

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291636** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.22

(22) Дата подачи заявки
2020.11.25

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

(54) ТРОЙНАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM, ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА И ВИРУСА ОСПЫ ПТИЦ

(31) **19212630.8**

(32) **2019.11.29**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2020/083293**

(87) **WO 2021/105167 2021.06.03**

(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ВЕТМЕДИКА ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
Мало Вергара Аристотелес (DE)

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) Изобретение среди прочего относится к иммуногенной композиции, содержащей: а) один или большее количество антигенов avibacterium paragallinarum, и один или большее количество антигенов вируса птичьего энцефаломиелита, и один или большее количество антигенов вируса оспы птиц; и б) фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам иммунизации субъекта, включающим в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения или предупреждения клинических признаков, вызванных avibacterium paragallinarum, вирусом птичьего энцефаломиелита и вирусом оспы птиц у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением.

A1

202291636

202291636

A1

ТРОЙНАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM, ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА И ВИРУСА ОСПЫ ПТИЦ

5

Предпосылки создания изобретения

Инфекционный ринит (ИР) представляет собой инфекционное заболевание верхних дыхательных путей, поражающее сельскохозяйственную птицу. Это заболевание вызывается *Avibacterium paragallinarum*, ранее известным как *Haemophilus paragallinarum*. Некоторыми клиническими признаками, которые обычно наблюдаются при ИР, являются ринит, отечность лица или отек, анорексия, задержка роста, снижение производства яиц и отчасти смертность. Болезнь является очень опасной в птицеводческой отрасли.

Вirus птичьего энцефаломиелита представляет собой вирус с одноцепочечной РНК (оцРНК), принадлежащий к семейству *Picornaviridae*. Инфекция может вызвать неврологические симптомы у сельскохозяйственной птицы (такие как атаксия, быстрый тремор головы и шеи), слабость, потерю веса, повышенную смертность и снижение яйценоскости.

Вirus оспы птиц (ВОП), ДНК-содержащий вирус рода *Avipoxvirus* семейства *Poxviridae*, поражает сельскохозяйственную птицу. Болезни, вызванные вирусом оспы птиц, оказывают значительное экономическое воздействие во всем мире, поскольку потери возникают в результате снижения яйценоскости несушек, снижения темпов роста бройлеров, слепоты и, в некоторых случаях, гибели.

Однако необходимы эффективные комбинированные вакцины, обеспечивающие защиту от многих патогенов. Такие комбинированные вакцины очень желательны для того, чтобы свести к минимуму количество вакцинаций, необходимых для обеспечения защиты от множества патогенов (благополучие животных), снизить административные расходы и повысить показатели приемлемости и охвата.

Тем не менее, проблема интерференции усложняет разработку многокомпонентных вакцин. В частности, интерференция относится к наблюдению, согласно которому введение нескольких антигенов часто приводит к уменьшению ответа на определенные антигены по сравнению с иммунным

ответом, наблюдаемым при индивидуальном введении таких антигенов. Обычно интерференция может возникать при введении нескольких антигенов. Однако, в частности, явление интерференции проблематично при комбинировании убитых вакцин с живыми вакцинами, поскольку на компонент живой вакцины может
5 воздействовать компонент убитой вакцины (который может содержать фармацевтически приемлемый носитель).

Таким образом, существует потребность в эффективных комбинированных вакцинах, обеспечивающих защиту от многих патогенов.

Подробное описание изобретения

10 Перед описанием аспектов настоящего изобретения необходимо отметить, что используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не требует иное. Таким образом, например, ссылка на «антиген» включает множество антигенов, ссылка на «вирус» представляет собой ссылку
15 на один или несколько вирусов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и так далее. Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или
20 эквивалентные описанным в настоящей заявке, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, в данном случае описаны предпочтительные способы, устройства и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящей заявке, включены в нее посредством ссылки с целью описания и раскрытия клеточных линий, векторов и методологий, как указано в
25 публикациях, которые могут быть использованы в связи с изобретением. Ничто в настоящей заявке не должно быть истолковано как признание того, что изобретение не может предшествовать такому раскрытию в силу предшествующего изобретения.

Сущность изобретения

30 В настоящем изобретении решают проблемы, присущие предшествующему уровню техники, и обеспечивает существенный прогресс в уровне техники.

В основном, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую: а) один или большее количество антигенов avibacterium paragallinarum и один или большее количество антигенов вируса

птичьего энцефаломиелита и один или большее количество антигенов вируса оспы птиц; и б) фармацевтически приемлемый носитель.

Кроме того, настоящее изобретение также обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую: а) один или большее количество антигенов
5 бактерины *avibacterium paragallinarum*, один или большее количество антигенов модифицированного живого вируса птичьего энцефаломиелита и один или большее количество антигенов модифицированного живого вируса оспы птиц; и б) фармацевтически приемлемый носитель. Таким образом, иммуногенная композиция относится к комбинации бактерины *avibacterium paragallinarum*,
10 модифицированного живого вируса птичьего энцефаломиелита и модифицированного живого вируса оспы птиц.

Помимо этого, настоящее изобретение также обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую: а) бактерины *avibacterium paragallinarum*, модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и
15 модифицированный живой вирус оспы птиц; и б) фармацевтически приемлемый носитель.

Кроме того, настоящее изобретение также обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую в комбинации бактерины *avibacterium paragallinarum*, модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и
20 модифицированный живой вирус оспы птиц.

Преимущественно, представленные в настоящей заявке экспериментальные данные ясно свидетельствуют о том, что тройная вакцина обеспечивает защиту от птичьего ринита, птичьего энцефаломиелита и оспы птиц. Удивительно, но не было обнаружено влияния на эффективность различных компонентов вакцины.
25 Существует даже небольшой положительный синергетический эффект как для противооспенной вакцины, так и для эффективности вакцины против ПЭ в тройной вакцинной комбинации, что является неожиданным.

Термин «*avibacterium paragallinarum*» хорошо известен специалистам в данной области. *Avibacterium paragallinarum* представляет собой
30 грамотрицательную бактерию из семейства *Pasteurellaceae*. Инфекционный ринит (ИР) вызывается *Avibacterium paragallinarum*. Инфекционный ринит (ИР) представляет собой инфекционное заболевание верхних дыхательных путей, поражающее домашнюю птицу.

Термин «вирус птичьего энцефаломиелита» хорошо известен специалистам в данной области. Вирус птичьего энцефаломиелита представляет собой вирус с одноцепочечной РНК (оцРНК), принадлежащий к семейству Picornaviridae. Инфекция у домашней птицы может вызывать неврологические симптомы (такие как атаксия, быстрый тремор головы и шеи), слабость, потерю веса, повышенную смертность и снижение яйценоскости.

Термин «вирус оспы птиц» хорошо известен специалистам в данной области. Вирус оспы птиц (ВОП), представитель рода Avipoxvirus, поражает домашнюю птицу. Болезни, вызванные вирусом оспы птиц, оказывают значительное экономическое воздействие во всем мире, поскольку потери возникают в результате снижения яйценоскости несушек, снижения темпов роста бройлеров, слепоты и, в некоторых случаях, гибели.

Используемый в настоящей заявке термин «антиген» относится, но не ограничивается ими, к компонентам, которые вызывают у хозяина иммунологический ответ на представляющую интерес иммуногенную композицию или вакцину, содержащую такой антиген или его иммунологически активный компонент. Антиген или иммунологически активный компонент может представлять собой целый микроорганизм (в инактивированной или модифицированной живой форме) или любой его фрагмент или фракцию, которые при введении хозяину могут вызывать у хозяина иммунологический ответ. Антиген может представлять собой или может содержать цельные живые организмы либо в своей исходной форме, либо в виде аттенуированных организмов в так называемой модифицированной живой вакцине (МЖВ). Антиген может дополнительно содержать соответствующие элементы указанных организмов (субъединичные вакцины), при этом эти элементы образуются либо путем уничтожения всего организма или ростовых культур таких организмов и последующих стадий очистки, дающих желаемую структуру (структуры), либо путем синтетических процессов, индуцированных путем надлежащего манипулирования подходящей системой, такой как, но не ограничиваясь, бактериями, насекомыми, млекопитающими или другими видами, и, необязательно, последующими процедурами выделения и очистки или индукцией указанных синтетических процессов у животного, нуждающегося в вакцине, путем прямого включения генетического материала с использованием подходящих фармацевтических композиций (полинуклеотидная вакцинация).

Антиген может содержать целые организмы, инактивированные соответствующими методами в так называемой убитой вакцине (УВ). Если организм представляет собой бактерию, убитая вакцина называется бактерином.

5 Термин «иммуногенная композиция» относится к композиции, содержащей по меньшей мере один антиген, который вызывает иммунологический ответ у хозяина, которому вводят иммуногенную композицию. Такой иммунологический ответ может быть клеточным и/или опосредованным антителами иммунным ответом на иммуногенную композицию в соответствии с изобретением. Предпочтительно иммуногенная композиция индуцирует иммунный ответ и, 10 более предпочтительно, обеспечивает защитный иммунитет против одного или нескольких клинических признаков инфекции. Хозяин также описывается как «субъект». Предпочтительно любой из хозяев или субъектов, описанных или упомянутых в настоящей заявке представляет собой птицу или сельскохозяйственную птицу.

15 Обычно «иммунологический ответ» включает, но не ограничивается одним или несколькими из следующих эффектов: выработку или активацию антител, хелперных Т-клеток, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, и/или гамма-дельта-Т-клеток, специально направленных на антиген или антигены, включенные в предлагаемую в изобретении иммуногенную композицию. Предпочтительно, чтобы хозяин проявлял либо защитный 20 иммунологический ответ, либо терапевтический ответ.

«Защитный иммунологический ответ» или «защитный иммунитет» будет продемонстрирован либо уменьшением, либо отсутствием клинических признаков, которые обычно проявляются у инфицированного хозяина, более 25 быстрым временем выздоровления и/или уменьшением продолжительности инфекционности, или снижением титра патогенов в тканях или биологических жидкостях, или выделениях инфицированного хозяина.

В случае, когда хозяин проявляет защитный иммунологический ответ, такой, что устойчивость к новой инфекции будет увеличиваться и/или 30 уменьшаться клиническая тяжесть заболевания, то иммуногенная композиция описывается как «вакцина».

В одном конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением один или большее количество антигенов *avibacterium paragallinarum* представляет собой бактериин *avibacterium paragallinarum*.

Используемое в настоящей заявке понятие «бактерин» относится к инаktivированной бактерии. Таким образом, бактерин *avibacterium paragallinarum* относится к убитой, инаktivированной *avibacterium paragallinarum*.

5 В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением бактерин *avibacterium paragallinarum* представляет собой целый инаktivированный бактерин *avibacterium paragallinarum*.

Для целей настоящего изобретения можно использовать любой обычный метод инаktivации. Таким образом, инаktivацию можно проводить с помощью
10 химических и/или физических обработок, которые известны специалисту в данной области. Предпочтительные методы инаktivации включают добавление циклизованного бинарного этиленимина (BEI), включая добавление раствора гидробромида 2-бромэтиленамина (BEA), который был циклизован до бинарного этиленимина (BEI). Другие предпочтительные химические средства инаktivации
15 содержат, но не ограничиваются ними тритон X-100, дезоксихолат натрия, бромид цетилтриметиламмония, β -пропиолактон, тимеросал, фенол и формальдегид (формалин). Тем не менее, инаktivация может также включать в себя стадию нейтрализации. Предпочтительные нейтрализующие средства включают, но не ограничиваются ними, тиосульфат натрия, бисульфит натрия и
20 тому подобное.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением бактерин *avibacterium paragallinarum* представляет собой целый инаktivированный формалином или тимеросалом бактерин *avibacterium paragallinarum*.

25 Предпочтительно условия инаktivации формалином включают в себя концентрацию формалина между приблизительно от 0,02% (объемн./объемн.) – 2,0% (объемн./объемн.), более предпочтительно от приблизительно 0,1% (объемн./объемн.) – 1,0% (объемн./объемн.), еще более предпочтительно от приблизительно 0,15% (объемн./объемн.) – 0,8% (объемн./объемн.), еще более
30 предпочтительно от приблизительно 0,16% (объемн./объемн.) – 0,6% (объемн./объемн.) и наиболее предпочтительно приблизительно 0,2% (объемн./объемн.) – 0,4% (объемн./объемн.). Время инкубации зависит от устойчивости *avibacterium paragallinarum*. В целом, процесс инаktivации

осуществляют до тех пор, пока рост *avibacterium paragallinarum* не будет обнаружен в подходящей системе культивирования.

Предпочтительно инаktivированный *avibacterium paragallinarum* в соответствии с настоящим изобретением является инаktivированным
5 формалином, предпочтительно с использованием описанных выше концентраций.

Предпочтительные условия инаktivации тимеросалом включают в себя концентрацию тимеросала в пределах от приблизительно 1% (объемн./объемн.) – 20% (объемн./объемн.), более предпочтительно от приблизительно 3%
10 (объемн./объемн.) – 17% (объемн./объемн.), еще более предпочтительно от приблизительно 5% (объемн./объемн.) – 15% (объемн./объемн.) и наиболее предпочтительно приблизительно 8% (объемн./объемн.) – 12% (объемн./объемн.). Время инкубации зависит от резистентности *avibacterium paragallinarum*. Как правило, процесс инаktivации осуществляют до тех пор,
15 пока рост *avibacterium paragallinarum* не будет обнаружен в подходящей системе культивирования.

Предпочтительно инаktivированный *avibacterium paragallinarum* в соответствии с настоящим изобретением является инаktivированным тимеросалом, предпочтительно с использованием описанных выше
20 концентраций.

Инаktivированный компонент бактерины в соответствии с изобретением может быть включен в липосомы с использованием известной технологии, такой как описанная в Nature, 1974, 252, 252-254 или Journal of Immunology, 1978, 120, 1109-13. В другом варианте осуществления изобретения инаktivированный
25 компонент бактерины в соответствии с изобретением может быть конъюгирован с подходящими биологическими соединениями, такими как полисахариды, пептиды, белки и т.п., или их комбинацией.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением вирус оспы птиц представляет собой
30 модифицированный живой вирус оспы птиц.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением модифицированный живой вирус оспы птиц является аттенуированным.

Термин «аттенуированный» относится к патогену, имеющему пониженную вирулентность по сравнению с изолятом дикого типа. В настоящем изобретении аттенуированный вирус представляет собой вирус, вирулентность которого снижена, так что он не вызывает клинических признаков этой вирусной инфекции, но способен вызывать иммунный ответ у целевого животного, а также может означать, что клинические признаки уменьшаются по частоте или тяжести у животных, инфицированных аттенуированным вирусом по сравнению с «контрольной группой» животных, инфицированных неаттенуированным вирусом и не получавших аттенуированный вирус. В этом контексте термин «понизить/пониженный» означает уменьшение по меньшей мере на 10%, предпочтительно на 25%, еще более предпочтительно на 50%, еще более предпочтительно 60%, еще более предпочтительно 70%, еще более предпочтительно 80%, еще более предпочтительно 90%, еще более предпочтительно 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с контрольной группой, инфицированной неаттенуированным вирусом, как определено выше. Таким образом, аттенуированный штамм вируса является штаммом, который подходит для включения в иммуногенную композицию, содержащую модифицированный живой вирус.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением модифицированный живой вирус оспы птиц является нерекомбинантным.

Используемый в настоящей заявке термин «нерекомбинантный» относится к геному РНК или ДНК (или последовательности РНК, последовательности кДНК, последовательности ДНК или белку), имеющему только модификации, которые естественно встречаются в соответствующем геноме РНК или ДНК (или последовательности РНК, последовательности кДНК, последовательности ДНК или белке).

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением вирус оспы птиц является рекомбинантным.

Используемый в настоящей заявке термин «рекомбинантный» относится к геному РНК или ДНК (или последовательности РНК, последовательности кДНК, последовательности ДНК или белку), имеющим любые модификации, которые не происходят природным путем в соответствующем геноме РНК или ДНК (или последовательности РНК, последовательности кДНК, последовательности ДНК

или белке). Например, геном РНК или ДНК (или последовательность РНК, последовательность кДНК, последовательность ДНК или белок) считается «рекомбинантным», если он содержит вставку, делецию, инверсию, перемещение или точечную мутацию, введенную искусственно, например, вмешательством человека. Следовательно, геном РНК или ДНК (или последовательность РНК, последовательность кДНК, последовательность ДНК или белок) не связана со всеми или частью последовательностей (последовательности РНК, кДНК, ДНК или аминокислотной последовательности белка), с которыми она связана в природе. Термин «рекомбинантный», используемый в отношении вируса или бактерии, означает вирус или бактерию, полученные путем искусственного манипулирования вирусным или бактериальным геномом. Термин «рекомбинантный вирус» или «рекомбинантная бактерия» охватывает генетически модифицированные вирусы или бактерии.

Рекомбинантные вакцины против вируса оспы птиц уже были описаны в предшествующем уровне техники, и было показано, что они обеспечивают защиту. Кроме того, такие рекомбинантные вакцины против оспы птиц являются коммерчески доступными, например, TROVAC® NDV или TROVAC® H7 подтипа (от Boehringer Ingelheim) или VECTORMUNE® ОП LT + ПЭ (от Ceva) основаны на модифицированной живой вакцине против оспы птиц.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением вирус птичьего энцефаломиелита представляет собой модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита является аттенуированным.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита является нерекомбинантным.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением вирус птичьего энцефаломиелита является рекомбинантным.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция является эффективной при

лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных avibacterium paragallinarum у нуждающегося в этом субъекта.

5 Термины «лечение и/или профилактика», «клинические признаки» и «нуждающийся» были определены в другом месте. Термин «инфекция» или «зараженный» относится к заражению субъекта патогеном, то есть avibacterium paragallinarum, или вирусом птичьего энцефаломиелита, или вирусом оспы птиц.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция эффективна при лечении и/или профилактике клинических признаков птичьего ринита.

10 В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция эффективна при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных инфекцией вируса птичьего энцефаломиелита у нуждающегося в этом субъекта.

15 В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция эффективна при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных заражением вирусом оспы птиц у нуждающегося в этом субъекта.

20 В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанный субъект представляет собой птицу или сельскохозяйственную птицу. Термины «птица» и «сельскохозяйственная птица» были определены в другом месте.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанная иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

25 Термин «вакцина» уже был описан в другом месте настоящей заявки. Тем не менее, в случае, когда хозяин проявляет защитный иммунологический ответ, такой, что устойчивость к новой инфекции будет усиливаться и/или уменьшаться клиническая тяжесть заболевания, иммуногенная композиция описывается как «вакцина».

30 В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанная иммуногенная композиция составлена для введения однократной дозы.

Однократную дозу вводят только один раз. Объем однократной дозы определен в другом месте настоящей заявки.

Кроме того, было показано, что одна доза иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением эффективна после введения такой однократной дозы такой иммуногенной композиции.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанный фармацевтически приемлемый носитель
5 выбран из группы, состоящей из растворителей, дисперсионных сред, покрытий, стабилизирующих средств, разбавителей, консервантов, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических средств, средств, замедляющих адсорбцию, адъювантов, иммуностимуляторов и их комбинаций.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает в себя любые и
10 все растворители, дисперсионные среды, покрытия, стабилизирующие средства, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства, средства, замедляющие адсорбцию, адъюванты, иммуностимуляторы и их комбинации.

К «разбавителям» относят воду, физиологический раствор, декстрозу,
15 этанол, глицерин и т.п. Изотонические средства могут включать, среди прочего, хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Стабилизаторы включают в себя, среди прочего, альбумин и щелочные соли этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Предпочтительно, иммуногенная композиция дополнительно содержит
20 стабилизатор сахарозы и желатина.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит консервант.

Предпочтительно в качестве консерванта используют формальдегид
25 (формалин) или тимеросал.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция в качестве консерванта
содержит формальдегид.

Предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель представляет
30 собой хитозан. Хитозан представляет собой природный деацетилированный полисахарид из хитина ракообразных (например, креветок, крабов), насекомых и других беспозвоночных. Недавно Rauw и соавт. 2009 (Vet Immunol Immunop 134:249–258) продемонстрировали, что хитозан усиливает клеточный иммунный ответ живой вакцины против болезни Ньюкасла и усиливает ее защитный

эффект. Кроме того, Wang и соавт., 2012 (Arch Virol (2012) 157:1451–1461) показали результаты, раскрывающие потенциал хитозана в качестве адъюванта для использования в живой аттенуированной вакцине против гриппа.

Предпочтительно иммуногенная композиция дополнительно может включать в себя один или несколько других иммуномодулирующих средств, таких как, например, интерлейкины, интерфероны или другие цитокины. Количества и концентрации адъювантов и добавок, применимых в контексте настоящего изобретения, могут быть легко определены квалифицированным специалистом в данной области.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант.

В некоторых аспектах иммуногенная композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит адъювант. Используемое в настоящей заявке понятие «адъюванты» может охватывать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию типа «вода-в-масле», эмульсию типа «масло-в-воде», эмульсию типа «вода-в-масле-в-воде». Эмульсия может быть основана, в частности, на легком жидком парафиновом масле (тип Европейской Фармакопеи); изопреноидном масле, таком как сквалан или сквален; масле, полученном после олигомеризации алкенов, в частности, изобутила или децена; сложных эфирах кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, более конкретно растительных маслах, этилолеате, ди-(каприлат/капрат) пропиленгликоле, три-(каприлат/капрат) глицериле или диолеате пропиленгликоля; сложных эфирах разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, сложных эфирах изостеариновой кислоты. Для получения эмульсии масло используют в сочетании с эмульгаторами. Эмульгаторы предпочтительно представляют собой неионные поверхностно-активные вещества, в частности, сложные эфиры сорбитана, маннита (например, олеат ангидроманнита), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолевой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно являются этоксилированными, и блок-сополимеры полиоксипропилен-полиоксиэтилена, в частности, продукты плуроник, особенно L121. См., Hunter и соавт., The Theory

and Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) и Todd и соавт., Vaccine 15:564-570 (1997). Примерными адъювантами являются эмульсия SPT, описанная на стр. 147 в «Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach», под ред. M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсия MF59, описанная на стр. 183 этой же книги.

Еще одним примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и производного алкенила. Предпочтительными адъювантными соединениями являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые сшиты, особенно с простыми полиалкениловыми эфирами сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения являются известны под термином карбомер (Pharmeuropa том 8, № 2 июнь 1996). Специалисты в данной области техники могут обратиться также к патенту США № 2,909,462, в котором описаны такие акриловые полимеры, перекрестно сшитые с полигидроксиллированным соединением, которое имеет по меньшей мере 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более 8, где атомы водорода по меньшей мере трех гидроксильных заменены ненасыщенными алифатическими радикалами, содержащими по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительными радикалами являются радикалы, содержащие от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллиллы и другие этиленненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы могут сами содержать другие заместители такие, как метил. В особенности пригодны продукты, которые продают под названием Carbopol; (BF Goodrich, Огайо, США). Они являются перекрестно сшитыми с аллилсахарозой или аллилпентаэритритолом. Среди них можно упомянуть Carbopol 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является применение Carbopol 971P. Среди сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного находятся сополимеры ЕМА (Monsanto), которые являются сополимерами малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде обеспечивает кислый раствор, который будет нейтрализован, предпочтительно до физиологического рН, чтобы получить раствор адъюванта, в который будет включена сама иммуногенная, иммунологическая или вакцинная композиция.

Кроме того, пригодные адъюванты охватывают, но не ограничиваются ними, адъювантную систему RIBI (Ribi Inc.), блок-сополимер (CytRx, Atlanta

GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил липид А, липидно-аминный адъювант авридин, термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой), холерный токсин, IMS 1314 или мурамилдипептид, или встречающиеся в природе или рекомбинантные цитокины или их аналоги, или стимуляторы

5 высвобождения эндогенных цитокинов, среди многих других.

Предполагают, что адъювант можно добавлять в количестве приблизительно от 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, предпочтительно в количестве приблизительно от 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу, более предпочтительно в количестве приблизительно от 500 мкг до приблизительно 5

10 мг на дозу, еще более предпочтительно в количестве приблизительно от 750 мкг до приблизительно 2,5 мг на дозу, и наиболее предпочтительно в количестве приблизительно от 1 мг на дозу. Альтернативно, адъювант может находиться в концентрации приблизительно от 0,01 до 50%, предпочтительно в концентрации приблизительно от 2% до 30%, более предпочтительно в концентрации

15 приблизительно от 5% до 25%, еще более предпочтительно в концентрации приблизительно от 7% до 22%, и наиболее предпочтительно в концентрации от 10% до 20% по объему конечного продукта.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанный фармацевтически приемлемый носитель

20 представляет собой адъювант, выбранный из группы, включающей в себя гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сапонины, эмульсию «вода-в-масле», эмульсию «масло-в-воде», эмульсию «вода-в-масле-в-воде», полимеры акриловой или метакриловой кислоты, сополимеры малеинового ангидрида и алкенильного производного, адъювантную систему RIBI, блок-сополимер, SAF-

25 М, монофосфорил липид А, липидно-аминный авридин, термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой), холерный токсин, IMS 1314, мурамилдипептид, минеральное масло и их комбинации.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанный фармацевтически приемлемый носитель

30 представляет собой адъювант, выбранный из группы, включающей в себя минеральное масло, эмульсию «вода-в-масле», эмульсию «масло-в-воде», эмульсию «вода-в-масле-в-воде» и их комбинации.

Преимущественно приведенные в настоящей заявке экспериментальные данные показывают, что в качестве адъюванта пригодна эмульсия «вода-в-масле».

5 В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле» или адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле», содержащей минеральное масло. Такой адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле» или адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле», содержащей минеральное масло, хорошо известен специалистам в данной области и коммерчески доступен. Например, белые минеральные масла
10 доступны от Citation™ и Avatech™.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанное минеральное масло содержит или состоит из насыщенных алифатических и алициклических углеводородов. Представленные
15 в настоящей заявке экспериментальные данные показывают, что подходят минеральные масла, содержащие или состоящие из насыщенных алифатических и алициклических углеводородов. Однако следует понимать, что подходят и другие минеральные масла.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением антигены avibacterium paragallinarum и вируса
20 птичьего энцефаломиеелита и вируса оспы птиц действуют вместе синергетически.

Преимуществом является то, что представленные в настоящей заявке экспериментальные данные ясно свидетельствуют об отсутствии
25 обнаруживаемого влияния на эффективность живой аттенуированной вакцины против ПЭ (птичьего энцефаломиеелита) и ОП (оспы птиц) в сочетании с инаktivированной вакциной против ринита (avibacterium paragallinarum), содержащей фармацевтически приемлемый носитель. Существует даже слегка положительный синергетический эффект как для противооспенной вакцины, так и для эффективности вакцины против ПЭ в комбинации тройной вакцины, что
30 является неожиданным.

Комбинация в соответствии с настоящим изобретением является предпочтительной, эта комбинация сводит к минимуму количество иммунизаций (количество вакцинаций), необходимых для обеспечения защиты от птичьего

ринита, птичьего энцефаломиелита и оспы птиц, она снижает затраты на введение и повышает показатели приемлемости и охвата.

Используемый в настоящей заявке термин «синергетически» означает, что иммунологический ответ, вызванный иммуногенной композицией в соответствии с настоящим изобретением (тройная комбинация), усиливается по сравнению с эталонной моновалентной или бивалентной иммуногенной композицией, содержащей модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и/или модифицированный живой вирус оспы птиц. Предпочтительно, чтобы иммунологический ответ увеличивался по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 75%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 100% по сравнению с указанной эталонной моновалентной или бивалентной иммуногенной композицией, содержащей модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и/или модифицированный живой вирус оспы птиц.

Специалисту в данной области известно, как измерить иммунологический ответ. В частности, специалисту в данной области понятно, что или сравнивают клеточно-опосредованный иммунный ответ соответствующей иммуногенной композиции с клеточно-опосредованным иммунным ответом эталона, или опосредованный антителами иммунный ответ соответствующей иммуногенной композиции с таковым эталонной композиции, но ни клеточно-опосредованный иммунный ответ соответствующей иммуногенной композиции с опосредованным антителами иммунным ответом эталона, ни наоборот.

Более того, клеточно-опосредованный иммунный ответ можно измерить, например, путем измерения активации цитотоксических Т-клеток представляющей интерес иммуногенной композицией/антигеном. Опосредованный антителами иммунный ответ можно измерить, например, путем измерения количества антиген-специфических антител, образующихся в результате введения животному иммуногенной композиции, содержащей такой антиген. Кроме того, иммунологический ответ можно измерить по клиническим параметрам. Пример 1, представленный в настоящей заявке, описывает, как

определить очаги оспы или титр антител к вирусу птичьего энцефаломиелита (ELISA).

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 10^2 до 10^{15} КОЕ на дозу avibacterium paragallinarum перед инактивацией.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 10^5 до 10^{10} КОЕ на дозу avibacterium paragallinarum перед инактивацией.

В предшествующем уровне техники подробно описаны модифицированные живые вакцины против вируса птичьего энцефаломиелита. Calnek и соавт. 1961 (Avians Dis 5:297-312) уже описали вакцинный штамм Calnek и вакцинный штамм van Roekel. Кроме того, штамм Van Roekel задепонирован в Американской коллекции типовых культур под регистрационным номером ATCC® VR-2058 (адаптированный куриный эмбрион).

В предшествующем уровне техники уже были описаны модифицированные живые вакцины против вируса птичьего энцефаломиелита, и было доказано, что они обеспечивают защиту. Кроме того, коммерчески доступны такие вакцины против вируса птичьего энцефаломиелита, например, Nobilis® ПЭ 1143 или Nobilis® ПЭ+Pox (от MSD), Volvac® ПЭ + ОП MLV (от Boehringer Ingelheim) или Cevac® Tremor L или Cevac® Poximmune ПЭ L (от Ceva).

Кроме того, специалистам в данной области известно, где можно получить любые штаммы вируса птичьего энцефаломиелита. Штаммы вируса птичьего

энцефаломиелиита могут быть получены из научных институтов. Помимо этого, штамм Van Roekel задепонирован в Американской коллекции типовых культур под номером доступа ATCC® VR-713 (полевой штамм). Более того, штаммы вируса птичьего энцефаломиелиита могут быть выделены в полевых условиях.

5 Способы выделения штаммов вируса птичьего энцефаломиелиита и характеристики указанных штаммов хорошо известны специалистам в данной области. Кроме того, были секвенированы вирусы птичьего энцефаломиелиита, и доступны геномные последовательности (например, Marvil и соавт. 1999: J. Gen. Virol. 80: 653-62; или номер доступа к базе данных EMBL AJ225173). Таким
10 образом, геном вируса может быть получен путем синтеза его последовательности, а также с использованием реверсивных генетических систем.

Путем серийного пассирования указанных штаммов вируса птичьего энцефаломиелиита можно легко получить модифицированные живые вакцины.
15 Это может сделать специалист в данной области техники без особых трудностей, однако в патенте US 5 208 023 даются дополнительные рекомендации в этом отношении.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением вирус птичьего энцефаломиелиита выбирают из списка,
20 включающего в себя: штамм Calnek 1733 и адаптированный к яйцам штамм Van Roekel.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением вирус птичьего энцефаломиелиита представляет собой штамм Calnek 1733.

25 Модифицированные живые вакцины против оспы птиц подробно описаны в предшествующем уровне техники. Mocket и соавт. 1990 (Avian Pathology, 19: 613-625) в качестве примера описали модифицированные живые штаммы вируса оспы птиц HP1 и HP193, Diallo и соавт. 1998 (Avian Pathology, 27: 60-66) описали вакцинный штамм S (FPV30), вакцинный штамм M (FPV31), вакцинный
30 штамм steggeles (FPV32, 33 и 34) и вакцинный штамм Вебстера (FPV30), а также другие штаммы и изоляты. Ariyoshi и соавт. 2003 (J. Vet. Med. Sci. 65(10): 1127-1130) описывают вакцинный штамм F132-с. Вакцинный штамм Beaudette оспы птиц задепонирован в Американской коллекции типовых культур под номером доступа ATCC VR-229. Вакцинный штамм KEM-7 и Gibbs также были описаны в

предшествующем уровне техники и используются в имеющихся в продаже вакцинах против оспы птиц.

Модифицированные живые вакцины против оспы птиц уже были описаны в предшествующем уровне техники, и было показано, что они обеспечивают
5 защиту. Кроме того, коммерчески доступны такие вакцины против оспы птиц, например, Nobilis® ПЭ+Pox (от MSD), Volvac® ПЭ + ОП MLV (от Boehringer Ingelheim) или Cevac® ОП L или Cevac® Poximmune ПЭ L (от Ceva).

Кроме того, специалистам в данной области известно, где можно получить
любые штаммы вируса оспы птиц. Штаммы оспы птиц можно получить в
10 научных институтах. Кроме того, штаммы оспы птиц могут быть выделены в полевых условиях. Способы выделения штаммов оспы птиц и характеристики указанных штаммов хорошо известны специалистам в данной области. Кроме того, были секвенированы вирусы оспы птиц, и доступны геномные последовательности. Таким образом, геном вируса может быть получен путем
15 синтеза его последовательности, а также с использованием реверсивных генетических систем. Путем серийного пассирования указанных штаммов оспы птиц могут быть легко получены модифицированные живые вакцины.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением вирус оспы птиц выбирают из списка, включающего в
20 себя: штаммы вируса HP1 и HP193, вакцинный штамм S (FPV30), вакцинный штамм M (FPV31), вакцинные штаммы steggeles (FPV32, 33 и 34), вакцинный штамм Вебстера (FPV30), вакцинный штамм F132-с, вакцинный штамм Beaudette, вакцинный штамм KEM-7 и вакцинный штамм Gibbs.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с
25 настоящим изобретением вирус оспы птиц выбирают из списка, включающего в себя: вакцинный штамм Weybridge, вакцинный штамм Beaudette, вакцинный штамм KEM-7 и вакцинный штамм Gibbs.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с
30 настоящим изобретением вирус оспы птиц представляет собой вакцинный штамм Beaudette.

Для *avibacterium paragallinarum* были описаны три различные серогруппы A, B и C, а также 9 сероваров (A1–A4, B-1 и C1–C4) (Blackall и соавт. 1990; JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, июнь 1990, сс. 1185-1187). Кроме того, были идентифицированы различные эталонные штаммы: штамм 221

(серовар А-А1), штамм 2403 (серовар А-А2), штамм Е-3С (серовар А-А3), штамм НР14 (серовар А-А4), штамм Н-18 (серовар С-С1), штамм Modesto (серовар С-С2), штамм SA-3 (серовар С-С3), штамм НР60 (серовар С-С4) и штамм 2671 (серовар В-В1). Помимо этого, штаммы *avibacterium paragallinarum* задепонированы в Американской коллекции типовых культур под номерами доступа ATCC® 29545, ATCC® 29975 и ATCC® 29976.

Убитые вакцины *Avibacterium paragallinarum* (например, вакцины, содержащие серогруппы А+В+С или А+С) уже были описаны в предшествующем уровне техники, и было показано, что они обеспечивают защиту. Кроме того, коммерчески доступны такие вакцины против птичьего ринита, например, Nobilis® Coryza (от MSD), Volvac® AC Plus Bact KV (от Boehringer Ingelheim) или CEVAC® CORYZA K (от Ceva).

Кроме того, специалистам в данной области известно, где можно получить любые штаммы *Avibacterium paragallinarum*. Штаммы *Avibacterium paragallinarum* могут быть получены из научных институтов. Более того, штаммы *Avibacterium paragallinarum* могут быть выделены в полевых условиях. Способы выделения штаммов *Avibacterium paragallinarum* и характеристики указанных штаммов хорошо известны специалистам в данной области. Методами инактивации (такими как использование β-пропиолактона, тимеросала, фенола или формалина) можно легко получить убитые вакцины.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением *avibacterium paragallinarum* выбирают из списка, включающего в себя: серогруппу А, серогруппу В и серогруппу С.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением *Avibacterium paragallinarum* содержит штаммы *Avibacterium paragallinarum* серогруппы А и С.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением *Avibacterium paragallinarum* содержит штаммы *Avibacterium paragallinarum* серогрупп А, В и С.

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением *Avibacterium paragallinarum* содержит штаммы, выбранные из списка, включающего в себя: А1 (O83), В1 (Spross/классический), 4143 (вариант В1), San Francisco 27 (вариант В1) и С2 (Modesto).

В другом конкретном аспекте иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением *Avibacterium paragallinarum* содержит штаммы A1 (O83), B1 (Spross/классический), 4143 (вариант B1), San Francisco 27 (вариант B1) и C2 (Modesto). Преимущественно было показано, что тройная комбинация эффективна при включении в нее таких штаммов *Avibacterium paragallinarum*.

Наборы

При необходимости композиции могут быть представлены в упаковке или дозирующем устройстве, которые могут содержать одну или несколько стандартных дозированных форм, содержащих действующее вещество. Упаковка может содержать, например, металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. К упаковке или дозирующему устройству могут быть приложены инструкции по применению, предпочтительно для введения субъектам, особенно сельскохозяйственной птице. С такой емкостью(ями) может быть связано уведомление в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических, или биологических продуктов, при этом уведомление отражает одобрение органом производства, использования или продажи для введения человеку.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает набор, содержащий иммуногенную композицию, описанную в настоящей заявке.

В одном конкретном аспекте набора в соответствии с настоящим изобретением бактерий *avibacterium paragallinarum*, модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиеелита и модифицированный живой вирус оспы птиц находятся в одной емкости.

В одном конкретном аспекте набора в соответствии с настоящим изобретением бактерий *avibacterium paragallinarum*, модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиеелита и модифицированный живой вирус оспы птиц находятся в одной или двух емкостях.

В одном конкретном аспекте набора в соответствии с настоящим изобретением бактерий *avibacterium paragallinarum*, модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиеелита и модифицированный живой вирус оспы птиц находятся в отдельных емкостях.

В одном конкретном аспекте набора в соответствии с настоящим изобретением бактерий *avibacterium paragallinarum* находится в одной емкости; и

модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и модифицированный живой вирус оспы птиц находятся в одной емкости.

В одном конкретном аспекте набора в соответствии с настоящим изобретением набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике заболеваний птиц.

В одном конкретном аспекте набора в соответствии с настоящим изобретением набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике заболеваний сельскохозяйственных птиц.

В одном конкретном аспекте набора в соответствии с настоящим изобретением набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике птичьего ринита и/или вируса птичьего энцефаломиелита и/или вируса оспы птиц.

В другом конкретном аспекте набора в соответствии с настоящим изобретением набор дополнительно содержит дозирующее устройство, способное вводить вакцину животному, птице или сельскохозяйственной птице.

Кроме того, в соответствии с другим аспектом указанная инструкция содержит информацию о повторном введении по меньшей мере одной дозы указанной комбинированной вакцины.

Способ лечения

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ иммунизации субъекта, включающий в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции, как описано в настоящей заявке.

Термин «иммунизация» относится к активной иммунизации путем введения иммуногенной композиции субъекту, подлежащему иммунизации, тем самым вызывая иммунологический ответ против антигена, включенного в такую иммуногенную композицию.

Предпочтительно иммунизация приводит к снижению заболеваемости конкретной инфекцией в стае или к уменьшению тяжести клинических признаков, вызванных конкретной инфекцией или связанных с ней.

Кроме того, иммунизация нуждающегося в ней субъекта иммуногенными композициями, как предусмотрено в настоящей заявке, приводит к предотвращению инфицирования субъекта конкретной инфекцией. Еще более предпочтительно иммунизация приводит к эффективному, продолжительному иммунологическому ответу против конкретной инфекции. Следует понимать,

что указанный период времени будет длиться более 1 месяца, предпочтительно более 2 месяцев, предпочтительно более 3 месяцев, более предпочтительно более 4 месяцев, более предпочтительно более 5 месяцев, более предпочтительно более 6 месяцев. Следует понимать, что иммунизация не может
5 быть эффективной у всех иммунизированных субъектов. Тем не менее, термин подразумевает, чтобы значительная часть стаи была иммунизирована эффективно.

Предпочтительно в этом контексте рассматривают стаю субъектов, у которых обычно, то есть без иммунизации, развиваются клинические признаки,
10 обычно вызываемые или связанные с конкретной инфекцией. Специалист в данной области техники без особых усилий может определить, эффективно ли иммунизированы животные в стае. Предпочтительно иммунизация должна быть эффективной, если клинические признаки по меньшей мере у 33%, по меньшей мере у 50%, по меньшей мере у 60%, по меньшей мере у 70%, по меньшей мере у
15 80%, по меньшей мере у 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере у 95% и наиболее предпочтительно у 100% особей данной стаи уменьшились по частоте или степени тяжести по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%,
20 еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектами, которые либо
25 не были иммунизированы, либо иммунизированы иммуногенной композицией, которая была доступна до настоящего изобретения, но впоследствии были инфицированы (посредством *avibacterium paragallinarum* и/или вируса птичьего энцефаломиелита и/или вируса оспы птиц).

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения или
30 предупреждения клинических симптомов, вызванных посредством вируса птичьего энцефаломиелита, у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины, как описано в настоящей заявке.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения или предупреждения клинических симптомов, вызванных посредством вируса оспы птиц у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины, как описано в настоящей заявке.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения или предупреждения клинических симптомов, вызванных посредством вируса оспы птиц и вируса птичьего энцефаломиеелита у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины, как описано в настоящей заявке.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения или предупреждения клинических симптомов, вызванных посредством avibacterium paragallinarum у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины, как описано в настоящей заявке.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения или предупреждения клинических симптомов, вызванных посредством вируса оспы птиц, вируса птичьего энцефаломиеелита и avibacterium paragallinarum у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины, как описано в настоящей заявке.

Понятие «лечение или предупреждение» относится к снижению заболеваемости конкретной инфекцией (такой как avibacterium paragallinarum и/или вирус птичьего энцефаломиеелита и/или вирус оспы птиц) в стае или к снижению тяжести клинических признаков, вызванных или связанных с конкретной инфекцией. Таким образом, термин «лечение или предупреждение» также относится к уменьшению количества инфицированных субъектов в стае (= уменьшение заболеваемости конкретной инфекцией), или к снижению тяжести клинических признаков, обычно связанных с или вызванных конкретной инфекцией или снижению распространения вирусов после инфицирования или предотвращения или уменьшения яйценоскости у кур-несушек после инфицирования в группе субъектов, которые получили эффективное количество

иммуногенной композиции, представленной в настоящей заявке по сравнению с группой субъектов, которые не получали такую иммуногенную композицию.

Понятие «лечение или предупреждение» обычно включает введение эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением субъекту или стае субъектов, нуждающихся в таком лечении/профилактике или которым могло бы помочь такое лечение/профилактика. Термин «лечение» относится к введению эффективного количества иммуногенной композиции после того, как субъект или по меньшей мере некоторые субъекты стаи уже инфицированы и у таких субъектов уже проявляются некоторые клинические признаки, вызванные или связанные с таким инфицированием. Термин «профилактика» относится к введению субъекту до любого заражения такого субъекта или по меньшей мере, когда такой субъект или ни один из субъектов в группе субъектов не проявляет каких-либо клинических признаков, вызванных или связанных с инфицированием. Термины «профилактика» и «предупреждение» взаимозаменяемы в этой заявке.

Используемый в настоящей заявке термин «эффективное количество» означает, но не ограничивается этим, количество антигена, которое вызывает или способно вызвать иммунный ответ у субъекта. Такое эффективное количество способно снизить частоту конкретного инфицирования в стае или уменьшить тяжесть клинических признаков конкретного инфицирования (посредством *avibacterium paragallinarum* и/или вируса птичьего энцефаломиелита и/или вируса оспы птиц).

Предпочтительно клинические признаки уменьшаются по частоте или тяжести по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектами, которых либо не лечили, либо лечили иммуногенной композицией, которая была доступна до настоящего изобретения, но впоследствии инфицированных.

Используемый в настоящей заявке термин «клинические признаки» относится к признакам инфицирования субъекта посредством *avibacterium paragallinarum* и/или вируса птичьего энцефаломиелита и/или вируса оспы птиц. Клинические признаки инфекции зависят от выбранного возбудителя.

5 Примеры таких клинических признаков, вызванных инфицированием посредством *avibacterium paragallinarum*, включают в себя, но не ограничены этим, ринит, отечность лица или отек, анорексию, снижение скорости роста, снижение яйценоскости, вялость и повышенную смертность.

10 Примеры таких клинических признаков, вызванных инфицированием посредством вируса птичьего энцефаломиелита, включают в себя, но не ограничены этим, атаксию, быстрый тремор головы и шеи, слабость, потерю веса, повышенную смертность и снижение яйценоскости.

15 Примеры таких клинических признаков, вызванных инфицированием посредством вируса оспы птиц, включают в себя, но не ограничены этим, распространение высыпаний, струпьев и поражений на гребенках и сережках; поражения полости рта, глотки, гортани и трахеи; снижение яйценоскости; сниженные темпы роста; слепоту и повышенную смертность.

20 Клинические признаки включают в себя, но не ограничены этим, клинические признаки, которые непосредственно наблюдают у живого животного. Примеры клинических признаков, которые можно непосредственно наблюдать у живого животного, включают оспу; высыпания, струпья и повреждения на гребнях и сережках; поражения полости рта, глотки, гортани и трахеи; взъерошенные перья; потеря веса; сниженные темпы роста; снижение аппетита; хромота; вялость; истощение и худосочность и тому подобное.

25 Предпочтительно клинические признаки с меньшей частотой или тяжестью у пролеченного субъекта по сравнению с субъектами, которых либо не лечили, либо лечили иммуногенной композицией, которая была доступна до настоящего изобретения, но впоследствии заразили, относятся к более короткой продолжительности бактериемии, более короткой продолжительности виремии,
30 более низкой бактериальной нагрузке, более низкой вирусной нагрузке, пониженной смертности, снижению тремора, уменьшению атаксии, уменьшению слабости, уменьшению потери веса, уменьшению снижения яйценоскости, уменьшению поражений, уменьшению анорексии или их комбинаций.

Термин «нуждающийся» или «необходимый», используемый в настоящей заявке, означает, что введение/лечение связано с усилением или улучшением состояния здоровья или клинических признаков, или любым другим положительным лечебным эффектом на здоровье субъектов, которые получают иммуногенную композицию в соответствии с настоящим изобретением.

К тому же, настоящее изобретение обеспечивает способ снижения смертности у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом из неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции, как описано в настоящей заявке.

В дополнение к этому, настоящее изобретение обеспечивает способ снижения тремора у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом из неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции, как описано в настоящей заявке.

В свою очередь, настоящее изобретение обеспечивает способ уменьшения снижения яйценоскости у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом из неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции, как описано в настоящей заявке.

Также настоящее изобретение обеспечивает способ уменьшения высыпаний оспы или очагов поражения оспой у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом из неиммунизированной контрольной группы того же вида, способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции, как описано в настоящей заявке.

Как показано в примерах, было доказано, что иммуногенная композиция, представленная в настоящей заявке, эффективна для лечения и профилактики инфекций, вызванных вирусом оспы птиц и вирусом птичьего энцефаломиеелита, а также эффективна для лечения и профилактики инфекций, вызванных *avibacterium paragallinarum*.

Термины «снижение» или «сниженный», или «уменьшение» или «ниже» используются взаимозаменяемо в настоящей заявке. Термин «уменьшение» означает, что клинические признаки уменьшаются по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, еще более предпочтительно по

меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с нелечеными (не иммунизированными), но впоследствии инфицированными субъектами.

Термин «уменьшение смертности, тремора, снижения яйценоскости, оспы или очагов оспы» означает, что указанные клинические признаки уменьшаются по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида. Специалисту в данной области известно, как измерять указанные клинические признаки/параметры.

В одном аспекте настоящего изобретения указанный субъект представляет собой птицу.

Понятие «птица» хорошо известно специалисту в данной области. Понятие «птица» охватывает всех птиц, включая сельскохозяйственную птицу.

В одном аспекте настоящего изобретения субъект представляет собой сельскохозяйственную птицу.

Понятие «сельскохозяйственная птица» хорошо известно специалисту в данной области. Понятие «сельскохозяйственная птица» включает в себя кур, индеек, перепелов, фазанов, цесарок, гусей и уток. Кроме того, понятие «курица» включает бройлеров, кур-несушек и репродуктивное поголовье обоих поскольку они также считаются племенными птицами.

В одном аспекте настоящего изобретения указанный субъект выбирают из перечня, включающего в себя курицу, индейку, перепела или фазана.

В одном аспекте настоящего изобретения указанный субъект представляет собой курицу.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят однократно.

Понятно, что однократную дозу вводят только один раз. Как показано в Примерах, иммуногенная композиция, представленная в настоящей заявке, оказалась эффективной после введения однократной дозы нуждающемуся субъекту.

Объем дозы на птицу зависит от способа вакцинации и возраста птицы.

Вакцина для внутримышечной или подкожной вакцинации может содержать дозу в объеме от 30 мкл до 1000 мкл. Предпочтительно однократная доза имеет общий объем между примерно 30 мкл и 1000 мкл, более предпочтительно между примерно 100 мкл и 800 мкл, более предпочтительно между примерно 100 мкл, 200 мкл и 700 мкл с наиболее предпочтительной однократной дозой в 200 мкл, 300 мкл, 400 мкл, 500 мкл, 600 мкл, 700 мкл или 800 мкл.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят в двух и более дозах.

Тем не менее, иммуногенную композицию можно вводить двумя или несколькими дозами, причем первую дозу вводят до введения второй (бустерной) дозы.

В предпочтительном аспекте схемы двукратного введения как первую, так и вторую дозы иммуногенной композиции вводят в одинаковом количестве. Преимущественно каждая доза находится в предпочтительных количествах, указанных выше. В дополнение к первому и второму режимам дозирования альтернативный вариант осуществления включает дополнительные последующие дозы. Например, в этих аспектах может быть введена третья, четвертая или пятая доза. Предпочтительно последующие третий, четвертый и пятый режимы дозирования вводят в том же количестве, что и первую дозу, при этом временные рамки между дозами соответствуют времени между первой и второй дозами, упомянутыми выше.

Иммуногенную композицию предпочтительно вводят местно или системно. Подходящими способами введения, обычно используемыми, являются пероральное или парентеральное введение, такое как интраназальное, внутривенное, внутрикожное, трансдермальное, внутримышечное, внутрибрюшинное, подкожное, а также в виде ингаляции, *in ovo*, в виде спрея,

через питьевую воду или в виде глазных капель. Тем не менее, в зависимости от природы и способа действия соединения иммуногенная композиция также может быть введена другими путями. Например, такие другие пути включают введение внутрикочно, внутривенно, внутрисосудисто, внутриартериально, 5 внутривнутрибрюшинно, интратекально, интратрахеально, внутрикочно, интракардиально, внутривнутрилобально, внутривнутрилобарно, интрамедуллярно, внутривнутрилегочно, интравнутриректально и интравнутривагинально. Тем не менее, наиболее предпочтительно иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно, перорально, *in ovo*, в виде спрея, с питьевой водой или в виде 10 глазных капель.

В одном аспекте настоящего изобретения указанную иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно, внутрикочно, перорально или в виде глазных капель.

В одном аспекте настоящего изобретения указанную иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно. 15

Как правило, вакцина содержит вирус птичьего энцефаломиелита в концентрации от 10^1 до 10^8 EID₅₀ (50%-ная доза для заражения яиц) на дозу, предпочтительно в концентрации от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу и более предпочтительно в концентрации от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу. 20

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита.

Обычно вакцина содержит вирус оспы птиц в концентрации от 10^1 до 10^8 EID₅₀ (50%-ная доза для заражения яиц) на дозу, предпочтительно в концентрации от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу и более предпочтительно в концентрации от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу. 25

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц. 30

Обычно вакцина содержит *avibacterium paragallinarum* в концентрации от 10^1 до 10^{20} КОЕ (колониеобразующая единица) на дозу до инаktivации,

предпочтительно в концентрации от 10^2 до 10^{15} EID₅₀ на дозу и более предпочтительно в концентрации от 10^5 до 10^{10} EID₅₀ на дозу.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит от 10^2 до 10^{15} КОЕ на дозу avibacterium paragallinarum перед
5 инактивацией.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит от 10^5 до 10^{10} КОЕ на дозу avibacterium paragallinarum перед инактивацией.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция
10 содержит от 10^2 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита, 10^2 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц и от 10^7 до 10^9 КОЕ на дозу avibacterium paragallinarum перед инактивацией.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят субъектам начиная с 2-недельного, 3-недельного, 4-недельного, 6-
15 недельного или 8-недельного возраста.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят субъектам начиная с 2-недельного возраста.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят субъектам начиная с 3-недельного возраста.

20 В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят субъектам начиная с 6-недельного возраста.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят субъектам за 5 - 8 недель до начала яйцекладки.

25 В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят субъектам начиная с 3-недельного возраста.

Как показано в примерах, было доказано, что иммуногенная композиция, представленная в настоящей заявке, безопасна и эффективна при введении 3-недельной сельскохозяйственной птице.

30 В одном аспекте настоящего изобретения указанный способ приводит к улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, состоящей из: более короткой продолжительности бактериемии, более короткой продолжительности виремии, более низкой бактериальной нагрузки, более низкой вирусной нагрузки, снижения смертности, уменьшения тремора, уменьшенной атаксии, уменьшенной слабости, уменьшенной потери веса,

уменьшенного снижения яйценоскости, уменьшенных поражений, уменьшенной анорексии или их комбинаций по сравнению с субъектом из неиммунизированной контрольной группы того же вида.

5 Термин «вирусная нагрузка» или «бактериальная нагрузка» хорошо известен специалисту в данной области. В настоящей заявке термин «вирусная
нагрузка» («бактериальная нагрузка») используют взаимозаменяемо с термином
«титр вируса» («титр бактерий»). Вирусная нагрузка (бактериальная нагрузка)
или титр вируса (титр бактерий) являются мерой тяжести активной вирусной
(бактериальной) инфекции и могут быть определены методами, известными
10 специалисту в данной области. Определение может быть основано на
обнаружении вирусных (бактериальных) белков, например, путем связывания
антител с вирусными (бактериальными) белками и дальнейшего обнаружения
или, альтернативно, путем обнаружения вирусной (бактериальной) РНК
методами амплификации, такими как ОТ-ПЦР. Например, вирусная нагрузка
15 (бактериальная нагрузка) или титр вируса (титр бактерий) могут быть
рассчитаны путем оценки живого количества вируса (бактерий) в пораженной
жидкости организма, например количества копий РНК на миллилитр плазмы
крови.

Термин «снижение», «сниженный», «уменьшение» или «ниже» или
20 «короче» означает, что параметр эффективности (продолжительность
бактериемии, продолжительность виремии, бактериальная нагрузка, вирусная
нагрузка, смертность, тремор, атаксия, слабость, потеря веса, снижение
яйценоскости, поражения, анорексия) снижается по меньшей мере на 10%,
предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей
25 мере на 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более
предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно по
меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще
более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по
меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и
30 наиболее предпочтительно на 100% по сравнению с субъектом
неиммунизированной контрольной группы того же вида. Специалисту в данной
области известно, как измерить улучшение параметров эффективности.

В одном аспекте настоящего изобретения лечение или предупреждение приводят к предотвращению или снижению смертности по сравнению с субъектами не подвергавшейся лечению контрольной группы того же вида.

5 В одном аспекте настоящего изобретения лечение или предупреждение приводят к предотвращению или уменьшению тремора по сравнению с субъектами не подвергавшейся лечению контрольной группы того же вида.

10 В одном аспекте настоящего изобретения лечение или предупреждение приводят к предотвращению или уменьшения снижения яйценоскости по сравнению с субъектами не подвергавшейся лечению контрольной группы того же вида.

В одном аспекте настоящего изобретения лечение или предупреждение приводят к предотвращению или уменьшению оспы или поражений оспой по сравнению с субъектами не подвергавшейся лечению контрольной группы того же вида.

15 Помимо этого, в настоящем изобретении предложена иммуногенная композиция, содержащая в комбинации:

- бактерин *avibacterium paragallinarum* и
- модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и
- модифицированный живой вирус оспы птиц и
- 20 - адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле» или адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле», содержащей минеральное масло.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую в комбинации:

- бактерин *avibacterium paragallinarum* с от 10^5 до 10^{10} КОЕ на дозу *avibacterium paragallinarum* перед инактивацией и
- 25 - модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита с от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита и
- модифицированный живой вирус оспы птиц с от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц; и
- 30 - адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле» или адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле», содержащей минеральное масло.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, содержащую в комбинации:

- бактерин *avibacterium paragallinarum* и

- модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита, и
- модифицированный живой вирус оспы птиц; и
- адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле», содержащей минеральное
масло, содержащее или состоящее из насыщенных алифатических и
алициклических углеводов.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную
композицию, содержащую в комбинации:

- бактерин *avibacterium paragallinarum* с от 10^5 до 10^{10} EID₅₀ на дозу
avibacterium paragallinarum до инаktivации, и

- модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита с от 10^1 до
 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита, и

- модифицированный живой вирус оспы птиц 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу
вируса оспы птиц; и

- адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле», содержащей минеральное
масло, содержащее или состоящее из насыщенных алифатических и
алициклических углеводов.

В одном аспекте настоящего изобретения указанная иммуногенная
композиция представляет собой вакцину.

В одном аспекте настоящего изобретения указанная иммуногенная
композиция содержит от 10^2 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего
энцефаломиелита.

В одном аспекте настоящего изобретения указанная иммуногенная
композиция содержит от 10^2 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.

В одном аспекте настоящего изобретения указанная иммуногенная
композиция содержит от 10^7 до 10^9 КОЕ на дозу *avibacterium paragallinarum*
перед инаktivацией.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную
композицию, описанную в настоящей заявке для терапевтического применения.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную
композицию, описанную в настоящей заявке для применения в качестве
иммуногена или вакцины.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную
композицию, описанную в настоящей заявке для применения в качестве
лекарственного средства.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает применение иммуногенной композиции, описанной в настоящей заявке для изготовления лекарственного средства.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ получения иммуногенной композиции, включающий в себя:

- а) обеспечение бактерина *avibacterium paragallinarum*; и
- б) обеспечение модифицированного живого вируса птичьего энцефаломиелита; и
- в) обеспечение модифицированного живого вируса оспы птиц;
- г) сочетание компонентов а) - в) для получения трехвалентной композиции; и
- д) получение указанной трехвалентной композиции; и
- е) добавление фармацевтически приемлемого носителя.

Термин «получение» может включать в себя сбор, выделение, очистку и/или приготовление (например, окончательную обработку и/или смешивание).

В одном конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант.

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант, выбранный из группы, включающей в себя гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сапонины, эмульсию «вода-в-масле», эмульсию «масло-в-воде», эмульсию «вода-в-масле-в-воде», полимеры акриловой или метакриловой кислоты, сополимеры малеинового ангидрида и алкенильного производного, адъювантную систему RIBI, блок-сополимер, SAF-M, монофосфорил липид А, липидно-аминный авридин, термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой), холерный токсин, IMS 1314, мурамилдипептид, минеральное масло и их комбинации.

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант, выбранный из группы, включающей в себя минеральное масло, эмульсию «вода-

в-масле», эмульсию «масло-в-воде», эмульсию «вода-в-масле-в-воде» и их комбинации.

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанный
5 фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле» или адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле», содержащей минеральное масло.

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением указанное минеральное
10 масло содержит или состоит из насыщенных алифатических и алициклических углеводов.

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу вируса птичьего
15 энцефаломиелита.

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита.

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.
20

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.
25

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 10^2 до 10^{15} КОЕ на дозу avibacterium paragallinarum перед инактивацией.

В другом конкретном аспекте способа получения иммуногенной композиции в соответствии с настоящим изобретением иммуногенная композиция содержит от 10^5 до 10^{10} КОЕ на дозу avibacterium paragallinarum перед инактивацией.
30

ПУНКТЫ

Нижеследующие пункты также описаны в настоящей заявке:

- 5 1. Иммуногенная композиция, содержащая: а) один или большее количество антигенов *avibacterium paragallinarum* и один или большее количество антигенов вируса птичьего энцефаломиелита и один или большее количество антигенов вируса оспы птиц; и б) фармацевтически приемлемый носитель.
- 10 2. Иммуногенная композиция, содержащая: а) один или большее количество антигенов бактериона *avibacterium paragallinarum*, один или большее количество антигенов модифицированного живого вируса птичьего энцефаломиелита и один или большее количество антигенов модифицированного живого вируса оспы птиц; и б) фармацевтически приемлемый носитель.
- 15 3. Иммуногенная композиция, содержащая: а) бактерион *avibacterium paragallinarum*, модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и модифицированный живой вирус оспы птиц; и б) фармацевтически приемлемый носитель.
- 20 4. Иммуногенная композиция, содержащая в комбинации бактерион *avibacterium paragallinarum*, модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и модифицированный живой вирус оспы птиц.
- 25 5. Иммуногенная композиция по пункту 1, в которой один или большее количество антигенов *avibacterium paragallinarum* представляют собой бактерион *avibacterium paragallinarum*.
- 30 6. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 2 - 5, в которой бактерион *avibacterium paragallinarum* представляет собой целый инактивированный бактерион *avibacterium paragallinarum*.
7. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 2 - 6, в которой бактерион *avibacterium paragallinarum* представляет собой целый инактивированный формалином или тимеросалом бактерион *avibacterium paragallinarum*.
8. Иммуногенная композиция по пункту 1, в которой вирус оспы птиц представляет собой модифицированный живой вирус оспы птиц.

9. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 2 - 4 и 6 - 8, в которой модифицированный живой вирус оспы птиц является аттенуированным.

10. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 2 - 4 и 6 - 9, в которой модифицированный живой вирус оспы птиц является нерекомбинантным.

5 11. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 2 - 4 и 6 - 9, в которой модифицированный живой вирус оспы птиц является рекомбинантным.

12. Иммуногенная композиция по пункту 1, в которой вирус птичьего энцефаломиелита представляет собой модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита.

10 13. Иммуногенная композиция по пунктам 2 - 4 и 6 - 12, в которой модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита является аттенуированным.

14. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 2 - 4 и 6 - 13, в которой модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита является
15 нерекомбинантным.

15. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 2 - 4 и 6 - 13, в которой модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита является рекомбинантным.

16. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 15, в которой
20 иммуногенная композиция эффективна при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных инфекцией *avibacterium paragallinarum* у нуждающегося в этом субъекта.

17. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 16, в которой иммуногенная композиция эффективна при лечении и/или профилактике
25 клинических признаков птичьего ринита.

18. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 17, в которой иммуногенная композиция эффективна при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных вирусной инфекцией птичьего энцефаломиелита у нуждающегося в этом субъекта.

30 19. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 18, в которой иммуногенная композиция эффективна при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных вирусной инфекцией оспы птиц у нуждающегося в этом субъекта.

20. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 16 - 19, где указанный субъект представляет собой птицу или сельскохозяйственную птицу.

21. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 20, при этом указанная иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

5 22. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 21, при этом указанную иммуногенную композицию составляют для однократного введения.

10 23. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 3 и 5 - 19, в которой указанный фармацевтически приемлемый носитель выбран из группы, включающей в себя растворители, дисперсионные среды, покрытия, стабилизирующие средства, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства, средства, замедляющие адсорбцию, адъюванты, иммуностимуляторы и их комбинации.

24. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 23, где иммуногенная композиция содержит консервант.

15 25. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 24, где иммуногенная композиция содержит формальдегид в качестве консерванта.

26. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 3 и 5 - 25, где указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант.

20 27. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 3 и 5 - 26, где указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант, выбранный из группы, включающей в себя гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сапонины, эмульсию «вода-в-масле», эмульсию «масло-в-воде», эмульсию «вода-в-масле-в-воде», полимеры акриловой или метакриловой
25 кислоты, сополимеры малеинового ангидрида и алкенильного производного, адъювантную систему RIBI, блок-сополимер, SAF-M, монофосфорил липид А, липидно-аминный авридин, термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой), холерный токсин, IMS 1314, мурамилдипептид, минеральное масло и их комбинации.

30 28. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 3 и 5 - 27, в которой указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант, выбранный из группы, включающей в себя минеральное масло, эмульсию «вода-в-масле», эмульсию «масло-в-воде», эмульсию «вода-в-масле-в-воде» и их комбинации.

29. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 3 и 5 - 28, в которой указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле» или адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле», содержащей минеральное масло.

5 30. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 27 - 29, в которой указанное минеральное масло содержит или состоит из насыщенных алифатических и алициклических углеводородов.

10 31. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 30, в которой антигены *avibacterium paragallinarum*, вируса птичьего энцефаломиелита и вирус оспы птиц действуют вместе синергетически.

32. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 31, где иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита.

15 33. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 32, где иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита.

34. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 33, где иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.

20 35. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 34, где иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.

25 36. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 35, где иммуногенная композиция содержит от 10^2 до 10^{15} КОЕ на дозу *avibacterium paragallinarum* перед инаktivацией.

37. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 36, где иммуногенная композиция содержит от 10^5 до 10^{10} КОЕ на дозу *avibacterium paragallinarum* перед инаktivацией.

30 38. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 37, где вирус птичьего энцефаломиелита выбирают из списка, включающего в себя: штамм Calnek 1733 и адаптированный к яйцам штамм Van Roekel.

39. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 38, в которой вирус птичьего энцефаломиелита представляет собой штамм Calnek 1733.

40. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 39, в которой вирус оспы птиц выбирают из списка, включающего в себя: штаммы вируса HP1 и HP193, вакцинный штамм S (FPV30), вакцинный штамм M (FPV31), вакцинные штаммы steggeles (FPV32, 33 и 34), вакцинный штамм Вебстера (FPV30),
5 вакцинный штамм F132-с, вакцинный штамм Beaudette, вакцинный штамм КЕМ-7 и вакцинный штамм Gibbs.

41. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 40, в которой вирус оспы птиц выбирают из списка, включающего в себя: вакцинный штамм Weybridge, вакцинный штамм Beaudette, вакцинный штамм КЕМ-7 и вакцинный
10 штамм Gibbs.

42. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 41, в которой вирус оспы птиц представляет собой вакцинный штамм Beaudette.

43. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 42, вакцинный штамм avibacterium paragallinarum выбирают из списка, включающего в себя:
15 серогруппу А, серогруппу В и серогруппу С.

44. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 43, в которой Avibacterium paragallinarum содержит штаммы Avibacterium paragallinarum серогрупп А и С.

45. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 44, в которой
20 Avibacterium paragallinarum содержит штаммы Avibacterium paragallinarum серогрупп А, В и С.

46. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 45, в которой Avibacterium paragallinarum содержит штаммы, выбранные из списка, включающего в себя: А1 (O83), В1 (Spross/классический), 4143 (вариант В1) San
25 Francisco 27 (вариант В1) и С2 (Modesto).

47. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 1 - 46, в которой Avibacterium paragallinarum содержит штаммы А1 (O83), В1 (Spross/классический), 4143 (вариант В1), San Francisco 27 (вариант В1) и С2 (Modesto).

48. Набор, содержащий иммуногенную композицию по одному из пунктов 1 - 47.

49. Набор по пункту 48, в котором бактериин avibacterium paragallinarum, модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и модифицированный живой вирус оспы птиц находятся в одной емкости.

50. Набор по пункту 48, в котором бактерин *avibacterium paragallinarum*, модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и модифицированный живой вирус оспы птиц находятся в одной или двух емкостях.

5 51. Набор по пункту 48, в котором бактерин *avibacterium paragallinarum*, модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и модифицированный живой вирус оспы птиц находятся в отдельных емкостях.

10 52. Набор по пункту 48, в котором бактерин *avibacterium paragallinarum* находится в одной емкости; и модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и модифицированный живой вирус оспы птиц находятся в одной емкости.

53. Набор в соответствии с любым из пунктов 48 - 52, при этом набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике заболеваний птиц.

15 54. Набор в соответствии с любым из пунктов 48 - 53, при этом набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике заболеваний птиц сельскохозяйственных птиц.

20 55. Набор в соответствии с любым из пунктов 48 - 54, при этом набор дополнительно содержит инструкцию по лечению и/или профилактике птичьего ринита, и/или вируса птичьего энцефаломиелита и/или вирус оспы птиц.

56. Способ иммунизации субъекта, включающий в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции по одному из пунктов 1 - 47.

25 57. Способ лечения или предупреждения клинических признаков, вызванных вирусом птичьего энцефаломиелита у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с одним из пунктов 1 - 47.

30 58. Способ лечения или предупреждения клинических признаков, вызванных вирусом оспы птиц у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с одним из пунктов 1 - 47.

59. Способ лечения или предупреждения клинических признаков, вызванных вирусом оспы птиц и вирусом птичьего энцефаломиелита у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает в себя введение субъекту

терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с одним из пунктов 1 - 47.

5 60. Способ лечения или предупреждения клинических признаков, вызванных посредством *avibacterium paragallinarum* у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с одним из пунктов 1 - 47.

10 61. Способ лечения или предупреждения клинических признаков, вызванных вирусом оспы птиц, вируса птичьего энцефаломиелита и *avibacterium paragallinarum* у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с одним из пунктов 1 - 47.

15 62. Способ снижения смертности у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, где способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с одним из пунктов 1 - 47.

20 63. Способ уменьшения тремора у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, где способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с одним из пунктов 1 - 47.

25 64. Способ уменьшения снижения яйценоскости у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, где способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с одним из пунктов 1 - 47.

30 65. Способ уменьшения оспы или очагов оспы у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, где способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции в соответствии с одним из пунктов 1 - 47.

66. Иммуногенная композиция в соответствии с одним из пунктов 1 - 47 для применения в способе иммунизации субъекта, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции.

67. Иммуногенная композиция в соответствии с одним из пунктов 1 - 47 для применения в способе лечения или предупреждения клинических признаков, вызванных вирусом оспы птиц и/или вирусом птичьего энцефаломиелита и/или *avibacterium paragallinarum* у нуждающегося в этом субъекта, указанный способ
5 включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции.

68. Иммуногенная композиция в соответствии с одним из пунктов 1 - 47 для применения в способе снижения смертности и/или тремора и/или снижения яйценоскости, и/или оспы или очагов оспы у нуждающегося в этом субъекта, по
10 сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, указанный способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества указанной иммуногенной композиции.

69. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 68, где указанный субъект является птицей.

15 70. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 69, где указанный субъект является сельскохозяйственной птицей.

71. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 70, где указанный субъект выбран из списка, включающего в себя курицу, индейку, перепела или фазана.

20 72. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 71, где указанный субъект представляет собой курицу.

73. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 72, где иммуногенную композицию вводят один раз.

25 74. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 72, где иммуногенную композицию вводят в двух и более дозах.

75. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 74, где указанную иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно, внутривенно, перорально или в виде глазных капель.

30 76. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 75, где указанную иммуногенную композицию вводят подкожно внутримышечно.

77. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 76, где иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита.

78. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 77, где иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита.

5 79. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 78, где иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.

80. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 79, где иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.

10 81. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 80, где иммуногенная композиция содержит от 10^2 до 10^{15} КОЕ на дозу avibacterium paragallinarum перед инактивацией.

15 82. Способ или применение по одному из пунктов 56 - 81, где иммуногенная композиция содержит от 10^5 до 10^{10} КОЕ на дозу avibacterium paragallinarum перед инактивацией.

83. Способ по одному из пунктов 56 - 82, где иммуногенную композицию вводят субъектам начиная с 2-недельного, 3-недельного, 4-недельного, 6-недельного или 8-недельного возраста.

20 84. Способ по одному из пунктов 56 - 83, где иммуногенную композицию вводят субъектам начиная с 3-недельного возраста.

25 85. Способ по одному из пунктов 56 - 84, при этом указанный способ приводит к улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, состоящей из: более короткой продолжительности бактериемии, более короткой продолжительности виремии, более низкой бактериальной нагрузки, более низкой вирусной нагрузки, снижения смертности, уменьшения тремора, уменьшенной атаксии, уменьшенной слабости, уменьшенной потери веса, уменьшенного снижения яйценоскости, уменьшенных поражений, уменьшенной анорексии или их комбинаций по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида.

30 86. Иммуногенная композиция, содержащая в комбинации:

- бактерий avibacterium paragallinarum и
- модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и
- модифицированный живой вирус оспы птиц; и

- адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле» или адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле», содержащей минеральное масло.

87. Иммуногенная композиция, содержащая в комбинации:

- бактерин *avibacterium paragallinarum* с от 10^5 до 10^{10} КОЕ на дозу *avibacterium paragallinarum* перед инактивацией, и

- модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита с от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита, и

- модифицированный живой вирус оспы птиц 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц; и

- адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле» или адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле», содержащей минеральное масло.

88. Иммуногенная композиция, содержащая в комбинации:

- бактерин *avibacterium paragallinarum*, и

- модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита, и

- модифицированный живой вирус оспы птиц; и

- адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле», содержащей минеральное масло, содержащее или состоящее из насыщенных алифатических и алициклических углеводов.

89. Иммуногенная композиция, содержащая в комбинации:

- бактерин *avibacterium paragallinarum* с от 10^5 до 10^{10} EID₅₀ на дозу *avibacterium paragallinarum* до инактивации, и

- модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита с от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита, и

- модифицированный живой вирус оспы птиц с от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц; и

- адъювант в виде эмульсии «вода-в-масле», содержащей минеральное масло, содержащее или состоящее из насыщенных алифатических и алициклических углеводов.

90. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 86 - 89, где указанная иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

91. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 86 - 90, где указанная иммуногенная композиция содержит от 10^2 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита.

92. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 86 - 91, где указанная иммуногенная композиция содержит от 10^2 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.

93. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 86 - 92, где указанная
5 иммуногенная композиция содержит от 10^7 до 10^9 КОЕ на дозу avibacterium paragallinarum перед инактивацией.

Способ получения

94. Способ получения иммуногенной композиции, включающий в себя:

- а.) обеспечение бактерина avibacterium paragallinarum; и
- 10 б.) обеспечение модифицированного живого вируса птичьего энцефаломиелита; и
- в.) обеспечение модифицированного живого вируса оспы птиц;
- г.) сочетание компонентов а) - в) для получения трехвалентной композиции; и
- 15 д.) получение указанной трехвалентной композиции; и
- е.) добавление фармацевтически приемлемого носителя.

95. Способ получения иммуногенной композиции по пункту 94, где указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант.

20 96. Способ получения иммуногенной композиции по пунктам 94 или 95, где указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант, выбранный из группы, включающей в себя гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сапонины, эмульсию «вода-в-масле», эмульсию «масло-в-воде», эмульсию «вода-в-масле-в-воде», полимеры акриловой или метакриловой
25 кислоты, сополимеры малеинового ангидрида и алкенильного производного, адъювантную систему RIBI, блок-сополимер, SAF-M, монофосфорил липид А, липидно-аминный авридин, термолабильный энтеротоксин из E. coli (рекомбинантный или другой), холерный токсин, IMS 1314, мурамилдипептид, минеральное масло и их комбинации.

30 97. Способ получения иммуногенной композиции по одному из пунктов 94 - 96, где указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант, выбранный из группы, включающей в себя минеральное масло, эмульсию «вода-в-масле», эмульсию «масло-в-воде», эмульсию «вода-в-масле-в-воде» и их комбинации.

98. Способ получения иммуногенной композиции по одному из пунктов 94 - 97, где иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита.

5 99. Способ получения иммуногенной композиции по одному из пунктов 94 - 98, где иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса птичьего энцефаломиелита.

100. Способ получения иммуногенной композиции по одному из пунктов 94 - 99, где иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^5 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.

10 101. Способ получения иммуногенной композиции по одному из пунктов 94 - 100, где иммуногенная композиция содержит от 10^1 до 10^3 EID₅₀ на дозу вируса оспы птиц.

15 102. Способ получения иммуногенной композиции по одному из пунктов 94 - 101, где иммуногенная композиция содержит от 10^2 до 10^{15} КОЕ на дозу avibacterium paragallinarum перед инактивацией.

103. Способ получения иммуногенной композиции по одному из пунктов 94 - 102, где иммуногенная композиция содержит от 10^5 до 10^{10} КОЕ на дозу avibacterium paragallinarum перед инактивацией.

20 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1. Процент птиц с очагами оспы (на крыле и/или на бедре) в день после заражения. ПК = положительный контроль; НК = отрицательный контроль

Фигура 2. Средний титр ПЭ ELISA на группу лечения. ПК = положительный контроль; ОК = отрицательный контроль

25 ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приведены ниже для иллюстрации конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти примеры носят исключительно иллюстративный характер и не ограничивают объем или лежащие в основе принципы настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1:

Определение интерференции вакцины против инфекционного птичьего ринита с эффективностью модифицированной живой вакцины против оспы птиц и энцефаломиелита птиц

5 Цель клинического исследования

Определение интерференции инаktivированной вакцины против инфекционного птичьего ринита (*avibacterium paragallinarum*) с эффективностью живой аттенуированной вакцины против оспы птиц (ОП) и живой аттенуированной вакцины против птичьего энцефаломиелита (ПЭ) у
10 сельскохозяйственной птицы.

Дизайн экспериментов

Кур-несушек SPF (возраст 21 день в D0) случайным образом делят на четыре группы лечения (ГЛ):

• ГЛ01 (20 животных): вакцинация живой вакциной ПЭ-ОП,
15 добавленной к инаktivированной вакцине против ринита (тройная вакцина), с последующим контрольным заражением ОП. Эта группа служит для выявления влияния вакцины против ринита на эффективность вакцины ПЭ-ОП.

• ГЛ02 (20 животных): вакцинация живой вакциной ПЭ-ОП
(бивалентная вакцина) с последующим контрольным заражением ОП. Эта группа
20 служит для демонстрации эффективности живой вакцины ПЭ-ОП.

• ГЛ03 (10 животных): не вакцинированы, но подвергались воздействию вируса ОП (ВОП). Эта группа служит для определения заражения ВОП и, таким образом, валидности исследования на животных (контроль заражения).

• ГЛ04 (5 животных): не вакцинированы, но инокулированы стерильной
25 водой. Эта группа служит для контроля отсутствия антител к ПЭ и ВОП и отсутствия развития оспы и валидности исследования.

Экспериментальной единицей были группы лечения (ГЛ).

Вакцинированные животные получают по одной дозе испытываемых вакцин в различных сочетаниях. Пути вакцинации являются
30 зарегистрированными путями для вакцин (таблица 1). Заражение проводят через три недели после вакцинации; ГЛ01, ГЛ02 и ГЛ03 патогенным штаммом оспы через перепонку крыла и способом перьевого фолликула, а ГЛ04 (контрольную группу) инокулируют стерильной водой. После этого и до конца исследования за

птицами ежедневно наблюдают и между 29-35 днями проверяют появление клинических признаков оспы птиц. В конце исследования птиц усыпляют путем вдыхания газовой смеси O_2 - CO_2 . Пробы крови берут у всех птиц на 0, 21 и 42 сутки. Кровь исследуют на наличие и отсутствие антител к ПЭ.

5 Таблица 1. Экспериментальный дизайн исследования

Группа лечения (ГЛ)	№ несушки SPF	Вакцинация	Забор крови*	Проверка вакцинной оспы	Заражение оспой	Забор крови**	Наблюдение оспы	Забор крови**
		D0		D8	D21		D29-D35	D42***
ГЛ01	20	Инактивированная вакцина против ринита + живая вакцина ПЭ + ОП (подкожно)	Да	Да	Да	Да	Да	Да
ГЛ02	20	Живая вакцина ПЭ + ОП (перепонка крыла)	Да	Да	Да	Да	Да	Да
ГЛ03	10	Нет	Да	Да	Да	Да	Да	Да
ГЛ04	5	Нет	Да	Да	Нет	Да	Да	Да

* Для ELISA ПЭ

** Для ELISA ПЭ

*** Или раньше, когда птицу усыпляют из соображений защиты животных

10 Основными параметрами в этом исследовании являются:

1. Гуморальный ответ на вирус ПЭ, определенный с помощью стандартного коммерчески доступного теста ELISA;

2. Определение титров антител к Coryza A с помощью реакции ингибирования гемагглютинации;

15 3. Наличие или отсутствие развития оспы в местах прививки (перепонка крыла и боковая поверхность бедра).

Материалы и способы

20 Таблица 2. Бивалентная вакцина против птичьего энцефаломиелита и оспы птиц

Общее название действующего вещества	Модифицированная живая вирусная вакцина против птичьего энцефаломиелита и оспы кур, состоящая из штамма Calnek 1733 вируса ПЭ и штамма Beaudette ВОП, полученного из куриных эмбрионов, свободных от специфических патогенов (SPF). Продукт содержит минимальный титр для ПЭ: $10^{2.5}$ EID50 и ОП: $10^{2.5}$ EID50 на дозу.
Производитель	Boehringer Ingelheim Vetmedica

Условия хранения	от 2 до 7°C. Беречь от прямых солнечных лучей и не замораживать.
------------------	--

Таблица 3. Трехвалентная вакцина против птичьего инфекционного ринита, птичьего энцефаломиеелита и оспы птиц

Общее название действующего вещества	Трехвалентная инактивированная вакцина «вода-в-масле» против ОП и ПЭ (см. таблицу 2) и инфекционного ринита птиц, содержащая штаммы <i>Avibacterium paragallinarum</i> серогрупп А, В и С; минимальный титр/доза/серотип: 10 ^{8.0} КОЕ
Производитель	Boehringer Ingelheim Vetmedica
Условия хранения	от 2 до 7°C. Беречь от прямых солнечных лучей и не замораживать.

5 Таблица 4. Материал для заражения

Общее название действующего вещества	ВОП
Производитель	GD (Gezondheidsdienst voor Dieren, Deventer, Нидерланды)
Эффективность	10 ^{7.1} EID ₅₀ на флакон (1 мл)
Условия хранения	< -60°C

Таблица 5. Среды

Общее название действующего вещества	Стерильная вода
Производитель	GD
Условия хранения	2-8 °C

Таблица 6. Подробная информация о вакцинации и процедуре заражения

Группа лечения	№ птиц	Вакцина (D0)	Доза	Путь	Объем [мл]	Заражение (D21)	n	Доза [log ₁₀ EID ₅₀]	Путь	Объем [мл]
ГЛ01	20	Инактивированный инфекционный ринит с живой вакциной ПЭ + ОП	1	п.к.	0.5	ВОП	20	4.1	Перепонка крыла	0.01
									Перьевые фолликулы	0.1
ГЛ02	20	Живая вакцина ПЭ + ОП	1	Перепонка крыла	0.01	ВОП	20	4.1	Перепонка крыла	0.01
									Перьевые фолликулы	0.1
ГЛ03	10	-	-	-	-	ВОП	10	4.1	Перепонка крыла	0.01
									Перьевые фолликулы	0.1
ГЛ04	5	-	-	-	-	Mock	5	-	Перепонка	0.01

Группа лечения	№ птиц	Вакцина (D0)	Доза	Путь	Объем [мл]	Заражение (D21)	n	Доза [log ₁₀ EID ₅₀]	Путь	Объем [мл]
									крыла	
									Перьевые фолликулы	0.1

п.к. = подкожно

Таблица 7. Введение вакцины

Доза:	Инактивированную вакцину против инфекционного ринита и живую аттенуированную вакцину против ПЭ - ОП вводят п.к. в объеме 1 дозы 0,5 мл один раз в D0. Только живую аттенуированную ПЭ - ОП вводят способом в перепонку крыла в объеме 1 дозы 0,01 мл один раз в D0.
Оборудование для введения вакцины:	<u>п.к.:</u> будет использован стерильный шприц объемом 1 мл с иглой 23Gx1" или эквивалентной иглой <u>Способ в перепонку крыла:</u> с помощью двойной иглы для введения в перепонку крыла
Введение:	<u>п.к.:</u> тыльная сторона шеи <u>Способ в перепонку крыла:</u> двойная игла проникает в кожную складку крыла

п.к. = подкожно

5

Таблица 8. Введение материала заражения

Доза:	10 ^{4.1} EID ₅₀ на курицу (см. Введение)
Оборудование:	Двойная игла для перепонки крыла Ватный тампон для растирания перьевых фолликулов
Введение:	10 ^{4.1} EID ₅₀ вводят на D21 посредством: разведения исходного раствора заразного штамма (10 ^{7.1} EID ₅₀) 1:100 в холодной стерильной деминерализованной воде до титра 10 ^{5.1} EID ₅₀ на мл (= 10 ^{4.1} на 0,11 мл) - внутрикожного введения согласно способу в перепонку крыла (двойная игла проникает в кожную складку крыла): 1 доза 0,01 мл на животное таким способом прививается в одно крыло. - способ в перьевые фолликулы: пять перьев выдергивают на боковой поверхности бедра. Затем 0,1 мл поксвируса осторожно втирают в перьевые фолликулы.

Наблюдения

После контрольного заражения цыплят дважды в течение дня осматривают на наличие клинических признаков. Все признаки и смертность записывают и сохраняют в архиве исследования.

10

Забор крови

Образцы крови для серологического исследования берут путем пункции крыловой вены на 0, 21 и 42 день. Кровь собирают в пробирки с сывороточным гелем и оставляют свертываться в течение по меньшей мере 2 часов при комнатной температуре. После этого сыворотку собирают путем центрифугирования пробирок (4700 g; 10 - 15 минут, комнатная температура), делят на аликвоты двойными порциями и хранят при температуре $< -16^{\circ}\text{C}$ для дальнейшей обработки.

Реакция торможения гемагглютинации

Наличие антител к Coryza серотипа А оценивали в сыворотках птиц, взятых в D42, с помощью реакции ингибирования гемагглютинации с антигеном A1 штамма Kume. Двукратные серийные разведения сыворотки готовили в PBS с использованием микротитрационных планшетов с круглым дном. В каждую лунку добавляли равные количества гемагглютинирующих единиц (50 мкл, 4 единицы) и 0,75% формализированных куриных эритроцитов (50 мкл). После инкубации в течение 45 минут при комнатной температуре результаты считывали как максимальное разведение сыворотки, при котором полностью ингибировалась гемагглютинация. Формализированные куриные эритроциты готовили путем инкубации куриных эритроцитов (двукратно промытых в PBS) посредством PBS с 3% формальдегидом в течение 18 ч. при 4°C . Затем эритроциты однократно промывали в PBS и суспендировали в PBS для получения 50% суспензии, которую разбавляли до 0,75% непосредственно перед проведением теста (Jacobs и соавт., 1992).

Результаты

A. Coryza A (Avibacterium Paragallinarum)

Все птицы групп ГЛ02, ГЛ03 и ГЛ04, которые не были вакцинированы инактивированной вакциной против ринита, не имели определяемых уровней антител против ринита серотипа А. Это свидетельствует о высокой специфичности теста.

В группе ГЛ01 (живой ПЭ + ОП, добавленный к инактивированной вакцине против ринита) уровни антител против Coryza серотипа А были обнаружены на ожидаемых уровнях (данные не показаны). Эти результаты доказывают, что отсутствуют признаки отрицательного влияния компонента вакцины против

Согуза, как ожидали. Любую негативную интерференцию в основном ожидали для любого или обоих компонентов живой вакцины.

Б. Оспа птиц

5 Результат вакцинации показан на Фигуре 1 (процент птиц с поражениями оспы птиц после заражения).

10 Исследование является достоверным, поскольку в группе отрицательного контроля (ГЛ04) очаги оспы отсутствуют, в то время как у птиц из группы положительного контроля (ГЛ03) у всех появляются очаги оспы. То же самое делается для части исследования, посвященной птичьему энцефалиту, поскольку
15 невакцинированные группы (ГЛ03 и ГЛ04) остаются отрицательными по результатам ELISA, а обе группы, вакцинированные против ПЭ (ГЛ01 и ГЛ02), становятся положительными на антитела против ПЭ.

20 Уровень защиты от оспы для обеих групп, вакцинированных живой аттенуированной вакциной ПЭ – ОП, показан на Фигуре 1. У всех зараженных невакцинированных птиц наблюдаются очаги оспы в течение недели или более;
25 у большинства вакцинированных птиц (приблизительно 75%) после заражения не обнаруживаются оспы; примерно у 25% птиц наблюдаются незначительные поражения (поражения классифицируются как небольшие (размер 2-3 мм)) в течение 1-3 дней. Уровень защиты в ГЛ01 (инактивированные вакцины против согуза + ПЭ - ОП) составляет 96%, а в ГЛ02 (живая вакцина ПЭ - ОП) составляет 92%, таким образом, уровень защиты в ГЛ01 несколько выше. На 21-й день жизни в обеих вакцинированных группах поражений нет, тогда как у 89% птиц ГЛ03 все еще наблюдаются очаги оспы.

30 Эти результаты показывают, что, к удивлению, нет признаков отрицательного влияния инактивированной вакцины против ринита на эффективность живой аттенуированной вакцины против ОП. Тем не менее, есть даже небольшой положительный синергетический эффект в отношении эффективности вакцины против оспы в комбинации тройной вакцины, что удивительно.

30 С. Вирус птичьего энцефаломиелита (ПЭ)

В Таблице 9 и на Фигуре 2 показаны средние титры ПЭ ELISA для всех групп в день вакцинации и на 21 и 42 д.п.в.

Таблица 9. Средний титр ПЭ ELISA на группу лечения

Группа лечения	Количество птиц	Вакцинация	ШТАММ заражения	Средний титр ПЭ ELISA		
		D0	D21	D0	D21	D42
ГЛ01	20	Инактивированные вакцины Coryza + живые ПЭ + ОП	Вирус оспы птиц	3	1146	1778
ГЛ02	20	Живая вакцина ПЭ + ОП	Вирус оспы птиц	1	806	1980
ГЛ03	10	-	Вирус оспы птиц	0	1	19
ГЛ04	5	-	-	0	0	0

Среднее развитие титра для компонента ПЭ показано на Фигуре 2. Через 21 и 42 дня после вакцинации процент птиц с положительной реакцией ELISA на антитела к ПЭ в группе, которая была вакцинирована живой аттенуированной вакциной ПЭ – ОП, добавленной к инактивированной вакцине против ринита (ГЛ01) составляет 81% и 95% соответственно. Процент положительных результатов для птиц, вакцинированных живой аттенуированной вакциной против ПЭ-оспа, составляет соответственно 57% и 90% в те же дни (ГЛ02). Таким образом, процент положительных на антитела птиц в ГЛ01 несколько выше. Эти результаты показывают, что нет признаков отрицательного влияния инактивированной вакцины против ринита на эффективность живой аттенуированной вакцины против ПЭ - ОП. Тем не менее, существует даже небольшой положительный синергетический эффект в отношении эффективности вакцины против ПЭ (увеличивается процент птиц с положительной реакцией на антитела к ПЭ) в комбинации тройной вакцины, что является неожиданным.

Заключение

Подводя итоги, можно сделать вывод об отсутствии заметного влияния на эффективность живой аттенуированной вакцины против ПЭ (птичьего энцефаломиелита) и ОП (оспы птиц) при добавлении к инактивированной вакцине против ринита (*avibacterium paragallinarum*). Приведенные в настоящей заявке данные показывают, что животные, вакцинированные тройной вакциной, защищены от заражения вирусом оспы птиц и что животные продуцируют высокий титр антител против ПЭ. Существует даже слегка положительный синергетический эффект как для вакцины против оспы, так и для эффективности

вакцины против ПЭ, в комбинации тройной вакцины, что является неожиданным. Часто ожидается отрицательное влияние на эффективность вакцины при комбинировании вакцин для получения более сложной композиции вакцины в целом. В частности, этого можно ожидать при комбинировании 5 модифицированных живых вакцин с бактерином, содержащим адъювант, поскольку адъювант может влиять на активность компонентов модифицированной живой вакцины.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая: а) один или большее количество антигенов бактерина *avibacterium paragallinarum*, один или большее количество антигенов модифицированного живого вируса птичьего энцефаломиелита и один или большее количество антигенов модифицированного живого вируса оспы птиц; и б) фармацевтически приемлемый носитель.

2. Иммуногенная композиция, содержащая: а) бактерин *avibacterium paragallinarum*, модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и модифицированный живой вирус оспы птиц; и б) фармацевтически приемлемый носитель.

3. Иммуногенная композиция по пп. 1 или 2, в которой бактерин представляет собой целый инактивированный бактерин.

4. Иммуногенная композиция по одному из пп. 1 - 3, в которой иммуногенная композиция эффективна при лечении и/или профилактике клинических признаков, вызванных инфекцией *avibacterium paragallinarum* и/или вирусной инфекцией птичьего энцефаломиелита и/или вирусной инфекцией оспы птиц у нуждающегося в этом субъекта.

5. Иммуногенная композиция по одному из пп. 1 - 4, в которой указанная иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

6. Иммуногенная композиция по одному из пп. 1 - 5, в которой указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант.

7. Иммуногенная композиция по одному из пп. 1 - 6, в которой указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой адъювант, выбранный из группы, включающей в себя минеральное масло, эмульсию «вода-в-масле», эмульсию «масло-в-воде», эмульсию «вода-в-масле-в-воде», и их комбинации.

8. Иммуногенная композиция по одному из пп. 1 - 7, в которой антигены avibacterium paragallinarum, вируса птичьего энцефаломиелита и вируса оспы птиц действуют вместе синергетически.

5

9. Набор, содержащий иммуногенную композицию по одному из пп. 1 - 8.

10. Набор по п. 9, в котором бактерин avibacterium paragallinarum, модифицированный живой вирус птичьего энцефаломиелита и модифицированный живой вирус оспы птиц находятся в одной или двух емкостях.

10

11. Способ иммунизации субъекта, включающий в себя введение такому субъекту иммуногенной композиции по одному из пп. 1 - 8.

15

12. Способ лечения или предупреждения клинических признаков, вызванных avibacterium paragallinarum, и/или вируса птичьего энцефаломиелита и/или вируса оспы птиц у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по одному из пп. 1 - 8.

20

13. Способ снижения смертности и/или тремора и/или снижения яйценоскости у нуждающегося в этом субъекта, по сравнению с субъектом неиммунизированной контрольной группы того же вида, где способ включает в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции по одному из пп. 1 - 8.

25

14. Способ по одному из пп. 11 - 13, где указанный субъект представляет собой сельскохозяйственную птицу.

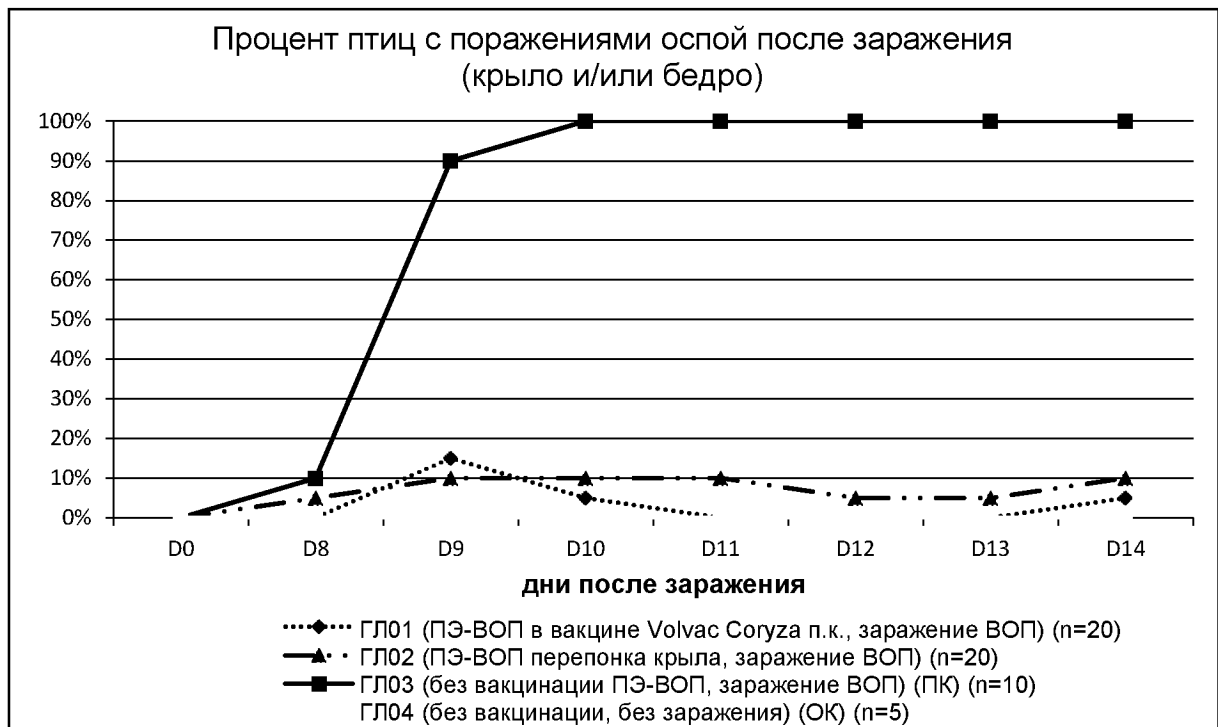
30

15. Способ по одному из пп. 11 - 14, где иммуногенную композицию вводят один раз.

16. Способ по одному из пп. 11 - 15, где указанную иммуногенную композицию вводят подкожно, внутримышечно, внутрикожно, перорально или в виде глазных капель.

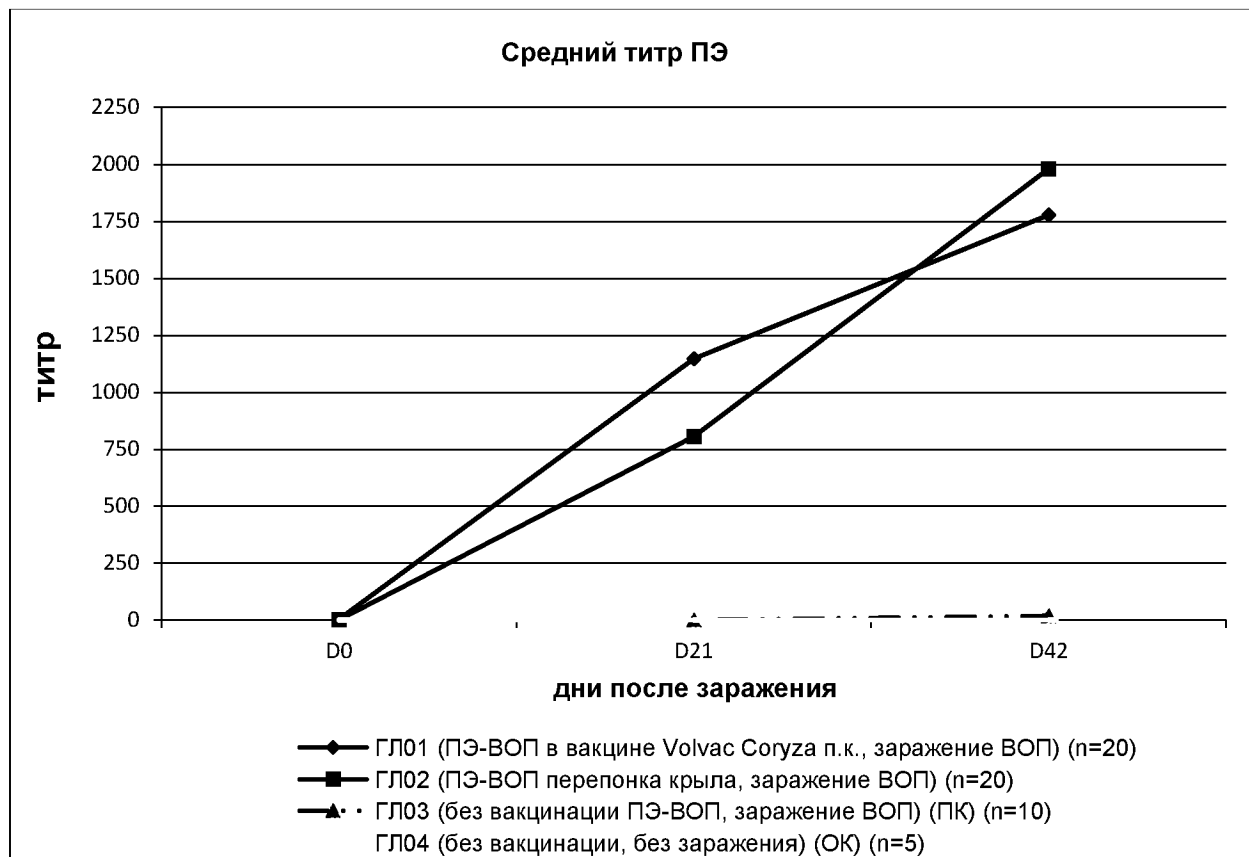
5 17. Способ по одному из пп. 11 - 16, при этом указанный способ приводит к
улучшению параметра эффективности, выбранного из группы, состоящей из
более короткой продолжительности бактериемии, более короткой
продолжительности виремии, более низкой бактериальной нагрузки, более
низкой вирусной нагрузки, снижения смертности, уменьшения тремора,
10 уменьшенной атаксии, уменьшенной слабости, уменьшенной потери веса,
уменьшенного снижения яйценоскости, уменьшенных поражений, уменьшенной
анорексии или их комбинаций по сравнению с субъектом неиммунизированной
контрольной группы того же вида.

Фигура 1



ПК = положительный контроль; ОК = отрицательный контроль

Фигура 2



ПК = положительный контроль; ОК = отрицательный контроль