белков, полученные из патогенов, рекомбинантных белков, предпочтительно, вирусный антиген, такой как вирусные капсидные белки, белки клеточной стенки, пептиды или части структуры бактериального или паразитического организма, такие как полисахариды, липополисахариды и гликобелки.
45 Антиген также может представлять собой ДНК или рекомбинантные ДНК. Антигены могут быть обеспечены в очищенной или неочищенной форме.

 Если антиген представляет собой ослабленный микроорганизм, такой как вирус, бактерия или другие патогены, ослабленный патоген сохраняет иммуногенные свойства

и, в основном, лишен патогенных свойств. Ослабление может происходить в результате применения естественных или искусственных способов ослабления, таких как пассирование в живых животных или в различных естественных средах, включая органы, клетки, яйца с развивающимися эмбрионами и т.п. Искусственное ослабление также может быть получено путем химической обработки, сушки, старения, адаптации к низким температурам или к конкретным условиям культивирования, генетических делеций и т.п.

Антиген также может включать убитые инактивированные микроорганизмы. Получение инактивированных вирусов для вакцинации, как правило, достигают с помощью химических или физических средств. На химическую инактивацию можно воздействовать, обрабатывая вирусы, например ферментами, формальдегидом, β -пропиолактоном, бинарным этилен-имином или их производными. Полученный таким способом инактивированный вирус может быть впоследствии нейтрализован или стабилизирован. Физическая инактивация может быть осуществлена путем воздействия на вирусы высокоэнергетическим излучением, таким как ультрафиолетовое излучение, рентгеновское излучение или γ -излучение.

Бактерии, включая споры, могут быть инактивированы, например, с помощью нагревания, давления и/или путем применения химических агентов, часто называемых бактерицидами. Например, для инактивации бактерий применяют едкие композиции, например, формальдегид и гипохлорит натрия (отбеливатель). Альтернативно, инактивация бактерий может быть получена под воздействием этиленоксида, γ -излучения, стерилизации паром или путем применения обработки диоксидом углерода в около- и сверхкритическом состоянии. Бактерии также могут быть инактивированы или могут утратить вирулентные свойства путем генетической модификации одного или нескольких генов, вовлеченных в патогенность. Примеры таких генетических модификаций раскрыты, например, в WO2012/092226.

Такие ослабленные или инактивированные микроорганизмы, например, вирусы, бактерии или другие птичьи паразиты также могут быть приобретены из коммерческих источников.

Антиген может быть гомологичного (таким как куриный вирус для защиты кур) или гетерологичного (таким как вирус индейки для защиты кур) типа.

Вакцины или композиции изобретения могут включать комбинацию живых антигенов, синтетических антигенов, их фрагментов или фракций. Композиции также могут включать антигены из различных патогенов, для обеспечения иммунного ответа.

В соответствии с настоящим изобретением, антиген может представлять собой вирус (быть получен из вирусов), ответственный за распространенные заболевания, такие как описаны G.D. Butcher, J.P. Jacob и F.B. Mather (PS47, Veterinary Medicine-Large Animal Clinical Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida; May 1999), такие как птичья оспа, болезнь Ньюкасла, инфекционный бронхит, перепелиный бронхит, лимфолейкоз, болезнь Марека, инфекционный бурсит, инфекционный ларинготрахеит, синдром снижения яйценоскости, реовирус, инфекционный тендовагинит, птичий энцефаломиелит, синдром распухшей головы, ринотрахеит индеек или птичий грипп, из бактерий, ответственных за распространение микоплазмоза, пастереллеза, сальмонеллеза, бордетеллеза и т.п., и/или из других птичьих паразитов, ответственных за распространение кокцидиоза, кампилобактериоза. Предпочтительные вакцина, примененные в композиции вакцины настоящего изобретения, включают цельный ослабленный живой штамм вируса.

Предпочтительные антигены представляют собой клеточные патогены или их

получают из клеточных патогенов, в особенности, из бактерий или грибов, таких как *Actinobaccilus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, сальмонелла, шигелла, иерсиния, кампилобактер, клостридиум, вибрион и лямблии, энтамеба и криптоспоридий.

5 В конкретном воплощении, по меньшей мере, один антиген включает бактериальную клетку, предпочтительно, живую, ослабленную или инактивированную бактерию. В контексте настоящего изобретения бактериальная клетка может включать цельные клетки, субфракции клеток или их дебрис или осадки.

В предпочтительном воплощении, бактериальная клетка представляет собой
10 бактерию сальмонеллу, предпочтительно, выбранную из штаммов *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Kentucky*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Heidelberg* или их комбинации. В частности, антиген включает комбинацию из нескольких различных бактериальных клеток, более предпочтительно, различных штаммов сальмонеллы и/или их субфракций. В предпочтительном воплощении, антиген включает, по меньшей мере, две различных
15 клетки сальмонеллы, которые выбирают из *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium* и *Salmonella Kentucky*.

Адьювант

Как было указано, изобретение комбинирует WOW-композицию и адьювантное
соединение. Как WOW-композиция, так и адьювант проявляют адьювантную
20 активность, которая, при комбинировании в соответствии изобретением, неожиданно обеспечивает синергетический эффект.

В контексте изобретения дополнительный адьювант представляет собой любое
соединение, которое может способствовать или стимулировать иммунный ответ на
антиген.

25 Примеры адьювантов включают, без ограничений, белки, полипептиды, пептиды, нуклеиновые кислоты (такие как олигонуклеотиды), сахара, токсины, липиды, синтетические молекулы или соли, такие как соли алюминия. Более конкретные примеры адьювантов включают химические и полипептидные иммуностимуляторы, которые усиливают ответ иммунной системы на антигены. Такие адьюванты могут включать,
30 например, гидроксид алюминия, фосфат алюминий, цитокины, лимфокины, молекулы адгезии, бактериальные токсины, производные хитина и хитозан и им подобные.

Соли алюминия в настоящее время применяют с антигенами в виде осажденной
алюминием вакцины и в виде адсорбированной алюминием вакцины. В качестве примера
соли алюминия, можно привести гидроксид алюминия.

35 В предпочтительном воплощении, дополнительный адьювант представляет собой соль алюминия, предпочтительно, гидроксид алюминия.

В конкретном воплощении, адьювант представляет собой комплекс антиген-
адьювант, предпочтительно в комбинации с дополнительным количеством, по меньшей
мере, одного антигена, как определен выше. Более предпочтительно, адьювант
40 представляет собой комплекс антиген-гидроксид алюминия.

WOW-эмульсии

Термин «WOW» обозначает эмульсию типа вода-масло-вода. Эмульсии типа вода-
масло-вода (WOW) представляют собой эмульсии, в которых небольшие капли воды
или водные везикулы (внутренняя водная фаза) заключены внутри масляных частиц
45 (масляная фаза), диспергированных в непрерывной водной фазе (внешняя водная фаза). WOW-эмульсии получают в результате первичного эмульгирования, при котором водную фазу добавляют к масляной фазе, с последующим, по меньшей мере, вторичным эмульгированием, при котором указанную масляную фазу диспергируют в водной

фазе. Конкретные WOW-эмульсии или композиции изобретения, как показано на фигуре 1, как правило, включают, внутреннюю водную фазу, соответствующую водным везикулам или каплям, окруженным пленкой первого поверхностно-активного вещества, масляную фазу, окруженную пленкой второго поверхностно-активного вещества, и

5 внешнюю водную фазу.

Типичные WOW-композиции представляют собой композиции в виде частиц, включающих водные везикулы, встроенные в масляные частицы, указанные масляные частицы диспергированы во внешней водной фазе.

Предпочтительно, антиген или его фракция содержится во внутренней водной фазе, заключенной или инкапсулированной в масляные везикулы, а дополнительное адъювантное соединение находится во внешней водной фазе. В предпочтительном воплощении, внешняя водная фаза включает фракцию указанного, по меньшей мере, одного антигена и указанный дополнительный адъювант, предпочтительно, в форме комплекса антиген-адъювант. В соответствии с предпочтительным воплощением,

15 приблизительно 75% от общего количества антигена в композиции находятся в масляных везикулах, и приблизительно 25% от общего количества антигена в композиции находится во внешней водной фазе, необязательно, в комплексе с адъювантным соединением.

WOW-эмульсии могут иметь различные характеристики размера/распределения.

20 Однако в предпочтительном воплощении, масляные частицы имели размер от 1 до 40 мкм, более предпочтительно, от 3 до 30 мкм, еще более предпочтительно, от 3 до 20 мкм, наиболее предпочтительно, от 5 до 20 мкм. Размер частицы, как правило, обозначает ее диаметр. Изобретение действительно показывает, что такой диапазон размера обеспечивает наилучшую иммунологическую эффективность при введении *in vivo*.

В частности, в предпочтительных WOW-композициях изобретения, по меньшей мере, 80% масляных частиц имеют размер менее 20 мкм, более предпочтительно, по меньшей мере, 85%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 90% масляных частиц имеют размер менее 20 мкм. Кроме того, в предпочтительных воплощениях, по меньшей мере,

30 5%, предпочтительно, приблизительно 10% масляных частиц имеют размер равный или менее 10 мкм, предпочтительно, размер от 5 до 10 мкм. Наиболее предпочтительные композиции изобретения имели профиль распределения масляных частиц такой, что, по меньшей мере, 90% масляных частиц имеют размер менее чем или равный 20 мкм и, по меньшей мере, 10% имеют размер менее 10 мкм (например, $D_{10} \leq 10$ мкм и $D_{90} \leq 20$ мкм). Изобретение показывает, что с таким размером и профилем распределения может быть получен особенно сильный иммунный ответ против бактериальных антигенов.

Масло

Подходящие масла для применения в WOW-эмульсии изобретения включают, без ограничений, растительные масла, животные жиры и минеральные масла или их смеси.

40 Примеры растительных масел включают, без ограничений, кокосовое масло, кукурузное масло, хлопковое масло, оливковое масло, пальмовое масло, арахисовое масло, рапсовое масло, рапсовое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, соевое масло, подсолнечное масло, горчичное масло, ланолиновое масло, миндальное масло, аргановое масло, касторовое масло, масло макадамии, масло ореха кешью, масло

45 лесного ореха, масло монгонго, масло ореха пекан, фисташковое масло, масло грецкого ореха, масло калофилла, масло авокадо, соевое масло, масло жожоба или их смеси.

Примеры животных жиров включают, без ограничений, рыбий жир, жир черепахи, норковый жир, куриный жир, китовый жир, кашалотовый жир, тюлений жир, рыбий

жир, масло эму, гидрогенизованный сквален (или пергидросквален) или их смесь(смеси).

Примеры минеральных масел включают, без ограничений, парафиновое масло, такое как парафин и изопарафины, вазелиновое масло, Drakeol или минеральное масло Light No.5.

5 В конкретном воплощении, WOW-эмульсии и масляные частицы изобретения включают одно или несколько масел, которые предпочтительно выбирают из растительных, животных и минеральных масел или смесь их. Предпочтительно WOW-эмульсии и масляные частицы включают, по меньшей мере, минеральное масло.

Поверхностно-активное вещество

10 В предпочтительном воплощении, WOW-эмульсии изобретения дополнительно содержат, по меньшей мере, одно поверхностно-активное вещество.

Поверхностно-активное вещество(поверхностно-активные вещества), как правило, выбирают, или комбинируют, или применяют в условиях, обеспечивающих композиции надлежащий гидрофильно-липофильный баланс (HLB). HLB поверхностно-активного
15 вещества или комбинации поверхностно-активных веществ, представляющее собой меру того, в какой степени вещество гидрофильно или липофильно, определяют путем вычисления значения для различных областей молекул, как описано Griffin (Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 1949, 1(5), 311-26 и Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 1954, 5(4), 249-56).

20 Наиболее предпочтительно, если поверхностно-активное вещество или комбинация поверхностно-активных веществ, примененная в первой эмульсии, имеет низкое значение HLB (как правило, между 4 и 7, предпочтительно, равное примерно 6,0), и если поверхностно-активное вещество или комбинация поверхностно-активных веществ, примененная во второй эмульсии имеет высокое значение HLB (как правило, между 7
25 и 15, предпочтительно, примерно 10,5).

Примеры поверхностно-активных веществ, примененных в эмульсии вакцины, включают, без ограничений, сорбитана моноолеат (Span 80), полиоксиэтиленсорбитана моноолеат (Tween 80), сорбитансесквиолеат (Span 83), лецитин и маннида моноолеат или их смеси.

30 Предпочтительно, WOW-эмульсии изобретения включают, по меньшей мере, одно поверхностно-активное вещество, выбранное из полиоксиэтиленсорбитана моноолеата и сорбитана моноолеата. Более предпочтительно, поверхностно-активное вещество, примененное в первой WO-эмульсии, представляет собой комбинацию Span 80 и Tween 80, и поверхностно-активное вещество, примененное во второй OW-эмульсии,
35 представляет собой Tween 80.

Соли

Вакцины и композиции изобретения необязательно дополнительно включают одну или несколько солей. Добавление соли может ингибировать осмос воды в масляные частицы и дополнительно стабилизировать масляные частицы.

40 Примеры таких солей включают, без ограничений, хлорид натрия, хлорид магния, сульфат натрия или сульфат магния. В конкретном воплощении, соль представляет собой хлорид натрия.

Консерванты

Композиции изобретения могут дополнительно включать один или несколько
45 консервантов, которые приемлемы для применения в области ветеринарии. Без ограничений, примеры подходящих консервантов включают:

- кислоты, такие как бензойная кислота, сорбиновые кислоты и их натриевые или калиевые соли;

- эфиры, такие как метилпарабен, этилпарабен и пропилпарабен;
- спирты, такие как хлорбутанол, бензиловый спирт, фенилэтиловый спирт, феноксиэтанол, фенолы, такие как хлоркрезол и о-фенилфенол;
- соединения ртути, такие как тимеросал, нитромерзол, нитрат фенилртути и ацетат фенилртути;
- соединения четвертичного аммония, такие как хлорид бензалкония и хлорид цетилпиридиния.

В предпочтительном воплощении, консервант представляет собой раствор тимеросала, и, как правило, 10%-ный раствор тимеросала.

Способ получения

Композиции изобретения могут быть получены с применением методик, как правило, известных как таковые в данной области техники. Однако предпочтительно, чтобы способ включал первую стадию формирования WOW-эмульсии и вторую стадию смешивания указанной WOW-эмульсии с дополнительным адьювантным соединением.

В частности, вакцины изобретения могут быть получены способом, включающим следующие стадии:

а) эмульгирование раствора указанного, по меньшей мере, одного антигена в масляной основе, с формированием тем самым эмульсии вода-в-масле (WO),

б) добавление указанной WO-эмульсии к фазе диспергирования, с формированием тем самым WOW-эмульсии, и эмульгирование указанной WOW-эмульсии, и

с) смешивание указанной WOW-эмульсии с дополнительным адьювантом, предпочтительно в комбинации с дополнительным количеством указанного, по меньшей мере, одного антигена.

Следовательно, дополнительная цель изобретения заключается в способе получения композиции, включающей, по меньшей мере, один антиген и дополнительный адьювант, способ, включающий следующие стадии:

а) эмульгирование раствора указанного, по меньшей мере, одного антигена в масляной основе, с формированием тем самым эмульсии вода-в-масле (WO),

б) добавление указанной WO-эмульсии к фазе диспергирования, с формированием тем самым WOW-эмульсии и эмульгирование указанной WOW-эмульсии, и

с) смешивание указанной WOW-эмульсии с дополнительным адьювантом, предпочтительно в комбинации с дополнительным количеством указанного, по меньшей мере, одного антигена.

В конкретном воплощении, масляная основа на стадии а) включает одно или несколько масел и, по меньшей мере, одно поверхностно-активное вещество, как определено выше. Предпочтительно, масляная основа включает минеральное масло и комбинацию Span 80 и Tween 80. Более предпочтительно, поверхностно-активное вещество или смесь поверхностно-активных веществ обеспечивает HLB от 4 до 7, предпочтительно, примерно 6,0.

В еще одном конкретном воплощении, диспергирующая фаза на стадии б) включает деионизированную воду и, по меньшей мере, одно поверхностно-активное вещество, предпочтительно Tween 80. В конкретном воплощении, диспергирующая фаза дополнительно включает соль и/или консервант, как определены выше.

Предпочтительно, диспергирующая фаза включает деионизированную воду, хлорид натрия, Tween 80 и раствор тимеросала. В особенности, поверхностно-активное вещество (например, Tween 80) или смесь поверхностно-активных веществ обеспечивает HLB от 7 до 15, предпочтительно, примерно 10,5.

В еще одном конкретном воплощении, дополнительный адьювант на стадии с)

представляет собой такой адъювант, как определен выше. Предпочтительно, дополнительный адъювант представляет собой или включает в себя гидроксид алюминия, предпочтительно, в комбинации с дополнительным количеством указанного, по меньшей мере, одного антигена.

5 Стадии эмульгирования могут быть выполнены с помощью многоступенчатой установки для эмульгирования, параметры циркуляции которой были установлены для получения масляных частиц с заранее заданным размером.

В конкретном воплощении, раствор указанного, по меньшей мере, одного антигена в масляной основе эмульгируют при очень высоких оборотах в минуту (rpm),
 10 предпочтительно, от 15000 до 30000 rpm, более предпочтительно, от 20000 до 25000 rpm, как правило, равных примерно 22000 rpm, по меньшей мере, для одной циркуляции, предпочтительно, в течение трех циркуляций. Эмульсию затем добавляют к указанной диспергирующей фазе и эмульгируют при низких rpm, предпочтительно, от 1000 до 6000 rpm, более предпочтительно, от 2000 до 5000 rpm, как правило, примерно при 3000
 15 rpm в течение, по меньшей мере, одной циркуляции, предпочтительно, в течение двух циркуляций, более предпочтительно, в течение трех циркуляций. Необязательно, проводят дополнительную циркуляцию при средних rpm, предпочтительно, от 5000 до 15000 rpm, более предпочтительно, от 8000 до 12000 rpm, как правило, при примерно 10000 rpm.

20 Такие конкретные условия способа позволяют получить масляные частицы, нагруженные, по меньшей мере, одним антигеном с профилем распределения по размеру, как определен выше, и предпочтительно, с примерно 10% частиц (D10), имеющими размер <10 мкм, предпочтительно, от 5 и 10 мкм, и примерно 90% частиц (D90), имеющими размер < 20 мкм.

25 Такой профиль распределения по размеру масляных частиц, нагруженных, по меньшей мере, одним указанным антигеном, обеспечивает стабильную WOW-эмульсию, которая менее вязкая, чем традиционные эмульсии вода-в-масле, ее легко вводить с помощью шприца и она обладает высокой иммуногенностью.

30 После стадий эмульгирования а) и б), композиции изобретения получают смешиванием одного дополнительного адъювантного соединения или нескольких дополнительных адъювантных соединений с WOW-эмульсиями, предпочтительно в комбинации с дополнительным количеством указанного, по меньшей мере, одного антигена.

Соответственно, предпочтительный способ получения композиция изобретения включает:

35 а) эмульгирование раствора указанного, по меньшей мере, одного антигена в масляной основе с помощью многоступенчатой установки для эмульгирования при примерно 22000 rpm в течение трех циркуляций, с формированием тем самым эмульсии вода-в-масле (WO),

40 б) эмульгирование указанной WO-эмульсии в диспергирующей фазе с помощью многоступенчатой установки для эмульгирования при примерно 3000 rpm в течение трех циркуляций и при примерно 10000 rpm в течение одной дополнительной циркуляции, с формированием тем самым WOW-эмульсии, и

45 в) смешивание дополнительного адъюванта, предпочтительно, гидроксида алюминия, с указанной WOW-эмульсией, предпочтительно, в комбинации с дополнительным количеством указанного, по меньшей мере, одного антигена.

В более предпочтительном воплощении, стадию а) осуществляют при HLB, равном примерно 6,0, и стадию б) осуществляют при HLB, равном примерно 10,5.

Предпочтительные композиции

Ниже описаны предпочтительные композиции и вакцины изобретения. Данные композиции могут индуцировать сильную и стойкую иммунную защиту *in vivo*, включая в пределах внутренних органов, позволяя эффективно защищать против различных заболеваний, например, животных, не относящихся к человеку.

5 Конкретная композиция изобретения включает бактериальные антигены, скомбинированные с адьювантным соединением в WOW-эмульсии, имеющей размер частиц от 1 до 30 мкм.

10 Еще одна конкретная композиция изобретения включает бактериальные антигены, скомбинированные с адьювантным соединением в WOW-эмульсии, имеющей размер частиц от 1 и 30 мкм, в которой бактериальные антигены включают цельные ослабленные клетки.

Еще одна конкретная композиция изобретения включает антигены *Salmonella*, скомбинированные с адьювантным соединением в WOW-эмульсии, имеющей размер частиц от 1 и 30 мкм.

15 Еще одна конкретная композиция изобретения включает антигены *Salmonella*, скомбинированные с адьювантным соединением в WOW-эмульсии, имеющей размер частиц от 1 до 30 мкм, антигены *Salmonella*, включающие цельный клетки *Salmonella*, необязательно ослабленные, предпочтительно, смесь, по меньшей мере, двух типов клеток *Salmonella*, выбранные из ST, SE и SK.

20 Композиции настоящего изобретения предпочтительно включают эффективное количество антигена, например, количество антигена которого достаточно (при однократном или многократном введении) для индукции иммунного ответа у животного. Эффективное количество антигена может быть скорректировано специалистом в зависимости от антигена, композиции и предполагаемого применения. Количество
25 антигена в композиции может быть оценено различными способами, такими как по массе, биологической активности и/или плотности. В типичном воплощении, эффективное количество представляет собой количество, в котором композиция имеет общую OD₆₀₀/мл выше 4, предпочтительно, выше 5, как правило, от 4 до 12, предпочтительно, от 5 до 8, более предпочтительно, от 5 и 6,5. Кроме того, поскольку
30 антиген может содержаться в масляных частицах, а также во внешней водной фазе, то предпочтительно, чтобы содержание антигена в масляных частицах составляло, по меньшей мере, 60% от общего количества антигена в композиции изобретения, наиболее предпочтительно, от приблизительно 60-75%, а оставшиеся 40-25% были расположены во внешней водной фазе.

35 В связи с этим, еще одна конкретная цель изобретения представляет собой вакцину или иммуногенную композицию, включающую цельные бактериальные клетки в WOW-эмульсии, в которой, по меньшей мере, 90% масляных частиц в WOW-эмульсии имеют размер менее 20 мкм, OD₆₀₀/мл композиции превышает 4, и, по меньшей мере, 60%
40 клеток в композиции содержатся в указанных масляных частицах. В дополнительном предпочтительном воплощении, композиции изобретения включают цельные инактивированные или ослабленные бактериальные клетки в WOW-эмульсии, в которой, по меньшей мере, 90% масляных частиц в WOW-эмульсии имеют размер менее 20 мкм и, по меньшей мере, 5% имеют размер менее 10 мкм, OD₆₀₀/мл композиции превышает
45 5, и 60-75% клеток в композиции содержатся в указанных масляных частицах. В предпочтительном воплощении, данные композиции дополнительно содержат дополнительное адьювантное соединение, которое находится, как правило, во внешней водной фазе.

Предпочтительные композиции изобретения дополнительно включают поверхностно-активное вещество, соль и консервант.

Применение

Вакцины и композиции изобретения могут быть применены для доставки эффективного количества указанного, по меньшей мере, одного антигена у животного.

В частности, вакцины изобретения могут быть применены для индукции иммунного ответа против, по меньшей мере, одного антигена, как определен выше, у животного.

Как иллюстрировано в примерах, вакцины изобретения, включающие системы с двойным адьювантом вызывают усовершенствованную защиту против патогенной инфекции в некоторых органах, таких как печень, селезенка и слепая кишка. Кроме того, как было показано, этот эффект гораздо сильнее эффекта, наблюдаемого с вакциной предшествующего уровня техники, что иллюстрирует синергетический эффект WOW и адьювантного соединения.

Соответственно, дополнительно цель изобретения относится к применению вакцины или композиции, как определена выше, для лечения и/или предупреждения инфекции у животного, предпочтительно, бактериальной инфекции.

Дополнительно цель изобретения представляет собой способ лечения и/или предупреждения инфекции у животного, предпочтительно, бактериальной инфекции, включающий введение животному вакцины или композиции, как определены выше.

В конкретном воплощении, бактериальная инфекция представляет собой инфекцию, вызываемую сальмонеллой, предпочтительно, инфекцию, вызываемую *Salmonella Enteritidis*, инфекцию, вызываемую *Salmonella Kentucky*, инфекцию, вызываемую *Salmonella Typhimurium*, или инфекцию, вызываемую *Salmonella Heidelberg*.

Композиции и вакцины изобретения могут быть введены любым общепринятым путем, таким как с помощью системного введения, предпочтительно, внутримышечного введения, подкожного введения, внутривенного введения, внутривентриального введения, назального применения, глазного введения, более предпочтительно, введения с помощью инъекции.

Изобретение, в особенности, подходит для лечения животных, не относящихся к человеку, в особенности, домашней птицы (например, кур), коров, овец или свиней. В особенности, животное представляет собой курицу.

В конкретном воплощении, вакцину изобретения вводят в организм животного, имеющего низкую устойчивость к обычным вакцинам в эмульсии вода-в-масле (W/O).

Дополнительный аспект и преимущества изобретения будут раскрыты в нижеследующем экспериментальном разделе, который иллюстрирует заявленное изобретение.

Примеры

A. Получение вакцины A, включающей бактериальные антигены

Бактериальный антиген представлял собой комбинацию бактеринов *Salmonella Enteritidis-Kentucky-Typhimurium*, изделие, получаемое при минимальной концентрации антигена. Плацебо, полученное с применением такого же способа, как при получении вакцины, содержало все адьюванты и другие компоненты, без добавления антигена *Salmonella*. Антигенная композиция для каждой 0,50 мл дозы бактериона *Salmonella Enteritidis-Kentucky-Typhimurium* и плацебо проиллюстрированы в приведенной ниже таблице 1.

Таблица 1

Фракция	A: Бактерин <i>Salmonella Enteritidis-Kentucky-Typhimurium</i>	Плацебо
---------	--	---------

	OD/мл	Добавлен-ный объем (мл)	OD/фракция	Концентрация OD/мл	Объем (мл)	Рассчитанная OD	
	Salmonella enteritidis	66,07	302,71	20000	0	0	
	Salmonella Kentucky	65,28	306,37	20000	0	0	
	Salmonella Typhimurium	91,85	217,75	20000	0	0	
5	солевой раствор (заменитель антигена)	NA ¹	NA	NA	NA	414	NA
	раствор диспергирующей фазы ²	NA	5008	NA	NA	2503	NA
	адьювант на масляной основе ³	NA	3222	NA	NA	1612	NA
10	гидроксид алюминия	NA	942,72	NA	NA	471	NA
	Общая OD = 60000			Общая OD = 0			
	Общий объем = 10000 мл			Общий объем = 5000 мл			
	Общая OD/мл = 6,00			Конечная OD/мл = 0			
15	Общая OD/0,5 мл доза = 3,00 SE = 1,00 OD/0,5 мл доза SK = 1,00 OD/0,5 мл доза ST = 1,00 OD/0,5 мл доза			Конечная OD/0,5 мл доза=0			
	¹ NA = Не применимо						
	² Диспергирующую фазу подготавливали путем объединения 0,85% хлорид натрия, Tween 80 и тимеросала.						
20	³ Масляный адьювант подготавливали путем объединения минерального масла, Span 80 и Tween 80, так чтобы гидрофильный-липофильный баланс был равен 6,0, и оставшийся Tween добавляли к диспергирующей фазе для получения конечного гидрофильного-липофильного баланса, равного 10,5.						

Вакцину получали следующим образом:

Стадия I:

Комплекс гидроксид алюминия-антиген подготавливали путем объединения 942 мл гидроксида алюминия с 206 мл суммарного антигена (25% суммарного антигена).

25 Комплекс перемешивали в течение, по меньшей мере, четырех часов при комнатной температуре и хранили при 2-7°C до применения.

Стадия II:

30 3222 мл масляной основы циркулировало через эмульгатор при приблизительно 22000 оборотах в минуту (rpm) и 620 мл суммарного антигена (75% суммарного антигена) медленно добавляли непосредственно перед вводом эмульгатора. После добавления антигена, раствор эмульгировали в течение трех циркуляций при 22000 rpm. Таким способом получали эмульсию вода-в-масле (WO).

Стадия III:

35 WO-эмульсию затем медленно добавляли к 5008 мл диспергирующей фазы (0,85% хлорид натрия, Tween 80 и тимеросал) при энергичном перемешивании, и оставляли перемешиваться в течение одного часа. Таким способом получали эмульсию типа вода-масло-вода (WOW).

Стадия IV:

40 Размер частиц WOW-эмульсии уменьшали путем эмульгирования при 3000 rpm в течение трех циркуляций с последующей одной циркуляцией при 10000 rpm. Диапазон размеров частиц D10 и D90 был равен 8,6 и 12,2 микрометров, соответственно.

Стадия V:

45 Затем 1148 мл комплекса гидроксид алюминия-антиген замешивали в WOW-эмульсии и оставляли перемешиваться в течение, по меньшей мере, одного часа при комнатной температуре перед заполнением.

В. Получение вакцины В, включающей бактериальные антигены

Бактериальный антиген представлял собой комбинацию бактеринов Salmonella Enteritidis-Kentucky-Typhimurium, изделие, полученное при минимальной концентрации

антигена. Плацебо, полученное с применением такого же способа, как при получении вакцины, содержало все адъюванты и другие компоненты, без добавления антигена *Salmonella*. Антигенная композиция для каждой 0,50 мл дозы бактерина сальмонеллы *Enteritidis-Kentucky-Typhimurium* и плацебо проиллюстрированы в приведенной ниже

5 таблице 2.

Таблица 2

Фракция	В: бактерин <i>Salmonella Enteritidis-Kentucky-Typhimurium</i>			Плацебо		
	OD/мл	Добавленный объем (мл)	OD ₆₀₀ /фракция	Концентрация OD/мл	Объем (мл)	Рассчитанная OD ₆₀₀
<i>Salmonella enteritidis</i>	37,46	534	20003	0	0	0
<i>Salmonella Kentucky</i>	34,62	577	19975	0	0	0
<i>Salmonella Typhimurium</i>	40,95	327	13390	0	0	0
солевой раствор (заменитель антигена)	NA ¹	NA	NA	NA	288	NA
раствор диспергирующей фазы ²	NA	4394	NA	NA	880	NA
адъювант на масляной основе ³	NA	3223	NA	NA	644	NA
гидроксид алюминия	NA	942	NA	NA	190	NA
Общая OD = 53368			Общая OD = 0			
Общий объем = 9997 мл			Общий объем = 2002 мл			
Общая OD/мл = 5,34			Конечная OD/мл = 0			
Общая OD/0,5 мл доза = 2,67 SE = 1,00 OD/0,5 мл доза SK = 1,00 OD/0,5 мл доза ST = 0,67 OD/0,5 мл доза			Конечная OD/0,5 мл доза=0			
¹ NA = Не применимо ² Диспергирующую фазу подготавливали путем объединения 0,85% хлорида натрия, Tween 80 и тимеросала. ³ Масляный адъювант подготавливали путем объединения минерального масла, Span 80 и Tween 80, так чтобы гидрофильный-липофильный баланс был равен 6,0, и оставшийся Tween добавляли к диспергирующей фазе для получения конечного гидрофильного-липофильного баланса, равного 10,5.						

30 Вакцину получали следующим образом:

Стадия I:

Комплекс гидроксид алюминия-антиген подготавливали путем объединения 943 мл гидроксида алюминия с 360 мл суммарного антигена (25% суммарного антигена). Комплекс перемешивали в течение, по меньшей мере, четырех часов при комнатной

35 температуре и хранили при 2-7°C до применения.

Стадия II:

3223 мл масляной основы циркулировали через эмульгатор при приблизительно 22000 оборотах в минуту (rpm) и 1079 мл суммарного антигена (75% суммарного антигена) медленно добавляли непосредственно перед вводом эмульгатора. После

40 добавления антигена, раствор эмульгировали в течение трех циркуляций при 22000 rpm. Таким способом получали эмульсию вода-в-масле (WO).

Стадия III:

Затем WO-эмульсию медленно добавляли к 4394 мл диспергирующей фазы (0,85% хлорид натрия, Tween 80 и тимеросал) при энергичном перемешивании, и оставляли перемешиваться в течение одного часа. Таким способом получали эмульсию типа вода-масло-вода (WOW).

45

Стадия IV:

Размер частиц WOW-эмульсии снижали эмульгированием при 3000 rpm в течение трех циркуляций с последующей одной циркуляцией при 10000 rpm. Диапазон размеров

частиц D10 и D90 был равен 9,3 и 12,6 микронметров, соответственно.

Стадия V:

Затем 1300 мл комплекса гидроксид алюминия-антиген замешивали в WOW-эмульсию и оставляли перемешиваться в течение, по меньшей мере, двух часов при комнатной

5 температуре перед заполнением.

С.Эффективная защита против бактерий *Salmonella*

Материалы

Вакцины 1-4 получали для сравнительной оценки.

10 Вакцина 1 изобретения включала систему с двойным адъювантом (WOW + Ag-Al(OH)₃).

Вакцина 2 включала адъювант Ag-Al(OH)₃, но не представляла собой WOW.

Вакцина 3 включала WOW-эмульсии, но не включала дополнительное адъювантное

15 соединение.

Вакцина 4 включала WOW-эмульсии и Al(OH)₃ и не включала антиген (плацебо).

15

Вакцины No. 2-4 получали с помощью стандартных процедур для проведения сравнительных испытаний. Все вакцины (но не плацебо) содержали одинаковое количество антигена.

Способ

20

Кур вакцинировали на 4-ой и 8-ой недели жизни и заражали на 12-ой неделе жизни. Вскрытие проводили на 7-ой день после заражения в возрасте 13-ти недель.

Результаты

25

Результаты представлены в приведенной ниже таблице 3. Как можно видеть в крайней правой колонке, в то время как вакцина 1 предупреждает инфекцию *Salmonella* (0,002), вакцины 2-4 были очень неэффективны и по существу не предупреждали бактериальную

инфекцию.

Таблица 3

30

№	Вакцина	Тип	Печень	Селезенка	L/S	Все
1	Ag-в-масле + Ag-Al(OH) ₃	WOW	0,001	<0,001	<0,001	0,002
2	Ag-Al(OH) ₃	OW	1,000	0,333	0,333	1,000
3	Ag-в-масле	WOW	0,226	1,000	1,000	1,000
4 ¹	Al(OH) ₃ (плацебо)	WOW	81%	94%	94%	94%

35

¹ Процент контролей, которые были положительными для повторного выделения из ткани штамма экспериментального заражения.

Как можно видеть, вакцина 1, включавшая систему с двойным адъювантом изобретения, давала замечательную защиту во всех протестированных целевых тканях.

40

Вакцина 2, простая OW-эмульсия, не была эффективной, в особенности, в печени (повторное выделение = 100%); и вакцина 3, лишенная адъювантного соединения, также была неэффективной для всех тканей (повторное выделение = 100%).

Следовательно, авторы изобретения неожиданно показали усовершенствованную эффективность вакцины изобретения для предотвращения бактериальной инфекции. Эффект был значительным во всех протестированных тканях, и синергическим, поскольку он был еще более мощным, чем эффект моно-адъювантных вакцин сравнения

45

2 и 3.

D: Вакцины изобретения эффективно защищают от бактериальной инфекции *in vivo*

Материалы и способы

Животные

В данном исследовании применяли специфических свободных от патогена кур от компании «Charles River». На первый день жизни, кур транспортировали в лабораторию Rural Technologies, Inc., расположенную в Университет Брукингса штата Южная Дакота, Южная Дакота. Все кур оставались в одной комнате (смешанными) на протяжении
5 всего исследования. Для подтверждения негативного статуса кур по сальмонелле, от индивидуальных кур на 12-ой и 24-ой неделе жизни получали клоакальные мазки, и тестировали их на повторное выделение сальмонеллы.

Заражение организмов

Кур во всех группах обработки заражали гетерологичным штаммом для
10 экспериментального заражения SE (Salmonella Enteritidis), SK (Salmonella Kentucky), ST (Salmonella Typhimurium) или SH (Salmonella Heidelberg). Дозы заражения определяли с помощью анализа количества жизнеспособных микроорганизмов.

Способы

Специфических свободных от патогена кур на 14-ой неделе жизни случайным образом
15 разделяли на три группы обработки и вакцинировали. Одну группу вакцинировали бактерином Salmonella Enteritidis-Kentucky-Typhimurium (вакцина А), применяя 0,5 мл дозу IM (внутримышечно). Вторую группу также вакцинировали 0,5 мл вакцины А, введенной SQ (подкожным) путем. Третьей группе вводили плацебо, применяя 0,5 мл дозу; половине этих кур плацебо вводили SQ-путем и половине IM-путем. На 18-ой
20 неделе жизни, курам вводили еще одну 0,5 мл дозу вакцины или плацебо таким же путем. Через восемь недель после второй вакцинации, когда куры были на 26-ой неделе жизни, всех кур заражали вирулентным гетерологичным штаммом для экспериментального заражения SE, SK ST или SH. Через одну неделю после заражения, кур вскрывали, и от каждой курицы собирали слепую кишку, печень/селезенку или яичники и тестировали
25 на колонизацию SE, SK, ST или SH. Результаты по повторному выделению применяли для завершения оценки фракции, в которой заражение было предупреждено, для определения того, помогает ли бактериин в снижении колонизации SE, SK, ST или SH в слепой кишке, печени/селезенке или яичниках. Вакцинация, наблюдение, заражение и повторное выделение проводили в RTI (Rural Technologies, Inc).

30 Скрининг на Salmonella

1. Предварительная вакцинация

Двадцать (20) кур забивали и вскрывали на шестой неделе жизни. Образцы печени, селезенки и слепой кишки получали и тестировали, как описано, в приведенном ниже разделе «Обнаружение колонизации ткани». Клоакальные мазки брали у всех кур на
35 13-ой неделе жизни. У каждой из этих кур брали мазок предварительно увлажненным тампоном и по пять мазков птиц объединяли в пробирке, содержащей 10 мл бульона, обогащенного тетрациклатом бриллиантового зеленого (TTBG). Пробирки инкубировали при 42°C в течение 48-ми часов. После 24-х часов инкубации, по 10-микролитровой аликвоте каждой культуры из TTBG наносили штрихом на ксилозо-
40 лизиновый агар, содержащим тергитол 4 (XLT4) и инкубировали при 37°C в течение 48-ми часов. После 24-х часов инкубации, XLT4-чашки исследовали на присутствие черных колоний или колоний с черным центром, которые типичны для сальмонеллы (Difco Manual, 1998). Бульонные культуры, которые были отрицательными на типичные для сальмонеллы колонии, после посева штрихом XLT4 в первый раз, были повторно
45 расштрихованы на XLT4 для 48-часовой пост-инкубации и чашки оценивали позже, через 24 и 48 часов. Отрицательные образцы от 24- и 48-часового отбора проб затем тестировали с помощью отложенного вторичного обогащения (DSE). Кратко, TTBG-пробирки инкубировали при комнатной температуре (20-25°C) в течение 5-7 дней, перед

тем как перенести 1 мл образца в 9 мл свежей ТТВГ. Эти пробирки затем инкубировали в течение 24-х часов при 37°C, высевали на XLT4-чашки, и чашки инкубировали 48 часов при 37°C. Через 48 часов инкубации, XLT4-чашки исследовали на присутствие черных колоний или колоний с черным центром, которые типичны для сальмонеллы (Difco Manual, 1998).

2. Поствакцинация/предварительное заражение

За две недели до заражения, когда птицам было 24 недели от роду, у всех птиц, которых предполагали заразить, брали клоакальные мазки и проводили скрининг на присутствие сальмонеллы, как описано выше.

Способ заражения

На восьмой неделе после второй вакцинации, когда курам было 26 недель, всех птицы заражали 0,5 мл свежеработанной вирулентной гетерологичной культуры SE, SK, ST или SH, разбавленной до содержания колониеобразующих единиц (КОЕ), равного от 1×10^3 до 1×10^7 , перорально или с помощью внутримышечного введения. Для подготовки к заражению, замороженный посевной материал размораживали, 1 мл переносили в 250 мл соево-пептонного бульона и инкубировали при 37°C в течение 6-ти часов. Один (1) мл 6-часовой культуры добавляли к заранее заданному объему солевого раствора фосфатного буфера (PBS) для перорального или внутримышечного заражения. Данный препарат для заражения серийно разводили и высевали на чашки для определения количества жизнеспособных микроорганизмов при заражении.

Выявление колонизации ткани

На седьмой день после заражения (dpc), каждую птицу вскрывали. Брали образцы печени, селезенки, яичников и мешочки слепой кишки с содержимым и тестировали их на колонизацию штаммом для экспериментального заражения в качестве прямого способа, демонстрирующего защитный ответ. Всю селезенку целиком и приблизительно 1 г печени помещали в один тканевой измельчитель, в каждый измельчитель добавляли 20 мл ТТВГ, ткани измельчали и затем инкубировали при 37°C в течение 48 часов. Яичники, включая яйца, помещали в пакет «Whirl-Pak», измельчали вручную, взвешивали, переносили в ТТВГ в отношении 1:10 масс./объем ткани к среде и затем инкубировали при 37°C в течение 48-ми часов. Приблизительно 1 грамм каждого мешочка слепой кишки с содержимым помещали в одноразовый стерильный измельчитель ткани с крышкой, добавляли 20 мл ТТВГ-бульона, ткань измельчали и измельчитель ткани, содержащий образец, инкубировали при 42°C в течение 48-ми часов. После 24-х часов инкубации, аликвоту каждой культуры ТТВГ-бульона наносили штрихом на XLT4-агар и инкубировали при 37°C в течение 24-х часов. ТТВГ-бульонные культуры возвращали в инкубацию при соответствующей температуре для дополнительного роста. Через 24 часа инкубации, XLT4-чашки исследовали на присутствие черных колоний или колоний с черным центром, которые типичны для сальмонеллы (Difco Manual, 1998). Бульонные культуры, которые в первый раз были отрицательными на колонии типичной сальмонеллы на XLT4, повторно наносили штрихом на новые XLT4-чашки во второй раз для 48-часовой постинкубации, инкубировали при 37°C в течение 24-х часов и оценивали в это время. Для подтверждающих тестов, бактериальные колонии, которые были типичными для сальмонеллы на XLT4-чашках, пересеивали на три разных агара: трехсахарный агар с железом (TSI), лизиновый агар с железом (LIA) и агар с настоем телятины, и инкубировали в течение 24-х часов при 37°C. Если изолят давал типичную для сальмонеллы реакцию на TSI и LIA (Difco Manual, 1998), то затем колонии этого изолята отбирали с агаровых чашек с настоем телятины для агглютинации в однофакторной видо-специфической антисыворотке Salmonella O для подтверждения

группы Salmonella, и в антисыворотке Salmonella H:g,m для подтверждения серотипа Salmonella зараженного организма.

Все образцы ткани от всех групп обработки, которые были отрицательными для первичного обогащения, протестировали с помощью отложенного вторичного обогащения (DSE). Кратко, ТТВG-культуры хранили при комнатной температуре (20-25°C), затем инкубировали в течение исходных 48 часов. Через шесть (6) дней после перенесения в комнатную температуру, культуры обогащали в свежем ТТВG-бульоне путем добавления 1 мл культуры к 9 мл свежего ТТВG. Образцы затем инкубировали при 42°C. После 24-х часов инкубации, аликвоту каждой культуры ТТВG-бульона наносили штрихом на XLT4-агар и инкубировали при 37°C в течение 48 часов. После 24 и 48 часов инкубации, XLT4-чашки исследовали на присутствие черных колоний или колоний с черным центром, которые типичны для сальмонеллы (Difco Manual, 1998).

Оценка

Каждую группу, вакцинированную IM- и SQ-путем и получавшую содержащий антиген бактериин, сравнивали с группой, вакцинированной плацебо, для оценки колонизации штамма для экспериментального заражения внутренних органов, слепой кишки, печени/селезенки, яичников и репродуктивного тракта после заражения. Эффективность бактериина для каждой группы обработки статистически оценивали путем вычисления фракции, в которой заражение было предупреждено, (дополнение соотношения риска) для колонизации SE, SK, ST или SH во внутренние органы, репродуктивный тракт и/или кишечник.

Статистика

Фракцию, в которой заражение было предупреждено, (дополнение соотношения риска) рассчитывали в соответствии с уравнением $PF = 1 - p_v/p_c$, где p_v и p_c представляли собой фракции, на которые воздействовали вакцинами, и контроли, соответственно. Как указано в протоколе, контрольная группа содержала всех кур, которые получали плацебо, вне зависимости от того каким путем, IM или SQ, оно было введено. Все анализы проводили на всех имеющихся данных, применяя SAS[®] System, версия 9.3 (код был предоставлен APHIS), и R 2.13.0.

Результаты

Скрининг сальмонеллы

Все образцы тканей от шестинедельных кур и все клоакальные образцы от 24-недельных кур были негативными, что указывает на то, что куры были свободны от сальмонеллы перед вакцинацией и перед заражением.

Безопасность наблюдений

Кур наблюдали ежедневно для контроля любых связанных с вакциной побочных реакций и для контроля смертности. Не наблюдали никаких негативных реакций, связанных с вакциной, или случаев гибели какой-либо курицы.

1. Защита против инфекции Salmonella Enteritidis (SE)

Результаты проиллюстрированы в следующей таблице 4 и на фигурах 2A и 2B.

Таблица 4. Частота (%) повторного выделения, фракция, в которой заражение было предупреждено, и 95%-ный доверительный интервал с вакциной A.

Ткань	Сравнение	Доля положительных	Нижний 95% CL ¹	Фракция, в которой заражение было предупреждено	Верхний 95% CL ¹
печень/ селезенка	IM	14/56 (25,0%)	0,553	0,708	0,847
	Плацебо	48/56 (85,7%)	NA	NA	NA
	SQ	38/63 ² (60%)	0,122	0,298	0,438
	Плацебо	55/64 (86,0%)	NA	NA	NA

5	слепая кишка	IM	11/52 (21%)	0,235	0,577	0,786
		Плацебо	25/50 (50%)	NA	NA	NA
		SQ	11/51 (22%)	0,191	0,569	0,781
		Плацебо	25/50 (50%)	NA	NA	NA
10	яичниках	IM	3/54 (5,6%)	0,767	0,914	0,989
		Плацебо	36/56 (64,3%)	NA	NA	NA
		SQ	19/62 ³ (30,6%)	0,378	0,584	0,722
		Плацебо	47/64 (73%)	NA	NA	NA

¹ CL = доверительный интервал

² Одна курица умерла в день один после заражение и исключена из статистики

³ У двух кур не было развивающихся яичников и их исключили из статистики

IM: внутримышечное

SQ: подкожное

N/A: Не применимо

15 Результаты показали, что:

Вакцина А, введенная с помощью SQ-пути, была эффективна в снижении и предупреждении колонизацию SE всех протестированных внутренних органов, таких как печень,/селезенка, слепая кишка и яичники.

20 В особенности, фракция, в которой заражение было предотвращено, величиной больше, чем 0,5, была получена в слепой кишке и яичниках, а значит, лечение вакциной усовершенствовало более чем на 50% (PF = 0,569 и PF = 0,584) эффективность защиты от SE в таких внутренних органах. Данные результаты также проиллюстрированы на фигуре 2А, на которой эффективность защиты от SE больше, чем 70%, была получена в слепой кишке (78%) и в яичниках (70%).

25 Введение вакцины А IM-путем было еще более эффективно в снижении колонизации SE всех внутренних органов, таких как печень/селезенка, слепая кишка и яичники (таблица 3: PF > 0,7 для печени/селезенки и яичников и фигура 2В: эффективность защиты от SE > 75% для печени/селезенки, слепой кишки и яичников).

30 Нижние 95% доверительные уровни для всех внутренних органов были больше 0 для обоих SQ- и IM-путей, что представляет собой статистически значимое доказательство того, что вакцинация кур вакциной А, введенной с помощью SQ- и IM-пути была эффективна в снижении колонизации штаммами для экспериментального заражения SE внутренних органов.

35 2. Защиты против инфекции Salmonella Typhimurium (ST)

Результаты проиллюстрированы в следующей таблице 5 и на фигурах 3А и 3В.

Таблица 5. Частота (%) повторного выделения, фракция, в которой заражение было предотвращено, и 95% доверительный интервал с вакциной А.

40	Ткань	Сравнение	Доля положительных	Нижний 95% CL ¹	Фракция, в которой заражение было предотвращено	Верхний 95% CL ¹
	печень/селезенка	IM	18/71 (31%)	0342	0,575	0,726
		Плацебо	43/73 (58,9%)	N/A	N/A	N/A
		SQ	21/74 (28,4%)	0,276	0,519	0,681
45	слепая кишка	Плацебо	60/73 (82,7%)	N/A	N/A	N/A
		SQ	44/74 (59,5%)	0,101	0,275	0,416
		IM	43/71 (60,6%)	0,085	0,262	0,406

¹ CL = доверительный интервал

IM: внутримышечное

SQ: подкожного

N/A: Не применимо

Результаты показали, что:

Вакцина А введенная с помощью SQ- или IM-пути была эффективна в снижении и предупреждении колонизации ST печени/селезенки и слепой кишки. В особенности, фракция, в которой заражение было предотвращено, превышающая 0,5, была получена в печени/селезенке, что означает усовершенствованную эффективность защиты в таких внутренних органах. Фигуры 3А и 3В также иллюстрирует усовершенствованную эффективность защиты для обоих SQ- и IM-путей в печени/селезенке (эффективность защиты от ST > 70%) и в слепой кишке (эффективность защиты от ST равна 40%).

3. Защиты против инфекции Salmonella Kentucky (SK)

Результаты проиллюстрированы в следующей таблице 6 и на фигуре 4.

Таблица 6. Частота (%) повторного выделения, фракция, в которой заражение было предотвращено, и 95%-ный доверительный интервал с вакциной А для слепой кишки.

Обработка	№. Положительных/Об- щий	Доля Положительных	Нижний 95% CL ¹	Фракция, в которой зараже- ние было предотвращено	Верхний 95% CL ¹
вакцина (IM)	7/55 ³	12,7%	0,167	0,64	0,789
Плацебо	20/57	35,1%	N/A	N/A	N/A
вакцина (SQ)	7/55 ⁴	12,7%	0,0,167	0,641	0,789

¹ CL = доверительный интервал

² Одна курица умерла на день один после заражения и ее исключили из статистики

³ Две курицы умерли от сепсиса перед заражением.

⁴ Одна курица умерла от инфекции кокцидиями, и одна курица умерла из-за зоба, который был заполнен водой, и в нем не было никакого корма.

IM: внутримышечно

SQ: подкожно

N/A: Не применимо

Результаты показали, что:

Вакцина А, введенная SQ- или IM- путями, была эффективна в снижении и предупреждении колонизацию SK в слепой кишке.

В особенности, в которой заражение было предотвращено, равная примерно 0,64, была получена IM-путем и фракция, в которой заражение было предотвращено, превышающая 0,4, была получена SQ-путем. Фигура 4 также иллюстрирует усовершенствованную эффективность защиты против SK для вакцины с SQ- и IM-путями (эффективность защиты от SK >85%, фигура 4).

4. Защиты против инфекции Salmonella Heidelberg (SH)

Таблица 7. Частота (%) повторного выделения, фракция, в которой заражение было предотвращено, и 95%-ный доверительный интервал с вакциной А.

Ткань	Сравнение	Доля положительных	Нижний 95% CL ¹	Фракция, в которой зараже- ние было предотвращено	Верхний 95% CL ¹
печень/селезенка	IM	7/37 ² (19%)	0,5588	0,7694	0,9285
	Плацебо	32/39 (82%)	N/A ³	N/A	N/A
	SQ	5/39 (13%)	0,6647	0,8438	0,9658
слепая кишка	Плацебо	27/39 (69%)	N/A	N/A	N/A
	SQ	16/39 (41%)	0,0684	0,4074	0,6573
яичники	IM	5/37 ² (14%)	0,4747	0,7709	0,9293

	Плацебо	23/39 (59%)	N/A	N/A	N/A
	SQ	3/39 (8%)	0,6356	0,8696	0,9816

¹ CL = доверительный интервал

IM: внутримышечно

SQ: подкожно

N/A: Не применимо

Результаты показали, что:

Процент повторного выделения штамма для экспериментального заражения SH из внутренних органов печени и селезенки был равен 13%, из слепой кишки – 41% и из яичников – 8% в группе вакцинирования с вакциной A SQ-путем, и 82%, 69% и 59%, соответственно, в группе плацебо (фигура 5A). Нижний 95%-ный доверительный интервал для фракций, в которых заражение было предотвращено, был больше нуля для всех трех тканей. Следовательно, вакцина A снижает SH-инфекцию во внутренних органах, слепой кишке и яичниках при введении SQ-путем.

Процент повторного выделения штамма SH из внутренних органов, печени и селезенки, был равен 19%, из слепой кишки – 70% и из яичников – 14% в группе вакцинирования с вакциной A IM-путем (фигура 5B). Нижний 95%-ный доверительный интервал для фракций, в которых заражение было предотвращено, был больше нуля для внутренних органов и яичников. Следовательно, вакцина A снижает инфекцию SH во внутренних органах и яичниках при введении IM-путем.

Вакцина А, включающая бактерию SE-ST-SK, введенная с помощью IM- или SQ-пути неожиданно оказалась эффективной в снижении и предупреждении SH-инфекции внутренних органов (печень/селезенка) и яичников вакцинированных животных.

Е. Безопасность композиций вакцин

Безопасность вакцины были проанализированы путем расчета реакции в месте внутримышечной инъекции у курочек. Способы подсчета баллов определены в таблице 8.

Таблица 8

Внешний осмотр	Поражения, обнаруженные при вскрытии		Распространение поражений (ширина x глубина x длина (см ³))	
	Балл		Балл	
Покраснение	1	Диффузная, точечная гранулема (≤1 мм)	1	≤ 20
Покраснение и опухание (мягкое)	2	Диффузная, небольшая гранулема (1-2 мм)	2	≤ 40
Покраснение и опухание (твердое)	3	Изолированная гранулема, более чем 2 мм	3	≤ 60
Изъязвления	4	Воспалительные затвердение мышц и изменения цвета (бледно-желтый)	4	> 60

Результаты проиллюстрированы на фигуре 6 и показывают средний балл реакции вакцин А (SE-ST-SH) по сравнению с вакцинами предшествующего уровня техники в простой ВО-эмульсии в зависимости от величины OD/доза для Salmonella.

При OD/доза SE, равных 1,15 и 1,03, вакцины в простой ВО-эмульсии имели средний балл реакции равный 4,8 и 10,2, соответственно.

Средний балл реакции, полученный для вакцины А, был равен 3,7, в то время как OD/доза для сальмонеллы была примерно в 5 раз более концентрированной (5,1).

Эти результаты неожиданно показали слабый средний балл реакции при внутримышечном введении с помощью инъекций вакцин изобретения, тем самым продемонстрировав усовершенствованную безопасность.

(57) Формула изобретения

1. Вакцина, предназначенная для индуцирования иммунного ответа против сальмонеллы у кур, включающая эффективное количество по меньшей мере одного антигена и адъювантное соединение в эмульсии типа вода-масло-вода (WOW), в которой (i) по меньшей мере один антиген представляет собой комбинацию бактерий *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Kentucky* и *Salmonella Typhimurium*, (ii) адъювантное соединение представляет собой гидроксид алюминия, (iii) эмульсия WOW содержит водные везикулы, заключенные в масляные частицы, причем указанные масляные частицы имеют размер меньше 20 мкм и диспергированы во внешней водной фазе, и (iv) по меньшей мере 60% (мас./мас.) от общего количества указанного по меньшей мере одного антигена в вакцине содержится в масляных частицах.

2. Вакцина по п. 1, в которой бактерия представляет собой живую, ослабленную или инактивированную бактерию.

3. Вакцина по п. 1 или 2, в которой антиген включает инактивированную *Salmonella Enteritidis*, инактивированную *Salmonella Kentucky* и инактивированную *Salmonella Typhimurium*.

4. Вакцина по п. 1, в которой указанная WOW-эмульсия включает одно или несколько масел и по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество.

5. Вакцина по п. 4, в которой масло включает растительное масло, животный жир, минеральное масло или их смеси.

6. Вакцина по п. 4, в которой по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество выбирают из группы, состоящей из моноолеата полиоксиэтиленсорбитана, моноолеата сорбитана.

7. Вакцина по любому из пп. 1-6, в которой 60-75% (мас./мас.) от общего количества указанного по меньшей мере одного антигена в вакцине содержатся в масляных частицах.

8. Вакцина по п. 1, в которой масляные частицы включают растительное масло, животное масло, минеральное масло или их смеси.

9. Вакцина по п. 1, в которой адъювантное соединение находится во внешней водной фазе.

10. Вакцина по п. 9, в которой внешняя водная фаза дополнительно включает фракцию указанного по меньшей мере одного антигена и указанного адъювантного соединения.

11. Вакцина по п. 1, в которой масляные частицы имеют размер между 1 и 20 мкм.

12. Вакцина по п. 5, в которой масло включает минеральное масло.

13. Вакцина по п. 1, в которой масляные частицы включают минеральное масло.

14. Способ получения вакцины, включающей по меньшей мере один антиген и адъювантное соединение, в которой по меньшей мере один антиген представляет собой комбинацию бактерий *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Kentucky* и *Salmonella Typhimurium*, и адъювантное соединение представляет собой гидроксид алюминия, включающий следующие стадии:

а) эмульгирование раствора указанного по меньшей мере одного антигена в масляной основе с формированием WO-эмульсии,

б) добавление указанной WO-эмульсии к фазе диспергирования с формированием WOW-эмульсии и эмульгирование указанной WOW-эмульсии,

с) получение комплекса гидроксид алюминия - антиген и

д) смешивание указанной WOW-эмульсии с указанным комплексом.

15. Способ вакцинации кур против сальмонеллы, включающий введение курице эффективного количества вакцины по п. 1.

5

10

15

20

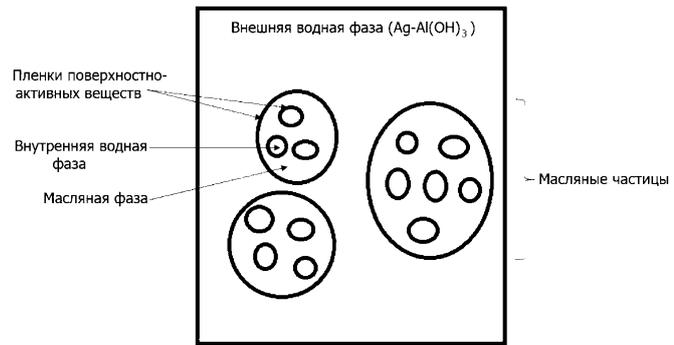
25

30

35

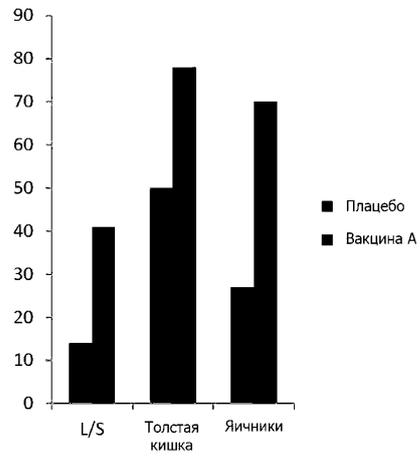
40

45

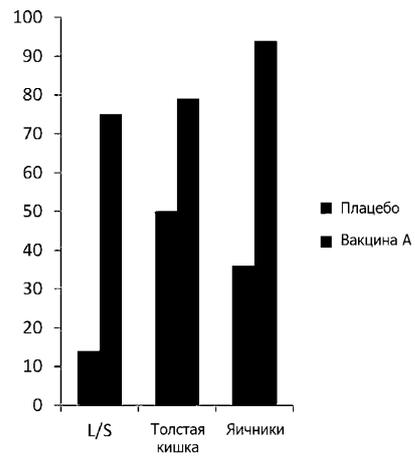


Фиг. 1

2 / 6

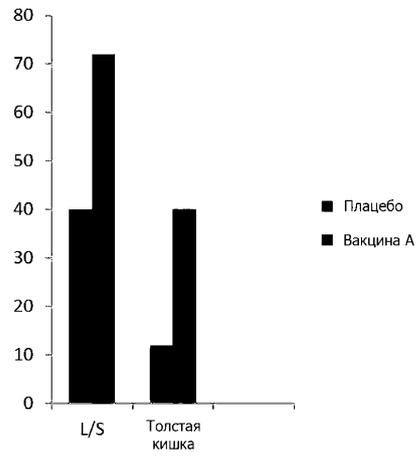


Фиг. 2А

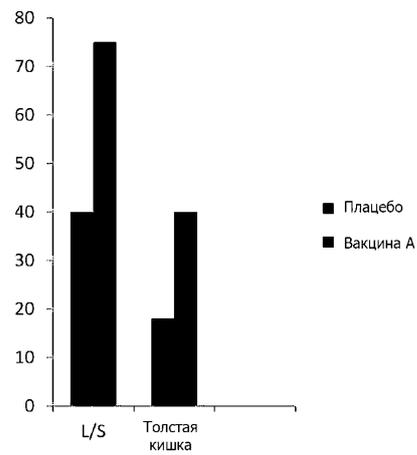


Фиг. 2В

3 / 6

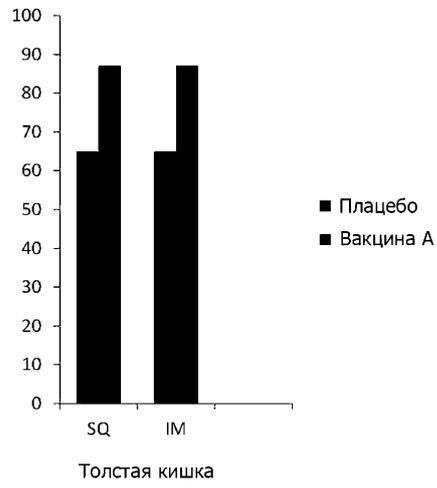


Фиг. 3А



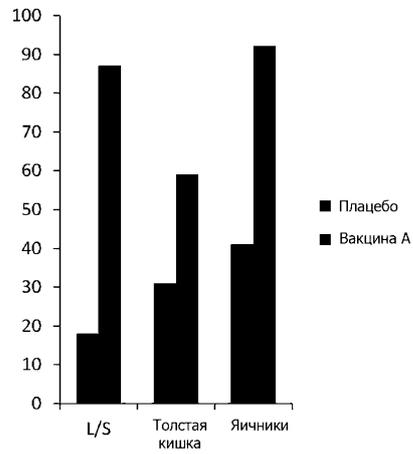
Фиг. 3В

4 / 6

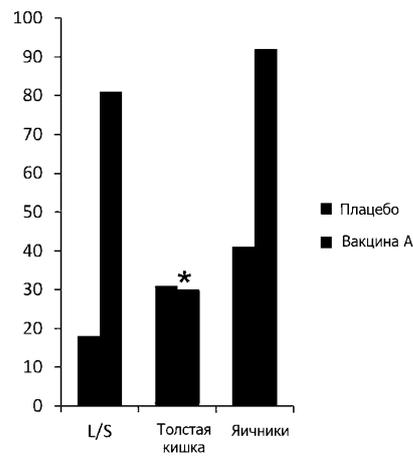


Фиг. 4

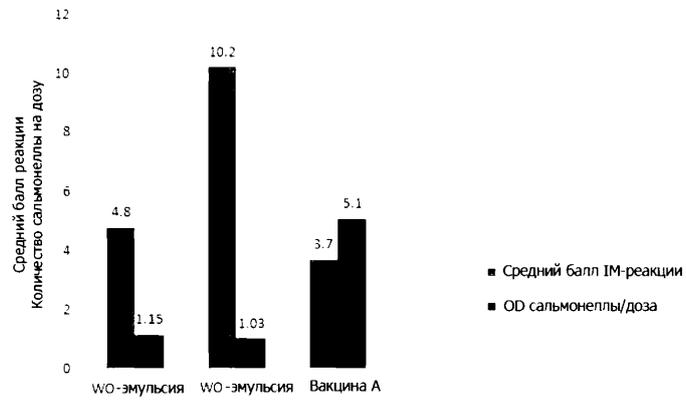
5 / 6



Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 6