

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039237**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.21

(21) Номер заявки
201891124

(22) Дата подачи заявки
2013.10.29

(51) Int. Cl. *A61K 31/722* (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 39/08 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/112 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ МАННОЗИЛИРОВАННОГО ХИТОЗАНА В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТА
В СОСТАВЕ ВАКЦИН ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ИЛИ МУКОЗНОЙ ДОСТАВКИ**

(31) 61/719,713

(32) 2012.10.29

(33) US

(43) 2018.10.31

(62) 201590829; 2013.10.29

(56) RU-C2-2415857
WO-A1-1999027960
RU-C2-2306140
US-A1-20060045912
CA-A1-2426490
RU-C2-2435609

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЗЕ БОРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ АРКАНЗАС (US)

(72) Изобретатель:
Харджис Билли М., Памфорд Нейл Р.,
Морган Марион (US), Шиварамаiah
Сричаитаня (IN), Теллес Гильермо,
Вулфенден Аманда (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к применению адьювантной композиции или вакцинного состава, содержащего адьювантную композицию, для усиления иммунного ответа у субъекта, где адьювантная композиция содержит углевод, связанный с хитозаном для образования основания Шиффа, и где углевод представляет собой маннозу с открытым кольцом, где композиция составлена для перорального введения или введения в слизистые оболочки.

B1**039237****039237****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Патентная заявка на данное изобретение испрашивает приоритет предварительной патентной заявки Соединенных Штатов Америки № 61/719713, зарегистрированной 29 октября 2012 г., включенной в настоящий документ полностью в качестве ссылки.

Введение

Адьювант является фармакологическим или иммунологическим лекарственным средством, которое модифицирует эффект других препаратов, таких как лекарственное средство или вакцина. Адьюванты часто включают в вакцины для усиления иммунного ответа реципиента на представленный антиген, в то же время сводя инъецированный чужеродный материал до минимума.

Адьюванты сами по себе не обеспечивают иммунитет. Адьюванты могут действовать различными способами при презентировании антигена иммунной системе. Адьюванты могут действовать в качестве депо для антигена, презентуя антиген в течение длительного периода времени, таким образом максимизируя иммунный ответ до того, как организм очистится от антигена. Примерами адьювантов типа депо являются масляные эмульсии наподобие адьюванта Фрейнда. Адьюванты также могут действовать в качестве раздражителей, которые заставляют организм задействовать и усилить его иммунный ответ. Вакцина от столбняка, дифтерии и коклюша, например, содержит весьма малые количества токсинов, продуцируемых каждой из целевых бактерий, но также содержит гидроксид алюминия. Соли алюминия являются распространенными адьювантами в вакцинах, продаваемых в Соединенных Штатах Америки, и применялись в вакцинах в течение 70 лет.

Хитозан является линейным полисахаридом, составленным из случайным образом распределенных β -(1-4)-связанного D-глюкозамина (деацетилированная единица) и N-ацетил-D-глюкозамина (ацетилированная единица). Он создан посредством обработки панцирей креветок и других ракообразных с применением щелочного гидроксида натрия. Хитозан с некоторым успехом применяли в качестве носителя как для пероральных, так и для подкожных вакцин. Здесь авторы представляют новые составы, содержащие адьювант на основе хитозана, которые, как продемонстрировано, лучше действуют в качестве адьювантов, чем традиционно применяемые адьюванты на основе алюминия. В частности, адьюванты на основе хитозана, представленные в настоящем документе, были эффективными при стимуляции IgA ответа.

Сущность

Изобретение относится к применению адьювантной композиции для усиления иммунного ответа у субъекта, где адьювантная композиция содержит углевод, связанный с хитозаном для образования основы Шиффа, и где углевод представляет собой маннозу с открытым кольцом, где композиция составлена для перорального введения или введения в слизистые оболочки. Указанную адьювантную композицию можно комбинировать с антигеном. Указанный углевод представляет собой маннозу.

краткое описание фигур

На фиг. 1 представлен график, демонстрирующий ответ антитела IgG на β -галактозидазу у индеек после первичной вакцинации и стимуляции посредством указанных составов вакцины-адьюванта. Различные буквы указывают на значимые различия ($p < 0,05$).

На фиг. 2 представлен график, демонстрирующий ответ антитела IgG на *Clostridium septicum* у индеек после первичной вакцинации и стимуляции посредством указанных составов вакцины-адьюванта. Различные буквы указывают на значимые различия ($p < 0,05$).

На фиг. 3 представлен набор графиков, демонстрирующих ответ антитела IgG (фиг. 3A) и IgA (фиг. 3B) у курей в различные моменты времени после вакцинации и стимуляции посредством указанных *Bacillus*-векторных составов вакцины-адьюванта к птичьему гриппу.

На фиг. 4 представлен график, демонстрирующий уровни антитела IgG против *Salmonella* после первичной вакцинации и стимуляции посредством указанных составов вакцины-адьюванта, измеренные посредством конкурентного ELISA. Различные буквы указывают на значимые различия ($p < 0,05$).

На фиг. 5 представлен график, демонстрирующий уровни антитела IgA против *Salmonella* после первичной вакцинации и стимуляции посредством указанных составов вакцины-адьюванта, измеренные посредством конкурентного ELISA. Различные буквы указывают на значимые различия ($p < 0,05$).

На фиг. 6 представлен набор графиков, демонстрирующих уровни антител IgG (фиг. 6A) и IgA (фиг. 6B) против *Salmonella* после первичной вакцинации и стимуляции посредством указанных составов вакцины-адьюванта, измеренные посредством конкурентного ELISA. Различные буквы указывают на значимые различия ($p < 0,05$).

На фиг. 7 представлен график, демонстрирующий процент восстановления *Salmonella* в печени и селезенке (L/S) или в скоплениях лимфоидной ткани в слепой кишке (CT) на 22 сутки после первичной вакцинации (на 3 сутки после стимуляции антигеном). Протокол вакцинации был таким же, как и тот, что применяли на фиг. 6, и * указывает на $P < 0,05$.

На фиг. 8 представлен график, демонстрирующий уровень антитела IgA против *Salmonella* на 22 сутки после первичной вакцинации и стимуляции (12 сутки) посредством указанных составов вакцины-адьюванта посредством указанных путей введения как измеренные с применением конкурентной ELISA. Различные буквы указывают на значимые различия ($p < 0,05$).

На фиг. 9 представлен график, демонстрирующий иммунный ответ IgG на *Salmonella* после вакцинации цыплят с применением указанных составов вакцины-адьюванта, как было измерено посредством конкурентной ELISA. Различные буквы указывают на значимые различия ($p < 0,05$).

На фиг. 10 представлен график, демонстрирующий иммунный ответ IgA на *Salmonella* после вакцинации цыплят с применением указанных составов вакцины-адьюванта, как было измерено посредством конкурентной ELISA. Различные буквы указывают на значимые различия ($p < 0,05$).

На фиг. 11 представлен график, демонстрирующий иммунный ответ IgG на *Bordetella avium* после однократной парентеральной вакцинации индеек с применением указанных составов вакцины-адьюванта. Различные буквы указывают на значимые различия ($p < 0,05$).

На фиг. 12 представлен график, демонстрирующий иммунный ответ IgG на *Bordetella avium* после подкожной вакцинации посредством указанного состава вакцины-адьюванта вылупившихся индеек с последующим введением с питьевой водой той же комбинации вакцины-адьюванта на 14 сутки. Ответ измеряли на 21 сутки. Различные буквы указывают на значимые различия ($p < 0,05$).

Подробное описание

В настоящем документе представлены адьюванты, которые включают хитозан, составы вакцины, содержащие адьюванты, способы создания адьювантов и способы применения адьювантов и составов вакцин. В сущности, в настоящем документе описана новая система адьювантов, которую можно использовать в подобных способах по отношению к другим адьювантам, таким как те, которые применяли для парентеральной (инъекции). Основная молекула включает хитозан, который является деацетилированной формой хитина, экзоскелета многих беспозвоночных животных (креветок, крабов, насекомых и т.д.). Хитозан считают общепризнанным в качестве безопасного (GRAS) соединения и применяют для потери массы, снижения холестерина, бессонницы и улучшения функции почек. Кроме того, хитозан применяют в качестве адьюванта, применяемого с различными мукозными вакцинами (Jabbal-Gill et al., 2012), но хитозаны, описываемые в настоящем документе, являются новыми и функционируют лучше, чем традиционный хитозан, как продемонстрировано в примерах.

Хитозан-белок, поперечно сшитый с применением формальдегида, и хитозан, сшитый с углеводом, представляют уникальный адьювант для пероральной или парентеральной доставки антигенов вакцины. Хитозан применяли в качестве носителя для пероральных и подкожных вакцин. В некоторых составах антиген ковалентно связан с хитозаном посредством обработки формальдегидом, в других систему адьюванта улучшают посредством добавления углевода (маннозы, фукозы и галактозы), связанного с хитозаном, обеспечивая таргетинг рецепторов маннозы на антигенпредставляющих клетках, таким образом усиливая иммунный ответ на хитозан-антигенный комплекс. Как хитозан-белок, поперечно сшитый с применением формальдегида, так и маннозилированный хитозан-белковый комплекс дают надежный иммунный ответ посредством как парентерального, так и перорального (или других мукозных) путей доставки, что является уникальным для инактивированных вакцин.

В одном из аспектов представлена композиция адьюванта, содержащая углевод, сшитый с хитозаном, для образования основания Шиффа. Этот адьювант можно комбинировать с антигеном. Углеводом может быть манноза, маннобиоза, глюкоза, галактоза или фруктоза. Можно использовать другие подходящие углеводы. Не ограничивая в теории, углевод добавляют к хитозану в целях таргетинга хитозана к рецепторам для этих углеводов на поверхности антигенпредставляющих клеток.

Углевод-хитозан, применяемый в настоящем документе, создан, как описано более подробно в примерах ниже. Предлагаемый способ основан на Jayasree (Jayasree et al., 2011) с применением углевода с открытым кольцом с доступной карбонильной группой, которая реагирует с аминогруппой на хитозане для образования основания Шиффа. Основание Шиффа можно стабилизировать посредством восстановления цианоборогидрида натрия (NaCNBH_4). Авторы продемонстрировали, что восстановление не было необходимым для иммунопотенцирования на фиг. 6, на которой восстановленную (Man-C VI) сравнивали с невосстановленной формой (Man-C V2) хитозана. Невосстановленная форма производила лучший IgA ответ, таким образом, можно использовать любую форму. Кроме того, невосстановленная форма маннозилированного хитозана не требует добавления токсичного химиката (NaCNBH_4). В кратком изложении углевод, пригоден манноза (10 мкМ), растворяют в 0,1 М ацетата натрия pH 4,0 при 60°C в течение 2 ч и хитозан (0,2-2%) растворяют в 1,5% уксусной кислоте. Растворенную маннозу и растворенный хитозан затем комбинируют и инкубируют при комнатной температуре, чтобы позволить аминогруппе на хитозане реагировать с карбонилем на сахаре для образования основания Шиффа. Восстановление основания Шиффа не является необходимым для адьюванта, чтобы функционировать, и фактически примеры демонстрируют, что невосстановленное основание Шиффа является лучшим адьювантом (см. фиг. 6). В других вариантах осуществления основание Шиффа может быть восстановленным.

В другом варианте осуществления хитозан и антиген могут быть поперечно сшитыми с применением альдегида. В одном из аспектов композиция содержит от 0,5 до 2% хитозана, поперечно сшитого альдегидом, и антиген. Конечный состав вакцины пригоден содержит от 0,5 до 1,5% хитозана. Адьювант может содержать от 0,5 до 3% хитозана, пригоден от 0,5 до 2% хитозана, пригоден от 0,5 до 1,5% хитозана, пригоден от 0,5 до 1,2% хитозана. Конечная концентрация альдегида в композиции вакцины пригодна менее чем 0,5%. Максимальная концентрация альдегида основана на максимальном уровне оста-

точного альдегида, допустимого в вакцинах. Более высокий уровень альдегида можно использовать для поперечного сшивания хитозана, но конечный состав вакцины пригоден содержит менее чем 0,5% альдегида. В примерах формальдегид применяли в качестве альдегида для поперечного сшивания хитозана.

Также можно использовать другие альдегиды, такие как формалин, глутаральдегид, ацетальдегид, пропиональдегид или бутиральдегид. Альдегиды поперечно сшивают аминокгруппы хитозана с аминокгруппами на других молекулах хитозана или на антигенах.

Также в настоящем документе представлены способы создания состава вакцины, содержащей хитозан, поперечно сшитый альдегидом, и антиген. Способы включают растворение хитозана в растворе уксусной кислоты. В качестве хитозана по этому способу также можно использовать сшитый углеводом хитозан. Пригодно уксусную кислоту применяют при конечной концентрации в воде 1,5%, или 1,5 мл уксусной кислоты, растворенной в 1 л воды. Пригодно количество хитозана составляет от 0,5 до 2%, пригоден от 0,5 до 1,5%. К растворенному хитозану добавляют антиген на соответствующем уровне. Количество и форма антигенов, применяемых в составах вакцины, могут быть определены специалистами в данной области. В заключение антиген и хитозан комбинируют с альдегидом таким образом, что конечная концентрация альдегида составляет от 0,02 до 0,5%. Альдегид способен химически перекрестно сшивать хитозан с другими молекулами хитозана и хитозан с антигеном, трис-HCl можно добавлять, чтобы погасить свободные альдегиды, трис можно добавлять до конечной концентрации 0,5 г/л.

Любую композицию адьюванта, описываемую в настоящем документе, можно комбинировать с усиливающими молекулами, включая в качестве неограничивающих примеров сапонин, толл-подобные рецепторы, субъединицу В бактериального токсина, бактериальные токсины, столбнячный токсин, CpG мотивы, липосомы или монофосфоридный липид А. Пригодные усиливающие молекулы действуют в качестве дополнительных стимуляторов иммунной системы и усиливают иммунный ответ, вызванный после введения состава вакцины индивидууму. Эти составы вакцин, представленные в настоящем документе, содержат адьюванты на основе хитозана, описываемые в настоящем документе, и антигены. Антигены могут быть любыми антигенами, доступными специалистам в данной области. Антигены, такие как белки, синтетические пептиды, пептиды, конъюгированные с носителями, или микробы можно использовать в вакцинах. Микробы включают бактерии, дрожжи, паразитов, грибы, вирусы, гельминтов или другие организмы, вызывающие заболевание. Микробы включают живые, мертвые, аттенуированные, рекомбинантные или инактивированные организмы. Примеры микробов в качестве неограничивающих примеров включают *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bordetella*, *Clostridium*, *Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Influenza* и *Eimeria*. Микробы могут быть инактивированными или убитыми перед применением лечения теплом, метанолом или другими фиксаторами, такими как формальдегид или другие альдегиды. Альдегиды могут быть погашены последующим добавлением трис-HCl до конечной концентрации 0,5 г/л. Подходящие антигены также могут включать пептидные антигены, такие как *Influenza M2e*, гемагглютинин, нейраминидаза или ядерные белки; *Eimeria* TRAP или MPP; сиалидаза *Clostridium*, *Sag A*, альфа-токсин, *NetB* токсин или белок транспорта железа. Примеры других пептидных антигенов можно найти, по меньшей мере, в заявках U.S. № 12/441855; 12/740631; 12/740608; 13/574504 и 13/702827, все из которых включены в настоящий документ полностью в качестве ссылки. Адьюванты на основе хитозана можно использовать для увеличения иммунного ответа на вакцины, уже доступные или недавно разработанные вакцины или аутогенные вакцины.

Существует два значительных улучшения вакцинации, связанные с этой работой. Первое, когда модифицированный хитозан вводят с инактивированной вакциной посредством парентерального пути введения, авторы видят иммунный ответ, который является превосходящим иммунный ответ, наблюдаемый при других адьювантах, таких как алюминиевые квасцы, с минимальной реакцией в месте инъекции. Многие адьюванты вызывают воспалительный ответ в месте инъекции или отложенную абсорбцию из места инъекции или и то, и другое. Одной из обратных сторон традиционных адьювантов является то, что они часто вызывают некоторую реакцию, болезненность, и в некоторых случаях они вызывают стойкие поражения, которые вызывают понижение качества или выстрижку убойных животных при забое. Модифицированный хитозан может уменьшить эти основания для беспокойства, связанные с другими адьювантами вакцин. Его дешево производить и легко создавать в виде коммерческих вакцин. Кроме того, возникают надежные иммунные ответы, когда убитые антигены совместно присутствуют в пероральном виде либо посредством принудительного кормления, либо посредством включения в питьевую воду. Это действительно является важным для домашних животных, особенно птицы, поскольку обработка парентеральной инъекции является очень трудоемким процессом и вызывает стресс у птиц или других животных. Применять инактивированные вакцины у птиц, за исключением инкубирования, как правило, является слишком дорогостоящим ввиду затрат при введении. Способность доставить вакцину перорально меняет подход, с помощью которого можно вакцинировать животных. Существует два основных преимущества живых вакцин (называемых модифицированными живыми или аттенуированными вакцинами) для массового введения. Первое, можно в массовом порядке применять питьевую воду или спрей. Второе, эти живые вакцины также вырабатывают иммунитет в локальной слизистой оболочке (дыхательные пути и кишечный тракт, где инфицируется большинство патогенов). Как таковые, или убитые, или живые вакцины могут защитить от заболевания, но живые вакцины исторически являются

более эффективными при предотвращении настоящей инфекции и, таким образом, являются предпочтительными.

Существует огромное преимущество убитых вакцин в том, что их можно получать быстро с очень низким риском вызвать инфекцию и заболевание, и они не могут генетически повернуть назад в вызывающий заболевание родительский тип, и по этим причинам они обладают гораздо меньшими регуляторными проблемами. Кроме того, существует большое и постоянно растущее число редких заболеваний, которые не являются достаточно распространенными для группы вакцин для развития нормированной/лицензированной вакцины, и в законе US (и многих других стран) существуют оговорки для получения "аутогенных" вакцин, специально созданных из патогена, представляющего интерес, убитых и применяемых на группах (или на животных, или на человеческих популяциях). В развивающихся странах возникают редкие заболевания, которые требуют вакцин, которые не являются доступными или которые технически невозможно производить в данной местности или достаточно быстро, чтобы справиться со вспышкой заболевания. Адьюванты, представленные в настоящем документе, являются доступными и технологически открытыми для производства. Их можно легко комбинировать с убитым или инактивированным микробом для производства вакцины.

Некоторые потенциальные применения для технологии, описываемые в настоящем документе, являются доступными. Системный ответ на убитые вакцины можно улучшить посредством включения измененного хитозана в качестве адьюванта для инъекции. Авторы могут предотвратить некоторые заболевания посредством перорального введения убитых вакцин с применением этой адьювантной платформы. Эта адьювантная платформа, введенная перорально, может быть таргетирована для стимуляции системного и/или мукозного ответов, означая, что она обладает многими преимуществами живых вакцин, но лишена проблем живых вакцин, описанных выше.

Адьюванты и составы вакцин, описываемые в настоящем документе, могут быть скомбинированы с другими фармацевтически приемлемыми носителями. Фармацевтически приемлемым носителем является любой носитель, пригодный для введения *in vivo*. Примеры фармацевтически приемлемых носителей, пригодных для использования в композициях в качестве неограничивающих примеров, включают воду, буферные растворы, растворы глюкозы, жидкости на масляной основе или бактериальные культуральные жидкости. Дополнительные компоненты композиций могут пригодны включать, например, такие эксципиенты, как стабилизаторы, консерванты, разбавители, эмульгаторы и смазочные средства. Примеры фармацевтически приемлемых носителей или разбавителей включают стабилизаторы, такие как углеводы (например, сорбит, маннит, крахмал, сахароза, глюкоза, декстран), белки, такие как альбумин или казеин, белок-содержащие средства, такие как бычья сыворотка или снятое молоко и буферы (например, фосфатный буфер). Особенно, когда такие стабилизаторы добавляют к композиции, композиция является подходящей для лиофилизации или распылительной сушки. Композиция также может быть эмульсифицированной.

Композиции, описываемые в настоящем документе, также можно комбинировать с другими фармацевтическими композициями, и эти композиции можно вводить в любом порядке, в одно и то же время или в качестве части цельной композиции. Две композиции можно вводить таким образом, что одну вводят перед другой с разницей во времени введения в 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 ч, 1, 2, 4, 7 суток, 2, 4 недели или более.

Эффективное количество или терапевтически эффективное количество составов вакцин, как применяются в настоящем документе, означает количество композиций, которое при введении индивидууму для повышения иммунного ответа индивидуума на таргетное заболевание способно увеличить иммунный ответ, такой как клеточно-опосредованный или антитело-опосредованный иммунный ответ для сокращения заболеваемости или смертности, связанных с инфекцией или проявлением таргетного заболевания. Пригодно, иммунный ответ повышают до такого уровня, что введение является достаточным, чтобы сделать эффективным лечение или заблокировать заболевание, связанное с заболеваемостью или смертностью. Терапевтически эффективное количество будет варьировать в зависимости от вакцины, состава или композиции, заболевания и его тяжести, возраста, массы, физического состояния и чувствительности к лечению индивидуума. Например, уровень антитела, произведенный в ответ на вакцинацию, можно увеличить в два раза, три раза, четыре раза или более посредством включения адьюванта, описываемого в настоящем документе, по сравнению с введением того же антигена без адьюванта или с алюминием в качестве адьюванта. Увеличенный иммунный ответ может быть IgA ответом или IgG ответом. Адьювант также может вести к снижению заболеваемости или смертности, связанных с последующей инфекцией. Как продемонстрировано в примерах, применение адьювантов, описываемых в настоящем документе, в комбинации с антигеном может привести к сокращению уровня последующей инфекции или тяжести последующей инфекции с применением микроба, на который антиген вызывает иммунный ответ, по сравнению с вакцинацией с применением антигена в отдельности или вакцинации с применением антигена и отдельно адьюванта. Тяжесть инфекции можно измерять способностью микроорганизма внедряться в ткани за пределами места введения, размножаться и/или персистировать внутри организма в течение длительного времени или вызывать заболеваемость или смертность. Вакцинированные животные могут быть затем инфицированы посредством патогена. В таких случаях рост патогена в индиви-

дууме после стимуляции антигеном уменьшается по меньшей мере $1 \log_{10}$, $2 \log_{10}$ или даже $3 \log_{10}$ в индивидуумах, которым ввели вакцину, по сравнению с индивидуумами, которым ввели контроль.

Композиции, описываемые в настоящем документе, можно вводить посредством любых способов, известных специалистам в данной области, включая в качестве неограничивающих примеров пероральный, интраназальный, интраперитонеальный, парентеральный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, назофарингеальный или трансмукозальное всасывание. Таким образом, соединения можно формулировать в качестве принимаемого внутрь, распыляемого или инъектируемого состава. Например, пероральное введение может повлечь добавление в питьевую воду, распыление на пищу, распыление на животных (таких как курицы или индейки, которые проглотят эту вакцину в виде спрея, когда будут чистить свои перья). Индивидуумы могут быть млекопитающими, включая людей, коров, свиней, кошек, собак или других домашних животных, или не млекопитающих, таких как птица, т.е. курицы или индейки.

Следует понимать, что специфическая дозировка введения и режим введения (т.е. первичная вакцинация и стимуляция) в любом данном случае будет приспособлена к вводимому составу, заболеванию, против которого направлено лечение, риску воздействия инфекции, состоянию индивидуума и другим соответствующим медицинским факторам, которые могут модифицировать ответ индивидуума или целесообразность применения состава индивидуумом. Например, специфическая дозировка для индивидуума зависит от типа индивидуума, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, диеты, распорядка и способа введения, уровня выведения, лекарственных средств, применяемых в комбинации, и тяжести конкретного нарушения, на которое направлена вакцина. Начальную вакцинацию и бустер-дозу можно вводить различными способами. Например, начальная вакцинация посредством подкожного пути введения может быть осуществлена посредством включения комплекса адъювант-антиген в питьевую воду или пищу. Процент хитозана в составах вакцины, как правило, составляет от 0,2 до 2%, пригоден 0,5-1,5%. Общее количество вводимого хитозана может составлять от менее чем 1 до 100 мг на вакцинацию, пригоден 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 50, 75 или 100 мг хитозана. В примерах применяли 2-5 мг хитозана на дозу. При комбинировании с микробным антигеном может быть включено от 1×10^6 до 1×10^9 микробов на дозу. В примерах применяли от 1×10^7 до 1×10^8 микробов на дозу. Антиген может быть включен в количестве от 10 мкг до 10 мг на дозу. В примерах применяли 100 мкг на дозу.

Следующие примеры призваны быть иллюстрирующими и не ограничивающими объем изобретения или приложенной формулы изобретения. Все цитируемые в настоящем документе ссылки включены в качестве ссылки полностью.

Примеры

Пример I. Иммунный ответ на β -галактозидазу после первичной вакцинации и введения бустер-дозы.

В первом эксперименте для тестирования хитозан-белка, поперечно сшитого с формальдегидной вакциной в качестве модельного белка, применяли классический белок β -галактозидазу (β -Gal). Индюшат вакцинировали посредством β -Gal, как описано в таблице, с шестью лечебными группами и одним контролем. Индюшат вакцинировали с применением физиологического раствора или β -Gal 100 мкг (0,25 мл) тоже в физиологическом растворе, 15% алюминиевых квасцов, 1% хитозана, поперечно сшитого (3 группы) с применением формальдегида (форм) или 1,5% хитозана, не поперечно сшитого с применением формальдегида, посредством парентеральной подкожной (sq) инъекции в день вылупления. Всем группам вводили бустер-дозу с применением той же формулы sq на 14 и 25 сутки, за исключением двух групп 1% хитозана, одной бустер-дозы оба дня с применением 1% хитозан- β -Gal посредством перорального принудительного кормления и одной бустер-дозы посредством спрея с 1% хитозаном- β -Gal (2 мл).

Иммунный ответ на β -галактозидазу определяли с применением сыворотки в ELISA для β -галактозидазы, и результаты представлены на фиг. 1. Об уровнях иммунного ответа сообщали в качестве образца к положительным контрольным соотношениям оптической плотности в непрямой ELISA. Более высокие соотношения S/P указывают на более высокие титры антител к β -галактозидазе. Существовала очень небольшая перекрестная реактивность в ELISA с применением сыворотки из индеек, вакцинированных с применением физиологического раствора, и только умеренного количественного повышения при вакцинации посредством β -Gal в физиологическом растворе. Общеприменяемый коммерческий адъювант, применяемый в настоящее время, является 15% алюминиевыми квасцами, и при их применении наблюдался хороший иммунный ответ. Применяя иммуностимулированную хитозаном и поперечно сшитую формальдегидом вакцинную систему (помеченную как 1% хитозан), наблюдали значительное повышение иммунного ответа на модельный антиген, β -Gal. С применением хитозана в отдельности даже при более высокой концентрации в 1,5% наблюдали значительно более низкий иммунный ответ. Кроме того, когда антиген был введен в составе бустер-дозы с адъювантом, обработанным 1% хитозан-формальдегидом, посредством спрея или перорально, наблюдали ответ, сравнимый со стандартным адъювантом, 15% алюминиевыми квасцами, введенными подкожно.

Лечебные группы

Группа	Иммуноген	Первичный день вылупления (100 мкг/ 0,25 мл)	Вторичная иммунизация на 14 день после вылупления
Физиологический раствор	Нет	SQ	SQ (100 мкг/0,5 мл)
βG в физиологическом растворе	β- галактозидаза	SQ	SQ (100 мкг/0,5 мл)
15% алюминиевые квасцы	β- галактозидаза	SQ	SQ (100 мкг/0,5 мл)
1% хитозан	β- галактозидаза	SQ	SQ (100 мкг/0,5 мл)
1,5% хитозан без Форм	β- галактозидаза	SQ	SQ (100 мкг/0,5 мл)
1% хитозан 2й пероральный	β- галактозидаза	SQ	Пероральное принудительное кормление (100 мкг/0,5 мл)
1% хитозан 2й спрей	β- галактозидаза	SQ	Спрей (100 мкг/мл) Атомизированный спрей 50 мл на 20 птиц в комнате 20 кв. фут

Пример II. Иммунный ответ на *Clostridium* после вакцинации с различными адъювантами.

Эксперимент, подобный тому, который описан выше, проводили посредством введения 4×10^8 КОЕ/мл *Clostridium septicum* бактерина (CS) в любом поперечно сшитом с применением алюминиевых квасцов или формалина хитозане таким образом, что конечная доза на птицу составляет 1×10^8 КОЕ/птицу на индюшат в день вылупления подкожно (в 0,25 мл) или в отдельности, или в комбинации с 12% алюминиевых квасцов или 0,5% поперечно сшитого формалином хитозана. Всем птицам была введена бустер-доза на 14 сутки той же вакциной тем же путем. Уровни окончательного иммунного ответа измеряли посредством непрямого анализа ELISA и сообщали в виде соотношений оптической плотности положительного контроля (S/P). Более высокие соотношения S/P являются показателем более высоких антител к CS.

У птиц, получавших вакцину без адъюванта, результатом стал детектируемый ELISA ответ антител с соотношением S/P 0,16, как показано на фиг. 2. Этот уровень антител не отличался статистически от уровня CS, с добавлением адъюванта на основе алюминиевых квасцов. После введения одной бустер-дозы (через 14 суток после первичной вакцинации) индюшек вакцинировали посредством CS бактерина с добавлением адъюванта с 0,5% поперечно сшитого формалином хитозана, и они продемонстрировали уровни IgG, которые дали в результате соотношения S/P, приблизительно удвоенные по сравнению с CS бактерином без адъюванта, 0,4 и 0,16 соответственно. CS бактерии с адъювантом на основе гидроксида алюминия индуцировал уровни IgG, которые были приблизительно на 30% ниже, чем уровни IgG, индуцированные посредством CS с применением хитозана по сравнению с соотношениями S/P, 0,27 и 0,4 соответственно (см. фиг. 2). Важно, что повреждения в месте инъекции являются менее выраженными на 72 ч (или позже) благодаря введению хитозана, тогда как алюминиевые квасцы всегда производили местное воспаление и гранулемы, часто приводящие к инкапсулированной рубцовой ткани.

Пример III. Эксперименты по вакцинации от птичьего гриппа.

Птичий грипп (AI) является значительной проблемой общественного здравоохранения и серьезной экономической угрозой для коммерческого птицеводства во всем мире. Предыдущие данные заявителей позволяют предположить, что *Salmonella*-векторные вакцины, экспрессирующие M2e совместно с CD154, являются эффективными против AI. Были протестированы новые конструкты, применяющие *Bacillus subtilis* в качестве вектора и эпитопы M2e с иммуностимулирующими молекулами. Уровни M2e

специфической сыворотки IgG и мукозального антитела IgA определяли посредством ELISA на 11, 15 и 21 сутки после вылупления. В день вылупления индюшат вакцинировали либо посредством перорального принудительного кормления, либо посредством подкожной инъекции с применением либо *Bacillus* дикого типа (BSBB), либо *Bacillus* векторной вакцины от птичьего гриппа (BSAI) в качестве живой вакцины, BSAI после инактивации формалином, BSAI после инактивации формалином, лиофилизации и реконструкции с применением физиологического раствора или BSAI после инактивации формалином и поперечно сшитый с 1% хитозана. Каждую вакцину вводили в концентрации 10^6 КОЕ/цыпленка в 0,25 мл или 0,25 мл физиологического раствора. На 10 сутки только что вылупившимся цыплятам в двух группах (BSAI живые, BSAI инактивированные и лиофилизированные) вводили бустер-дозу того же препарата, который они получали на 0 сутки, и все другие группы не получали вторую дозу вакцины.

Образцы сыворотки IgG и мукозального IgA от птиц во всех группах на 11, 15 и 21 сутки получали после вылупления и применяли ELISA захват антител. Планшеты покрывали M2e конъюгированным с BSA (10 мкг/мл), блокировали, инкубировали с сывороткой от каждой лечебной группы, растворенной в концентрации 1:50 в 2% FBS/PBS, с последующей инкубацией с HRP-конъюгированным вторичным антителом, растворенным в концентрации 1:7500, и развивали с применением TMB субстрата. Результаты представлены как средние соотношения S/P (средний образец средний отрицательный контроль)/(средний положительный контроль - средний отрицательный контроль) $\pm$ SEM (n=20).

При сравнении с *Bacillus backbone control* (BSBB) наблюдали значительные повышения M2e специфических ответов антител IgG в каждой вакцинированной группе в каждый тестируемый момент времени. Однако не наблюдали никаких различий между различными моментами времени между какими-либо шестью вакцинированными группами в увеличенном ответе IgG антител (см. фиг. 3A). Реальная разница в иммунном ответе является очевидной, когда смотришь на специфический ответ IgA антитела (см. фиг. 3B). BSAI+1% хитозана продемонстрировал заметное повышение в специфическом ответе IgA при сравнении с контролем или дополнительными пятью лечебными группами, получившими вакцинацию во все три протестированных момента времени.

Суммируя сказанное, в экспериментах с применением поперечно сшитого хитозана авторы продемонстрировали, что эта модификация хитозана является лучшим адъювантом, чем гидроксид алюминия, введенный как парентеральным, так и пероральным способами (фиг. 1 и 2). Было продемонстрировано, что хитозан, обработанный формальдегидом в качестве кросс-линкера, был более эффективным, чем хитозан без формальдегида (фиг. 1) При пероральном применении хитозан повышал продукцию IgA (фиг. 3B) предпочтительно над IgG (фиг. 3A).

Пример IV. Усиление адъюванта на основе хитозана.

В дальнейшем адъювант усиливали посредством серии экспериментов, спланированных, чтобы улучшить адъювант на основе хитозана посредством добавления усиливающих молекул или альтернативных стратегий доставки. Иммуностимулирующие соединения могут потенциально улучшить ответы при применении с адъювантами, и ранее некоторые из них уже были исследованы; см. обзоры (Guy, 2007; Mutwiri et al., 2011). Потенциальные адъюванты включают сапонины, бактериальные компоненты, соединения, которые взаимодействуют с врожденными иммунными системами, такими как толл-подобные рецепторы, нуклеиновые кислоты, такие как CpG мотив, вирусы, эмульсии, включая липосомы, или комбинацию любых этих компонентов. Некоторые из более многообещающих иммуностимулирующих молекул, которые взаимодействуют с врожденной иммунной системой, являются столбнячным токсином (TT), В субъединицей термолабильного энтеротоксина (LTB) и В субъединицей холерного токсина (СТВ). Другие соединения, которые, как было показано, усиливали иммунную систему, эмпирически через присущие химические свойства включают сапонин и монофосфорил липид А (MPLA). Иммунную функцию можно усилить с применением маннозы или других сахаров для таргетинга связи с рецепторами макрофага.

Комбинации различных адъювантов могут действовать синергетически, как, например, с IL-12 или другими цитокинами для стимуляции иммунного ответа.

Первый эксперимент для улучшения адъюванта по сравнению с адъювантом на основе хитозана поперечно сшитого формальдегидом, который состоит из интересующего антигена, поперечно сшитого 0,5% хитозаном с применением формальдегида для получения данных, представленных выше на фиг. 1-3. Эту адъювантную систему затем применяли в качестве контроля или исходного уровня для отбора лучших комбинаций выбранных иммунных усиливающих молекул. Тестовым иммуногеном был *Salmonella enteritidis* (SE) бактерии, выросший до 10^8 КОЕ/мл и инактивированный формальдегидом. Для определения того, может ли адъювант на основе поперечно сшитого хитозана быть улучшен в дальнейшем, тестовый иммуноген (*Salmonella* бактерии с хитозаном составлял 4×10^7 КОЕ/мл с конечной дозой 1×10^7 КОЕ на птицу) смешивали в соотношении 2:1 с поперечно сшитым хитозаном в отдельности с усиленным с применением столбнячного токсина (ХТ), В субъединицы термолабильного энтеротоксина (LIV) или маннозилированного хитозана и введенного либо в питьевую воду, либо в пищу. Результаты представлены на фиг. 4.

TT может быть потенциальной иммунной усиливающей молекулой, и ее применяли экстенсивно в

развитии вакцин. Было показано, что термолabileный энтеротоксин из *E. Coli* является мощной иммуностимулирующей молекулой, но является очень токсичным и, таким образом, не годным в качестве адьюванта. Термолabileный энтеротоксин состоит из двух субъединиц, центрального ядра LTA и пяти субъединиц LTB (da Hora et al., 2011). Субъединица LTB сохраняет иммунные свойства адьюванта и все же является нетоксичной. Таким образом, она является безопасным потенциальным компонентом адьюванта. Манноза и некоторые другие углеводы (такие как галактоза и фукоза) являются лигандами для рецепторов, которые активируют макрофаги. Маннозилированный хитозан получали посредством способа, сходного с описанным ранее Yalpani и Hall (1980 и 1985) и Jayasree et al (2011) без добавления цинка. В кратком изложении, 2 мол. экв. маннозы в одном объеме 0,1 М ацетата натрия нагревали при 60°C в течение 2 ч. К раствору затем добавляли два объема 1 мол. экв. 2% хитозана в 0,15% уксусной кислоты и оставляли для реакции в течение 10 мин при комнатной температуре для получения 1,5% маннозилированного хитозана. Затем к 1,5% маннозилированному хитозану добавляли SE бактерии в соотношении 2:1. Образовавшиеся основания Шиффа затем убирали посредством натрий цианборгидрата (NaCNBH_4).

Вдобавок к иммунопотенцирующим молекулам были также исследованы различные системы доставки, как указано выше. Типичная система доставки питьевой воды, применяемая в промышленном птицеводстве, растворяет лекарственное средство или химическую одну часть к 128 частям воды. Оригинальную рецептуру хитозана, применяемую на фиг. 1-3, разбавляли 1:128 в питьевой воде в качестве потенциальной системы доставки. Последняя тестовая группа была 0,5% хитозаном, поперечно сшитым с формальдегидом с применением SE бактериина (оригинальная рецептура с хитозаном), инкапсулирована посредством добавления по каплям к триполифосфату (TPP), затем осушали и размалывали в порошок для добавления к еде на уровне 0,5% (вес./вес.).

Бройлерным цыплятам в день вылупления давали 0,25 мл указанных препаратов подкожно, как обозначено выше. Эти группы кормили так же, как и группу, получавшую только хитозан. Цыплятам была введена бустер-доза посредством перорального принудительного кормления на 12 сутки от рождения, за исключением питьевой воды и TPP групп, которым была введена бустер-доза в воде в соотношении 1:128 или в пище в концентрации 0,5% (вес./вес.) в течение 8 ч соответственно. Уровни антител на 22 сутки в сыворотке (IgG) и илеальный мукозальный (IgA) определяли с применением конкурентного набора ELISA (IDEXX). Сниженные уровни оптической плотности или образец для контрольных соотношений указывают на более высокие уровни антител, которые распознают планшеты, покрытые SE флагеллином.

Как отмечено на фиг. 1 и 2 выше, адьювант хитозана превосходил алюминиевые квасцы при получении надежного иммунного ответа. В настоящем документе каждый из адьювантов на основе хитозана был способен получать надежный ответ на SE бактерии со значительно более высокими уровнями IgG и IgA по сравнению с хитозаном в отдельности, введенным подкожно (фиг. 4 и 5 соответственно). Группы ТТ и сухого порошка TPP имели значительно более высокий иммунный ответ, чем sq, получавшие sq бустер-дозу с адьювантом на основе хитозана (фиг. 4 и 5). Остальные три группы, хитозан с LTB, маннозилированный хитозан и бустер-доза на основе хитозана в питьевой воде были постоянно выше при получении антител по сравнению с хитозаном в отдельности, введенным подкожно (фиг. 4 и 5).

В последующем ряде экспериментов три лучшие группы из предыдущих экспериментов (LTB, бустер-доза на основе хитозана в DW и сниженный маннозилированный хитозан) повторили наряду с отрицательным контролем (физиологический раствор) и эталонным контролем 0,5% хитозана поперечно сшитого формальдегидом, введенного sq для первичной вакцинации и бустер-дозы, что, как ранее было показано, превосходило алюминиевые квасцы. В этом эксперименте авторы добавили три новые лечебные группы с применением эталонного контроля 0,5% хитозана поперечно сшитого формальдегидом иммунопотенцированного В субъединицей холерного токсина (CTB), липида А из *Salmonella* (MPLA) или сапонином. Также в этом эксперименте добавили другую лечебную группу, которая была подобной лечебной группе, получавшей маннозилированный хитозан, который, как было показано, являлся превосходным адьювантом в предыдущем эксперименте (маннозилированный хитозан версия 1, Man-C VI), но эта группа не была уменьшена с применением NaCNBH_4 (Man-C V2).

В конкурентном ELISA с SE флагеллином было опять продемонстрировано, что птицы, вакцинированные подкожно с применением 0,5% хитозана (C) как для первичной вакцинации, так и для бустер-дозы, имели более высокие уровни иммуноглобулина в сыворотке (фиг. 6A). Птицы, вакцинированные 0,5% хитозана с CTB (C+CTB), Man-C V2 и хитозана с сапонином (C+сапонин), демонстрировали лучший ответ IgG (фиг. 6A). Man-C V2 демонстрировали количественно лучший ответ IgA (фиг. 6B). Все эти три лечебные группы значительно отличались от эталонной группы (0,5% хитозана, инъекционно-го подкожно как для первичной вакцинации, так и для бустер-дозы) (фиг. 6).

Кроме того, птицам вводили антиген на 19 сутки с применением живой *Salmonella* в концентрации 5×10^7 КОЕ/цыпленок.

Через три дня после введения антигена птиц культивировали для *Salmonella* в скоплениях лимфоидной ткани в кишечнике (CT) и печени/селезенке (L/S). Хитозан с CTB, обе версии маннозилированно-

го хитозана, хитозан в питьевой воде с бустер-дозой и хитозан плюс сапонин значительно снижали *Salmonella* до уровней ниже детектируемых в печени/селезенке (L/S) при сравнении с отрицательным (вакцинацией физиологическим раствором) контролем (фиг. 7; $p < 0,05$). В кишечнике (СТ) уровни *Salmonella* были значительно снижены с применением одной из двух версий маннозилированного хитозана и в группе с бустер-дозой с 0,5% хитозана, разведенного 1:128 в питьевой воде. Значительное снижение в группах, получавших маннозилированный хитозан, указывает на то, что прямой таргетинг макрофага с лигандом для рецептора маннозы увеличивает эффективность адьюванта на основе хитозана. Кроме того, очень важным является то, что неуменьшенный состав основания Шиффа маннозилированного хитозана был лишь так же эффективен, как NaCNBH_4 ; сниженный маннозилированный хитозан, который не обладал дополнением потенциально вредного химиката. Другим важным сюрпризом было то, что 0,5% хитозан, растворенный в питьевой воде в соотношении 1:128, который применяли для бустер-инъекции, демонстрировал лучшие результаты при уменьшении колонизации *Salmonella* по сравнению с только парентеральной вакцинацией (фиг. 7).

Пример V. Путь введения при вакцинации.

Были исследованы лучший путь введения и комбинация адьюванта для вакцинации. Только что вылупившимся цыплятам вводили 0,25 мл или физиологического раствора, или вакцины с соответствующей смесью адьюванта, как указано на фиг. 8. Сравнимые адьюванты включают хитозан поперечно сшитый формальдегидом, сниженно маннозилированный хитозан (Man C VI), не сниженно маннозилированный хитозан (Man C V2), и каждый адьювант объединяли с антигеном и вводили при вылуплении или подкожно, или с питьевой водой. Птицы получали бустер-инъекцию со вторым введением той же комбинации адьюванта-антигена или подкожно, или с питьевой водой, или посредством перорального принудительного кормления. Группы, которые вакцинировали посредством питьевой воды (DW), растворяли 1:128 в воде. Этим получившим бустер-дозу посредством перорального принудительного кормления давали 0,25 мл. Мукозальный IgA ответ измеряли посредством конкурентного анализа ELISA с SE флагеллином (IDEXX), как описано выше. Хотя последние пять лечебных групп на фиг. 8 значимо не отличались, численно самая нижняя группа была маннозилированным хитозаном V2, доставленным sq во время первичной вакцинации и 1:128 разведения в DW для бустер-инъекции. Эта группа обладала значительно более высокими уровнями IgA в подвздошной кишке по сравнению с 0,5% хитозана посредством sq первичной вакцинацией и/или sq, или DW бустер-инъекции. Никаких значимых отличий не наблюдали между сниженными и не сниженными формами маннозилированного хитозана или когда давали бустер-дозу через питьевую воду или посредством перорального принудительного кормления.

Пример VI. Сравнение с адьювантом на основе минерального масла.

Маннозилированный хитозан затем сравнивали и комбинировали с коммерчески доступным адьювантом на основе минерального масла. *Salmonella enteritidis* (SE) бактерии, выросший до 10^8 КОЕ/мл и инактивированный посредством формальдегида, применяли в качестве антигена. *Salmonella* бактерии смешивали с хитозаном, маннозилированным хитозаном, адьювантом на основе минерального масла, комбинацией хитозана и адьюванта на основе минерального масла или PBS на уровне 4×10^7 КОЕ/мл с конечной дозой 1×10^7 КОЕ на птицу в соотношении 2:1. Только что вылупившиеся бройлерные цыплята получали 0,25 мл указанных препаратов подкожно, как было обозначено выше. Цыплятам давали бустер-дозу посредством перорального принудительного кормления в возрасте 12 суток. Уровни антител на 22 сутки в сыворотке (IgG) и илеальном мукозальном (IgA) определяли посредством набора ELISA (IDEXX), и результаты представлены на фиг. 9 и 10 соответственно.

Сниженные уровни оптической плотности образца контрольных соотношений указывают на более высокие уровни антител, которые распознают плашки, покрытые SE флагеллином. Вакцинация маннозилированным хитозаном и протокол введения бустер-дозы производили значительные увеличения уровней IgG и IgA по сравнению с каждой из других групп.

Пример VII. IgG ответ после однократного введения.

Для исследования IgG иммунного ответа после однократной парентеральной вакцинации только что вылупившихся цыплят вакцинировали подкожно посредством $2,5 \times 10^8$ КОЕ/птенец *Bordetella avium* бактерином, комбинированным с физиологическим раствором, нормальным хитозаном или маннозилированным хитозаном. Сыворотку собирали на 14 сутки и *Bordetella* специфический IgG измеряли посредством ELISA. Результаты представлены на фиг. 11 и демонстрируют образец положительных контрольных соотношений оптической плотности для указанных видов лечения. Более высокие уровни оптической плотности являются показателем увеличенного специфического IgG. Маннозилированный хитозан, комбинированный с антигеном *Bordetella*, произвел самый высокий уровень IgG.

Пример VIII. IgG ответ после введения бустер-дозы в питьевой воде.

Для исследования иммунного ответа IgG после введения *Bordetella avium* бактерии подкожно с последующей бустер-дозой в питьевой воде на 14 сутки только что вылупившихся цыплят вакцинировали подкожно $2,5 \times 10^8$ КОЕ/птенец *Bordetella avium* бактерина в комбинации с физиологическим раствором, нормальным хитозаном или маннозилированным хитозаном. На 14 сутки $7,8 \times 10^6$ КОЕ/мл *Bordetella avium* бактерии включали в питьевую воду в качестве бустер-дозы для вакцинации. На 21 сутки, в течение

ние 7 суток собирали сыворотку после введения бустер-дозы и специфический ответ IgG измеряли посредством ELISA. Результаты показаны на фиг. 12 и представляют образец соотношений положительно-го контроля оптической плотности для указанных лечений. Более высокие уровни оптической плотности являются показателем повышенного специфического IgG. Маннозилированный хитозан, комбинированный с антигеном Bordetella, произвел заметно более высокие уровни IgG по сравнению с контролем или не модифицированным хитозаном.

Способы получения адъюванта.

Получение белка хитозана, поперечно сшитого с формальдегидной вакциной: конечный продукт хитозана без маннозы может варьировать от минимальной конечной концентрации 0,5% хитозана до максимальной конечной концентрации 2% хитозана в составе вакцины. Хитозан растворяют в растворе, содержащем 15 мл ледяной уксусной кислоты на 1 л деионизированной воды в соответствующей концентрации (1,5% уксусной кислоты в воде). Как типично для бульонных культур, два объема культуры смешивают с одним объемом 1,5% хитозана (0,5% хитозана в конечном составе вакцины). Другие антигены разбавляют в настолько минимальном количестве, как это возможно, в конечной концентрации до 1,5% хитозана. К смеси хитозана, растворенного с антигеном, добавляют формальдегид таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 0,2% формальдегида или 0,008 М формальдегида. В примерах выше применяют 37% раствор формальдегида. К конечной концентрации 0,5 г/л добавляют трис-HCl.

Получение маннозилированного хитозана: два молярных эквивалента маннозы в одном объеме 0,1 М ацетата натрия, pH 4,0 нагревали при 60°C в течение 2 ч. Раствор затем добавляли к двум объемам 1 мол. экв. 2% хитозана в 0,15% уксусной кислоты и оставляли реагировать в течение 10 мин при комнатной температуре для получения 1,5% раствора маннозилированного хитозана. Его затем можно смешать с бульонными культурами таким образом, что два объема культуры смешивают с одним объемом 1,5% маннозилированного хитозана. Концентрированные антигены можно растворять как можно в более минимальном количестве, как возможно или как желательно, трис-HCl можно добавлять до конечной концентрации 0,5 г/л.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение адъювантной композиции для усиления иммунного ответа у субъекта, где адъювантная композиция содержит углевод, связанный с хитозаном для образования основания Шиффа, и где углевод представляет собой маннозу с открытым кольцом, где композиция составлена для перорального введения или введения в слизистые оболочки.

2. Применение по п.1, где основание Шиффа не восстановлено.

3. Применение по п.1, где основание Шиффа восстановлено.

4. Применение по любому из пп.1-3, где композиция дополнительно содержит усиливающую молекулу.

5. Применение по п.4, где усиливающая молекула представляет собой сапонин, толл-подобные рецепторы, субъединицу В бактериального токсина, бактериальные токсины, мотивы CpG, липосомы или монофосфоридный липид А.

6. Применение по п.4, где усиливающая молекула представляет собой столбнячный токсин, субъединицу В холерного токсина, термолабильную субъединицу В энтеротоксина или триполифосфат.

7. Применение вакцинного состава для усиления иммунного ответа у субъекта, где вакцинный состав содержит композицию по любому из пп.1-6 и антиген.

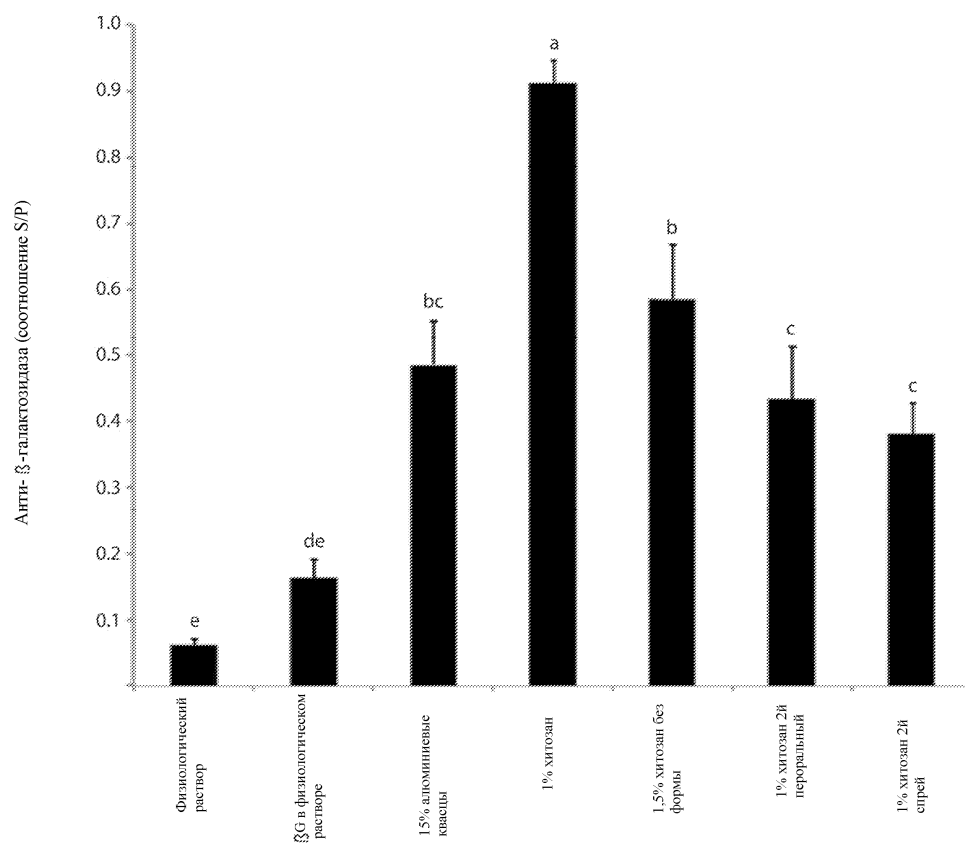
8. Применение по п.7, где антиген представляет собой белок.

9. Применение по п.7, где антиген представляет собой микробный антиген.

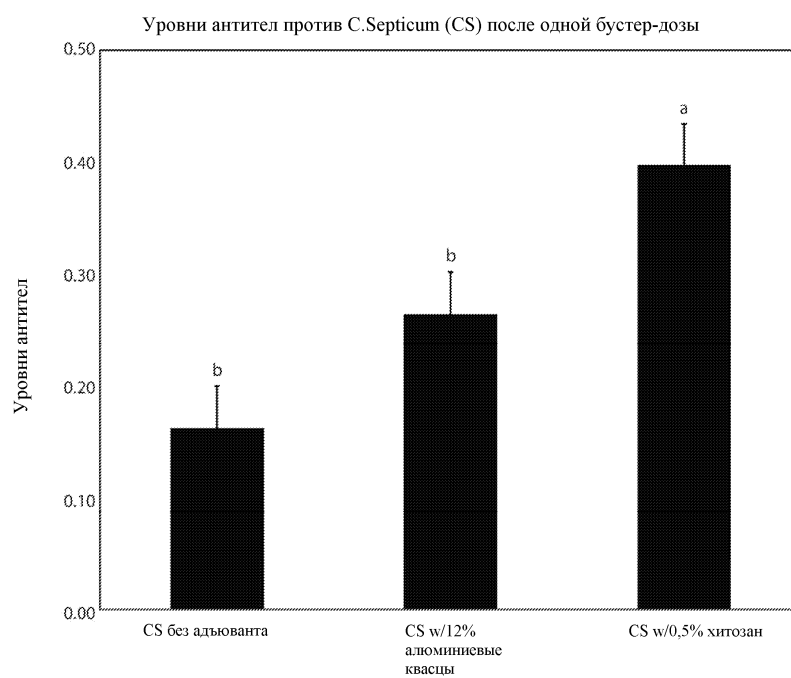
10. Применение по п.9, где микроб инактивирован или убит.

11. Применение по п.9, где микроб инактивирован или убит с использованием формальдегида, глутаральдегида или формалина.

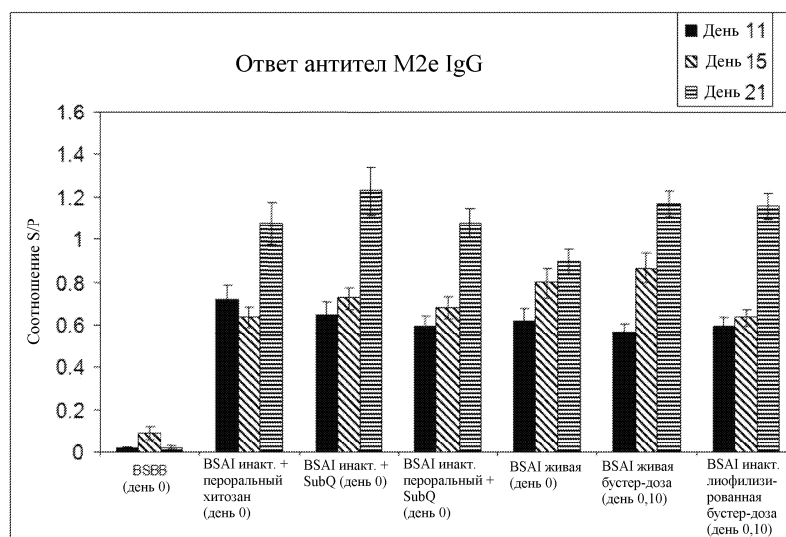
12. Применение по п.11, где микроб представляет собой Salmonella, Escherichia, Shigella, Bordetella, Clostridium, Mycoplasma, Staphylococcus, Streptococcus, Bacillus, Influenza или Eimeria.



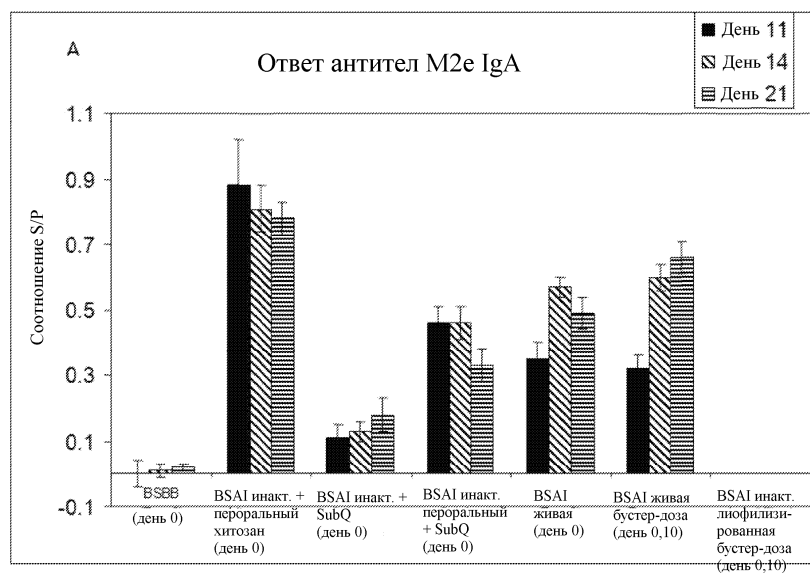
Фиг. 1



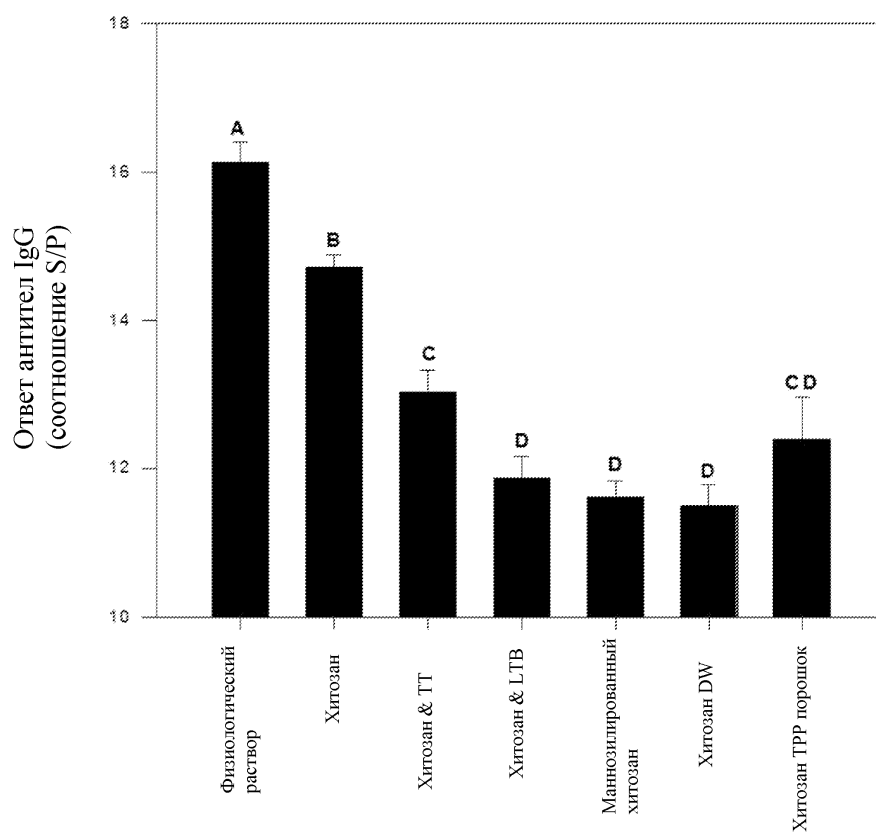
Фиг. 2



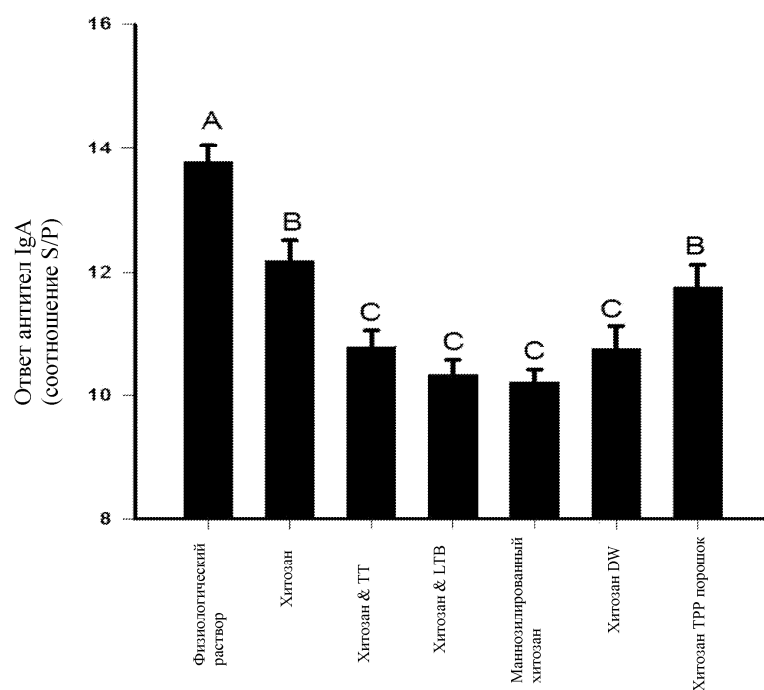
Фиг. 3А



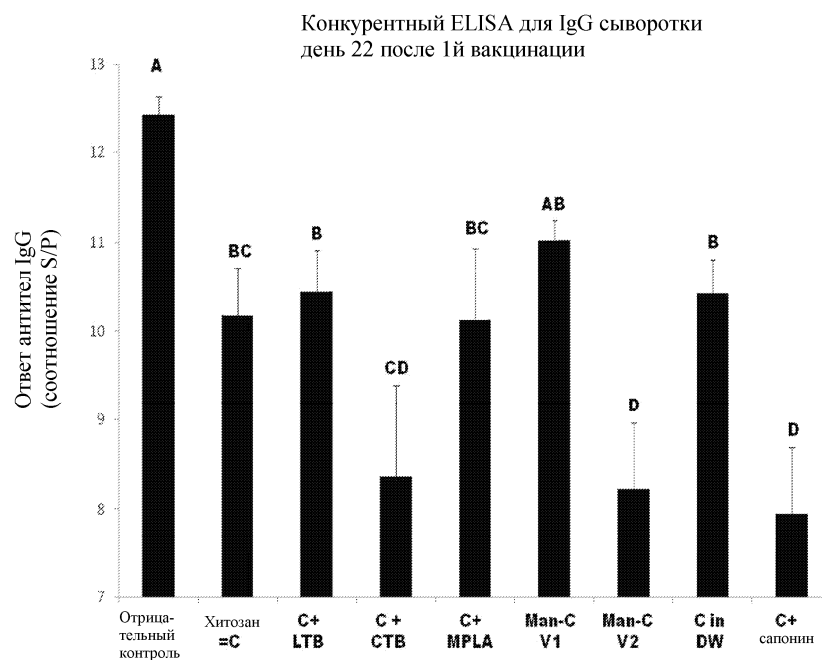
Фиг. 3В



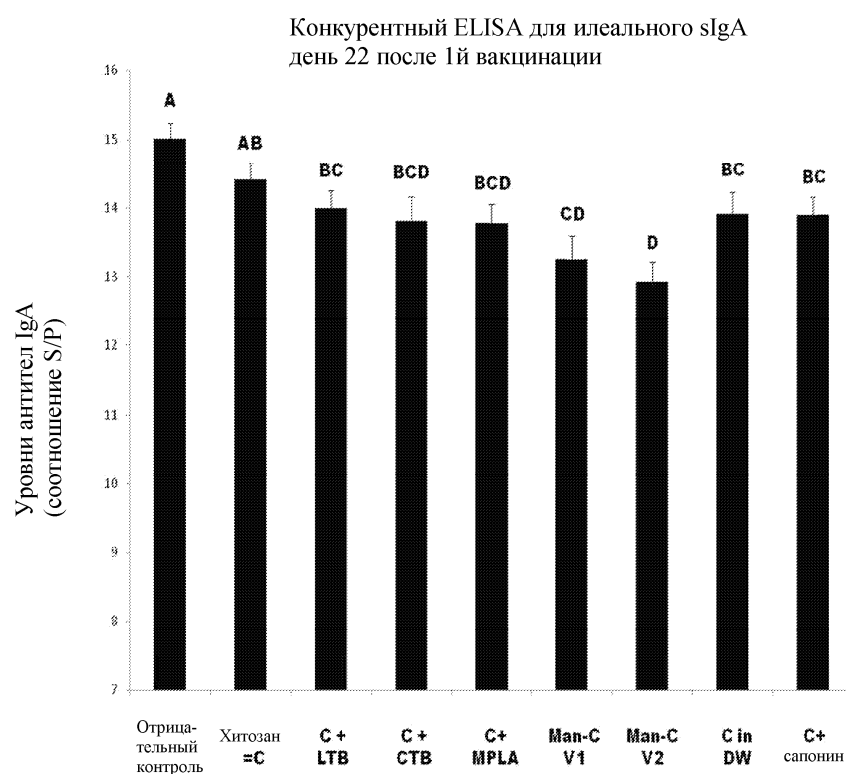
Фиг. 4



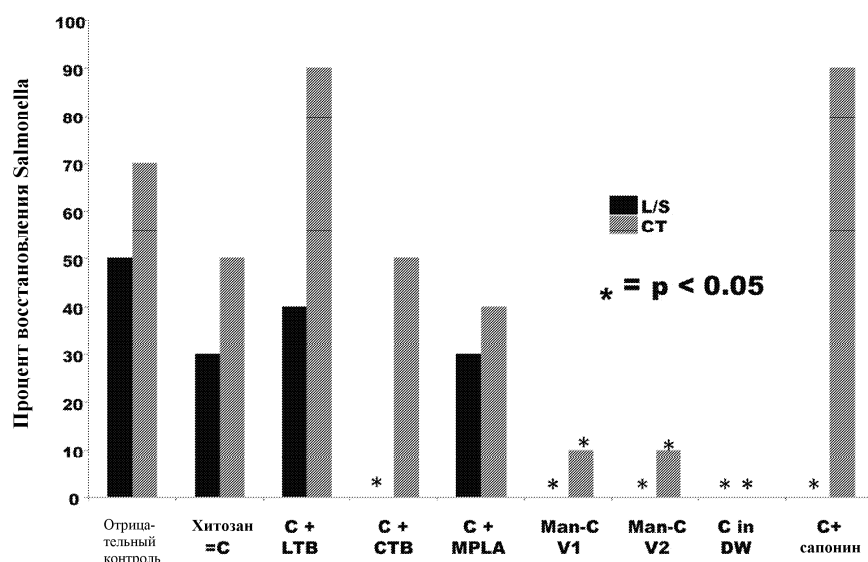
Фиг. 5



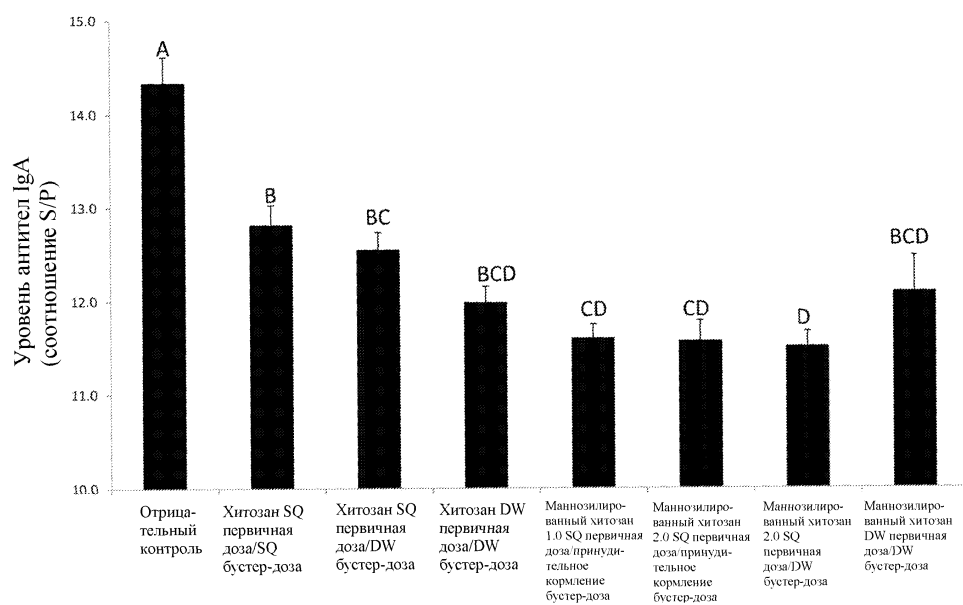
Фиг. 6А



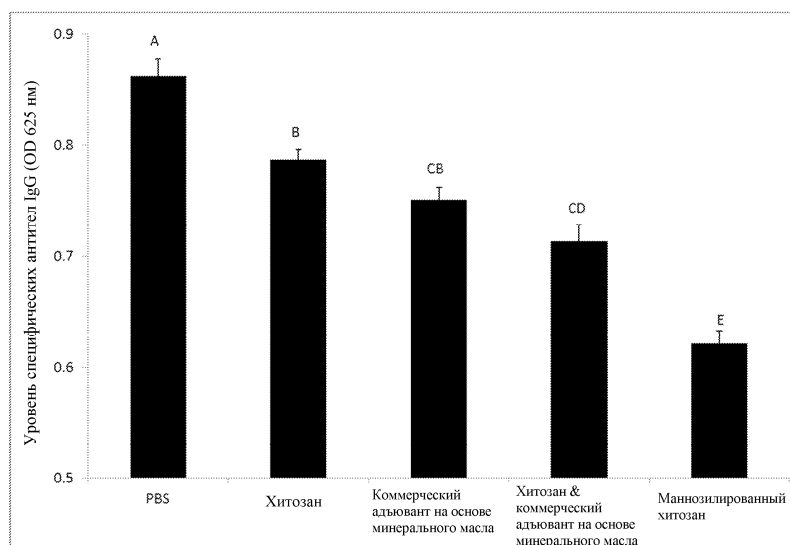
Фиг. 6В



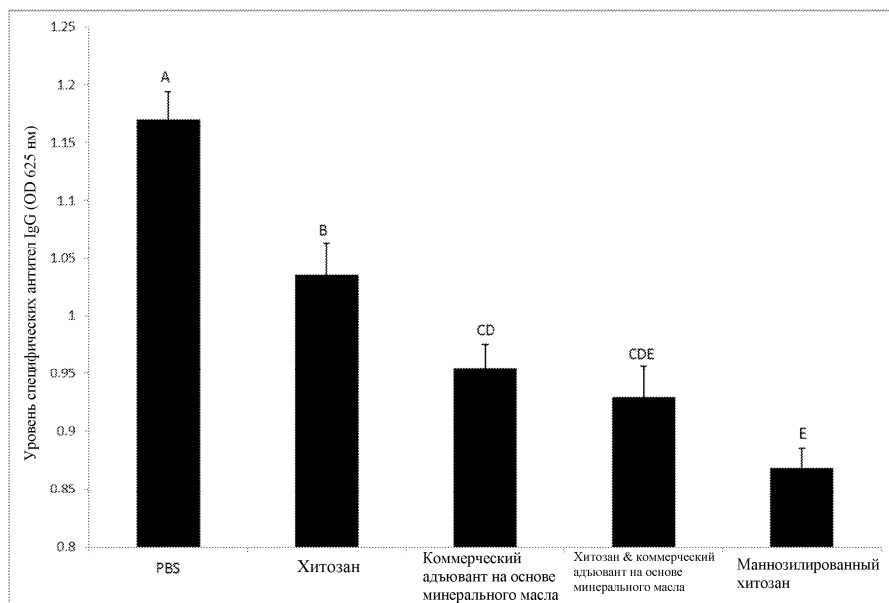
Фиг. 7



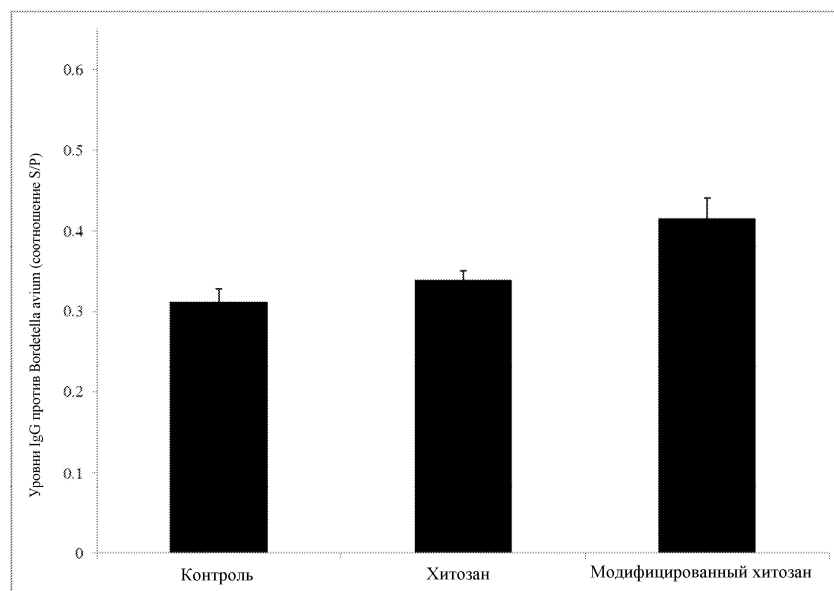
Фиг. 8



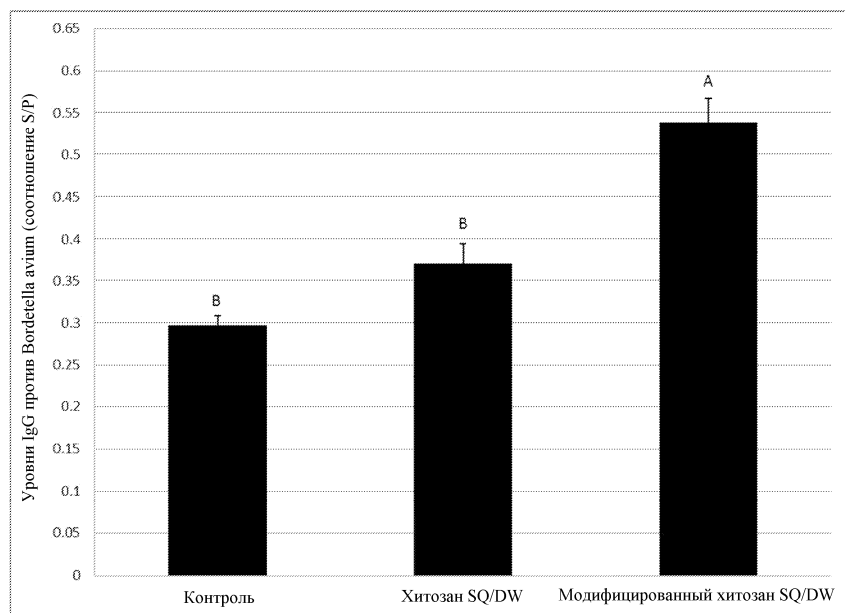
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2