



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013133856/10, 21.12.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.12.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

22.12.2010 US 61/425,855;

01.02.2011 EP 11152829.5;

08.11.2011 US 61/556,975

(43) Дата публикации заявки: 27.01.2015 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 10.08.2016 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: KR 1020080082883 A, 12.09.2008.
CHLADEK D.W. ET AL. Canine parainfluenza-Bordetella bronchiseptica vaccine immunogenicity. AMERICAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH. 1981. Vol. 42. No 2. P. 266-270. CN101575586, 11.11.2009.
MCARTHUR J.D. ET AL. An aromatic amino acid auxotrophic mutant of Bordetella bronchiseptica is attenuated and immunogenic in a (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 22.07.2013

(86) Заявка РСТ:
IB 2011/003100 (21.12.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/085642 (28.06.2012)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

О'КОННЕЛЛ, Кевин, А. (US),

ЛАФЛЕР Ронда (US),

ХУЧАППА Гауда Джаяппа (US),

УЕСМОЕН Терри Ли (US)

(73) Патентообладатель(и):

ИНТЕРВЕТ ИНТЕРНЭШНЛ БВ (NL)

(54) ВАКЦИНЫ С ЖИВЫМИ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ИЗОЛЯТАМИ ДЛЯ СИСТЕМНОГО ВВЕДЕНИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к биотехнологии. Предложены вакцинная композиция, подходящая для системного введения, для защиты животного против клинического заболевания, возникающего из

инфекции *Bordetella bronchiseptica*, и способы поддержки защиты псовых и животных против такого клинического заболевания путем системного введения вакцинной композиции. Вакцинная композиция включает живой аро-

мутантный штамм *Bordetella bronchiseptica* и ароматическую добавку, содержащую тирозин, триптофан, фенилаланин, пара-аминобензойную и 2,3-дигидроксибензойную кислоты. Дополнительно вакцинная композиция может включать антиген вируса гриппа псовых и/или антиген вируса парагриппа псовых. Предложенная вакцинная композиция является

безопасной и эффективной, при том что содержит уменьшенное количество живых аттенуированных бактерий, и может быть использована в медицине для системного введения животным для защиты против клинического заболевания, возникающего из инфекции *Bordetella bronchiseptica*. 3 н. и 8 з.п. ф-лы, 12 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

mouse model of infection. FEMS MICROBIOLOGY LETTERS. 2003. Vol. 221. P. 7-16. WO 2003060105 A1, 24.07.2003. WO 1989005856 A1, 29.06.1989. RU 2005124130 A, 20.01.2006.

RU 2 5 9 3 9 5 3 C 2

RU 2 5 9 3 9 5 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 593 953** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 39/10 (2006.01)

C07K 14/235 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2013133856/10**, 21.12.2011

(24) Effective date for property rights:
21.12.2011

Priority:

(30) Convention priority:
22.12.2010 US 61/425,855;
01.02.2011 EP 11152829.5;
08.11.2011 US 61/556,975

(43) Application published: **27.01.2015** Bull. № 3

(45) Date of publication: **10.08.2016** Bull. № 22

(85) Commencement of national phase: **22.07.2013**

(86) PCT application:
IB 2011/003100 (21.12.2011)

(87) PCT publication:
WO 2012/085642 (28.06.2012)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "JURidicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

OKONNELL, Kevin, A. (US),
LAFLER Ronda (US),
KHUCHAPPA Gauda Dzhayappa (US),
UESMOEN Terri Li (US)

(73) Proprietor(s):

INTERVET INTERNESHNL BV (NL)

(54) VACCINE WITH LIVE BACTERIAL ISOLATES FOR SYSTEMIC ADMINISTRATION

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: present invention relates to biotechnology. Invention discloses a vaccine composition suitable for systemic administration for animal protection against clinical disease, arising from infection with *Bordetella bronchiseptica*, and methods of supporting canines and animal protection against such clinical disease by systemic administration of vaccine composition. Vaccine composition comprises live ARO-mutant strain *Bordetella bronchiseptica* and a flavouring additive containing tyrosine, tryptophan,

phenylalanine, para-aminobenzoic acid and 2,3-dihydroxybenzoic acid. Additionally, vaccine composition can include influenza virus antigen canids and/or parainfluenza virus antigen canines.

EFFECT: presented vaccine composition is safe and effective, and contains reduced number of living attenuated bacteria, and can be used in medicine for systemic administration for protection against clinical disease, arising from infection with *Bordetella bronchiseptica*.

11 cl, 12 tbl, 5 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к вакцинам для системного введения, которые содержат живой аттенуированный бактериальный изолят. Это изобретение относится также к получению таких вакцин и способам вакцинации субъектов-животных.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Bordetella bronchiseptica (*B. bronchiseptica*) является высокоинфекционной грамотрицательной бактерией, которая может эффективно колонизировать здоровую реснитчатую респираторную мукозу (слизистую оболочку) с вызыванием респираторных инфекций в широком диапазоне видов-хозяев. Таким образом, *B. bronchiseptica* является этиологическим агентом как в атрофическом рините в свиньях, так и в псовом кашле у собак.

Однако следует отметить, что люди с гораздо большей вероятностью инфицируются более известным видом *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), для которой люди являются единственной природной мишенью (см., Stevenson and Roberts, FEMS Immunology and Medical Microbiology 37:121-128 (2003)). Кроме того, в отличие от *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* не экспрессирует коклюшный токсин. Кроме того, в то время как нет данных о том, что инфекции *B. pertussis* приводят к продолжительной колонизации верхних дыхательных путей, *B. bronchiseptica* вызывает хроническую инфекцию в верхних дыхательных путях в ряде различных видов животных.

В соответствии с этим, в то время как системное введение живой вакцины *B. pertussis* было недавно предложено для субъектов-людей (см., U.S. Publication No. 2009/0246222 A1), до сих пор живые аттенуированные вакцины *B. bronchiseptica* конструировали для местного интраназального введения в животных (за исключением людей), например, Nobivac® KC and Intra-Trac II (доступные из Merck Animal Health), Recombitek® KC2 (доступный из Merial) и Bronchi-Shield III (доступный из Fort Dodge).

Одним конкретным путем генерирования живой аттенуированной бактерии является модификация одного или нескольких ключевых генов этой бактерии. Во многих микроорганизмах хори́змат является критическим промежуточным продуктом в биосинтезе важных ароматических соединений, включающих в себя фолиевую кислоту и три ароматических аминокислоты, фенилаланин, тирозин и триптофан (Moat et al., Microbial Physiology (2002) Wiley-Liss, Chapter 15, pgs. 525-527). Таким образом, для генерирования живых аттенуированных бактерий использовали ген в биосинтетическом пути хори́змата, такой как *aroA*. Таким образом, конструировали значительное количество бактерий, содержащих делецию в их генах *aroA*, в том числе: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Hemophilus somnus* (см., например, Briggs, and Tatum, Applied and Environmental Microbiology, 71 (11) 7187-7195 (2005); Tatum and Briggs, Applied and Environmental Microbiology, 71 (11) 7196-7202. (2005); патент США № 5840556), *Salmonella typhimurium* (Dougan et al., Molecular and General Genetics, 207(2-3) 402-405 (1987), и *B. pertussis* (Roberts et al., Infectious Immunology 58:732-739 (1990)). Однако до сих пор вакцины, содержащие такие *aroA*-мутантные бактерии, показывали, в большинстве случаев, минимальный успех, если был какой-либо успех, см., например, абзац (0133) публикации США № 2009/0246222 A1, которая конкретно ссылается на довольно ограниченный успех вакцин, содержащих *B. pertussis* с делецией *aroA*, и которая рекомендует вместо этого применение живых конструкторов *B. pertussis* с мутацией в гене, кодирующем один из трех главных токсинов *B. pertussis*.

Был также сконструирован штамм *B. bronchiseptica* с делецией *aroA* (делетант *aroA*) (Stevenson and Roberts, Vaccine 20, 2325-2335 (2002)). Эти исследователи использовали их штамм *B. bronchiseptica* с делецией *aroA* только в интраназальной вакцине. Однако

интраназальные вакцины являются не пригодными для введения, особенно взрослым животным, таким как псовые или кошачьи, которые часто сопротивляются введению любого вещества в их ноздри. Введение таких интраназальных вакцин часто создает риск, заключающийся в том, что количество вакцины, принятой этим животным, будет
 5 значительно меньшим, чем доза, показанная как защитная, если это животное чихает во время введения. С другой стороны, до сих пор системное введение живых вакцин не рассматривалось в качестве безопасного выбора, так как известно, что системное введение живой *B. bronchiseptica*, даже аттенуированной, может приводить к серьезному образованию абсцессов (см., например, Toshach et al., J Am Anim Hosp Assoc 33:126-128
 10 (1997)).

Несколько убитых цельноклеточных и субъединичных вакцин *B. bronchiseptica* были также описаны для парентерального введения собакам, в том числе убитая
 цельноклеточная вакцина *B. bronchiseptica* Bronchicine[®] CAe, которая доступна из Pfizer Animal Health. К сожалению, имеются некоторые недостатки таких убитых вакцин *B.
 15 bronchiseptica*. Например, грамотрицательным бактериям свойственны липополисахариды (LPS), и, следовательно, системное введение убитой вакцины *B. bronchiseptica* может приводить к эндотоксическому шоку вследствие LPS. Таким образом, убитые вакцины должны быть высокоочищенными для минимизации количества LPS. Такая очистка
 20 делает получение этой вакцины более сложным, часто приводящим к потере эффективных антигенов и тем самым увеличивающим общую стоимость производства. Таким образом, остается потребность в получении вакцины для системного введения, которая является безопасной и эффективной, против *B. bronchiseptica*.

Цитирование любой ссылки здесь не должно пониматься как признание того, что такая ссылка является доступной в качестве известного «прототипа» изобретения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для преодоления недостатков существующих вакцин, приведенных в качестве примеров выше, изобретение относится к новым вакцинам против бактериальных инфекций, а также их соответствующие иммуногенные композиции. Настоящее
 30 изобретение относится также к способам введения таких вакцин животному. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам предотвращения заболевания у животного посредством введения вакцины по изобретению. В частных вариантах осуществления это животное является представителем семейства псовых. В других вариантах осуществления это животное является представителем семейства кошачьих. В других вариантах осуществления это животное является представителем свиней.

В частных вариантах осуществления эта вакцина содержит живую аro-мутантную бактерию, которая находится в форме, подходящей для системного введения. В некоторых вариантах осуществления эта живая аro-мутантная бактерия является живой аroA-мутантной бактерией. В частных вариантах осуществления этой бактерией является
 40 *B. bronchiseptica*. В некоторых вариантах осуществления этого типа эта вакцина содержит живой аroA-мутантный штамм *B. bronchiseptica*. В частных вариантах по изобретению вакцина может способствовать защите животного и/или защищать это животное от нарушения и/или клинического заболевания, возникающего из инфекции *B. bronchiseptica*.

Вакцины по изобретению могут содержать живую аro-мутантную бактерию и ароматическую добавку. В частных вариантах осуществления ароматическая добавка
 45 вакцины по изобретению содержит тирозин. В некоторых вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит триптофан. В частных вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит фенилаланин. В некоторых вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины

по изобретению содержит пара-аминобензойную кислоту. В частных вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит 2,3-дигидробензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит фолиевую кислоту. В частных вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит энтеробактин.

В частных вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит множественные ароматические соединения. Варианты любой комбинации двух или более таких ароматических соединений могут содержаться в ароматической добавке вакцины по изобретению. В некоторых вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит фенилаланин и триптофан. В частных вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит фенилаланин и тирозин. В некоторых вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит тирозин и триптофан. В частных вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит фенилаланин, тирозин и триптофан.

В частных вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит пара-аминобензойную кислоту и 2,3-дигидроксibenзойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит 2,3-дигидроксibenзойную кислоту и фолиевую кислоту. В частных вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит фолиевую кислоту и энтеробактин. В некоторых вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит пара-аминобензойную кислоту и энтеробактин.

В частных вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит фенилаланин, тирозин, триптофан и пара-аминобензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит фенилаланин, тирозин, триптофан и фолиевую кислоту. В частных вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит фенилаланин, тирозин, триптофан и 2,3-дигидроксibenзойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит фенилаланин, тирозин, триптофан и энтеробактин. В частных вариантах осуществления ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит фенилаланин, тирозин, триптофан, пара-аминобензойную кислоту и 2,3-дигидроксibenзойную кислоту.

В некоторых вариантах осуществления вакцина по изобретению содержит адъювант. В частных вариантах этого типа этим адъювантом является соль алюминия. В некоторых вариантах осуществления эта соль алюминия является фосфатом алюминия. В других вариантах осуществления эта соль алюминия является гидроксидом алюминия. В дополнительных вариантах осуществления эта соль алюминия является сульфатом алюминия-калия. В частных вариантах осуществления вакцина по изобретению содержит как ароматическую добавку, так и адъювант. В частных вариантах осуществления вакцина по изобретению содержит фенилаланин, тирозин, триптофан и пара-аминобензойную кислоту, а адъювантом является гидроксид алюминия. В одном конкретном варианте осуществления этого типа ароматическая добавка вакцины по изобретению содержит фенилаланин, тирозин, триптофан, пара-аминобензойную кислоту и 2,3-дигидроксibenзойную кислоту, а адъювант является гидроксидом алюминия.

Настоящее изобретение относится к также поливалентным вакцинам. Что касается всех вакцин по изобретению, поливалентные вакцины по изобретению могут содержать ароматическую добавку и/или адъювант. В некоторых вариантах осуществления эта

вакцина содержит живую аroA-мутантную *B. bronchiseptica* и антиген вируса парагриппа псовых (CPI). В частных вариантах осуществления этот антиген вируса парагриппа является модифицированным живым вирусом парагриппа. В некоторых вариантах осуществления эта вакцина содержит живую аroA-мутантную *B. bronchiseptica* и антиген вируса гриппа псовых (CIV). В частных вариантах осуществления этот антиген вируса гриппа псовых является убитым вирусом гриппа псовых. В некоторых вариантах осуществления эта вакцина содержит живую аroA-мутантную *B. bronchiseptica* и как антиген вируса гриппа псовых, так и антиген вируса парагриппа псовых. В частных вариантах осуществления этого типа антиген вируса гриппа псовых является убитым вирусом гриппа псовых и антиген вируса парагриппа псовых является модифицированным живым вирусом парагриппа.

Особые поливалентные вакцины по изобретению могут содержать живой аroA-мутант *B. bronchiseptica*, который содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, которая кодирует чужеродный антиген (например, антиген из другого патогена). Эта гетерологичная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, позволяя тем самым этому аroA-мутанту *B. bronchiseptica* экспрессировать этот чужеродный антиген. В некоторых вариантах осуществления этого типа эта гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует вирусный антиген. В частных вариантах осуществления этого типа этот вирусный антиген является антигеном вируса гриппа. В родственных вариантах осуществления этот антиген вируса гриппа является антигеном из вируса гриппа псовых. В других вариантах осуществления этот антиген вируса гриппа является антигеном из вируса гриппа кошачьих. В других вариантах осуществления этот антиген вируса гриппа является антигеном из вируса гриппа свиней. В некоторых вариантах осуществления этот антиген вируса гриппа является гемагглютинином. В других вариантах осуществления этот антиген вируса гриппа является нейраминидазой.

В более частных вариантах осуществления этот вирусный антиген является гемагглютинином H3 вируса гриппа псовых. В других вариантах осуществления эта гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует антигенный фрагмент гемагглютинина H3 вируса гриппа псовых. В других вариантах осуществления эта гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует нейраминидазу N8 вируса гриппа псовых. В других вариантах осуществления эта гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует нейраминидазу N2 вируса гриппа псовых. В других вариантах осуществления аroA-мутант *B. bronchiseptica* содержит множественные гетерологичные нуклеиновые кислоты. В одном конкретном варианте этого типа аroA мутант *B. bronchiseptica* аroA содержит как гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую гемагглютинин H3 вируса гриппа псовых, так и гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую нейраминидазу N8 вируса гриппа псовых. В других вариантах осуществления этого типа эта гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует как гемагглютинин H3, так и нейраминидазу N2 вируса гриппа псовых.

В более частных вариантах осуществления такие поливалентные вакцины содержат ароматическую добавку и/или адъювант в виде соли алюминия. В одном таком варианте осуществления эта поливалентная вакцина содержит ароматическую добавку и/или адъювант в виде соли алюминия и живой аroA-мутант *B. bronchiseptica*, содержащий гемагглютинин H3 вируса гриппа псовых, который функционально связан с промотором. В некоторых вариантах осуществления такие поливалентные вакцины дополнительно содержат модифицированный живой вирус парагриппа.

Все вакцины по изобретению могут быть лиофилизированы и/или имеют их лиофилизированную часть (например, фракцию). В частных вариантах осуществления

эта лиофилизированная вакцина или ее часть находится в форме лиофилизированного фильтровального осадка. В других вариантах осуществления эта лиофилизированная вакцина или ее часть находится в форме лиофилизированной сферы. В других вариантах осуществления эта лиофилизированная вакцина или ее часть находится в форме

5 лиофилизированного овала и/или эллипсоида.

Таким образом, вакцины по изобретению могут быть получены в двух или более различных частях (например, фракций) по меньшей мере с одной, являющейся лиофилизированной фракцией. В одном родственном варианте осуществления этого типа по меньшей мере одна другая часть является жидкостью. В некоторых вариантах

10 осуществления этого типа по меньшей мере одна часть является лиофилизированной и по меньшей мере одна другая является жидким разбавителем. В частных вариантах осуществления лиофилизированная часть поливалентной вакцины по изобретению содержит один или несколько антигенов, тогда как разбавитель содержит один или несколько других антигенов. В более частных вариантах осуществления этого типа

15 лиофилизированная часть поливалентной вакцины содержит живую агоА-мутантную *B. bronchiseptica*. В частных вариантах осуществления этого типа лиофилизированная часть поливалентной вакцины содержит живую агоА-мутантную *B. bronchiseptica* вместе с модифицированным живым вирусом парагриппа псовых. В родственных вариантах осуществления этот разбавитель содержит убитый вирус гриппа псовых. В частных

20 вариантах осуществления этот разбавитель содержит ароматическую добавку и/или адъювант. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированная часть поливалентной вакцины дополнительно содержит ароматическую добавку и/или адъювант. В частных вариантах осуществления как лиофилизированная часть поливалентной вакцины, так и разбавитель содержат ароматическую добавку и/или

25 адъювант. В частных вариантах осуществления лиофилизированная часть поливалентной вакцины содержит живую агоА-мутантную *B. bronchiseptica* и вирус парагриппа псовых вместе с ароматической добавкой, тогда как разбавитель содержит убитый вирус гриппа псовых и адъювант. В более частных вариантах осуществления этим адъювантом является 2-5% гидроксид алюминия.

30 Настоящее изобретение также относится к способам поддержки защиты животного (в том числе человека) против клинического заболевания, которое возникает из инфекции *B. bronchiseptica*. В частных вариантах осуществления этот способ включает системное введение вакцины по изобретению животному. В некоторых вариантах осуществления этого типа это животное является млекопитающим. В частных вариантах осуществления

35 это млекопитающее является свиньей. В других вариантах осуществления это млекопитающее является представителем семейства псовых. В других вариантах осуществления это млекопитающее является представителем семейства кошачьих. В некоторых вариантах осуществления системное введение вакцины по изобретению выполняют подкожной вакцинацией.

40 Настоящее изобретение также относится к применению живой аго-мутантной *B. bronchiseptica* для получения вакцины для защиты животного против клинического заболевания, возникающего из инфекции *B. bronchiseptica*. Предпочтительно эта вакцина находится в форме, подходящей для системного введения. В некоторых вариантах осуществления этого типа эта вакцина содержит адъювант. В частных вариантах

45 осуществления этот адъювант является солью алюминия. В более частных вариантах осуществления соль алюминия является гидроксидом алюминия. В других вариантах осуществления соль алюминия является фосфатом алюминия. В других вариантах осуществления соль алюминия является сульфатом алюминия-калия.

В некоторых вариантах осуществления эта вакцина дополнительно содержит ароматическую добавку. В частных вариантах осуществления эта вакцина содержит как адъювант, так и ароматическую добавку. В более частных вариантах осуществления этот адъювант является гидроксидом алюминия и ароматическая добавка содержит фенилаланин, тирозин, триптофан, пара-аминобензойную кислоту и 2,3-дигидроксibenзойную кислоту.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения будут более понятными со ссылкой на следующее подробное описание.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В отличие от убитых антигенов живые аго-мутантные бактерии по изобретению являются аттенуированными. В результате, следует соблюдать осторожность при приготовлении вакцины для поддержания титра аттенуированной бактерии на уровне, который является достаточно более низким, чем уровень, который может привести к значимому вредному эффекту. Однако достижение такого безопасного уровня часто приводит к существенному уменьшению эффективности живой аттенуированной вакцины. Настоящее изобретение позволило преодолеть эту проблему увеличением эффективности вакцины без увеличения титра живого аттенуированного бактериального антигена, добавляемого к вакцине. Кроме того, настоящее изобретение относится к средству для снижения стоимости производства этих вакцин, обеспечиваемому значительным уменьшением количества живых аттенуированных бактерий, необходимых для получения безопасной и эффективной вакцины.

Таким образом, настоящее изобретение относится к безопасным и эффективным вакцинам, которые содержат живую аго-мутантную бактерию в форме, подходящей для системного введения. В одном аспекте настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей живую аго-мутантную бактерию и ароматическую добавку. В частных вариантах осуществления эта живая аго-мутантная бактерия является агоА-мутантной бактерией. Неожиданно было обнаружено, что эффективность вакцины, содержащей живую агоА-мутантную бактерию, значимо увеличивалась при добавлении ароматической добавки к этой композиции вакцины, без вызывания непереносимых реакций сайта инъекции.

В другом аспекте это изобретение относится к живым аттенуированным вакцинам, которые обнаруживают более высокую эффективность вследствие присутствия адъюванта. Часто такое улучшение эффективности, достигаемое добавлением адъюванта, резко увеличивает отрицательные побочные эффекты. Таким образом, неожиданно было обнаружено, что эффективность вакцины, содержащей аго-мутантную *Bordetella bronchiseptica*, могла быть улучшена добавлением адъюванта при сохранении все еще ее безопасности на приемлемом уровне. Этот результат приводит, *inter alia*, к увеличению диапазона эффективных доз для таких вакцин.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к живым аго-мутантным бактериальным вакцинам, которые обнаруживают более высокую эффективность вследствие присутствия как адъюванта, так и ароматической добавки, при сохранении все еще безопасности этой вакцины на приемлемом уровне.

Кроме того, это изобретение относится к способам применения живой аго-мутантной *B. bronchiseptica* для получения вакцины для системного введения для защиты животного против клинического заболевания, возникающего из инфекции *B. bronchiseptica*. Настоящее изобретение относится также к способу защиты животного против клинического заболевания, возникающего из инфекции *B. bronchiseptica* infection, который предусматривает системное введение вакцины, содержащей живой аго-мутантный штамм

B. bronchiseptica.

В рамках изобретения следующие термины имеют определения, приведенные ниже.

В рамках изобретения «вакцина» является композицией, которая пригодна для введения животному (в том числе в некоторых вариантах осуществления людям), содержащей один или несколько антигенов, обычно объединенных с фармацевтически приемлемым носителем, таким как жидкость, содержащая воду, которая после введения животному индуцирует иммунную реакцию достаточно сильно, чтобы минимально содействовать защите от клинического заболевания, возникающего из инфекции микроорганизмом дикого типа, т.е. достаточно сильно для содействия в предотвращении клинического заболевания и/или предотвращения, уменьшения симптомов или излечения этого клинического заболевания.

В рамках изобретения «поливалентная вакцина» является вакциной, которая содержит два или более различных антигена. В одном конкретном варианте осуществления этого типа поливалентная вакцина стимулирует иммунную систему реципиента против двух или более различных патогенов.

В рамках изобретения термины «защита» или «обеспечение защиты от» и «содействует защите» не требуют полной защиты от любого показания инфекции. Например, «содействует защите» может означать, что эта защита является достаточной, так что после иммунизации симптомы лежащей в основе инфекции являются по меньшей мере уменьшенными, и/или что одна или несколько лежащих в основе клеточных, физиологических или биохимических причин или механизмов, вызывающих эти симптомы, уменьшаются или элиминируются. Понятно, что термин «уменьшенные» в этом контексте означает уменьшенные относительно состояния этой инфекции, в том числе молекулярного состояния инфекции, а не только физиологического состояния этой инфекции.

В рамках изобретения термин «фармацевтически приемлемые» используется здесь в виде прилагательного для обозначения, что модифицированное существительное является подходящим для применения в фармацевтическом продукте. При применении его, например, для описания эксципиента в фармацевтической вакцине, он характеризует этот эксципиент как являющийся совместимым с другими ингредиентами этой композиции и не является невыгодно вредным для имеющегося в виду реципиента.

Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или носителю, с которыми вводят это соединение. Фармацевтически приемлемыми носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и/или масла, в том числе масла из нефти, животные масла, растительные или синтетические масла, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода или водные солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина могут быть использованы в качестве носителей, в частности, для инъекционных растворов.

В рамках изобретения «адьювант» является веществом, которое способно благоприятствовать каскаду или усиливать каскад иммунологических событий, в конечном счете приводящим к улучшенной иммунологической реакции, т.е. интегрированной соматической реакции на антиген. Адьювант обычно не требуется для осуществления иммунологической реакции, но благоприятствует этой реакции или усиливает эту реакцию.

В рамках изобретения «системное введение» является введением в сердечно-сосудистую систему организма (содержащую сердечно-сосудистую и лимфатическую систему), влияющим на организм в целом, а не на специфический локус, такой как желудочно-кишечный тракт (например, через пероральное или ректальное введение),

и респираторную систему (например, через интраназальное введение). Системное введение может выполняться, например, введением в мышечную ткань (внутримышечно), в дерму (интрадермально, трансназально или супраназально), под кожу (подкожно), под мукозу (субмукозно), в вены (внутривенно) и т.д.

5 «Парентеральное введение» включает подкожные инъекции, субмукозные инъекции, внутривенные инъекции, внутримышечные инъекции, интрадермальные инъекции и инфузию.

В рамках изобретения термин «псовые» включает всех домашних собак, *Canis lupus familiaris* или *Canis familiaris*, если нет другого указания.

10 В рамках изобретения термин «кошачьи» относится к любому члену семейства кошачьих. Члены этого семейства включают диких членов, зоо- и домашних членов, таких как член подсемейств *Feline*, например, кошек, львов, тигров, пум, ягуаров, леопардов, снежных барсов, пантер, львов Североамериканских гор, гепардов, рысей, рыжих рысей, каракалов или любых из их кроссбредов. Кошки включают в себя также
15 домашних кошек, чистопородных и/или нечистокровных кошек-компаньонов, шоу-кошек, лабораторных кошек, клонированных кошек и диких или одичавших кошек.

В рамках изобретения «генетическое изменение» гена в бактерии может быть обусловлено мутацией, и/или делецией гена, и/или инсерцией в этот ген и может включать в себя генетические события, которые осуществляются природно и/или в лабораторных
20 условиях, и конструирование, например, посредством пассирования клеток и/или посредством одного или нескольких рекомбинантных генетических способов.

В рамках изобретения «аго-мутантная» бактерия является бактерией, которая либо не может синтезировать хори́змат, либо синтезирует значительно меньше хори́змата, чем соответствующая бактерия дикого типа, что приводит в результате к значительному
25 ингибированию и/или блокированию роста этой бактерии в средах без добавок, окружающей среде или окружении. агоА-мутантная бактерия может происходить из генетического изменения гена в хори́зматном биосинтетическом пути и/или посттрансляционной дисфункции, которая приводит к сравнимому ингибированию и/или инактивации соответствующего продукта гена (т.е. фермента, кодируемого этим
30 геном).

В рамках изобретения «агоА-мутантная» бактерия является аго-мутантной бактерией, в которой это генетическое изменение находится в гене агоА и/или обусловлено посттрансляционной дисфункцией, которая приводит к сходному ингибированию и/или инактивации соответствующего продукта гена агоА.

35 В рамках изобретения «ароматическая добавка» является композицией, которая содержит одно или несколько ароматических соединений, которые могут компенсировать, по меньшей мере частично, неэффективный рост аго-мутантной бактерии (например, агоА-мутанта). Таким образом, присутствие ароматической добавки в средах, окружающей среде и/или окружении позволяет аго-мутантной бактерии расти
40 более эффективно. Таким образом, ароматическая добавка может содержать один или несколько конечных продуктов биосинтетического пути, в котором хори́змат является промежуточным продуктом (например, ароматической аминокислотой, такой как фенилаланин) и/или промежуточным продуктом, который мог бы быть в противном случае биосинтезирован после хори́змата в биосинтетическом пути, который включает
45 в себя хори́змат (например, пара-бензойную кислоту, которая является промежуточным продуктом в биосинтетическом пути фолиевой кислоты). Ароматическая добавка может также содержать альтернативный источник для хори́змата и/или альтернативный источник для одного или нескольких промежуточных продуктов в биосинтетическом

пути хоризмата, которые подвергались вредному воздействию в аro-мутантной бактерии.

Хоризматный путь: Хоризмат является центральным промежуточным продуктом в биосинтезе фенилаланина, тирозина, триптофана, фолиевой кислоты, убихинона и энтеробактина (сидерофора) (см. Moat et al., Microbial Physiology (2002) Wiley-Liss, Chapter 15, pgs. 525-527). Реагенты, гены, кодирующие релевантные ферменты и продукты метаболического пре-хоризматного биосинтетического пути, начинающегося от комбинации D-эритрозо-4-фосфата с фосфоэнолпируватом и заканчивающегося биосинтезом хоризмата, представлены ниже:

где:

PEP обозначает фосфоэнолпируват;

DАНР обозначает 7-фосфат 3-гидрокси-L-арабиногептулозоната;

3-Р-шикимат обозначает 3-фосфошикимат; и

ЕЕРК обозначает 3-еноилпирувил-3-фосфошикимат.

Реагенты (реагенты)	Ген (гены)	Продукт (продукты)
D-эритрозо-4-фосфат + PEP	-- aro (F, G, H)- →	DАНР
DАНР	-- aro B - →	3-дигидрохинат
3-дигидрохинат	-- aro D - →	3-дигидрошикимат
3-дигидрошикимат	-- aro E - →	шикимат
Шикимат + АТФ	-- aro (K, L)- →	3-Р-шикимат + АДФ
3-Р-шикимат + PEP	-- aro A- →	ЕЕРК
ЕЕРК	-- aro C - →	Хоризмат

Как можно видеть, следующий порядок аroA-генов (кодирующих изоферменты из F, G, H), B, D, E (кодирующих изоферменты из K, L), A и C участвуют в синтезе хоризмата в *B. bronchiseptica*. По-видимому, нет обходных путей в биосинтезе хоризмата в *B.*

bronchiseptica. Таким образом, инактивация любого из этих аro-генов или соответствующих продуктов генов должна приводить к идентичной блокаде в биосинтезе ключевых ароматических соединений.

В частных вариантах осуществления эта аro-мутантная бактерия *B. bronchiseptica* является аroA-мутантом, хотя делеция в других аro-генах *B. bronchiseptica* может приводить к такой же блокаде в синтезе хоризмата, как отмечалось выше, и, следовательно, к тому же самому фенотипу этой мутантной бактерии.

Вакцины

Настоящее изобретение относится к безопасным и эффективным вакцинам, которые содержат живые аттенуированные бактерии, для системного введения. Следует понимать, что такие вакцины могут дополнительно содержать один или несколько обычных фармацевтически приемлемых носителей, включающих адъюванты (см. ниже), другие энхансеры иммунной реакции и/или наполнители (вместе называемые «эксципиентами»). Такие эксципиенты обычно выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с активным ингредиентом (активными ингредиентами) в вакцине. Применение эксципиентов обычно известно специалистам в области разработки вакцин.

Компоненты-стабилизаторы могут включать: сахара и сахароспирты (такие как сахароза, декстроза, трегалоза, сорбит), желатин, гидролизаты белков (гидролизат лактальбумина, NZ-Amine), сывороточный альбумин (бычий сывороточный альбумин, овальбумин) и буферные соединения. Необязательно и/или в дополнение другие вещества, такие как стабилизаторы и модификаторы вязкости, могут быть добавлены к вакцине в зависимости от предполагаемого использования или требуемых свойств этой вакцины. Многие формы вакцин пригодны для системной вакцинации, например, жидкие препараты с растворенными, эмульгированными или суспендированными

антигенами, и твердые препараты, такие как имплантаты, или твердый носитель антигена, суспендированный в жидкости. Системная вакцинация и подходящие физические формы вакцин для такой вакцинации были известны в течение многих лет.

Также следует понимать, что эта вакцина может быть высушена замораживанием (лиофилизирована) или иным образом уменьшена в объеме для хранения и затем воспроизведена в жидком разбавителе перед введением или в момент введения. Такое воспроизведение может достигаться, например, с использованием воды со степенью чистоты, требуемой для вакцин. В некоторых вариантах осуществления, иллюстрируемых в примерах ниже, лиофилизированная часть поливалентной вакцины может содержать один или несколько антигенов, тогда как растворитель может содержать один или несколько других антигенов.

В частных вариантах осуществления вакцина по изобретению может находиться в лиофилизированной форме. Примеры таких лиофилизированных форм включают: фильтровальные лепешки, таблетки, сферы и/или эллипсоиды, причем три последние формы могут быть получены по способу, описанному в WO 2010/125084, включенном здесь посредством ссылки в его полном виде. В частности, можно привести примеры от страницы 15, строки 28, до страницы 27, строки 9 WO 2010/125084, в которых описан способ получения таких быстродезинтегрирующихся таблеток/сфер/эллипсоидов. Такие лиофилизированные формы могут быть легко растворены в разбавителе для обеспечения возможности системного введения этой вакцины. Такие разбавители могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных активных компонентов этой вакцины.

Адьюванты. Как указано выше, вакцины по изобретению могут включать адьювант. В более частных вариантах осуществления этот адьювант содержит соль алюминия. Использование солей алюминия хорошо известно в области разработки вакцин. Соли алюминия были разработаны, в частности, для вакцин на основе токсоидов, но использовались также вместе с другими субъединичными вакцинами и вакцинами, содержащими инактивированные (цельные) микроорганизмы. Использование солей алюминия вместе с живыми вирусными вакцинами также описано, хотя соли алюминия обычно не используются для улучшения эффективности живых бактериальных вакцин. Однако неожиданно тот факт, что соли алюминия могут связывать живую *B. brochiseptica*, по-видимому, не оказывает отрицательного действия на адьювантные свойства этих солей в отношении живого аro-мутантного штамма *B. bronchiseptica*. Это в комбинации с хорошо известной регистрацией безопасности таких адьювантов делает их применение предпочтительным в сравнении с другими адьювантами, такими как углеводородные масла, сапонины и т.д. В одном улучшенном варианте осуществления соль алюминия выбирают из группы, состоящей из фосфата алюминия, фосфата алюминия-калия и гидроксида алюминия.

Оптимальное количество адьюванта для добавления к конкретной вакцине по изобретению может варьировать в зависимости от ряда переменных, таких как антигены, присутствующие в этой вакцине, и подлежащие вакцинации виды, но может быть легко определено специалистом в области разработки вакцин с использованием настоящего раскрытия. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество гидроксида алюминия, сульфата алюминия-калия и/или фосфата алюминия в этой вакцине может составлять от 0,5 до 15%. В более частных вариантах осуществления количество гидроксида алюминия, сульфата алюминия-калия и/или фосфата алюминия может составлять от 1,0 до 10% и в более частных вариантах осуществления количество гидроксида алюминия, сульфата алюминия-калия и/или фосфата алюминия в этой

вакцине может составлять от 1,5 до 7,5%. Как иллюстрируется ниже, количество гидроксида алюминия и/или фосфата алюминия в этой вакцине составляет приблизительно 2% или альтернативно приблизительно 5%.

ароА-смесь: Как указано выше, аро-мутантные бактериальные вакцины по изобретению могут включать в себя ароматическую добавку. Эта ароматическая добавка может содержать одно или несколько ароматических соединений. Примеры таких ароматических соединений включают, но не ограничиваются ими: фенилаланин, тирозин, триптофан, префенат, антралинат, индол, пара-аминобензойную кислоту, фолиевую кислоту, 2,3-дигидроксибензоат и энтеробактин (см., например, Moat et al., *Microbial Physiology* (2002) Wiley-Liss, Chapter 15, pgs. 525-527). Ароматическая добавка может также содержать альтернативный источник для хоризмата и/или альтернативный источник для одного или нескольких промежуточных продуктов в биосинтетическом пути хоризмата, которые подвергались вредному действию в ароА-мутантном штамме. В некоторых вариантах осуществления с ароматической добавкой может быть включен антиоксидант и/или хелатообразующий агент.

Оптимальное количество ароматических соединений, содержащихся в ароматической добавке, которое должно быть добавлено к конкретной вакцине по изобретению, может варьировать в зависимости от количества переменных, таких как сами ароматические соединения, система растворителей, используемая с ароматическими соединениями, антигены, присутствующие в этой вакцине, и виды, подлежащие вакцинации, но может быть легко определено специалистом в области разработки вакцин с использованием настоящего раскрытия. В некоторых вариантах осуществления по изобретению количество каждой ароматической кислоты в вакцине ароматической добавки может варьировать от 4 мкг/мл до 0,4 мкг/мл. В частных вариантах осуществления количество каждой ароматической кислоты в вакцине может варьировать от 10 мкг/мл до 0,2 мг/мл. В более частных вариантах осуществления количество каждой ароматической кислоты в вакцине может варьировать от 20 мкг/мл до 0,1 мг/мл. В еще более частных вариантах осуществления количество каждой ароматической кислоты в вакцине может варьировать от 30 мкг/мл до 60 мкг/мл. Как показано в виде примера ниже, индивидуальные количества фенилаланина, тирозина и триптофана в этой вакцине составляют приблизительно 40 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления по изобретению количество любого конкретного ароматического соединения в этой вакцине, которое не находится в биосинтетическом пути ароматических аминокислот, может варьировать от 1 мкг/мл до 0,1 мг/мл. В частных вариантах осуществления количество таких ароматических соединений может варьировать от 2,5 мкг/мл до 50 мкг/мл в этой вакцине. В более частных вариантах осуществления количество таких ароматических соединений в этой вакцине может варьировать от 5 мкг/мл до 20 мкг/мл в этой вакцине. Как иллюстрируется ниже, индивидуальные количества 2,3-дигидроксибензойной кислоты и пара-аминобензойной кислоты в этой вакцине составляют 5-10 мкг/мл.

Поливалентные вакцины: Настоящее изобретение также относится к поливалентным вакцинам. В одном варианте осуществления вакцина, содержащая живой аттенуированный аро-мутант *B. bronchiseptica* по изобретению, дополнительно содержит антиген вируса гриппа собак (CIV) и/или антиген вируса парагриппа собак (CPI). Вакцина в соответствии с этим вариантом осуществления должна обеспечивать защиту против комплекса кашля собак и/или собачьего инфекционного респираторного заболевания (CIRD) у собак.

Примеры других антигенов, которые могут быть объединены с живым

аттенуированным аro-мутантным штаммом *B. bronchiseptica* по изобретению (и/или другим аттенуированным аro-мутантным штаммом *B. bronchiseptica*) и/или антигеном вируса гриппа собак и/или антигеном вируса парагриппа собак для образования поливалентной вакцины, включают один или несколько из следующих компонентов:

- 5 вирус чумы собак, аденовирус типа 2 собак, парвовирус собак, пневмовирус собак, коронавирусы собак, герпесвирусы собак, вирус бешенства, виды *Mycoplasma*, *Ehrlichia canis*, виды *Anaplasma*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira autmnalis*, *Leptospira bratislava*. Кроме того, вакцина, содержащая живой аттенуированный аro-мутантный штамм *B. bronchiseptica* по изобретению, может содержать один или несколько из следующих кошачьих патогенов, таких как: кошачий герпесвирус (FHV), кошачий калицивирус (FCV), кошачий пневмовирус (FPN), *Chlamydomys felis*, кошачий парвовирус (FPV), кошачий вирус лейкоза (FeLV), кошачий вирус инфекционного перитонита (FIPV), кошачий вирус иммунодефицита (FIV), вирус болезни Борна (BDV),
10 вирус гриппа кошек, вирус гриппа птиц и *Bartonella* spp. (например, *B. henselae*).

Применение аroA-мутанта *B. bronchiseptica* в качестве рекомбинантного вектора:

- Сообщалось конструирование живых авирулентных мутантных векторов *Bordetella* (см., например, US2008/0254062), включающее применение рекомбинантного аroA-мутантного вектора *B. bronchiseptica* в вакцине (Stevenson and Roberts, Vaccine 20, 2325-
20 2335 (2002); Stevenson and Roberts, FEMS Immunology and Medical Microbiology 37:121-128 (2003); Stevenson and Roberts, Vaccine 22:4300-4305 (2004)). Таким образом, уже была обеспечена методология приготовления таких конструкторов.

- Кроме того, инсерция гетерологичной нуклеиновой кислоты (ДНК) в аroA-мутантный штамм *B. bronchiseptica* по изобретению для экспрессии соответствующего
25 гетерологичного антигена выполняется легко, например, когда концы как гетерологичной нуклеиновой кислоты, так и *B. bronchiseptica* содержат совместимые сайты рестрикции. Альтернативно может быть необходимой модификация концов гетерологичной нуклеиновой кислоты и/или *B. bronchiseptica* расщеплением задних одноцепочечных ДНК-выступов, генерируемых расщеплением рестрикционными
30 эндонуклеазами (рестриктазами) для получения тупых концов или для достижения того же самого результата заполнением одноцепочечных концов подходящей ДНК-полимеразой. В другой методологии могут быть получены желаемые сайты, например, легированием нуклеотидных последовательностей (линкеров) на эти концы. Такие линкеры могут содержать специфические олигонуклеотидные последовательности,
35 которые определяют желаемые сайты рестрикции. Сайты рестрикции могут быть также генерированы посредством применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) (см., например, Saiki et al., Science 239:487 (1988)). Этот расщепленный вектор и фрагменты нуклеиновой кислоты могут быть также модифицированы, если необходимо, наращиванием гомополимерных «хвостов».

- 40 Гетерологичная нуклеиновая кислота может быть функционально связана либо с эндогенным, либо с гетерологичным промотором (т.е. эндогенным относительно рекомбинантной *B. bronchiseptica*). Таким образом, эта гетерологичная нуклеиновая кислота может либо включать ее собственный природно встречающийся промотор, либо быть модифицирована для включения промотора (например, бактериального
45 промотора, такого как lac-промотор *E. coli*, который может быть конститутивным), который экспрессирует антиген, который он кодирует. Следует отметить, что Stevenson and Roberts, (Vaccine 22:4300-4305 (2004)) особо продемонстрировали применение промотора нитеобразного гемагглютинаина (fha) *B. bronchiseptica*. Альтернативно

гетерологичная нуклеиновая кислота может быть помещена в живую agoA-мутантную *B. bronchiseptica* таким образом, чтобы позволить промотору, уже присутствующему в agoA-мутантной *B. bronchiseptica*, экспрессировать этот гетерологичный антиген.

Гетерологичная нуклеиновая кислота может кодировать антиген, полученный из
 5 любого числа патогенов, и включает, но не рестриктирована ими, вирус гриппа собак, вирус парагриппа собак, аденовирус типа 2 собак, парвовирус собак, пневмовирус собак, вирус бешенства, коронавирусы собак, виды *Mycoplasma*, *Ehrlichia canis*, виды *Anaplasma*, герпесвирус кошек (FHV), калицивирус кошек (FCV), пневмовирус кошек (FPN), вирус гриппа кошек и/или *Chlamydomys felis*.

В вариантах осуществления изобретения эта гетерологичная нуклеиновая кислота
 10 кодирует белковый антиген из патогена кошачьих или псовых. В более частных вариантах осуществления этот белковый антиген получают из вируса гриппа собак (см. патент США 7959929 B2, содержание которого включено здесь посредством ссылки в его полном виде). В других вариантах осуществления этот белковый антиген получают
 15 из вируса гриппа кошек. В некоторых вариантах осуществления этого типа гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует гемагглютинин вируса гриппа собак. В частных вариантах осуществления этого типа эта гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует нейраминидазу вируса гриппа собак. В других вариантах осуществления этого типа эта гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует как гемагглютинин, так и
 20 нейраминидазу вируса гриппа собак.

В рамках изобретения термин «полипептид» используется взаимозаменяемо с термином «белок» и дополнительно предназначен для включения в него пептидов. Таким образом, в рамках изобретения полипептид является полимером из двух или более аминокислот, соединенных вместе пептидными связями. Предпочтительно термин
 25 «полипептид» относится к полимеру, содержащему двадцать или более аминокислотных остатков, соединенных вместе пептидными связями, тогда как пептид содержит два - двадцать аминокислотных остатков, соединенных вместе пептидными связями.

В рамках изобретения термин «антигенный фрагмент» в отношении конкретного белка является фрагментом этого белка (в том числе большими фрагментами, которые
 30 лишены всего лишь единственной аминокислоты из полноразмерного белка), который является антигенным, т.е. способным специфически взаимодействовать с молекулой узнавания антигена иммунной системы, такой как иммуноглобулин (антитело) или Т-клеточный рецептор антигена.

«Полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» является молекулой, содержащей
 35 нуклеотиды, включающие, но не ограничивающиеся ими, РНК, кДНК, геномную ДНК и даже синтетические последовательности ДНК. Следует понимать, что эти термины включают в себя также нуклеиновые кислоты, которые включают любой из известных в данной области аналогов оснований ДНК и РНК.

«Гетерологичная нуклеотидная последовательность» в рамках изобретения является
 40 нуклеотидной последовательностью, которая добавлена к нуклеотидной последовательности и/или геному рекомбинантными способами для образования конструктора, который не образуется природно в природе. Такие нуклеиновые кислоты могут также кодировать слитые (например, химерные) белки. Гетерологичные нуклеотидные последовательности могут кодировать пептиды и/или белки, которые
 45 имеют антигенные, регуляторные и/или структурные свойства. Гетерологичная нуклеотидная последовательность может содержать некодирующие последовательности, включающие сайты рестрикции, регуляторные сайты, промоторы и т.п.

В рамках изобретения термины «функционально связанные» и «оперативно

связанные» используются взаимозаменяемо и относятся к расположению генетических элементов, в котором описанные таким образом компоненты имеют такую конфигурацию, которая позволяет им выполнять их обычную функцию. Таким образом, регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, способны влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности. Эти регуляторные элементы не должны быть смежными с кодирующей последовательностью, пока они функционируют, управляя этой экспрессией. Например, промежуточные нетранслируемые, но транскрибируемые последовательности могут присутствовать между промотором и кодирующей последовательностью, и этот промотор может все еще считаться «функционально связанным» с этой кодирующей последовательностью.

В рамках изобретения термины «регуляторная последовательность» и «регуляторный элемент» используются взаимозаменяемо. Транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности являются регуляторными последовательностями ДНК, такими как промоторы, энхансеры, терминаторы и т.п., которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке-хозяине. В эукариотических клетках сигналы полиаденилирования являются регуляторными последовательностями. Кодирующая последовательность функционально связана с регуляторной последовательностью экспрессии, когда эта регуляторная последовательность экспрессии контролирует и регулирует транскрипцию и трансляцию этой нуклеотидной последовательности. Термин «функционально связанные» может включать в себя наличие подходящего стартового сигнала.

Кодирующая последовательность находится «под контролем» транскрипционных и трансляционных регуляторных последовательностей в клетке, когда РНК-полимераза транскрибирует кодирующую последовательность в мРНК, которая может быть затем транс-РНК-сплайсирована и, если необходимо, транслирована в белок, кодируемый этой кодирующей последовательностью.

Введение вакцин. Вакцины (в том числе поливалентные вакцины) по изобретению могут вводиться, например, системно вводиться, в виде части комбинированной терапии, т.е. терапии, которая включает, кроме самой вакцины, введение одного или нескольких дополнительных активных агентов, терапий и т.д. В этом случае должно быть понятно, что количество вакцины, которое составляет «терапевтически эффективное количество», может быть большим или меньшим, чем количество вакцины, которое могло бы составлять «терапевтически эффективное» количество, если бы эта вакцина вводилась в виде одного компонента. Другие терапии могут включать терапии, известные в данной области, такие как, например, противовирусные лекарственные средства, анальгезирующие средства, уменьшающие жар лекарственные средства, отхаркивающие средства, противовоспалительные лекарственные средства, антигистаминные средства, антибиотики, для лечения инфекции *B. bronchiseptica*, и/или введение жидкостей. В некоторых вариантах осуществления вакцину по изобретению вводят в комбинации с одной или несколькими из следующих вакцин: противогриппозной вакциной, вакциной против парагриппа, вакциной против кошачьего герпесвируса, вакциной против кошачьего калицивируса, Chlamydia-вакциной, вакциной против ринотрахеита, вакциной против панлейкопении, вакциной против вируса иммунодефицита, вакциной против вируса лейкоза или антирабической вакциной. В частных вариантах осуществления вакцину по изобретению вводят подкожно (S/C).

Уровень иммуногенности может быть определен экспериментальными способами исследования титрования дозы заражения, обычно известными в данной области. Такие способы обычно включают в себя вакцинацию ряда животных этой вакциной при

различных дозах и затем заражение этих животных вирулентным вирусом или бактерией для определения минимальной защитной дозы.

Факторы, влияющие на предпочтительную схему введения доз, могут включать, например, виды или породы (например, кошачьих или псовых), возраст, массу тела, пол, диету, активность, размер легких и состояние этого субъекта, способ введения, эффективность, безопасность и показатели продолжительности иммунитета конкретной используемой вакцины, использование или неиспользование системы доставки и введение вакцины в виде комбинации части лекарственного средства и/или вакцины. Таким образом, используемая фактически доза может варьировать для конкретных животных и, следовательно, может отклоняться от типичных доз, представленных выше. Определение таких коррекций доз обычно находится в рамках квалификации специалистов в области развития вакцин с использованием общепринятых способов. При конкретных условиях, используемых в примере 4 ниже, было определено, что безопасная и эффективная доза agoA-мутантного штамма *B. bronchiseptica* составляет от 5×10^5 до 5×10^7 КОЕ/мл в присутствии адъюванта и/или ароматической добавки.

Подобным образом объем, с которым обычно вводят такую дозу, составляет от 0,1 мл (обычно для интрадермального или трансдермального введения) до 5,0 мл. Обычный диапазон для объема введения равен 0,2-2,0 мл, предпочтительно приблизительно 1,0-2,0 мл для внутримышечного или подкожного введения.

Следует понимать, что эта вакцина может вводиться реципиенту вакцины один раз или альтернативно два или более раз на протяжении дней, недель, месяцев или лет. В некоторых вариантах осуществления эту вакцину вводят по меньшей мере два раза. В некоторых таких вариантах осуществления, например, эту вакцину вводят два раза, причем вторую дозу (например, бустер-дозу) вводят по меньшей мере спустя 2 недели после первой дозы. В частных вариантах осуществления эту вакцину вводят два раза, причем вторую дозу вводят спустя не более 8 недель после первой дозы. В других вариантах осуществления эту вторую дозу вводят спустя 1 неделю - 2 года после первой дозы, от 1,5 недель до 8 недель после первой дозы или от 2-4 недель после первой дозы. В других вариантах осуществления вторую дозу вводят спустя приблизительно 3 недели после первой дозы.

В приведенных выше вариантах осуществления первая и последующие дозы могут варьировать, например, в количестве и/или в форме. Однако часто эти дозы являются одинаковыми по количеству и по форме. При введении только единственной дозы количество вакцины в этой одной дозе обычно составляет терапевтически эффективное количество этой вакцины. Однако при введении более одной дозы количества вакцины в этих дозах вместе могут составлять терапевтически эффективное количество. Кроме того, вакцина может вводиться вначале и затем может вводиться бустер-доза спустя 2-12 недель, как обсуждалось выше. Однако последующие введения этой вакцины могут быть выполнены на ежегодной основе (1-годовой) или двухгодичной (2-годовой) основе независимо от того, вводилась или не вводилась бустер-доза.

Настоящее изобретение может быть лучше понято со ссылкой на следующие неограничивающие примеры, которые представлены в качестве примера по изобретению. Эти следующие далее примеры предоставлены для более полной иллюстрации вариантов осуществления по изобретению. Однако они ни в коем случае не должны пониматься как ограничение широкого объема по изобретению.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Конструирование agoA-мутантного штамма *Bordetella bronchiseptica*

Делеционный *aroA*-мутантный штамм *B. bronchiseptica* конструировали с целью приготовления эффективной вакцины с минимальными побочными эффектами. Делеция в гене *aroA* значительно нарушает способность *B. bronchiseptica* расти без экзогенной подачи одного или нескольких критических ароматических соединений.

5 Используемый штамм *B. bronchiseptica* сначала был выделен из собаки, которая имела заболевание верхних дыхательных путей. Ген *aroA*, который кодирует фермент в метаболическом пути, требуемый для синтеза обязательных ароматических соединений в *B. bronchiseptica* (см. выше), вместе с соседними последовательностями клонировали при помощи ПЦР из хромосомы *B. bronchiseptica*. Делецию из девяноста пар оснований
10 (bp) создавали затем рестрикционным расщеплением этого клонированного гена ферментом SalI. Затем эту делетированную версию гена *aroA* (Δ *aroA*) повторно вводили в *B. bronchiseptica* с использованием векторных инструментов и способов селекции, описанных для генерирования делеционных штаммов *aroA* *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* и *Haemophilus somnus*. (Briggs, and Tatum, Applied and Environmental
15 Microbiology, 71 (11) 7187-7195 (2005); Tatum and Briggs, Applied and Environmental Microbiology, 71 (11) 7196-7202. (2005); патент США № 5840556, содержания которых включены здесь посредством ссылки в их полном виде).

Вкратце эти способы основаны на создании чувствительных к температуре (*T_s*) версий сайта инициации репликации в плаزمиде, обнаруживаемых в *Mannheimia*
20 *haemolytica*. Эти *T_s*-плазмиды не могут эффективно размножаться при повышенных температурах (>39°C). Эти плазмиды модифицировали дополнительно таким образом, чтобы они имели устойчивости к канамицину, а также имели сайт инициации репликации *E. coli* ColE1 для размножения в *E. coli*. При введении гена Δ *aroA* в *B. bronchiseptica* происходят события гомологичной рекомбинации между районом нативного *aroA* и
25 районами этой плазмиды, так что части этой плазмиды будут вводиться в хромосому хозяина, *B. bronchiseptica*, с определенной частотой. Селекция трансформантов с использованием антибиотика канамицина позволяет выделить эти специфические трансформанты. Подтверждение инсерции гена Δ *aroA* выполняли при помощи ПЦР и размер ДНК определяли электрофорезом в агарозном геле.

30 Удаление нежелательных последовательностей из этой хромосомы, таких как нативный ген *aroA*, ген устойчивости к канамицину и любая другая последовательность вектора, происходит с использованием дополнительных событий рекомбинации. Селекцию желаемых рекомбинантов выполняли пассажем клеток без антибиотика при
35 недопустимой температуре для репликации плазмид. Изоляты, которые были чувствительны к канамицину, подвергали скринингу при помощи ПЦР и электрофореза ДНК на агарозе на ген Δ *aroA* и отсутствие нативного гена *aroA*. Анализ последовательности хромосомы *B. bronchiseptica* около района делеции *aroA* использовали для демонстрации того, что чужеродная векторная ДНК не удерживалась в изоляте *aroA*-мутантной *B. bronchiseptica*.

40 Пример 2

Сравнение LD₅₀ мыши *aroA*-мутантного штамма *B. bronchiseptica* с его родительским неаттенуированным штаммом

Группы из восьми мышей инокулировали внутрибрюшинно дозой 0,5 мл серийных разведений либо *aroA*-мутантного штамма *B. bronchiseptica* (см. пример 1 выше), либо
45 его родительского штамма для определения их LD₅₀. Этих мышей наблюдали в течение семи дней с ежедневной регистрацией мертвых мышей (см. таблицу 1 ниже). Имелась 100%-ная смертность в группах, инокулированных $2,8 \times 10^7$ КОЕ на дозу или более

родительского штамма ($LD_{50} 8,9 \times 10^6$) и $1,2 \times 10^9$ КОЕ на дозу или более агоА-мутантного штамма ($LD_{50} 3,8 \times 10^8$). Примечательно, что не было смертей при низких разведениях либо родительского штамма, либо агоА-мутантного штамма соответственно. Эти результаты демонстрируют, что делеция в гене агоА значительно аттенуирует *B. bronchiseptica*, делая ее приблизительно в 40 раз менее вирулентной в мышах, чем в родительском штамме.

Таблица 1
Смертность мышей после инокуляции

Группа	Штамм	КОЕ/доза	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6	День 7	Все-го
A1	Родитель	$2,8 \times 10^8$	1	7	---	---	---	---	---	8/8
A2	Родитель	$2,8 \times 10^7$	0	1	4	2	1	---	---	8/8
A3	Родитель	$2,8 \times 10^6$	0	0	0	0	0	0	0	0/8
A4	Родитель	$2,8 \times 10^5$	0	0	0	0	0	0	0	0/8
A5	Родитель	$2,8 \times 10^4$	0	0	0	0	0	0	0	0/8
B1	ΔагоА	$1,2 \times 10^{10}$	8	---	---	---	---	---	---	8/8
B2	ΔагоА	$1,2 \times 10^9$	0	8	---	---	---	---	---	8/8
B3	ΔагоА	$1,2 \times 10^8$	0	0	0	0	0	0	0	0/8
B4	ΔагоА	$1,2 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	0	0/8
B5	ΔагоА	$1,2 \times 10^6$	0	0	0	0	0	0	0	0/8

Пример 3

Определение безопасной и эффективной дозы вакцины

В попытке нахождения безопасного и эффективного диапазона доз экспериментальную вакцину, содержащую агоА-мутантный штамм (ΔагоА) *B. bronchiseptica* примера 1, вводили собакам при трех различных (обычно вводимых) уровнях доз.

Таким образом, дозу 1 мл живой культуры штамма ΔагоА *B. bronchiseptica* вводили группам обработки А, В и С (8 собакам в каждом случае) следующим образом: в дни исследования 0 и 21 эти бактерии выращивали в Триптоза-Фосфатном Бульоне (ТРВ) в течение 12 часов и затем разводили до доз-мишеней $1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл (группа А), $1,0 \times 10^7$ КОЕ/мл (группа В) и $1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл (группа С) соответственно. Собаки в контрольной группе D (9 собак) получали стерильный ТРВ.

Вакцинация

Каждую собаку вакцинировали подкожно у основания шеи дозой 1 мл соответствующей вакцины в дни исследования 0 и 21 с использованием шприца со стерильной иглой 22G 1". Первая вакцинация была на правой стороне, а вторая вакцинация на левой стороне. Чашечный подсчет бактерий выполняли до и после каждой вакцинации для определения предоставляемой дозы.

Мониторинг после вакцинации

После вакцинации цельную кровь брали для определения титров антител. Места инъекции пальпировали ежедневно, пока реакция места инъекции не становилась неощутимой. Высоту, ширину и глубину реакции места инъекции измеряли в сантиметрах (см) с использованием штангенциркулей. Реакцию места инъекции дополнительно характеризовали как утолщающуюся, мягкую, твердую или болезненную.

Заражение

Заражение выполняли со следующим материалом. Штамм D-2 *B. bronchiseptica* (Musser

et al., Journal of Bacteriology, 169(6):2793-2803 (June 1987)) инокулировали на агаровые чашки с Триптоза-Фосфатным Бульоном (ТРВ) (200 мкл на чашку), и эти чашки инкубировали в течение приблизительно 16-18 часов при $36\pm 2^\circ\text{C}$. Этот чистый бактериальный рост смывали с агаровых чашек 10 мл ТРВ на чашку, и плотность доводили до $\geq 1,0 \times 10^{10}$ КОЕ/мл. Свежий материал для заражения готовили для каждого дня заражения. В дни 35 и 36 исследования выполняли интраназальное введение материала для заражения инстилляцией 0,5 мл на ноздрю с использованием шприца на 3 мл с аппликатором.

Мониторинг после заражения

Собак наблюдали ежедневно в течение 21 дня после заражения на клинические признаки, включающие в себя, но не ограничивающиеся ими, депрессию, летаргию, отсутствие влечения к чему-либо, кашель, выделение из носа и одышку. Эти собаки получали мягкую трахеальную пальпацию ежедневно в попытке индуцирования кашля. Оценивали в баллах клинические признаки «мукоидное выделение», «слизисто-гнойное назальное выделение», «индуцированный кашель», «спонтанный кашель», «спонтанный кашель с рвотой» и «одышку». Назальные мазки собирали из каждой собаки два раза в неделю в течение трех недель для определения выделения организмов заражения.

Анализ данных:

Первичными полученными параметрами были клинические признаки заболевания и/или выделение бактерий. Экспериментальной единицей в этом изобретении была отдельная собака. Оценки в баллах предназначались для бихевиористических (поведенческих) и физических признаков в соответствии с клиническими наблюдениями. Клинические баллы суммировали для каждой собаки, для каждого дня и рассчитывали медианную оценку. Для результатов по выделению рассчитывали среднее КОЕ/мл организмов *B. bronchiseptica*, выделенных из назальных мазков: (i) для каждой группы обработки, (ii) для каждого сбора назальных мазков и (iii) число дней выделения.

Результаты:

Перед вакцинацией все собаки имели низкие титры антител (≤ 64) к *B. bronchiseptica* и были отрицательными в отношении инфекции *B. bronchiseptica*, как определено по выделению назальных мазков. Вакцинация $1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл *B. bronchiseptica* agoA- (группа обработки C) и плацебо (группа обработки D) не индуцировали увеличения антител, специфических в отношении *B. bronchiseptica*. В отличие от этого вакцинация дозой $1,0 \times 10^8$ (группа обработки A) индуцировала титры 256 или более у 100% (8/8) собак, а вакцинация дозой $1,0 \times 10^7$ КОЕ/мл индуцировала титры антител 128 или более у 25% (2/8) этих собак в день 28 исследования. Геометрическое среднее для групп обработки A, B, C и D в день 28 исследования было 470, 76, 35 и 40 соответственно (таблица 2).

Таблица 2
Геометрическое среднее титров сывороточных антител к *B. bronchiseptica* перед/после вакцинации

Группа обработки	День исследования -4	День исследования 20	День исследования 28
A $1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл	17	70	470
B $1,0 \times 10^7$ КОЕ/мл	25	41	76
C $1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл	29	35	35
D плацебо	25	30	40

Собаки в группе обработки A развивали отек в месте инъекции, который исчезал в

пределах 9-13 дней после вакцинации. Наибольшей реакцией места инъекции, измеренной в группе обработки А, была реакция 2×2×1,5 см, и 2 из 8 собак имели реакции места инъекции, которые были болезненными после пальпации. Собаки в группе обработки В развивали отек в месте инъекции, который исчезал в пределах 3-6 дней после вакцинации, с измерением наибольшей реакции места инъекции 2×2×1,5 см. Только одна собака развивала слабый отек в группе обработки С (0,5×0,5×0,5 см), который был измеримым только в течение одного дня. Реакции места инъекции не наблюдали в группе обработки Д. Средняя реакция места инъекции, рассчитанная с использованием реакции места инъекции наибольшего размера для каждой собаки после первой вакцинации, показана в таблице 3. Хотя ни одна из этих вакцин не вызывала вредных системных реакций после вакцинации, размер и характер отеков в группах А и В не могли быть приемлемыми в ветеринарной практике.

Таблица 3 Средние размеры реакции места инъекции	
Группа обработки	Средний размер реакции места инъекции (см ²)
А 1,0×10 ⁸ КОЕ/мл	2,1
В 1,0×10 ⁷ КОЕ/мл	1,0
С 1,0×10 ⁶ КОЕ/мл	0
Д плацебо	0

После заражения эти клинические признаки оценивали в баллах для каждой собаки и суммировали на протяжении 21-дневного периода наблюдения. Вакцинация штаммом aroA- *B. bronchiseptica* при 1,0×10⁸ КОЕ/мл и 1,0×10⁷ КОЕ/мл уменьшала клинические признаки, ассоциированные с инфекцией *B. bronchiseptica*. Семь из девяти (78%) собак в вакцинированной плацебо контрольной группе (группе обработки Д) и пять из восьми (63%) собак в группе обработки С (1,0×10⁶ КОЕ/мл) имели оценки в баллах кашля 1 или более во время 21-дневного периода наблюдения, тогда как только восемь (13%) собак, вакцинированных 1,0×10⁸ КОЕ/мл (группа обработки А), и две из восьми (25%) собак в группе обработки В имели оценки кашля 1 или более в течение одного дня во время 21-дневного периода наблюдения. Медианная клиническая оценка в баллах представлена в таблице 4 для каждой группы собак, вакцинированных живым aroA-мутантным штаммом *B. bronchiseptica* примера 1 и затем зараженных вирулентной *B. bronchiseptica*.

Насальные мазки собирали в шести временных точках во время 21-дневного периода наблюдения для определения выделения организмов заражения. При 21 дне после заражения все собаки (100%) в группах обработки С и Д выделяли большие количества *B. bronchiseptica* в сравнении с четырьмя из восьми (50%) собак, все еще выделяющих бактерии, в группе обработки А и пятью из восьми (63%) в группе обработки В. Среднее количество организмов *B. bronchiseptica*, выделенных из носов собак в группах А, В и С, было меньшим, чем среднее количество организмов, выделенных у собак в группе Д (таблица 4).

Таблица 4 Клинические оценки в баллах после заражения и выделение <i>B. Bronchiseptica</i>			
Группа обработки	Медианная клиническая оценка	Количество собак с оценками кашля ≥1	Среднее количество выделенных организмов <i>B. bronchiseptica</i>

5	A 1,0×10 ⁸ КОЕ/мл	0	1/8 (13%)	2261
	B 1,0×10 ⁷ КОЕ/мл	0,5	2/8 (25%)	32,592
	C 1,0×10 ⁶ КОЕ/мл	3,5	5/8 (63%)	46,341
	D плацебо	3,0	7/9 (78%)	73,656

Таким образом, живой аро-мутантный штамм *B. bronchiseptica* может быть использован в качестве живой вакцины для системного введения в членов семейства псовых. Однако при титрах, в которых этот живой ароА-мутантный штамм *B. bronchiseptica* был наиболее эффективным, эти вакцины вызывали неприемлемые реакции места инъекции.

Пример 4

Улучшение эффективности на безопасном уровне

Следующее исследование проводили для оценивания, может ли быть эффективность самой низкой тестированной дозы (1×10⁶ КОЕ) специфически улучшена при поддержании минимальных реакций места инъекции, если они имеются. Экспериментальные вакцины для новых групп обработки А, В, С и D (5 собак в каждой) содержали живую культуру ароА-мутантного штамма *B. bronchiseptica* примера 1 в дозе 1 мл. Собаки в группе обработки Е получали стерильную DMEM без какого-либо антигена. Этот ароА-мутантный штамм *B. bronchiseptica* выращивали в Триптоза-Фосфатном бульоне (TPB) в течение 17 часов в ферментере на 5 л и собирали, когда OD_{580 нм} была 1,0-2,0. Эту ферментационную культуру смешивали со стабилизатором и лиофилизировали.

Ллиофилизированные фильтровальные лепешки повторно гидратировали до дозы-мишени 1,0×10⁸ КОЕ/мл стерильной водой для группы обработки А. Для групп обработки В, С и D эти ллиофилизированные лепешки повторно гидратировали до дозы-мишени 1,0×10⁵ КОЕ/мл стерильной водой:

плюс 2% фосфата алюминия для группы В;

плюс 2% гидроксид алюминия для группы С; или

плюс смесь ароматических добавок для группы D.

Ллиофилизированные фильтровальные лепешки для группы обработки Е повторно гидратировали стерильной водой, см. таблицу 6 ниже.

Этим используемым, содержащим фосфат алюминия адъювантом был 2%

Rehydraphos[®], тогда как используемым, содержащим гидроксид алюминия адъювантом был 2% Rehydrogel[®] LV. Оба из этих адъювантов являются коммерчески доступными из Reheis Inc., Berkeley Heights, NJ, USA. Смесь ароматических соединений (ароматическая добавка) описана в таблице 5 ниже. В дни 0 и 21 исследования этих собак вакцинировали описанными выше вакцинами или DMEM-плацебо.

Таблица 5 Смесь ароматических добавок	
Компонент	Ароматическая добавка (мкг/мл)
L-тирозин	40
2,3-дигидроксibenзойная кислота	5
L-триптофан	40
L-фенилаланин	40
Пара-аминобензойная кислота	10

Вакцинация

Каждую собаку вакцинировали подкожно у основания шеи дозой 1 мл соответствующей вакцины в дни исследования 0 и 21 с использованием шприца со стерильной иглой 22G 1". Первая вакцинация была на правой стороне, а вторая вакцинация на левой стороне. Чашечный подсчет бактерий выполняли до и после

Мониторинг после вакцинации

После вакцинации цельную кровь брали для определения титров антител. Места инъекции пальпировали ежедневно, пока реакция места инъекции не становилась неощутимой. Высоту, ширину и глубину реакции места инъекции измеряли в сантиметрах (см) с использованием штангенциркулей. Реакцию места инъекции дополнительно характеризовали как утолщающаяся, мягкая, твердая или болезненная.

Заражение

Заражение выполняли со следующим материалом. Штамм D-2 *B. bronchiseptica* инокулировали на агаровые чашки с Триптоза-Фосфатным Бульоном (TPB) (200 мкл на чашку), и эти чашки инкубировали в течение приблизительно 16-18 часов при $36 \pm 2^\circ\text{C}$. Этот чистый бактериальный рост смывали с агаровых чашек 10 мл TPB на чашку и плотность доводили до $\geq 1,0 \times 10^{10}$ КОЕ/мл. Свежий материал для заражения готовили для каждого дня заражения. В день 42 исследования свежую культуру для заражения вводили интраназально инстилляцией 0,5 мл на ноздрю с использованием шприца на 3 мл с аппликатором. В день 43 свежую культуру вводили интраназально инстилляцией 0,5 мл на ноздрю с использованием распылителя с электрическим насосом.

Мониторинг после заражения

Собак наблюдали ежедневно в течение 21 дня после заражения на клинические признаки, включающие в себя, но не ограничивающиеся ими, депрессию, летаргию, отсутствие влечения к чему-либо, кашель, выделение из носа и одышку. Эти собаки получали мягкую трахеальную пальпацию ежедневно в попытке индуцирования кашля. Оценивали в баллах клинические признаки «мукоидное выделение», «слизисто-гнойное назальное выделение», «индуцированный кашель», «спонтанный кашель», «спонтанный кашель с рвотой» и «одышку».

Результаты.

Перед вакцинацией все собаки имели низкие титры антител (≤ 64) к *B. bronchiseptica* и были отрицательными в отношении инфекции *B. bronchiseptica*, как определено по выделению назальных мазков. Контрольные собаки (группа обработки Е) имели титры антител 32 или менее в 100% (пяти из пяти) собак в день 28 исследования. В отличие от этого вакцинация аroA-мутантным штаммом *B. bronchiseptica* при $1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл (группа обработки А) индуцировала титры антител 256 или более в 80% (четырёх из пяти) собак, вакцинация $1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл + 2% Rehydraphos® (группа обработки В) индуцировала титры антител 128 или более в 80% (четырёх из пяти) собак, вакцинация $1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл + 2% Rehydragel® IV (группа обработки С) индуцировала титры антител 128 или более в 40% (двух из пяти) собак и вакцинация при $1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл + 1 X AroMix (группа обработки D) индуцировала титры антител 128 или более в 60% (трех из пяти) собак. Средний геометрический титр для групп обработки А, В, С, D и Е в день 28 исследования был 338, 111, 84, 97 и 14 соответственно (таблица 6).

Таблица 6

Геометрическое среднее титров сывороточных антител к *B. bronchiseptica* перед/после вакцинации

Группа обработки	КОЕ	Добавление	День исследования - 4	День исследования 20	День исследования 28
------------------	-----	------------	--------------------------	-------------------------	-------------------------

A	1×10^8	---	37	64	338
B	1×10^6	2% фосфат алюминия	32	49	111
C	1×10^6	2% гидроксид алюминия	32	37	84
D	1×10^6	смесь ароматических добавок	32	56	97
E	---	---	28	28	14

Собаки оставались клинически здоровыми после вакцинации, в том числе не имели жара. Собаки в группе обработки А развивали умеренный отек в месте инъекции, который исчезал в пределах 16-19 дней после вакцинации. Наибольшей реакцией, измеренной в группе обработки А, была $3,0 \times 3,0 \times 0,5$ см, и три из пяти собак имели реакции, которые были болезненными после пальпации. Собаки (четыре из пяти) в группе обработки В развивали слабый отек в месте инъекции, который исчезал в пределах 9-11 дней после вакцинации, с измерением наибольшей реакции $1,0 \times 1,0 \times 0,5$ см, и одна из пяти собак имела реакцию, которая была болезненной после пальпации. Собаки (пять из пяти) в группе обработки С развивали слабый отек в месте инъекции, который исчезал в пределах 9-10 дней после вакцинации, с измерением наибольшей реакции $1,0 \times 1,0 \times 0$ см. Только две из пяти собак в группе обработки D развивали слабый отек в месте инъекции, который исчезал в пределах 5-8 дней после вакцинации, с измерением наибольшей реакции $0,5 \times 0,5 \times 0$ см. В группе обработки Е не наблюдали реакций места инъекции. Средняя реакция места инъекции для каждой группы обработки, рассчитанная с использованием реакции места инъекции наибольшего размера для каждой собаки после первой вакцинации, показана в таблице 7. Эти результаты подтверждают прежние наблюдения, что доза вакцины $1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл не является безопасной для применения у молодых собак, тогда как доза 1×10^6 КОЕ/мл, даже при введении с адьювантом, обеспечивает лучший профиль безопасности, который мог бы рассматриваться как приемлемый в ветеринарной практике.

Таблица 7 Средние размеры реакции места инъекции			
Группа обработки	КОЕ	Добавление	Средний размер реакции места инъекции (см ²)
A	1×10^8	---	4,5
B	1×10^6	2% фосфат алюминия	0,2
C	1×10^6	2% гидроксид алюминия	0,4
D	1×10^6	смесь ароматических добавок	0,1
E	---	---	0

После заражения эти клинические признаки оценивали в баллах для каждой собаки и суммировали на протяжении 21-дневного периода наблюдения. Было оценено, что доза заражения является достаточной для определения эффективности этих вакцин, так как по меньшей мере 50% контрольных собак обнаруживали клинические признаки заболевания и/или бактериальное выделение. Собаку определяли как развившую постоянный кашель (пораженную собаку), если спонтанный кашель или спонтанный кашель с рвотой наблюдали в ≥ 3 не последовательных дней во время периода наблюдения после заражения. Как показано в таблице 8, добавление либо адьюванта, либо смеси ароматических соединений (ароматической добавки) к вакцине, имеющей титр 1×10^6 КОЕ agoA-мутантного штамма *B. bronchiseptica*, приводило к защите вакцинированных собак против заражения вирулентной *B. bronchiseptica*. Четыре из пяти плацебо-вакцинированных собак развивали постоянный кашель после заражения

в сравнении с ни одной из собак в группах обработки А, В и D, и в сравнении с только 1 собакой группы обработки С. Медианный клинический признак для групп обработки А, В, С, D и Е был равен 2, 1, 3, 1 и 13 соответственно (таблица 8).

Назальные мазки собирали в шести временных точках во время 21-дневного периода наблюдения для определения выделения организмов заражения. При 21 дне после заражения (день 63 исследования) все собаки (100%) в группе обработки С выделяли большие количества *B. bronchiseptica*. Среднее КОЕ/мл организмов заражения *B. bronchiseptica*, выделенных из назальных мазков в день 63, было равно 726, 5048, 17400, 594, и 135840 для групп обработки А, В, С, D и Е соответственно. Общее среднее КОЕ/мл организмов заражения *B. bronchiseptica*, выделенных из назальных мазков во все дни исследования, было равно 6899, 3662, 6671, 8060 и 24067 для групп обработки А, В, С, D и Е соответственно (таблица 8).

Таблица 8
Клинические оценки после заражения и выделение *B. Bronchiseptica*

Группа обработки	КОЕ	Добавление	Медианная клиническая оценка	Количество пораженных собак*	Среднее количество выделенных организмов <i>B. Bronchiseptica</i>
А	1×10^8	---	2	0/5 (0%)	6899
В	1×10^6	2% фосфат алюминия	1	0/5 (0%)	3662
С	1×10^6	2% гидроксид алюминия	3	1/5 (20%)	6671
D	1×10^6	смесь ароматических добавок	1	0/5 (0%)	8060
Е	---	---	13	4/5 (80%)	24067

Таким образом, четыре различных препарата живой аттенуированной ароА-мутантной вакцины *B. bronchiseptica* оценивали на безопасность и эффективность.

Вакцины, имеющие титр 1×10^6 ароА-мутантного штамма *B. bronchiseptica* плюс либо содержащий гидроксид алюминия адъювант, содержащий фосфат алюминия адъювант, либо ароматическую добавку, способствовали защите собак от клинических признаков заболевания без вызывания значительного отека в месте инъекции.

Таким образом, данное изобретение минимально демонстрирует, что добавление адъюванта и/или ароматической добавки к вакцине, содержащей живой аттенуированный аро-мутантный штамм *B. bronchiseptica*, значительно уменьшает дозу, необходимую для эффективности этой вакцины, что, в свою очередь, служит для минимизации любых получаемых реакций места инъекции вследствие введения этой вакцины.

Пример 5

Вакцина против *Bordetella bronchiseptica*, вируса гриппа псовых и вируса парагриппа псовых

Была приготовлена поливалентная вакцина против вируса гриппа псовых (CIV), вируса парагриппа псовых (CPI) и *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*). Эта псовая вакцина содержит модифицированный живой вирус парагриппа псовых, убитый вирус гриппа псовых и живой аттенуированный ароА-мутантный штамм *B. bronchiseptica*, как описано в примере 1. Эта вакцина предназначена для подкожного введения. Этот продукт рекомендован в качестве вспомогательного средства в предотвращении заболевания, вызываемого *B. bronchiseptica*, вирусом парагриппа псовых, и в качестве вспомогательного средства в контроле заболевания, вызываемого вирусом гриппа псовых. Каждая доза вакцины должна содержать по меньшей мере $10^{5.7}$ TCID₅₀ (50%-ную инфекционную дозу для культуры ткани) CPI, 1×10^6 КОЕ *B. bronchiseptica* и 1000

HAU (гемагглютининовых единиц) CIV.

Производственные культуры *B. bronchiseptica* охлаждали в ферментере и добавляли к этой культуре смесь ароматических соединений (ароматическую добавку), как описано в таблице 9 ниже. Затем этот модифицированный живой CPI смешивали с живым aroA-мутантным штаммом *B. bronchiseptica* вместе со стабилизатором, 5%-ным раствором глутатиона, смесью ароматических соединений (ароматической добавкой) таблицы 9 и средой DMEM. Затем эту смесь лиофилизировали и хранили. Лيوфилизированную фильтровальную лепешку повторно гидратировали в разбавителе, содержащем убитый CIV и либо содержащий 2% гидроксид алюминия адъювант, либо содержащий 5% гидроксид алюминия адъювант.

Таблица 9 Смесь ароматических соединений	
Компонент	Объем (на литр полученного сбора клеток)
L-тирозин (16 мг/мл)	2,5 мл
2,3-дигидроксibenзойная кислота (5 мг/мл)	1 мл
L-триптофан (4 мг/мл), L-фенилаланин (4 мг/мл) и пара-аминобензойная кислота (1 мг/мл)	10 мл

Собак в группах обработки В и С вакцинировали лиофилизированной вакциной, содержащей живой aroA-мутантный штамм *B. bronchiseptica* и CPI, повторно

гидратированный до дозы-мишени $5,0 \times 10^5$ КОЕ/мл живого aroA-мутантного штамма *B. bronchiseptica* стерильной водой:

плюс CIV плюс содержащий 2%-ный гидроксид алюминия адъювант для группы В; или

плюс CIV плюс содержащий 5%-ный гидроксид алюминия для группы С.

Собак в группе обработки D вакцинировали только CIV плюс содержащим 2%-ный гидроксид алюминия адъювантом. Гидроксидом алюминия, используемым во всех трех группах обработки, был Rehydragel® LV.

Вакцинация

Каждую собаку вакцинировали подкожно у основания шеи дозой 1 мл соответствующей вакцины в дни исследования 0 и 21 с использованием шприца со стерильной иглой 22G 1". Первая вакцинация была на правой стороне, а вторая вакцинация на левой стороне. Чашечный подсчет бактерий выполняли до и после каждой вакцинации для определения предоставляемой дозы.

Мониторинг после вакцинации

После вакцинации цельную кровь брали для определения титров антител. Места инъекции пальпировали ежедневно, пока реакция места инъекции не становилась неощутимой. Высоту, ширину и глубину реакции места инъекции измеряли в сантиметрах (см) с использованием штангенциркулей и дополнительно характеризовали как утолщающиеся, мягкие, твердые или болезненные.

Заражение

Заражение выполняли со следующим материалом. Штамм D-2 *B. bronchiseptica* инокулировали на агаровые чашки с триптоза-фосфатным бульоном (TPB) (200 мкл на чашку) и эти чашки инкубировали в течение приблизительно 16-18 часов при $36 \pm 2^\circ\text{C}$. Этот чистый бактериальный рост смывали с агаровых чашек 10 мл TPB на чашку и плотность доводили до $\geq 1,0 \times 10^{10}$ КОЕ/мл. Свежий материал для заражения готовили для каждого дня заражения. В день 35 исследования материал для заражения вводили интраназальным способом инстилляцией 0,5 мл на ноздрю с использованием шприца на 3 мл с аппликатором. В день 36 исследования материал для заражения вводили

интраназальным способом инстилляцией ~0,5 мл на ноздрю с использованием распылителя с электрическим насосом.

Мониторинг после заражения

Собак наблюдали ежедневно в течение 21 дня после заражения на клинические признаки, включающие в себя, но не ограничивающиеся ими, депрессию, летаргию, отсутствие влечения к чему-либо, кашель, выделение из носа. Назальные мазки собирали два раза в неделю, с 3-4 днями между сборами, в течение 3 недель после заражения для определения выделения организмов заражения.

Результаты

Перед вакцинацией все собаки имели низкие титры антител (≤ 64) к *B. bronchiseptica* и были отрицательными в отношении инфекции *B. bronchiseptica*, как определено по выделению назальных мазков. В день 28 исследования, четыре из пяти (80%) плацебо-вакцинированных контрольных собак (группа обработки D) имели титры антител 64 или менее. В отличие от этого все собаки, которые получали тест-вакцину, содержащую $5,0 \times 10^5$ КОЕ/мл аroA-мутантного штамма *B. bronchiseptica*, CPI, CIV и 2% Rehydragel LV (группа обработки B) или 5% Rehydragel LV (группа обработки C), имели титр антител 64 или более высокий. Геометрический средний титр для групп обработки B, C и D в день 28 исследования был 111, 111 и 64 соответственно (таблица 10).

Таблица 10 Геометрическое среднее титров сывороточных антител к <i>B. bronchiseptica</i> перед/после вакцинации				
Группа обработки	<i>B. bronchiseptica</i> , КОЕ	Добавления к вакцине	День исследования - 1	День исследования 28
B	$5,0 \times 10^5$	CPI, CIV и 2% гидроксид алюминия	28	111
C	$5,0 \times 10^5$	CPI, CIV и 5% гидроксид алюминия	42	111
B	---	CIV и 2% гидроксид алюминия	42	64

Собаки оставались клинически здоровыми после вакцинации, в том числе не имели жара. Три из пяти собак в группе обработки B имели слабый отек в месте инъекции, который исчезал в пределах 1-5 дней после вакцинации, с измерением наибольшей реакции места инъекции $1,0 \times 1,0 \times 0,5$ см. Все собаки в группе обработки C развивали слабый отек в месте инъекции, который исчезал в пределах 7-11 дней после вакцинации, с измерением наибольшей реакции места инъекции $1,0 \times 1,0 \times 0,5$ см. Ни одна из пяти собак в группе D обработки не развивала реакций места инъекции после любой вакцинации. Средняя реакция места инъекции для каждой группы обработки, рассчитанная с использованием реакции места инъекции наибольшего размера для каждой собаки после первой вакцинации, показана в таблице 11.

Таблица 11 Средние размеры реакции места инъекции			
Группа обработки	КОЕ <i>B. bronchiseptica</i>	Добавление к вакцине	Средний размер реакции места инъекции (см ²)
B	$5,0 \times 10^5$	CPI, CIV и 2% гидроксид алюминия	0,2
C	$5,0 \times 10^5$	CPI, CIV и 5% гидроксид алюминия	0,3
D	---	CIV и 2% гидроксид алюминия	0

После заражения клинические признаки оценивали в баллах для каждой собаки и суммировали на протяжении 21-дневного периода наблюдения. Четыре из пяти плацебо-вакцинированных контрольных собак развивали клинические признаки заболевания, включающие в себя спонтанный кашель после заражения, свидетельствующий о

достоверном заражении. В отличие от этого две тест-вакцины уменьшали клинические признаки, ассоциированные с инфекцией *B. bronchiseptica*, конкретно кашель, в сравнении с контрольными собаками. Медианная оценка кашля для групп обработки В, С и D была 1, 0 и 2 соответственно (таблица 12), и процент собак, которые развивали клиническое заболевание, был 20%, 20% и 40% соответственно.

Назальные мазки собирали в шести временных точках во время 21-дневного периода наблюдения для определения выделения организмов заражения. При 21 дне после заражения (день 55 исследования) все собаки (100%) в группе обработки D выделяли большие количества организмов *B. bronchiseptica*, тогда как не было явно меньшего выделения в каждой из этих двух вакцинированных групп. Среднее КОЕ/мл зараженных организмов *B. bronchiseptica* D2, выделенных из назальных мазков в день 55 исследования, было 15494, 26802 и 150620 для групп обработки В, С и D соответственно. Общее среднее КОЕ/мл зараженных организмов *B. bronchiseptica* D2, выделенных из назальных мазков во все дни исследования, было 38642, 206713 и 178,609 для групп обработки В, С и D соответственно (таблица 12).

Таблица 12 Клинические оценки после заражения и выделение <i>B. Bronchiseptica</i>				
Группа обработки	Вакцина	Медианная клиническая оценка	% собак с клиническим заболеванием	Среднее количество выделенных организмов <i>B. bronchiseptica</i>
В	$5,0 \times 10^5$ КОЕ/мл В.б., СРІ, СІV и 2% гидроксид алюминия	1	20%	38,642
С	$5,0 \times 10^5$ КОЕ/мл В.б., СРІ, СІV и 5% гидроксид алюминия	0	20%	206,713
В	СІV и 2% гидроксид алюминия	2	40%	178,609

Таким образом, два различных препарата живой аттенуированной ароА-мутантной вакцины *B. bronchiseptica* плюс СРІ+СІV оценивали на безопасность и эффективность.

Вакцины, имеющие титр 5×10^5 ароА-мутантного штамма *B. bronchiseptica* плюс ароматическую добавку, и содержащий гидроксид алюминия адъювант при либо 2%, либо 5%, способствовали защите собак от клинических признаков заболевания без вызывания значимого отека в месте инъекции. Таким образом, данное изобретение минимально демонстрирует, что добавление адъюванта и/или ароматической добавки к вакцине, содержащей живой аттенуированный аро-мутантный штамм *B. bronchiseptica*, значительно уменьшает дозу, необходимую для эффективности этой вакцины, что, в свою очередь, служит для минимизации любых получаемых реакций места инъекции вследствие введения этой вакцины.

Данное изобретение не должно ограничиваться в объеме описанными здесь конкретными вариантами осуществления. Действительно, различные модификации по изобретению, наряду с описанными здесь, будут очевидными специалистам с квалификацией в данной области из предыдущего описания. Предполагается, что такие модификации находятся в объеме прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Вакцина для защиты животного против клинического заболевания, возникающего из инфекции *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*), содержащая живой аро-мутантный штамм *B. bronchiseptica* и ароматическую добавку, содержащую тирозин, триптофан, фенилаланин, пара-аминобензойную кислоту и 2,3-дигидроксibenзойную кислоту, где эта вакцина является подходящей для системного введения.

2. Вакцина по п. 1, где этот живой аро-мутантный штамм *B. bronchiseptica* является

живым agoA-мутантом *B. bronchiseptica*.

3. Вакцина по п. 2, которая дополнительно содержит адъювант.

4. Вакцина по п. 3, где этот адъювант содержит соль алюминия.

5 5. Вакцина по п. 4, где эта соль алюминия выбрана из группы, состоящей из фосфата алюминия, сульфата алюминия-калия и гидроксида алюминия.

6. Вакцина по п. 5, которая дополнительно содержит антиген вируса гриппа псовых, антиген вируса парагриппа псовых или как антиген вируса гриппа псовых, так и антиген вируса парагриппа псовых.

10 7. Вакцина по п. 2, которая дополнительно содержит антиген вируса гриппа псовых, антиген вируса парагриппа псовых или как антиген вируса гриппа псовых, так и антиген вируса парагриппа псовых.

8. Вакцина по п. 7, где этот антиген гриппа псовых является убитым вирусом гриппа псовых, и антиген вируса парагриппа псовых является модифицированным живым вирусом парагриппа псовых.

15 9. Вакцина по п. 8, где живой agoA-мутантный штамм *B. bronchiseptica* и модифицированный вирус парагриппа псовых находятся в лиофилизированных сферах и убитый вирус псовых находится в разбавителе.

20 10. Способ поддержки защиты псовых против клинического заболевания, возникающего из инфекции *B. bronchiseptica*, включающий системное введение эффективного количества вакцины по п. 1 этому члену семейства псовых.

11. Способ поддержки защиты животного против клинического заболевания, возникающего из инфекции *B. bronchiseptica*, включающий системное введение эффективного количества вакцины по п. 1 этому животному.

25

30

35

40

45