

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039370**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.19

(21) Номер заявки
201892330

(22) Дата подачи заявки
2017.04.13

(51) Int. Cl. **A61K 47/18** (2017.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01)

(54) **ИММУНОГЕННАЯ МНОГОДОЗОВАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ
АНТИМИКРОБНЫЙ ПОЛИАМИДНЫЙ КОНСЕРВАНТ**

(31) **62/322,258**

(32) **2016.04.14**

(33) **US**

(43) **2019.03.29**

(86) **PCT/US2017/027491**

(87) **WO 2017/180916 2017.10.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МЕРИАЛ, ИНК.; ДЖЕНЗИМ
КОРПОРЕЙШН (US)**

(72) Изобретатель:
**Риго Гийом, Лос-Дюно Селин, Паризо
Алексис Ги Андре Люсьен (FR), Дахл
Прадип К. (US)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) **WO-A2-2007031520**

US-A1-2014271526

US-B2-7371395

GEIER D.A. ET AL.: "The relative toxicity of compounds used as preservatives in vaccines and biologics", **MEDICAL SCIENCE MONITOR**, vol. 16, no. 5, 2010, pages SR21-27, XP002773216, the whole document

Harke H.-P.: "Disinfectants" In: "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", 2005, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, XP002773217, the whole document

(57) Изобретение предусматривает иммуногенную многодозовую композицию в форме эмульсии масло-в-воде, содержащую несколько доз антигена и эффективное консервирующее количество нертутного консерванта, представляющего собой специально подобранные антимикробные полиамидные полимеры и их комбинации. Предложенная композиция не содержит ртутный консервант. Изобретение также предусматривает флакон и предварительно наполненное устройство для доставки, содержащее иммуногенную многодозовую композицию по изобретению.

B1

039370

039370

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Эта заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/322258, зарегистрированной 14 апреля 2016 и полностью включенной в данное описание путем отсылки.

Включение в описание сведений путем ссылки

Эта заявка ссылается на США 2014/0271526 и США 2014/0275469, раскрытия которых полностью включаются в данное описание путем отсылки. Все цитированные или упомянутые в описании документы также включаются в описание путем отсылки и могут применяться при осуществлении на практике изобретения.

Область техники, к которой относится изобретение

Заявка имеет отношение к консервантам, не содержащим тимеросал, для многодозовой композиции. Консерванты включают антимикробные полиамиды и октенидин.

Предшествующий уровень техники

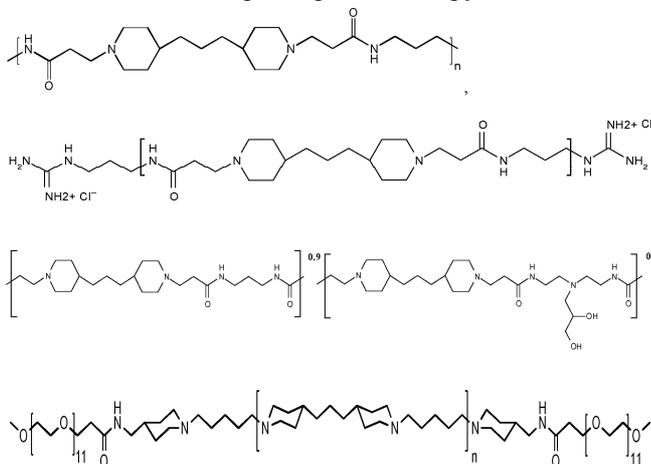
Для многодозовых композиций, включая вакцины, необходимы консерванты, для того, чтобы свети к минимуму инфицирование последующих доз композиции после использования первой дозы. Консервант должен обеспечить прохождение вакцинной композицией тестов на эффективность или антимикробных провокационных тестов в соответствии с Фармакопеей Соединенных Штатов Америки (USP) в США, Британской фармакопеей (BP) и Европейской фармакопеей (EP) в Европе.

Широко используемым в вакцинах консервирующим веществом является тимеросал. Тимеросал представляет собой ртутьсодержащее соединение, которое может вызывать раздражение и увеличивать появление аллергических реакций. Кроме того, тимеросал вреден для окружающей природной среды.

Поэтому было бы желательно обнаружить новые и безопасные консерванты для вакцин, чтобы заменить тимеросал. В данной заявке заявители раскрывают *inter alia* применение антимикробных полиамидных соединений и октенидина в качестве консервантов для вакцин. Высокоэффективные консерванты не вызывают раздражения и не содержат соединений ртути.

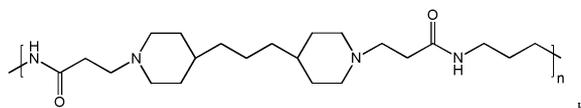
Сущность изобретения

Один аспект настоящего изобретения предусматривает иммуногенную многодозовую композицию в форме эмульсии масло-в-воде, которая содержит по меньшей мере две дозы по меньшей мере одного антигена, и эффективное консервирующее количество, достаточное для предотвращения роста загрязняющих микроорганизмов в многократно используемой иммуногенной многодозовой композиции, состоящее от около 0,05 мг/мл до около 5 мг/мл композиции, нертутного консерванта, представляющего собой антимикробный полиамидный полимер, выбранный из группы, состоящей из



и их комбинаций, где n представляет собой целое число от 1 до 400, композиция не содержит ртутный консервант и микроорганизмы представляют собой *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp., *Edwardsiella* spp., *Hafnia* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Yersinia* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* spp., *Enterococci*, *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Mycobacterium* spp., *Prototheca* spp., *Mycoplasma* spp., *Erwinia* spp., *Lactobacillus* spp., и их комбинации.

Согласно изобретению в одном из вариантов осуществления полиамид имеет следующую структуру:



и его средневесовой молекулярный вес (WAMW) составляет примерно от 1,0 kDa до 15,0 kDa, как определено с помощью эксклюзионной хроматографии.

Согласно изобретению в одном из вариантов осуществления полиамид имеет WAMW примерно от 2,0 kDa до 10 kDa.

Согласно изобретению в одном из вариантов осуществления полиамид имеет WAMW примерно от 2,5 kDa до 7,76 kDa, или имеет WAMW около 7,76 kDa.

Согласно изобретению в одном из вариантов осуществления иммуногенная многодозовая композиция содержит антимикробный полиамидный полимер в концентрации примерно от 0,1 мг/мл до 0,25 мг/мл композиции.

Согласно изобретению в одном из вариантов осуществления антимикробный полиамидный полимер имеет концентрацию около 0,25 мг/мл композиции.

Согласно изобретению в одном из вариантов осуществления иммуногенная многодозовая композиция дополнительно содержит адъювант.

Согласно изобретению в одном из вариантов осуществления антигенность иммуногенной многодозовой композиции является стабильной в течение не менее 1 года, 1,5 лет, 2 лет или 2,5 лет и иммуногенная многодозовая композиция остается стабильной, несмотря на по меньшей мере десятикратное использование.

Согласно изобретению в одном из вариантов осуществления после инокуляции иммуногенной многодозовой композиции одним или более микроорганизмами, концентрация указанных микроорганизмов уменьшается с течением времени, предпочтительно при этом в композиции наблюдается по меньшей мере 1.0 log сокращение от первоначально подсчитанного количества микроорганизмов через 24 часа по меньшей мере 3.0 log сокращение через 7 дней от ранее определенного значения и не более, чем 0,5 log увеличение через 28 дней от первоначально определенного значения.

Согласно изобретению в одном из вариантов осуществления после инокуляции иммуногенной многодозовой композиции одним или более микроорганизмами, в композиции наблюдается по меньшей мере 2,0 log сокращение между организмом от первоначально подсчитанного количества через 6 часов после инокуляции по меньшей мере 3,0 log сокращение через 24 часа от первоначально определенного значения и не наблюдается восстановления через 28 дней.

Согласно изобретению в одном из вариантов осуществления один или более микроорганизмов выбирают из *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* и их комбинаций.

Согласно изобретению в одном из вариантов осуществления иммуногенная многодозовая композиция дополнительно содержит одно или более из числа буфера, криопротектора, соли, двухвалентного катиона, неионного поверхностно-активного вещества и ингибитора свободно-радикального окисления.

Другой аспект настоящего изобретения предусматривает флакон, содержащий иммуногенную многодозовую композицию по изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения предусматривает предварительно наполненное устройство для доставки вакцины, содержащее иммуногенную многодозовую композицию по изобретению.

Согласно изобретению в одном из вариантов осуществления предварительно наполненное устройство для доставки вакцины представляет собой шприц, а иммуногенная многодозовая композиция предназначена для внутримышечной или подкожной инъекции.

Эти и другие варианты осуществления раскрываются или становятся очевидными из подробного описания и охватываются следующим подробным описанием.

Подробное описание изобретения

Следует отметить, что в этом раскрытии и, в частности, в пунктах формулы изобретения такие термины как "содержит", "содержащий" и тому подобные могут иметь значение, приписанное им в патентном законе США; например, они могут означать "включает", "включающий" и тому подобное; и что такие термины, как "состоящий в основном из" и "в основном состоит из" имеют значение, приписанное им в патентном законе США, например, эти термины дают возможность не перечислять элементы в прямой форме, однако исключают элементы, обнаруженные в предшествующем уровне техники или затрагивающие основные или новые отличительные признаки изобретения.

Если не указано иначе, технические термины используются в соответствии с общепринятым значением. Определения общепринятых терминов в молекулярной биологии можно найти в Benjamin Lewin, Genes V. под издательством Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, под издательством Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9) и Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: Comprehensive Desk Reference, под издательством VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Термин "около" при использовании в описании означает приблизительно, порядка или примерно. Когда термин "около" используется вместе с диапазоном числовых значений, он изменяет этот диапазон путем расширения границ выше и ниже установленных числовых значений. В общем, термин "около" используется в описании для обозначения изменения числового значения выше и ниже установленного значения на 10%. В одном аспекте термин "около" означает плюс или минус 20% от числового значения, которое используется. Следовательно, около 50% означает в пределах 45-55%. Диапазон числовых значений, перечисленных в описании с помощью конечных точек, включает все числа и их части, относящиеся к этому диапазону значений (например, от 1 до 5 включает 1; 1,5; 2; 2,75; 3; 3,90; 4 и 5). Также

предполагается, что все количества и их части могут быть изменены при помощи термина "около".

Использованный в описании термин "эффективное количество" означает количество композиции согласно настоящему изобретению, эффективное для получения желательного ветеринарного результата.

Термины в единственном числе включают объекты во множественном числе, если контекст явно не диктует иное. Аналогично, слово "или" включает "и", если контекст явно не диктует иное. Слово "или" означает один любой элемент из конкретного списка и также включает любую комбинацию членов этого списка.

Использованный в описании термин "животное" включает всех млекопитающих, птиц и рыб. Животное, использованное в описании, может быть выбрано из группы, состоящей из лошади, собаки, кошки, жвачного животного, свиньи, овцы, козы, верблюда, птицы, примата, людей и рыб. Термин "животное" также включает отдельное животное в любой стадии развития, включая эмбриональную и зародышевую стадии. Использованный в описании термин "боров" или "поросенок" означает животное свиного происхождения, в то время как "свинья" относится к самке репродуктивного возраста и способности.

Термины "полипептид" и "протеин" используются в описании взаимозаменяемым образом и имеют отношение к полимеру из последовательных аминокислотных остатков.

Термины "нуклеиновая кислота", "нуклеотид" и "полинуклеотид" используются взаимозаменяемым образом и относятся к РНК, ДНК, кДНК или кРНК и их производным, например, содержащим модифицированные остовы. Специалистам должно быть ясно, что изобретение предоставляет полинуклеотиды, содержащие последовательности, комплементарные описанным здесь последовательностям. "Полинуклеотид", рассматриваемый в настоящем изобретении, включает обе нити и прямую нить (от 5' к 3'), и обратнoкомплементарную нить (от 3' к 5'). Полинуклеотиды согласно изобретению можно получить различными способами (например, с помощью химического синтеза, с помощью клонирования генов и т.д.), причем они могут принимать различные формы (например, линейные или разветвленные, одно или двухцепочечные, или их гибриды, праймеры, зонды и т.д.).

При использовании в описании термин "антиген" или "иммуноген" означает субстанцию, вызывающую специфический иммунный ответ у животного-хозяина. Антиген может представлять собой целый организм, убитый, ослабленный или живой; субъединицу или часть организма; рекомбинантный вектор, содержащий вставку с иммуногенными свойствами; часть или фрагмент ДНК, способный вызывать иммунный ответ после "презентации" животному-хозяину; полипептид, антиген, эпитоп, гаптен или любую их комбинацию. Альтернативно, иммуноген или антиген может содержать токсин или антитоксин.

Термин "иммуногенный протеин или пептид" при использовании в описании включает полипептиды, которые являются иммунологически активными в том смысле, что после введения хозяину, он способен вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа, направленный против данного протеина. Предпочтительно фрагмент протеина является таким, что он обладает в основном такой же иммунологической активностью, как весь протеин. Таким образом, фрагмент протеина согласно изобретению содержит или состоит в основном из или состоит из, по меньшей мере, одного эпитопа или антигенной детерминанты. "Иммуногенный" протеин или полипептид, использованный в описании, включает полноразмерную последовательность протеина, его аналоги или его иммуногенные фрагменты. Термин "иммуногенный фрагмент" подразумевает фрагмент протеина, который включает один или более эпитопов и, таким образом, вызывает иммунологический ответ, описанный выше. Такие фрагменты могут быть идентифицированы с использованием любого количества методов картирования эпитопов, хорошо известных в данной области техники. Например, линейные эпитопы можно установить, например, путем одновременного синтеза большого числа пептидов на твердых подложках, пептидов, соответствующих участкам молекулы протеина, и проведения реакции пептидов с антителами, в то время как пептиды остаются прикрепленными к подложке. Аналогичным образом, конформационные эпитопы легко идентифицировать путем определения пространственной конформации аминокислот, например, с помощью рентгеновской кристаллографии и 2-мерного ядерного магнитного резонанса.

Кроме того, термин "иммуногенный протеин или пептид" рассматривает делеции, вставки и замены в последовательности, при условии, что полипептид функционирует таким образом, чтобы вызывать иммунологический ответ, как определено в описании.

Термин "консервативное изменение" обозначает замену аминокислотного остатка другим биологически сходным остатком или замену нуклеотида в нуклеиновокислотной последовательности, такую, что кодированный аминокислотный остаток не изменяется или является другим биологически сходным остатком. В этом отношении, особенно предпочтительными заменами являются консервативные по природе замены, т.е., такие замены, которые происходят в пределах семейства аминокислот. Например, аминокислоты обычно подразделяются на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Примеры консервативных изменений включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин на другой гидрофобный остаток, или замену одного поляр-

ного остатка на другой полярный остаток, такую как замена аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту, или глутамин на аспарагин, и тому подобное; или сходную консервативную замену аминокислоты структурно родственной аминокислотой, которая не будет оказывать большого влияния на биологическую активность. Следовательно, протеины, имеющие в основном такую же аминокислотную последовательность, как эталонная молекула, но обладающие минорными аминокислотными заменами, которые практически не влияют на иммуногенность протеина, находятся в пределах определения эталонного полипептида. Все полипептиды, полученные посредством этих модификаций, включаются в данное описание. Термин "консервативное изменение" также включает использование заменяющей аминокислоты вместо незамещенной исходной аминокислоты, при условии, что антитела, индуцированные к замещенному полипептиду, также вступают в иммунную реакцию с незамещенным полипептидом.

"Иммунологический ответ" на композицию или вакцину представляет собой развитие у хозяина клеточного и/или антителоопосредованного (гуморального) ответа на представляющую интерес композицию или вакцину. Как правило, "иммунологический ответ" включает, но не ограничивается этим, один или более из следующих эффектов: продуцирование антител, В-клеток, хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, направленных специфически на антиген или антигены, включенные в композицию или вакцину. Предпочтительно, хозяин будет демонстрировать или терапевтический или защитный иммунный ответ, такой, что устойчивость к новой инфекции будет увеличиваться и/или клиническая тяжесть заболевания будет уменьшаться. Такая защита будет проявляться или уменьшением или исчезновением симптомов, обычно проявляемых инфицированным хозяином, более быстрым периодом восстановления и/или уменьшенной патогенной нагрузкой у инфицированного хозяина.

Термины "рекомбинантный" и "генетически модифицированный" используются взаимозаменяемым образом и относятся к любой модификации, изменению или инжинирингу нативной формы или структуры полинуклеотида или белка или к любой модификации, изменению или инжинирингу нативной окружающей среды или окружающей обстановки полинуклеотида или белка. Модификация, изменение или инжиниринг полинуклеотида или протеина может включать, но не ограничивается этим, делецию одного или более нуклеотидов или аминокислот, делецию всего гена, оптимизацию кодонов гена, консервативную замену аминокислот, вставку одного или более гетерологичных полинуклеотидов.

Термины "поливалентная вакцина или композиция", "комбинированная или комбо вакцина или композиция" и "мультивалентная вакцина или композиция" используются взаимозаменяемым образом с целью упоминания композиции или вакцины, содержащей более чем одну композицию или вакцину. Поливалентная вакцина или композиция может содержать две, три, четыре или более композиций или вакцин. Поливалентная вакцина или композиция может содержать рекомбинантные вирусные векторы, активные или ослабленные или убитые вирусы дикого типа, субъединицы (протеины/антигены), ДНК плазмиды или их смесь.

Использованный в описании термин "инактивированная вакцина" означает вакцинную композицию, содержащую возбудителя инфекции или патоген, который более не способен к репликации или росту. Патоген может быть бактериального, вирусного, грибкового происхождения или простейшим организмом. Инактивация может осуществляться с помощью целого ряда методов, включая замораживание-оттаивание, высокое давление, химическую обработку (например, обработку тимеросалом, формалином, (бетапропиолактон), ВЕ1 (бинарный этиленмин)), или любым другим химическим веществом, включая октенидин, обработку ультразвуком, облучение, нагревание или с помощью любых других общепринятых способов, достаточных для предотвращения репликации или роста организма при сохранении его иммуногенности.

Обычно в многодозовых композициях, включая вакцины для животных, используются консерванты для предотвращения роста бактерий или грибов и для минимизирования контаминации композиций во время повторных (нестерильных) проколов во флаконе. Консерванты должны проходить проверку антимикробной эффективности (АЕТ), как описано в Фармакопее США. Как раскрывается в описании, заявители проводили антимикробные тесты согласно Фармакопее Соединенных Штатов Америки (USP), Британской Фармакопее (BP) и Европейской фармакопее (EP). Были использованы четыре тест-организма: *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *A. brasiliensis*. И хотя тимеросал и формол продолжают играть важную роль в вакцинах для ветеринарии, Европейские организации способствуют разработке вакцин, не содержащих эти соединения. С целью преодоления потенциальных будущих осложнений, связанных с возможным наложением запрета, заявители идентифицировали два соединения, протестировали и подтвердили их эффективность как WFI растворов при разных концентрациях для тестирования противомикробного консерванта согласно Фармакопее. Как раскрывается в этом описании, и антимикробные полиамидные полимеры и октенидин являются безопасными и эффективными консервантами для вакцин и инактивирующими бактериями агентами.

В одном аспекте изобретения представляются вакцинные композиции с консервантом, содержащие водорастворимые, антимикробные, амин-функциональные полиамиды или октенидин. Антимикробный полиамид может быть любым полиамидом, представленным формулой I, II, III, IV или V. В конкретном варианте осуществления выбирают один полиамид из двадцати пяти полимеров (A-Y), перечис-

ленных в табл. 1. В дополнение к особенно эффективным видам антимикробных полиамидов, представленным в описании, специалист может идентифицировать дополнительные активные члены раскрытых типов с использованием нестандартного экспериментирования.

Как проиллюстрировано в примерах ниже, полиамиды В и С эффективны, в частности, против целого ряда типичных загрязняющих патогенов, включая патогены, вызывающие мастит *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* и *A. brasiliensis*, на приемлемых уровнях с точки зрения USP и ветеринарии.

Важно отметить, что значения "MW" в табл. 1 показывают "средневесовой молекулярный вес", определенный с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), которая представляет собой водную версию GPC. В этой связи, например, "полимер В" при использовании в описании включает композиции, содержащие полимер В, имеющий средневесовой MW примерно от 5 до 15 kDa, примерно от 5 до 12 kDa, примерно от 5 до 10 kDa, примерно от 6 до 8,5 kDa, примерно от 7,5 до 8 kDa или около 7,76 kDa. Более того, "MW" означает "средневесовой молекулярный вес", если в прямой форме не установлено иное.

Как показано в табл. 1, полимеры В, С и D каждый имеет одинаковую повторяющуюся структуру (определенную в описании как поли(4,4-триметилен-дипиперидин биспропановая кислота-диаминопропан)), но разный средневесовой MW. Более того, MIC данные показывают, что полимеры В, С и D проявляют сравнимую эффективность в отношении панели патогенов. Таким образом, заявитель демонстрирует, что поли(4,4-триметилен-дипиперидин биспропановая кислота-диаминопропан) с целым рядом MW значений являются активными антимикробными агентами (т.е. значения MW, по меньшей мере, примерно от 2,5 г/моль, по меньшей мере, примерно до 10,6 г/мл).

Использованные в этом документе полимеры содержат следующие повторяющиеся единицы: А [4,4-триметилен дипиперидин бис-пропановая кислота-4,4'-дипиперидин]; В-D [4,4-триметилен дипиперидин бис-пропановая кислота-диаминопропан]; Е [2,2'-бипирролидин бис-пропановая кислота-пентадиамин]; G [4,4-триметилен дипиперидин бис-пропановая кислота-диаминопропан]; Н [4,4-триметилен дипиперидин биспропановая кислота-N(2-аминоэтил)диаминоэтан]; I [4,4'-триметилен дипиперидин биспропановая кислота-N(3-аминопропил)1,3-пропан диамин]; J [4,4'-триметилен дипиперидин бис-пропановая кислота-3,3'-диамино-N-метил-дипропиламин]; K [4,4'-дипиперидин бис-пропановая кислота-2,2'-диамино диэтиламин]; L [4,4'-дипиперидин бис-пропановая кислота-2,2'-диамино N-метил диэтиламин]; M [4,4'-дипиперидин биспропановая кислота-3,3'-диамино-дипропиламин]; N [4,4'-дипиперидин бис-пропановая кислота-3,3'-диамино-N-метил-дипропиламин]; O [4,4'-триметилен дипиперидин-1,3-диаминопропан-N,N'-ди-3-пропановая кислота]; P [4,4'-триметилен дипиперидин биспропановая кислота-N,N'-диметил-1,3-диаминопропан]; R [4,4-триметилен дипиперидин бис-пропановая кислота-4,4'-дипиперидин]; S [4,4-триметилен дипиперидин биспропановая кислота-диаминопропан]; и T [4,4'-триметилен дипиперидин бис-пропановая кислота-N-глицидол диэтилентриамин].

В другом аспекте изобретение в широком смысле предоставляет многодозовые композиции, содержащие активные фармацевтические ингредиенты (API), включая низкомолекулярные лекарственные средства (например, включая фамотидин) и биологические препараты (например, пептиды, включая инсулин). Подобно многодозовым вакцинным композициям, многодозовые композиции, содержащие API, подвергаются загрязнению или инокуляции микроорганизмами после повторных проколов иглой. В силу этого, в некоторых вариантах осуществления изобретение предоставляет многодозовые API-содержащие композиции с добавлением консервантов. API, обычно входящие в состав содержащих консервант многодозовых композиций, включают, но не ограничиваются этим, следующее.

Биологические терапевтические средства: антивенин (*Micrurus fulvius*) (лошадиного происхождения), антивенин (*Crotalidae*) (лошадиного происхождения), антивенин (*Latrodectus mactans*), кальцитонин-семги для инъекций, десмопрессина ацетат, этанерцепт, эпоэтин альфа (рекомбинантный), фоллитропин альфа для инъекций, инсулин аспарт (рекомбинантный), 70% инсулин аспарт протамин суспензия, 30% инсулин аспарт для инъекций (rDNA происхождения), инсулин гларгин [rDNA происхождения] для инъекций, инсулин глулизин для инъекций (rDNA происхождения), Regular U-500 (концентрированный) (инъекционный человеческий инсулин USP [rDNA] происхождения), инсулин лизпро для инъекций (rDNA происхождения), 75% инсулин лизпро протамин суспензия и 25% инсулин лизпро для инъекций (rDNA происхождения), интерферон альфа-n3 (происходящий от человеческих лейкоцитов), интерферон альфа-2b, рекомбинантный, интерферон альфа-2a, рекомбинантный, инъекционный лейпролида ацетат, инъекционный октреотида ацетат, пэгинтерферон альфа-2a, Rho (D) иммуноглобин (человеческий), Rho (D) иммуноглобулин (человеческий), сарграмостим (рекомбинантный), соматропин (rDNA происхождения), трастузумаб и туберкулин очищенное производное белка.

Вакцины: LEPTODOG®, RECOMBITEK® (инактивированная вакцина от собачьего лептоспироза), вакцины против бешенства, включая ALURABIFFA® и RABISIN® (инактивированные вакцины против бешенства с добавлением адьюванта), SYNTOXAN® линия (вакцина от клостридий), HYORESP® (инактивированная вакцина для свиней против *Mycoplasma hyopneumoniae*), CIRCOVAC® (инактивированная вакцина против свиного цирковируса 2 (PCV2)), PARVORUVAX® (комбо вакцина против свиного парвовируса, реовируса и эризипелотрикса), птичьи инактивированные вакцины (для цыплят и индюшек):

BIGOPEST®, BINEWVAX®, COR2®, GUMBOPEST®, GUMBORIFFA®, IMOPEST®, TUR3®, FLUVAC®, GALLIMUNE® линейка для Breeder/Layer/Broiler: вакцины против болезни Ньюкасла (ND), (IBD) инфекционных бронхитов, гриппа H9N2, гриппа H5N9, синдрома снижения яйценоскости (EDS), синдрома опухания головы, REO вируса, (ART) птичьего ринотрахеита, (IB) инфекционного бурсита птиц, адсорбированный дифтерийный, столбнячный и бесклеточный коклюшный анатоксин, комбинированная вакцина гепатит В (рекомбинантный) и инактивированный вирус полиомиелита, адсорбированная бесклеточная вакцина дифтерия, столбнячный токсин и коклюш, инактивированная вакцина от гепатита А, инактивированный гепатит А и гепатит В (рекомбинантный) вакцина, вакцина от гепатита В (рекомбинантная) и поливалентная пневмококковая вакцина.

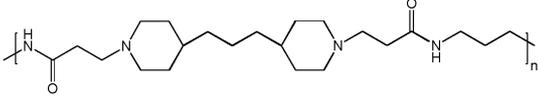
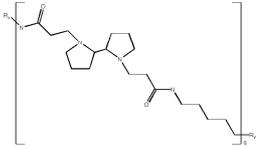
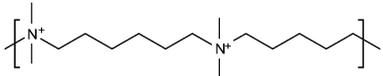
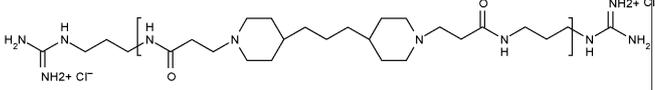
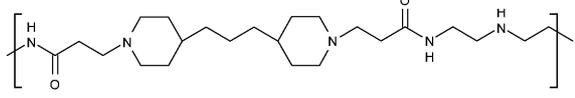
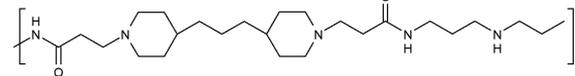
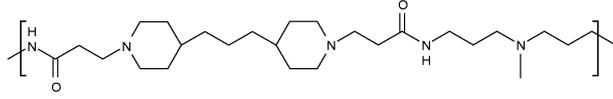
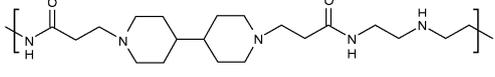
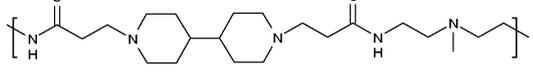
Низкомолекулярные средства: хлористоводородный апоморфин для инъекций, эналаприлат, эноксапарин натрия для внутривенных инъекций (конъюгированные эстрогены, USP), фамотидин, фулвестрант для инъекций, галоперидол, гидрокортизон натрия фосфат, кортизол фосфат для инъекций, гидроморфона гидрохлорид, метараминол битартрат, налбуфин гидрохлорид, метилпреднизолон ацетат суспензия для инъекций, USP, ондансетрон гидрохлорид, пенициллина G бензатин суспензия, фитонадион, натрий-железоглюконатный комплекс в растворе сахарозы, тестостерона энантан для инъекций USP, Multiple Dose Vial, медроксипрогестерона ацетат суспензия для инъекций, USP, медроксипрогестерона ацетата и эстрадиол ципионата суспензия для инъекций, флумазенил для инъекций, доласетрон мезилат для инъекций и циметидин гидрохлорид для инъекций, стрептомицина сульфат, USP.

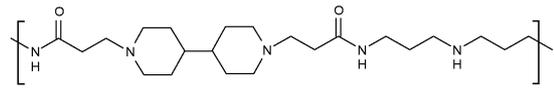
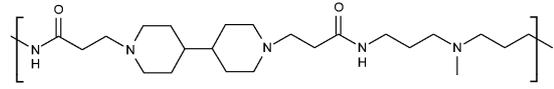
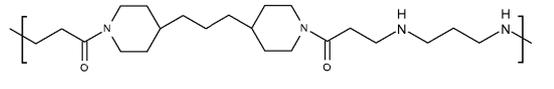
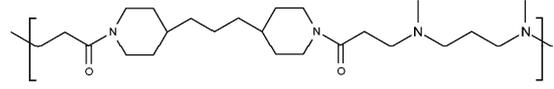
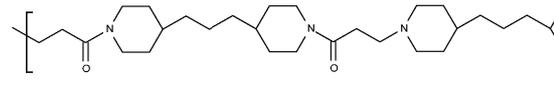
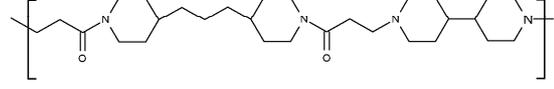
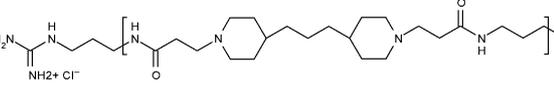
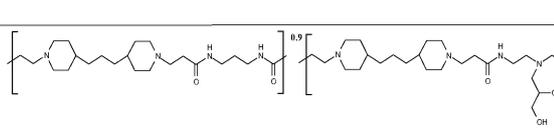
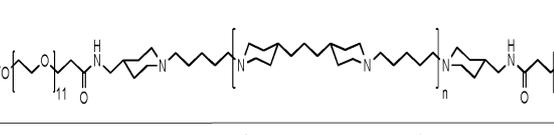
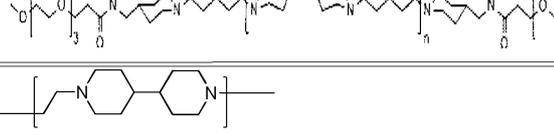
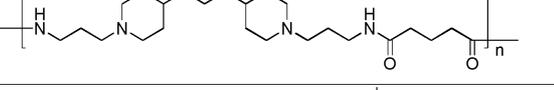
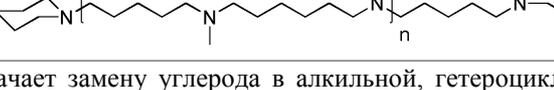
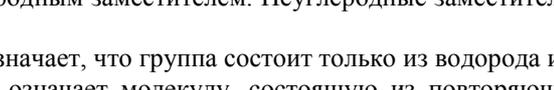
Таким образом, настоящее изобретение предоставляет новые и нетривиальные антимикробные полиамидные композиции и способы их использования для лечения и предотвращения мастита у нечеловекоподобных животных. Данные способы, как правило, включают введение инфицированному животному эффективного количества ветеринарной композиции для удаления или устранения, полностью или в существенной степени, вызывающего мастит патогена(ов). Как подробно описано далее, полиамидные соединения также являются высоко активными в отношении широкого спектра других, существенных для человека и животных патогенов. Более того, показана хорошая переносимость полиамидов на мышцах и крысах. Например, максимально переносимая доза для 4,4'-триметилен дипиперидин биспропановая кислота-со-1,3-диамино пропан составляла около 5 мг/кг (IP) и 40 мг/кг (IV).

Таблица 1. Двадцать пять противомикробных амин-функциональных полиамидов.

"MW" = средневесовой молекулярный вес

ID #	Структура	MW (kDa)
A		10.6
B		7.76
C		3.35

D		2.5
E		3.0
F		4.2
G		2.0
H		3-10
I		5.0
J		5.0
K		7.0
L		5.0

M		5.4
N		5.5
O		10.0
P		5.4
Q		7.5
R		3-10
S		4.9
T		4.5
U		~10
V		8.4
W		~10
X		5-10
Y		5-10

"Замещенный" означает замену углерода в алкильной, гетероциклической или арильной группах одним или более неуглеродным заместителем. Неуглеродные заместители выбирают из азота, кислорода и серы.

"Незамещенный" означает, что группа состоит только из водорода и углерода.

Термин "полимер" означает молекулу, состоящую из повторяющихся звеньев (единиц). Термин "повторяющаяся единица" или "мономер" означает группу в полимере, которая многократно повторяется или появляется в полимере. Полимер может быть сополимером, если повторяющиеся единицы или "со-мономеры" химически и структурно отличаются друг от друга.

Термин "фармацевтически приемлемый анион" означает анион, подходящий для фармацевтического использования. Фармацевтически приемлемые анионы включают, но не ограничиваются этим, галогениды, карбонат, бикарбонат, сульфат, бисульфат, гидроксид, нитрат, хлорид, фосфат, персульфат, сульфит, ацетат, аскорбат, бензоат, цитрат, дигидроген цитрат, гидроген цитрат, оксалат, сукцинат, тартрат, таурохолат, гликохолат и холат.

Термин "фармацевтически приемлемая концевая группа" означает концевую группу, подходящую для фармацевтического использования. Примеры фармацевтически приемлемой концевой группы вклю-

чают, но не ограничиваются этим, H, (C₁-C₁₀)алкил, (C₂-C₉)гетероалкил, (C₃-C₁₀)циклоалкил, (C₂-C₉)гетероциклоалкил, (C₆-C₁₄)арил, (C₂-C₉)гетероарил, (C₁-C₁₀)алкиламин, -O(O)C-(C₁-C₁₀)алкил, (C₁-C₁₀)алкил-СООН, (C₃-C₁₀)циклоалкил-СООН, -(O)СН₃, -ОН, амид, гуанидиногруппу, гуанидин-хлоридную группу, гуанидинобензольную группу, дигидроксигруппу и полиэтиленгликолевую группу.

Термин "эффективное количество" раскрытых аминфункциональных полиамидов обозначает количество, достаточное для достижения терапевтического и/или профилактического действия на конкретное состояние, требующее лечения, например, количество, приводящее к предотвращению или уменьшению симптомов, связанных с маститом. Точное количество раскрытых аминфункциональных полиамидов, которое вводится, будет зависеть от типа и тяжести мастита или инфекции, нуждающейся в лечении, и от характеристик животного, таких как общее состояние здоровья, возраст, вес тела и переносимость лекарственных средств.

В одном варианте осуществления способа эффективное количество полиамида или октенидина добавляется к одному или более антигенам для создания стабильной иммунологической композиции.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения обеспечивается применение антимикробного амин-функционального полиамида для сохранения (консервации) вакцинной композиции.

Вакцинные композиции с консервантом

В соответствии с настоящим изобретением вакцинная композиция с консервантом содержит водорастворимый антимикробный полиамидный полимер. Эффективные полиамиды, в частности, включают полимеры В, С, D, U и Т.

Использованный в описании термин "консервирующее эффективное количество" имеет отношение к концентрации консервирующего вещества, достаточной для предотвращения роста загрязняющих микроорганизмов в многократно используемой вакцинной композиции.

Содержащая консервант иммуногенная композиция настоящего изобретения может быть устойчива к некоторым патогенам, включая *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp., *Edwardsiella* spp., *Hafnia* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Yersinia* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* spp., *Enterococci*, *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Mycobacterium* spp., *Prototheca* spp., *Mycoplasma* spp., *Erwinia* spp., *Lactobacillus* spp., в числе прочих.

В одном варианте осуществления содержащая консервант композиция включает бактериальный экстракт *Borrelia burgdorferi* (например, антигены, раскрытые в любом из патентов US 5,523,089, US 5,582,990, US 5,688,512, US 5,777,095 и US 6,083,722, Symbicom). В одном варианте осуществления антиген содержит вектор экспрессии, включающий *OspA* (например, как раскрывается в US 6,159,477 или US 6,368,603, оба от Merial).

В другом варианте осуществления включающая консервант многодозовая композиция содержит *E. Coli* бактерин-токсоид (например, J-VAC® от Merial). В других вариантах осуществления многодозовая композиция содержит один или более антигенов в следующих вакцинных композициях: LEPTODOG®, RECOMBITEK® (инактивированная вакцина против лептоспироза собак), вакцины против бешенства, включая ALURABIFFA® и RABISIN® (инактивированные вакцины против бешенства с адьювантом), SYNTOXAN® линия (вакцина против клостридий), NYORESP® (инактивированная вакцина для свиней против *Mycoplasma hyopneumoniae*), CIRCOVAC® (инактивированная вакцина против свиного цирковируса 2 (PCV2)), PARVORUVAX® (комбо вакцина против свиного парвовируса, реовируса и эризипилотрикса), птичьи инактивированные вакцины (для цыплят и индюшек): BIGOPEST®, BINEVVAX®, COR2®, GUMBOPEST®, GUMBORIFFA®, IMOPEST®, TUR3®, FLUVAC®, GALLIMUNE® серия для Breeder/Layer/Broiler: вакцины против болезни Ньюкасла (ND), (IBD) инфекционных бронхитов, гриппа H9N2, гриппа H5N9, синдрома снижения яйценоскости (EDS), синдрома опухания головы, REO вируса, (ART) птичьего ринотрахеита, (IB) инфекционного бурсита птиц.

В одном варианте осуществления композиция является многодозовой вакцинной композицией. В некоторых вариантах осуществления многодозовая вакцинная композиция является моновалентной композицией. В других вариантах осуществления многодозовая вакцинная композиция является поливалентной вакцинной композицией.

В тех вариантах осуществления, где многодозовая композиция является моновалентной композицией, антиген может включать один антиген, включая, антиген, выбранный из антигена, присутствующего в одной из следующих вакцин: LEPTODOG®, RECOMBITEK® (инактивированная вакцина против лептоспироза собак), вакцины против бешенства, включая ALURABIFFA® и RABISIN® (инактивированные вакцины против бешенства с адьювантом), SYNTOXAN® линия (вакцина против клостридий), NYORESP® (инактивированная вакцина для свиней против *Mycoplasma hyopneumoniae*), CIRCOVAC® (инактивированная вакцина против свиного цирковируса 2 (PCV2)) и PARVORUVAX® (комбо вакцина против свиного парвовируса, реовируса и эризипилотрикса).

В тех вариантах осуществления, где многодозовая композиция является поливалентной композицией, композиция содержит, по меньшей мере, два антигена, включая антигены, выбранные из числа приведенных далее: канарипокс-направленная чума собачьих, аденовирус типа 2, парагрипп, парвовирус

(MLV), *Leptospira Canicola* бактерин и *Leptospira icterohaemorrhagiae* бактерин (например, RECOM-BITEK® C6 от Merial). В другом варианте осуществления поливалентная композиция содержит: вакцину от энцефаломиелита-гриппа, восточного и западного, инактивированного вируса, столбнячного анатоксина (т.е. EQUINE EWTF от Merial).

Принимая во внимание вышеизложенное, можно видеть, что достигаются некоторые цели изобретения и другие полезные результаты. Поскольку различные изменения могут быть сделаны в вышеописанных композициях, продуктах и процессах, не выходя за рамки изобретения, предполагается, что материал, содержащийся в вышеприведенном описании и показанный в прилагаемых таблицах, будет интерпретироваться как иллюстративный и не в ограничивающем смысле.

При включении элементов настоящего изобретения или их предпочтительных вариантов осуществления "указанный" означает, что существуют один или более элементов. Термины "содержащий", "включающий" и "имеющий" имеют охватывающий характер и означают, что могут существовать дополнительные элементы, отличные от перечисленных элементов. Более того, термин "состоящий в основном из" означает, что могут существовать дополнительные элементы отличные от перечисленных элементов, однако не те элементы, которые рассматриваются как "активные ингредиенты" (например, неактивные эксципиенты). И наконец, термин "состоящий из" означает, что включаются только перечисленные элементы.

Если не указано иначе, технические термины используются в соответствии с общепринятым словоупотреблением. Определения обычных терминов в молекулярной биологии можно найти в Benjamin Lewin, *Genes V*, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, опубликованной Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); и Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, опубликованной VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

В одном аспекте изобретение предоставляет способ консервации (сохранения) многодозовой композиции, включая композиции, содержащие терапевтические биологические средства, вакцины и небольшие молекулы, включающий смешивание многодозовых композиций с инертным консервантом, выбранным из полиамидного полимера и октенидина, для получения многодозовой композиции с консервантом, тем самым сохраняя многодозовую композицию.

В некоторых вариантах осуществления изобретение предоставляет способ приготовления многодозовой композиции с консервантом, способ, включающий, состоящий в основном из или состоящий из следующих стадий: а) предоставление по меньшей мере двух эффективных доз одного или более активных фармацевтических ингредиентов (API); б) предоставление консервирующего эффективного количества инертного консерванта, выбранного из одного или более антимикробных полиамидных полимеров, октенидина и их комбинаций; в) объединение API и инертного консерванта с водным и/или масляным компонентом с целью получения многодозовой жидкой композиции, содержащей консервант; г) необязательно предоставление одного или более эксципиентов; д) необязательно предоставление контейнера для содержания жидкой композиции; е) необязательно стерилизацию и перенос жидкой композиции в контейнер; и г) необязательно сушку замораживанием, лиофилизацию и/или остеклование жидкой композиции; таким образом получение многодозовой композиции с консервантом; и при этом данная композиция не содержит ртутого консерванта.

Вышеприведенные стадии могут осуществляться на практике в любом приемлемом порядке. Например, инертный консервант(ы), API(s) и необязательно эксципиент могут быть помещены в смешительный сосуд, содержащий водный и/или масляный компонент. После тщательного перемешивания с получением раствора, суспензии, суспензии, эмульсии или мицеллярного раствора, жидкая композиция с консервантом затем может быть простерилизована посредством фильтрации и в асептических условиях перенесена в стерильные контейнеры, включая флаконы для вакцин. Эксципиент может включать любой фармацевтически или с точки зрения ветеринарии приемлемый эксципиент, включая эксципиенты, улучшающие растворимость инертного консерванта(ов). Более того, может быть приготовлена любая подходящая жидкая композиция с консервантом.

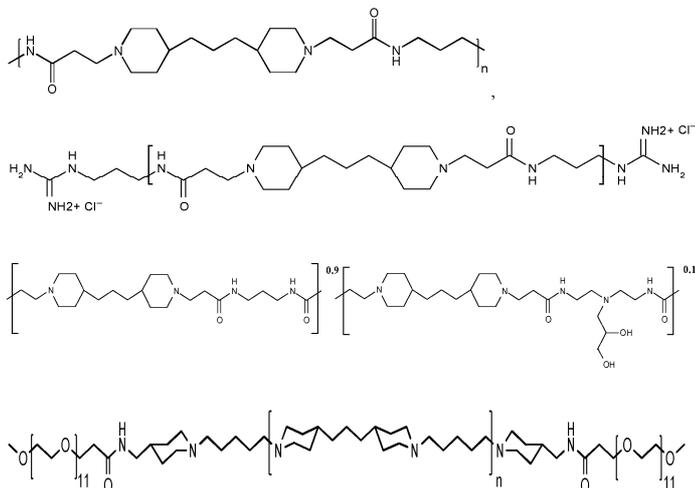
В конкретных вариантах осуществления жидкая композиция может представлять собой водный раствор, мицеллярный раствор, набухающий мицеллярный раствор, эмульсию масло-в-воде, эмульсию вода-в-масле или суспензию. В общем, для иммунологических или других биологических композиций с консервантом антиген или другой биологический препарат растворяется в водной фазе многофазной жидкой композиции. Эмульсии могут быть микроэмульсиями или "субмикронными" эмульсиями. Субмикронные эмульсии в описании в большинстве случаев называются "наноэмульсиями".

Более того, для того, чтобы считалось, что консервирующее вещество присутствует в многодозовых композициях, содержащих консервант, в "эффективном консервирующем количестве", композиции должны быть защищены от инокуляции микроорганизмами, как раскрывается в описании. Например, если количество бактерий, инокулированных в многодозовую композицию, содержащую консервант, уменьшается с течением времени, считается, что инертный консервант присутствует в эффективном консервирующем количестве. В другом примере консервант присутствует в эффективном консервирующем количестве, когда композиция, содержащая консервант, проходит тестирование, описанное в при-

мерах 1, 2 и/или 3.

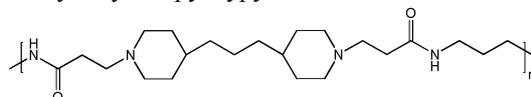
В другом аспекте изобретение предоставляет многодозовую композицию с консервантом, при этом: а) композиция содержит, по меньшей мере, две эффективных дозы одного или более активных фармацевтических ингредиентов (API) и эффективное консервирующее количество нертутного консерванта, выбранного из одного или более антимицробных полиамидных полимеров, октенидина и их комбинаций; или б) композиция изготавливается в соответствии с раскрытым способом приготовления многодозовой композиции с консервантом; при этом композиция не содержит ртутного консерванта.

В некоторых вариантах осуществления многодозовая композиция с консервантом содержит полиамидный полимер, выбранный из



и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления многодозовая композиция с консервантом содержит полиамидный полимер, имеющий следующую структуру:



при этом средневесовой молекулярный вес (WAMW) составляет примерно от 1,0 до 15,0 kDa, как измерено с помощью эксклюзионной хроматографии. В других вариантах осуществления полиамид может иметь WAMW примерно от 2,0 до 10 kDa. В следующих вариантах осуществления полиамид может иметь WAMW примерно от 2,5 до 7,76 kDa или имеет WAMW около 7,76 kDa.

В другом аспекте изобретение предоставляет иммуногенную композицию, содержащую, по меньшей мере, один антиген и, кроме того, содержащую, по меньшей мере, около 0,01 мг/мл полиамидного полимера или, по меньшей мере, около 0,1 мг/мл октенидина. В иммуногенной композиции полиамидный полимер или октенидин может присутствовать в концентрации примерно от 0,05 до 5 мг/мл или примерно от 0,1 до 0,25 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления полиамидный полимер или октенидин присутствует в концентрации примерно 0,1 мг/мл, около 0,125 мг/мл или около 0,25 мг/мл. Теперь, когда изобретение раскрыто, специалист может осуществить определенное регулирование концентраций этих безопасных и эффективных нертутных консервантов для достижения желательной консервирующей эффективности.

В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит не менее чем около 0,1 мг/мл полиамидного полимера. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит не менее чем около 0,1 мг/мл октенидина.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция дополнительно содержит адъювант. Подходящими адъювантами для применения на практике настоящего изобретения являются (1) полимеры акриловой или метакриловой кислоты, полимеры малеинового ангидрида и алкенильного производного, (2) иммуностимулирующие последовательности (ISS), такие как олигодезоксирибонуклеотидные последовательности, имеющие одну или более неметилированных CpG единиц (Klinman et al., 1996; WO 98/16247), (3) эмульсия масло-в-воде, такая как эмульсия SPT, описанная на странице 147 "Vaccine Design, The Subunit и Adjuvant Approach", опубликованной M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, и эмульсия MF59, описанная на странице 183 той же самой работы, (4) катионные липиды, содержащие четвертичную аммониевую соль, например, DDA (5) цитокины, (6) гидроокись алюминия или фосфат алюминия, (7) сапонин (включая, сапонины из коры Quillaja saponaria), (8) другие адъюванты, которые обсуждаются в любом из цитируемых в описании документов, включенные путем отсылки в настоящую заявку, или (9) любые комбинации или их смеси.

Эмульсия масло-в-воде (3), подходящая в частности для вирусных векторов, может быть основана

на: легком вазелиновом масле (стандарт Европейской фармакопеи), изопреноидном масле, таком как сквалан, сквален, масле, полученном в результате олигомеризации алкенов, например, изобутена или децена, сложных эфирах кислот или спиртов, имеющих прямую алкильную группу, таких как растительные масла, этилолеат, пропиленгликоль, ди(каприлат/капринат), глицерин три(каприлат/капринат) и пропиленгликоль диолеат, или сложных эфирах разветвленных жирных спиртов или кислот, в частности сложных эфирах изостеариновой кислоты. Масло используется в комбинации с эмульгаторами для образования эмульсии. Эмульгаторы могут быть неионными поверхностно-активными веществами, такими как: сложные эфиры с одной стороны сорбитана, маннида (например, ангидроманнитол олеат), глицерина, полиглицерина или пропиленгликоля и с другой стороны олеиновой, изостеариновой, рицинолевой или гидроксистеариновой кислот, указанные сложные эфиры необязательно являются этоксилированными, или полиоксипропилен-полиоксиэтилен блок-сополимерами, такими как плуроник, например, L121.

Из числа адьювантных полимеров типа (1) предпочтение отдается полимерам поперечно-связанной акриловой или метакриловой кислоты, в частности, поперечно-связанным полиалкениловыми эфирами Сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения известны под названием карбомер (Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, June 1996). Специалист также может сослаться на патент US 2,909,462, который предоставляет такие акриловые полимеры, поперечно-сшитые полигидроксильным соединением, имеющим, по меньшей мере, три гидроксильных группы, предпочтительно не более восьми таких групп, атомы водорода, по меньшей мере, трех гидроксильных групп являются замененными ненасыщенными, алифатическими радикалами, имеющими, по меньшей мере, два атома углерода. Предпочтительными радикалами являются радикалы, содержащие от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллилы и другие этиленненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы также могут содержать другие заместители, такие как метил. Продукты, продаваемые под названием карбопол (BF Goodrich, Ohio, США), являются особенно подходящими. Они являются поперечно-сшитыми аллил-сахарозой или аллил пентаэритритолом. В том числе, делается ссылка на карбопол 974P, 934P и 971P.

В некоторых вариантах осуществления антигенность иммуногенной композиции является стабильной в течение не менее чем 1 года; 1,5 лет; 2 лет или 2,5 лет.

В других вариантах осуществления после инокуляции иммуногенной композиции (или другой композиции с добавлением консервантов) одним или более микроорганизмами, концентрация указанных микроорганизмов уменьшается с течением времени благодаря присутствию консерванта. Когда это уменьшение наблюдается, считается, что нертутный консервант присутствует в "эффективном консервирующем количестве".

В некоторых вариантах осуществления после инокуляции одним или более штаммами бактерий в иммуногенной композиции (или другой композиции с добавлением консервантов) наблюдается, по меньшей мере, 1,0 log сокращения количества от первоначального количества микроорганизмов через 24 ч, по меньшей мере, 3,0 log сокращения через 7 дней от ранее измеренного значения и не более чем 0,5 log увеличения через 28 дней от ранее измеренного значения.

В следующих вариантах осуществления после инокуляции одним или более штаммами бактерий в иммуногенной композиции (или другой композиции с добавлением консервантов) наблюдается, по меньшей мере, 2,0 log сокращения от первоначального подсчитанного количества через 6 ч после инокуляции, по меньшей мере, 3,0 log сокращения через 24 часа от ранее определенного значения и отсутствует восстановление через 28 дней.

В некоторых вариантах осуществления один или более микроорганизмов выбирают из *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* и *B. subtilis*.

В других вариантах осуществления иммуногенная композиция (или другая композиция с консервантом) инокулируется несколько раз. Например, вторая инокуляция может происходить через 6 ч после первоначальной инокуляции, третья инокуляция может происходить через 24 ч после первоначальной инокуляции, четвертая инокуляция может происходить через 7 дней после первоначальной инокуляции, и пятая инокуляция происходит через 14 дней после первоначальной инокуляции.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция (или другая композиция с консервантом) может дополнительно содержать одно или более из числа буфера, криопротектора, соли, двухвалентного катиона, неионного поверхностно-активного вещества и ингибитора свободно-радикального окисления.

В другом аспекте изобретение предоставляет флакон, содержащий иммуногенную композицию (или другую композицию с консервантом), раскрытую в описании.

В некоторых вариантах осуществления флакон может содержать более чем две дозы иммуногенной композиции (или другой композиции с консервантом).

В другом аспекте раскрытие предоставляет многодозовую композицию с консервантом, изготовленную в соответствии с раскрытыми способами.

В другом аспекте раскрытие предоставляет иммуногенную композицию, содержащую по меньшей мере один антиген и, по меньшей мере, примерно от 0,01 до 0,25 мг/мл полиамидного полимера или, по меньшей мере, примерно от 0,1 мг/мл до 1,0 мг/мл октенидина.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция (или другая композиция с кон-

сервантом) содержит примерно от 0,05 до 5 мг/мл, или примерно от 0,1 до 0,25 мг/мл полиамидного полимера или октенидина.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция (или другая композиция с консервантом) содержит примерно от 0,1 до 0,25 мг/мл полиамидного полимера или октенидина.

В других вариантах осуществления иммуногенная композиция (или другая композиция с консервантом) содержит не менее чем примерно 0,1 мг/мл полиамидного полимера.

В следующих вариантах осуществления иммуногенная композиция (или другая композиция с консервантом) содержит не менее чем примерно 0,1 мг/мл октенидина.

В некоторых вариантах осуществления буферные растворы, содержащие относительно низкие количества солей, включая, в частности, фосфатные соли, добавляются к иммуногенной композиции или другой многодозовой композиции с консервантом с целью повышения растворимости октенидина. Это основывается на неожиданном открытии Заявителей, что октенидин хуже растворяется в обычно используемом фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Для решения проблемы, связанной с плохой растворимостью, заявители проверили целый ряд модификаций и окончательно установили, что замена фосфата натрия бикарбонатом натрия обеспечивает необходимую растворимость. По этой причине в некоторых вариантах осуществления многодозовые композиции, включающие октенидин, содержат меньше фосфата, чем стандартный PBS. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления буфер может содержать на 100 л около 5 г NaH_2PO_4 и около 200 г бикарбоната натрия (вместо стандартного PBS, имеющего отношение Na_2HPO_4 к KH_2PO_4 примерно 20:1).

В некоторых вариантах осуществления буфер может содержать относительно меньше NaCl , причем осмоляльность сохраняется при помощи компенсирующего добавления соответствующего количества глюкозы. Кроме того, в буфер могут быть добавлены дополнительные двухвалентные ионы, CaCl_2 и MgCl_2 .

В некоторых вариантах осуществления при использовании бикарбоната вместо фосфата количество фосфата уменьшается в 50 раз по сравнению со стандартным PBS.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит адьювант.

В одном варианте осуществления иммуногенной композиции антигенность иммуногенной композиции является стабильной в течение не менее 1 года; 1,5 лет; 2 лет или 2,5 лет.

В общем, "стабильная" многодозовая композиция демонстрирует отсутствие неприемлемых уровней роста микроорганизмов и практически отсутствие или отсутствие распада или деградации активного биологического или низкомолекулярного компонента. При использовании в описании "стабильная иммуногенная композиция" представляет собой композицию с консервантом, которая остается способной вызывать желаемый иммунологический ответ при введении намеченному животному. Стабильные иммуногенные композиции часто включают такие композиции, которые теряют не более половины \log активности в течение некоторого заданного периода времени. Например, "стабильная, по меньшей мере, в течение 1 года" означает, что иммуногенная композиция с начальным титром активности около $X \log 10 \text{CCID}_{50}/\text{дозу}$ будет сохраняться, по меньшей мере, активность около $(X-0,5) \log 10 \text{CCID}_{50}/\text{дозу}$, по меньшей мере, в течение одного года после приготовления иммуногенной композиции с консервантом (например, помещенная в стерильный контейнер; или ресуспендированная из лиофилизированной "таблетки", содержащейся в стерильном флаконе).

В отдельных вариантах осуществления содержащие консервант, многократно используемые композиции, включая иммуногенные композиции с консервантом, остаются стабильными в течение определенного периода времени, при том что проводятся неоднократные повторные инокуляции/проникновения в многодозовые контейнеры. В таких случаях такой термин, как "стабильная, по меньшей мере, в течение одного года при использовании до десяти раз" может использоваться для описания композиции с консервантом, содержащейся в многодозовом контейнере. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления многодозовые композиции остаются стабильными даже при проведении 10, 15, 20, 30, 40, 50 или даже 100 инокуляций/проникновений во флакон.

В некотором варианте осуществления после инокуляции иммуногенной композиции одним или более микроорганизмами, концентрация указанных микроорганизмов уменьшается с течением времени. При использовании в описании "инокуляция композиции" в большинстве случаев относится к введению в композицию постороннего объекта (например, иглы для подкожных инъекций), который может нести потенциально загрязняющие микроорганизмы. Примером инокуляции композиции является повторное введение иглы во флакон, содержащий многодозовую вакцинную композицию. Другим примером является повторное введение игл во флакон, содержащий многодозовую вакцинную композицию. Каждый из вышеперечисленных случаев является примером "инокуляции" в контексте настоящего документа.

В некоторых вариантах осуществления после инокуляции иммуногенной композиции одним или более штаммами бактерий, в композиции наблюдается по меньшей мере $1.0 \log$ сокращения от исходного количества микроорганизма через 24 ч, по меньшей мере $3.0 \log$ сокращения через 7 дней после первоначально измеренного значения и не более чем $0,5 \log$ увеличения через 28 дней после первоначально измеренного значения.

В других вариантах осуществления после инокуляции иммуногенной композиции в композиции

наблюдается по меньшей мере 2.0 log сокращения от первоначально подсчитанного количества через 6 ч после инокуляции, по меньшей мере 3.0 log сокращения через 24 ч после первоначально измеренного значения и не наблюдается восстановления через 28 дней. В некоторых вариантах осуществления один или более микроорганизмов выбирают из группы, состоящей из *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* и *B. subtilis*.

В некоторых вариантах осуществления композиция инокулируется несколько раз, включая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более раз. Любое число инокуляций более 1 предусматривается заявителями.

В некоторых вариантах осуществления вторая инокуляция происходит через 6 часов после первоначальной инокуляции, третья инокуляция происходит через 24 ч после первоначальной инокуляции, четвертая инокуляция происходит через 7 дней после первоначальной инокуляции и пятая инокуляция происходит через 14 дней после первоначальной инокуляции.

В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит одно или более из числа буфера, криопротектора, соли, двухвалентного катиона, неионного поверхностно-активного вещества и ингибитора свободно-радикального окисления.

В одном варианте осуществления раскрытие предоставляет флакон, содержащий многодозовую иммуногенную или другую композицию, содержащую активное вещество.

В одном варианте осуществления флакон содержит более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 доз иммуногенной композиции.

В одном варианте осуществления раскрытие предоставляет предварительно наполненное устройство для доставки вакцины, содержащее многодозовую композицию, включающую биологические или низкомолекулярные активные ингредиенты. В некоторых вариантах осуществления устройство включает шприц. В других вариантах осуществления устройство содержит двухкамерный или многокамерный шприц или флаконы или их сочетания. В следующих вариантах осуществления предварительно наполненное устройство для доставки вакцины содержит мультивалентную иммуногенную композицию, предназначенную для внутримышечной или подкожной инъекции.

В одном варианте осуществления контейнер содержит две дозы или более мультивалентной иммуногенной композиции по п.7, при этом каждая доза содержит от 0,1 до 2 мл композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит полиамидный полимер при концентрации в пределах примерно от 0,1 мг/дозу до 0,25 мг/дозу или в пределах примерно от 0,05 мг/дозу до 0,125, при этом объем дозы составляет 0,5 мл.

Следующие примеры предназначены для дальнейшей иллюстрации и объяснения настоящего изобретения. Следовательно, примеры не должны считаться ограничивающими рамки изобретения или способа, с помощью которого оно может применяться на практике.

Примеры

Как описано далее, были протестированы антимикробные полиамидные полимеры и октенидин, и было показано, что они являются эффективными консервирующими средствами для вакцин. Табл. 2 показывает сравнение USP и EP требований к тестированию антимикробной эффективности в отношении консервирующих веществ для вакцин.

Таблица 2. USP и EP требования к тестированию антимикробной эффективности

Время	USP	EP A	EP B
Требования к log сокращению бактерий			
6 час	Не требуется	2	Не требуется
24 час	Не требуется	3	1
7 дней	1	Восстановления нет	3
14 дней	3	Восстановления нет	Увеличения нет
28 дней	Увеличения нет	Восстановления нет	Увеличения нет
Требования к log сокращению грибов			
7 дней	Увеличения нет	2	Увеличения нет
14 дней	Увеличения нет	Увеличения нет	1
28 дней	Увеличения нет	Увеличения нет	Увеличения нет

Meyer B.K. "Antimicrobial Preservative Use in Parenteral Products: Past и Present," Merck Research Laboratories. J. of Pharmaceutical Sciences, 2007.

Табл. 3 и 4 представляют критерии приемлемости/Европейская Фармакопея (§ 5.1.3) и Европейская Фармакопея в отношении применения вакцин в ветеринарии.

Таблица 3. Критерии приемлемости/Европейская фармакопея (Sec. 5.1.3)

	6 час	24 час	7 дней	14 дней	28 дней
Бактерии	2 log	3 log	-	-	NR
	-	1 log	3 log	-	NI
Грибы	-	-	2 log	-	NI
	-	-	-	1 log	NI

NR: восстановление не наблюдается.

NI: Отсутствует увеличение количества жизнеспособных микроорганизмов по сравнению с предшествующим подсчетом

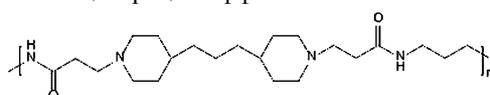
Таблица 4. Критерии приемлемости/Европейская Фармакопея в отношении применения вакцин в ветеринарии

	24 час	14 дней	28 дней
	7 дней		
Бактерии	NI	3 log	NI
Грибы	-	NI	NI

NI: Отсутствует увеличение количества жизнеспособных микроорганизмов по сравнению с предшествующим подсчетом.

Пример 1. Исследование полиамидного консерванта.

Meyer et al. (J. Pharm. Sc. 96(12):3155-67; 2007) показали следующие результаты в отношении минимальной ингибирующей концентрации (MIC) для тимеросала: 4-8 мкг/мл (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*); 0,2 мкг/мл (*Staphylococcus aureus*); 32 мкг/мл (*Candida albicans*); 128 мкг/мл (*Aspergillus niger*). Кроме того, концентрация тимеросала в различных вакцинах Merial для ветеринарии составляет от 0,005% до 0,01% (= примерно от 50 до 100 мкг/мл). Исходя из вышеизложенного, три разных дозы полиамидного полимера были выбраны в качестве начальной точки (0,1; 1 и 10 мг/мл). Заявители не могли заранее предугадать, будут ли эти концентрации эффективными.



Полимер "В"; MW = 7.6 kDa (см. табл. 1).

Таблица 5. Консервирующая эффективность полиамидного полимера (А и В являются критериями из Европейской Фармакопеи)

Критерии	S. aureus			P. aeruginosa			C. albicans			A. brasiliensis		
	0.1	1	10	0.1	1	10	0.1	1	10	0.1	1	10
А критерии	+			+			+			-		
В критерии	+			+			+			-		
USP	+			+			+			+		
Ветеринарное применение	+			+			+			+		

Результаты, удовлетворяющие Vet и USP, были получены при использовании трех доз. Эффекта низких доз не наблюдалось, показывая, что оптимальная доза составляет, вероятно, менее 100 мкг/мл.

Методика. Для каждой концентрации полиамидного полимера, нейтрализацию разбавлением проводили путем инокуляции 10 мл тестируемого продукта 100 мкл каждого тестируемого штамма. Подсчет проводили на моменты времени День 0, 6 ч (только бактерии), 24 ч (только бактерии), День 7, День 4 и День 28. Для проведения каждого подсчета 1 мл образца был нейтрализован в 9 мл нейтрализующего раствора (10 мин), (в отношении *S. Aureus*), а второе разведение 1:10 проводили в том же самом растворе. Затем 1 мл смеси переносили в чашки Петри и покрывали 15 мл среды с агаром (трипказо-соевый агар для бактерий и сабуро-декстрозный агар для грибов и плесеней).

Подсчет проводили после 24-48 ч инкубации при $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ для бактерий и 48-72 ч при $22,5^\circ\text{C} \pm 25^\circ\text{C}$ для дрожжей и плесеней. Тестируемые микроорганизмы включали *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* и *Aspergillus brasiliensis*. Наконец, нейтрализующий раствор содержал: Твин 80 (10%), лецитин (2%), сапонин (2%), натрия тиосульфат (0,5%) и забуференный раствор хлорида натрия. Сапонин был выделен из коры *Quillaja saponaria*.

Таблица 6. Консервирующая эффективность полиамидного полимера при 0,1 мг/мл

A0202-32B – 0,1 мг/мл												
	S. aureus			P. aeruginosa			C. albicans			A. brasiliensis		
Инокулум	8×10^6			$7,9 \times 10^5$			$1,7 \times 10^5$			$1,9 \times 10^5$		
T0	2×10^3			$4,9 \times 10^3$			$2,6 \times 10^2$			$4,1 \times 10^5$		
6 час	<	> 5.3		<	> 4.9		-			-		
	10	log		10	log							
24 час	<	> 5.3		<	> 4.9		-			-		
	10	log		10	log							
7 дней	<	> 5.3		<	> 4.9		<	> 4.2		9.7 x	0.3	
	10	log		10	log		10	log		10^4	log	
14 дней	<	> 5.3		<	> 4.9		<	> 4.2		1.0 x	0.3	
	10	log		10	log		10	log		10^5	log	
28 дней	<	> 5.3		<	> 4.9		<	> 4.2		6.6 x	0.5	
	10	log		10	log		10	log		10^4	log	
А критерии	+			+			+			-		
В критерии	+			+			+			-		
Ветеринарное применение	+			+			+			+		

Таблица 7. Консервирующая эффективность полиамидного полимера при 1,0 мг/мл

A0202-32B – 1.0 мг/мл								
	S. aureus		P. aeruginosa		C. albicans		A. brasiliensis	
Инокулум	8 x 10 ⁶		7.9 x 10 ⁵		1.7 x 10 ⁵		1.9 x 10 ⁵	
T0	8 x 10 ³		4.9 x 10 ³		10		3.3 x 10 ⁵	
6 час	< 10	> 5.3 log	< 10	> 4.9 log	-		-	
24 час	< 10	> 5.3 log	< 10	> 4.9 log	-		-	
7 дней	< 10	> 5.3 log	< 10	> 4.9 log	< 10	> 4.2 log	9.1 x 10 ⁴	0.3 log
14 дней	< 10	> 5.3 log	< 10	> 4.9 log	< 10	> 4.2 log	9.6 x 10 ⁴	0.3 log
28 дней	< 10	> 5.3 log	< 10	> 4.9 log	< 10	> 4.2 log	6.3 x 10 ⁴	0.5 log
А критерии	+		+		+		-	
В критерии	+		+		+		-	
Ветеринарное применение	+		+		+		+	

Таблица 8. Консервирующая эффективность полиамидного полимера при 10 мг/мл

A0202-32B – 10 мг/мл								
	S. aureus		P. aeruginosa		C. albicans		A. brasiliensis	
Инокулум	8 x 10 ⁶		7.9 x 10 ⁵		1.7 x 10 ⁵		1.9 x 10 ⁵	
T0	2.3 x 10 ⁵		3 x 10 ³		7.2 x 10 ²		3.9 x 10 ⁵	
6 час	< 10	> 4.3 log	< 10	> 4.9 log	-		-	
24 час	< 10	> 4.3 log	< 10	> 4.9 log	-		-	
7 дней	< 10	> 4.3 log	< 10	> 4.9 log	< 10	> 4.2 log	4.4 x 10 ⁴	0.6 log
14 дней	< 10	> 4.3 log	< 10	> 4.9 log	< 10	> 4.2 log	4.4 x 10 ⁴	0.6 log
28 дней	< 10	> 4.3 log	< 10	> 4.9 log	< 10	> 4.2 log	1.8 x 10 ⁴	1 log
А критерии	+		+		+		-	
В критерии	+		+		+		-	
Ветеринарное применение	+		+		+		+	

Пример 2. Исследование консервирующего действия октенидина Методика. Для каждой концентрации октенидина было сделано нейтрализующее разведение, как раскрывается в примере 1.

Таблица 9. Консервирующая эффективность октенидина дигидрохлорида (1 мг/мл)

Октенидина Дигидрохлорид – 1 мг/мл								
	S. aureus		P. aeruginosa		C. albicans		A. brasiliensis	
Инокулум	1.0 x 10 ⁶		1.2 x 10 ⁶		1.9 x 10 ⁵		1.9 x 10 ⁵	
T0	< 10 ²		< 10		< 10		1.6 x 10 ⁵	
6 час	< 10 ²	> 4 log	< 10	> 5.1 log	-		-	
24 час	< 10 ²	> 4 log	< 10	> 5.1 log	-		-	
7 дней	< 10 ²	> 4 log	< 10	> 5.1 log	< 10	> 4.3 log	2.9 x 10 ⁴	0.8 log
14 дней	< 10 ²	> 4 log	< 10	> 5.1 log	< 10	> 4.3 log	1.7 x 10 ⁴	1 log
28 дней	< 10 ²	> 4 log	< 10	> 5.1 log	< 10	> 4.3 log	1.4 x 10 ⁴	1.1 log
А критерии	+		+		+		-	
В критерии	+		+		+		+	
Ветеринарное применение	+		+		+		+	

Таблица 10. Консервирующая эффективность октенидина дигидрохлорида (0,1 мг/мл)

Октенидина Дигидрохлорид – 0,1 мг/мл								
	S. aureus		P. aeruginosa		C. albicans		A. brasiliensis	
Инокулум	1.0 x 10 ⁶		1.2 x 10 ⁶		1.9 x 10 ⁵		1.9 x 10 ⁵	
T0	< 10		< 10		< 10		1.7 x 10 ⁵	
6 час	< 10 ²	> 5 log	< 10	> 5.1 log	-		-	
24 час	< 10 ²	> 5 log	< 10	> 5.1 log	-		-	
7 дней	< 10 ²	> 5 log	50	4.4 log	< 10	> 4.3 log	7.5 x 10 ⁴	0.4 log
14 дней	< 10 ²	> 5 log	< 10	> 5.1 log	< 10	> 4.3 log	1.0 x 10 ⁴	1.3 log
28 дней	< 10 ²	> 5 log	< 10	> 5.1 log	< 10	> 4.3 log	2.8 x 10 ⁴	0.8 log
А критерии	+		+		+		-	
В критерии	+		+		+		+	
Ветеринарное применение	+		+		+		+	

Таблица 11. Консервирующая эффективность октенидина дигидрохлорида (0,01 мг/мл)

Октенидина Дигидрохлорид – 0,01 мг/мл								
	S. aureus		P. aeruginosa		C. albicans		A. brasiliensis	
Инокулум	1.0 x 10 ⁶		1.2 x 10 ⁶		1.9 x 10 ⁵		1.9 x 10 ⁵	
T0	10		< 10		2 x 10 ³		2.8 x 10 ⁵	
6 час	< 10	> 5 log	< 10	> 5.1 log	-		-	
24 час	< 10	> 5 log	< 10	> 5.1 log	-		-	
7 дней	< 10	> 5 log	< 10	4.4 log	< 10	> 4.3 log	3.8 x 10 ⁴	0.7 log
14 дней	< 10	> 5 log	< 10	4.4 log	< 10	> 4.3 log	3.2 x 10 ⁴	0.8 log
28 дней	< 10	> 5 log	< 10	4.4 log	< 10	> 4.3 log	3.1.0 x 10 ⁴	0.8 log
А критерии	+		+		+		-	
В критерии	+		+		+		-	
Ветеринарное применение	+		+		+		+	

Таблица 12. Консервирующая эффективность октенидина дигидрохлорида (0,001 мг/мл)

Октенидина Дигидрохлорид – 0,001 мг/мл								
	S. aureus		P. aeruginosa		C. albicans		A. brasiliensis	
Инокулум	1.0 x 10 ⁶		1.2 x 10 ⁶		1.9 x 10 ⁵		1.9 x 10 ⁵	
T0	1.6 x 10 ⁵		7.5 x 10 ⁴		1.7 x 10 ⁵		2.4 x 10 ⁵	
6 час	1.6 x 10 ²	3.8 log	1.0 x 10 ³	3 log	-		-	
24 час	< 10	> 5 log	1.0 x 10 ⁴	3 log	-		-	
7 дней	2 x 10 ²	3.7 log	> 3.3 x 10 ⁶	0 log	20	4 log	1.7 x 10 ⁵	0 log
14 дней	1.4 x 10 ²	3.9 log	> 3.3 x 10 ⁶	0 log	10	4.3 log	1.4 x 10 ⁵	0.1 log
28 дней	40	4.4 log	> 3.3 x 10 ⁶	0 log	< 10	> 4.3 log	1.0 x 10 ⁵	0.3 log
А критерии	-		-		+		-	
В критерии	+		-		+		-	
Ветеринарное применение	+		-		+		+	

Таблица 13. Сводная таблица консервирующей эффективности октенидина

Критерии	S. aureus				P. aeruginosa				C. albicans				A. brasiliensis			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Доза (мг/мл) A = 0,001 мг/мл B = 0,01 мг/мл C = 0,1 мг/мл D = 1 мг/мл																
А критерии					+								-	-	-	-
В критерии					-								-	-	+	+
USP					-		+									
Ветеринарное применение					-								+			

Таблица 14. Краткий обзор полимера и октенидина как консервантов для вакцин

Критерии	пол(имидо-амин)	Октенидин
Эффективность	MIC ≤ 0,25 мкг/мл Широкий спектр Без активных антибиотиков	MIC ≤ 1 мкг/мл Широкий спектр Без активных антибиотиков
Безвредность	Данные по цитотоксичности и пред. токс. IV/IP/перорально на мышах/крысах MTD примерно от 10 до 25 мг/кг IC ₅₀ гемолиз > 5000 мг/мл Благоприятный терапевтический индекс	Результаты по цитотоксичности не показали какого-либо побочного действия на заживление раны LD ₅₀ на крысах = 10 мг/кг
Оценка пищевой безопасности	Отсутствие MRL Ogal, IP и IV данных, связанных с токсичностью	MRL (накожная обработка) ADI = 37,5 мкг/индивид. EMA/CVMP/735219/2009

MTD оценивали с помощью IP, IV и перорального введения на мышах и крысах; и при интра-маммарном введении у коров (смотри США 2014/0271526 (Merial, Inc.) и США 2014/0275469 (Genzyme)).

Терапевтический индекс (ТИ) оценивали как величину, кратную MIC для мышинной (IP) MTD.

Пример 3. Исследование консервирующей эмульсии масло-в-воде.

Методика. Для каждой концентрации консерванта (или комбинации консервантов), нейтрализацию разбавлением и другое тестирование проводили, как раскрывается в примере 1. Композиция "TS6" представляет собой эмульсию масло-в-воде, описанную в США 7,371,395 B2 (Merial, Inc.; см пример 1). Для каждой композиции (см. табл. 15) TS6 антигенный компонент состоял из вирусоподобных частиц (VLPs) цирковируса свиней 2 (PCV2) и инактивированных Mycoplasma hyopneumoniae (M. hyo) (см. США 7,371,395 B2, примеры 3 и 5).

Таблица 15. Сводная таблица условий тестирования и результатов

ID	Формула	Консервант	Критерии Фармакопеи для ветеринарии				Фармакопея для человека	
			S. aureus	P. aeruginosa	C. albicans	A. brasiliensis	Crit. A	Crit. B
A	TS6	POL 250 мкг/мл	+	+	+	+	+	+
B	TS6	POL 500 мкг/мл	+	+	+	+	+	+
C	TS6	POL 100 мкг/мл + Тиомерсал 25 мкг/мл	+	+	+	+	+	+
D	TS6	Тиомерсал 25 мкг/мл	+	+	+	+	-*	-*
E	TS6	OCT 250 мкг/мл	+	-	+	+	-*	-
F	TS6	POL + OCT 100/100 мкг/мл	+	+	+	+	-	+

* для S. aureus.

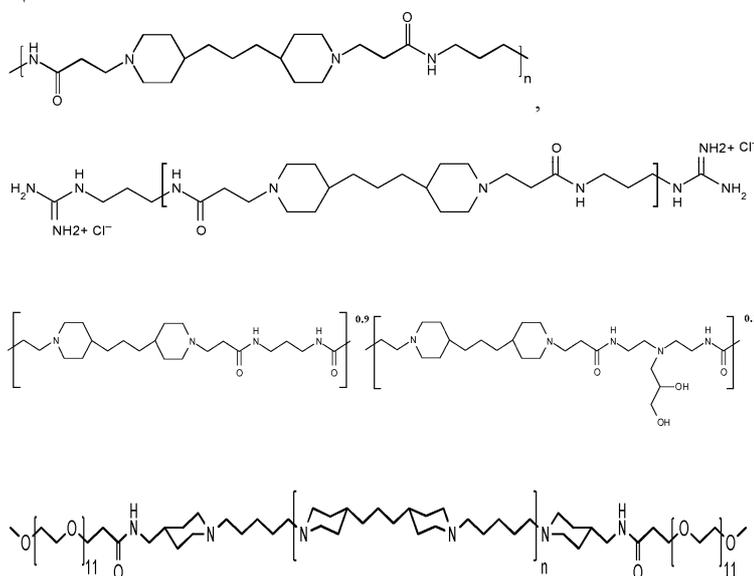
Взятые в совокупности и представленные в примерах 1-3 (и на всем протяжении этого раскрытия) результаты показывают, что и полиамидный полимер и октенидин являются безопасными и эффективными консервантами для вакцин. Наконец, пример 3 демонстрирует, что полиамидные полимеры и октенидин являются эффективными консервантами в значительно неблагоприятной среде для вакцин: эмульсии масло-в-воде. Например, эта сложная композиция предоставляет много возможностей для нежелательного взаимодействия с протеинами и поверхностно-активными веществами, которые могут ухудшать консервирующую эффективность полиамидных полимеров и/или октенидина. Фактически в предшествующем эксперименте Заявители показали, что 100 мкг/мл любого полиамидного полимера или ок-

тенидина в отдельности не продемонстрировали удовлетворительную консервирующую эффективность в этой масляной среде для вакцины. Соответственно, было весьма неожиданно наблюдать положительные результаты, суммированные в табл. 15. И наконец, антимикробные полиамидные полимеры продемонстрировали неожиданную эффективность, превосходящую октенидин и ртутный консервант, тиомерсал, в масляной среде для вакцины.

Таким образом, при наличии подробно описанных предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения, следует понимать, что изобретение, охарактеризованное вышеприведенными примерами, не ограничивается конкретными подробностями, изложенными в приведенном выше описании, поскольку возможны многие очевидные их изменения без отступления от существа или объема настоящего изобретения.

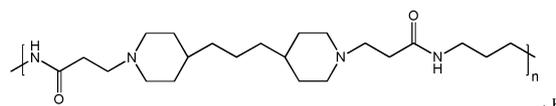
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная многодозовая композиция в форме эмульсии масло-вводе, которая содержит по меньшей мере две дозы по меньшей мере одного антигена и эффективное консервирующее количество, достаточное для предотвращения роста загрязняющих микроорганизмов в многократно используемой иммуногенной многодозовой композиции, составляющее от около 0,05 мг/мл до около 5 мг/мл композиции, нертутного консерванта, представляющего собой антимикробный полиамидный полимер, выбранный из группы, состоящей из



и их комбинаций, где n представляет собой целое число от 1 до 400, композиция не содержит ртутный консервант и микроорганизмы представляют собой *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp., *Edwardsiella* spp., *Hafnia* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Yersinia* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* spp., *Enterococci*, *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Mycobacterium* spp., *Prototheca* spp., *Mycoplasma* spp., *Erwinia* spp., *Lactobacillus* spp., и их комбинации.

2. Иммуногенная многодозовая композиция по п.1, в которой полиамид имеет следующую структуру:



и его средневесовой молекулярный вес (WAMW) составляет примерно от 1,0 до 15,0 kDa, как определено с помощью эксклюзионной хроматографии.

3. Иммуногенная многодозовая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой полиамид имеет WAMW примерно от 2,0 до 10 kDa.

4. Иммуногенная многодозовая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой полиамид имеет WAMW примерно от 2,5 до 7,76 kDa, или имеет WAMW около 7,76 kDa.

5. Иммуногенная многодозовая композиция по любому из предшествующих пунктов, которая содержит антимикробный полиамидный полимер в концентрации примерно от 0,1 до 0,25 мг/мл композиции.

6. Иммуногенная многодозовая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой ан-

тимикробный полиамидный полимер имеет концентрацию около 0,25 мг/мл композиции.

7. Иммуногенная многодозовая композиция по любому из предшествующих пунктов, которая дополнительно содержит адъювант.

8. Иммуногенная многодозовая композиция по любому из предшествующих пунктов, у которой антигенность является стабильной в течение не менее 1 года, 1,5 лет, 2 лет или 2,5 лет и которая остается стабильной, несмотря на по меньшей мере десятикратное использование.

9. Иммуногенная многодозовая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой после инокуляции композиции одним или более микроорганизмами концентрация указанных микроорганизмов уменьшается с течением времени, предпочтительно при этом в композиции наблюдается по меньшей мере 1.0 log сокращение от первоначально подсчитанного количества микроорганизмов через 24 ч по меньшей мере 3.0 log сокращение через 7 дней от ранее определенного значения и не более, чем 0,5 log увеличение через 28 дней от первоначально определенного значения.

10. Иммуногенная многодозовая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой после инокуляции одним или более микроорганизмами в композиции наблюдается по меньшей мере 2,0 log сокращение между организмом от первоначально подсчитанного количества через 6 ч после инокуляции по меньшей мере 3,0 log сокращение через 24 ч от первоначально определенного значения и не наблюдается восстановления через 28 дней.

11. Иммуногенная многодозовая композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой один или более микроорганизмов выбирают из *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* и их комбинаций.

12. Иммуногенная многодозовая композиция по любому из предшествующих пунктов, которая дополнительно содержит одно или более из числа буфера, криопротектора, соли, двухвалентного катиона, неионного поверхностно-активного вещества и ингибитора свободно-радикального окисления.

13. Предварительно наполненное устройство для доставки иммуногенной многодозовой композиции, содержащее иммуногенную многодозовую композицию по любому из предшествующих пунктов.

14. Предварительно наполненное устройство для доставки вакцины по п.13, которое представляет собой шприц, а иммуногенная многодозовая композиция предназначена для внутримышечной или подкожной инъекции.

