

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201690057** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.07.29

(51) Int. Cl. **A61K 38/17 (2006.01)**
A61P 37/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.07.04

**(54) ОСТЕОПОНТИН МОЛОКА МЛЕКОПИТАЮЩИХ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ**

(31) **13175267.7; 61/843,185**

(32) **2013.07.05**

(33) **EP; US**

(86) **PCT/EP2014/064339**

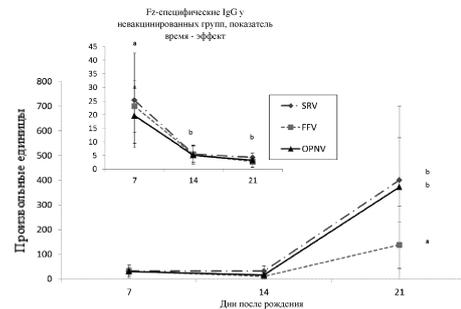
(87) **WO 2015/001092 2015.01.08**

(71) Заявитель:
АРЛА ФУДС АМБА (DK)

(72) Изобретатель:
**Квистгорд Анне Стаудт, Вейсе Петер
Лангборг (DK), Донован Шэрон,
Сайджел Марсиа Х. Монако, Комсток
Сара С. (US)**

(74) Представитель:
Поликарпов А.В. (RU)

(57) Раскрытое изобретение касается остеопонтина молока млекопитающего, и/или его активного укороченного варианта, или его активного пептида для улучшения иммунологической реактивности к инфекционному заболеванию у млекопитающего, например у субъекта-человека, а также повышения эффективности вакцинации для профилактического или терапевтического лечения инфекционного заболевания у млекопитающих, таких как люди. Изобретение дополнительно предусматривает вакцинную систему для применения в профилактическом или терапевтическом лечении инфекционного заболевания у млекопитающего, содержащую вакцину и остеопонтин молока млекопитающих, и/или его активный укороченный вариант, или его активный пептид, для перорального введения млекопитающему, а также способы повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего путем введения вакцины и остеопонтина молока млекопитающих и/или его активного укороченного варианта.



A1

201690057

201690057

A1

НАЗВАНИЕ: Остеопонтин молока млекопитающих для повышения иммунологической реактивности**ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

5 Настоящее изобретение касается улучшения иммунологической реактивности к
инфекционному заболеванию у млекопитающего, например, субъекта-человека, а
также повышения эффективности вакцинации для профилактического или
терапевтического лечения инфекционного заболевания у млекопитающих, таких как
люди. Было обнаружено, что пероральное введение остеопонтина (OPN) молока
10 млекопитающих или его активной укороченной части повышает иммунологическую
реактивность млекопитающего и повышает иммунный ответ, индуцированный
вакцинацией у млекопитающего, тем самым повышая профилактическую или
терапевтическую эффективность вакцинации.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 Иммунная система обеспечивает основной механизм защиты от заболевания в живых
организмах, в результате чего патогены и чужеродные организмы обнаруживаются и
удаляются компонентами иммунной системы. Врожденный иммунный ответ
функционирует в качестве первой линии обороны против инфекции, включающей
разнообразные клеточные компоненты, в том числе гранулоциты (базофилы,
20 эозинофилы и нейтрофилы), тучные клетки, естественные клетки-киллеры (НКС) и
антиген-презентирующие клетки (АРС), такие как макрофаги и дендритные клетки
(DC), и растворимые факторы, такие как белки комплемента. Адаптивный иммунный
ответ в качестве второй линии обороны медленнее развиваться и включает выбор из
клеточных и гуморальных ответов для устранения патогена. Клеточный иммунитет,
25 прежде всего, является Th1-индуцированным, что приводит к дифференцировке
цитотоксических Т-клеток, естественных клеток-киллеров (НКС) и активированных
макрофагов, роль которых заключается в уничтожении поврежденных клеток-хозяев
(например, клеток, инфицированных вирусом или патогеном). Гуморальный иммунитет
проявляется как увеличенная антигенная специфичность и антигенная память, в
30 результате чего активация Th2 и продуцирование цитокинов приводит к образованию
В-клеток, продуцирующих антитела, и клеток памяти, которые облегчают
распознавание патогенных антигенов и устранение патогена.

Врожденный иммунитет у новорожденного млекопитающего развит слабо, так что
устойчивость к заболеваниям у новорожденного в значительной мере зависит от
35 пассивного приобретения материнских антител, полученных через материнское грудное
молоко, в частности, молозиво. Параллельно развитие иммунной системы младенца

индуцируется иммуностимулирующими компонентами, присутствующими в молоке матери. Развитие иммунной системы у новорожденных млекопитающих при кормлении молочной смесью, а не материнским молоком, задерживается из-за дефицита основных индуцирующих и обеспечивающих иммунитет компонентов, которые в других случаях должны обеспечиваться в материнском молоке.

Поддержание иммунной системы остается существенным для здоровья на протяжении всей жизни, и, таким образом, индивидуумы с ослабленным иммунитетом любого возраста, а также пожилые люди с неуклонно снижающимся иммунитетом представляют собой группы пациентов с большим риском смертности, связанной с заболеванием.

Вакцинация для вызова иммунного ответа к инфекционным заболеваниям является наиболее эффективным способом улучшения здоровья населения. Постоянно растет спектр заболеваний, для которых доступны вакцины, и увеличивается применение этих вакцин для защиты взрослого населения, в частности, растущего населения пожилого возраста. Вакцинация, или профилактическая, или терапевтическая, стимулирует иммунную систему организма на распознавание антигенного агента, напоминающего агента, вызывающего данное заболевание, его уничтожение и его "запоминание" таким образом, чтобы при повторном заражении иммунная система могла легче распознавать и уничтожать агент, вызывающий заболевание. Как правило, такой агент получают из ослабленных или инактивированных форм патогенного микроорганизма, его токсинов или одного из его поверхностных белков.

Поскольку эффективность вакцинации зависит от способности вакцинированного субъекта к повышению эффективного иммунного ответа, полезное действие от вакцинации снижается у индивидуумов, у которых иммунная система или является не полностью развитой, как у новорожденных или младенцев, или у индивидуумов, у которых иммунная система либо снижена, либо нарушена, либо находится в состоянии упадка, как у некоторых взрослых и пожилых людей. Соответственно, существует необходимость в агентах, которые могут усиливать иммунологическую реактивность в данных группах пациентов, в частности, их иммунный ответ на вакцинацию. Программы общественного здравоохранения по вакцинированию таких больших групп пациентов должны быть чрезвычайно безопасными, и, следовательно, как агенты, применяемые для усиления иммунного ответа на вакцинацию, так и средства, применяемые для их введения, должны соответствовать этим требованиям безопасности.

Остеопонтин (OPN) представляет собой белок внеклеточного матрикса, экспрессируемый многими типами клеток, включая остеокласты, остеобласты, макрофаги, активированные Т-клетки, клетки гладких мышц и эпителиальные клетки. Он присутствует в некоторых тканях, включая костную, ткань почки, плаценты,

5 гладкие мышцы и секреторные эпителии. OPN способен опосредовать клеточную адгезию и миграцию и связан с нормальными процессами ремоделирования ткани, такими как костная резорбция, ангиогенез, заживление ран и повреждения тканей. OPN, кроме того, экспрессируется при некоторых болезненных состояниях, например, рестенозе, атеросклерозе, заболеваниях почек и опухолеобразовании. Была отмечена модифицированная транскрипция гена, кодирующего OPN, при этом транскрипты, получаемые в результате альтернативного сплайсинга, приводят к экспрессии различных форм OPN при некоторых болезненных состояниях (Bissonnette et al 2012). OPN проявляет многие свои биологические эффекты в результате взаимодействия с интегринами, которые составляют большое семейство гетеродимерных трансмембранных рецепторов, которые опосредуют как взаимодействия клетка-клетка, так и взаимодействия клетка-матрикс и могут играть роль при воспалительных заболеваниях.

10 WO 98/56405 A1 касается способа модулирования (увеличения или уменьшения) иммунного ответа индивидуума путем изменения (увеличения или уменьшения) активности остеопонтина; но не хватает доказательств для подтверждения терапевтического влияния введения OPN (например, рекомбинантного OPN) субъекту.

15 WO 00/63241 A2 касается Eta-1/остеопонтина как регулятора иммунных ответов; но не дано доказательство, что введение OPN повышает иммунорезистентность к инфекционному заболеванию.

20 Khajooe V et al., 2006 CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, 143(2):260-268, касается роли остеопонтина в защите против микобактериальной инфекции, на основе исследований, проведенных на культурах человеческих макрофагов моноцитарного происхождения.

25 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Схема исследования и популяции в испытании на животных. Поросята были разделены на три группы с различными рационами, получавшими или смесь-заменитель молока свиньи (FF; n=10), или смесь с добавлением 140 мг/л остеопонтина (OPN; n=12), или вскармвливались свиноматкой (SR; n=7).

30 **Фигура 2.** Среднесуточная масса тела постнатальных поросят, принадлежащих к группам с различными рационами, которые получали смесь-заменитель молока свиньи (FF; n=10) или смесь с добавлением 140 мг/л остеопонтина (OPN; n=12), а на вставке показаны поросята, вскармливаемые свиноматкой (SR; n=7).

35 **Фигура 3.** Титр Fluzone™-специфического IgG в сыворотке, полученной от поросят 7-, 14- и 21-дневного возраста, измеренный с помощью ELISA. Уровни Fluzone-

специфического IgG у невакцинированных поросят показаны на вставке. Данные выражены как среднее значение \pm SD. Различные нижние индексы относятся к статистическому уровню значимости при $p < 0,05$. Верхние индексы в невакцинированной группе относятся к различиям во времени со статистическим уровнем значимости; верхние индексы на вакцинированном графике показывают различия на 21 день между группами с обработкой различными рационами.

Фигура 4. Концентрации общего IgG в сыворотке вакцинированных и невакцинированных поросят, измеренные с помощью ELISA. Сыворотка была получена из образцов крови, взятых у поросят в 7-, 14- и 21-дневном возрасте. Уровни общего IgG, измеренные в образцах, взятых на 21-й день, показаны на вставке. Данные выражены как среднее значение \pm SD. Верхние индексы относятся к различиям во времени со статистическим уровнем значимости.

Фигура 5. Концентрации общего IgM в сыворотке, полученной от поросят 7-, 14- и 21-дневного возраста, измеренной с помощью ELISA. Данные выражены как среднее значение \pm SD. Верхние индексы относятся к различиям во времени со статистическим уровнем значимости.

Фигура 6. Диаграмма разброса данных проточной цитометрии популяции Т-лимфоцитов PBMC, окрашенных по CD4 (клон 74-12-4) и CD8 (клон 76-2-11). Диаграмма из 4 квадрантов: CD8+ лимфоциты (цитотоксические Т-клетки, имеющие CD3+CD4-CD8+ профиль), CD4+ лимфоциты (Т-хелперные клетки, имеющие CD3+CD4+CD8- профиль), CD4+CD8+ лимфоциты (Т-клетки памяти, имеющие CD3+CD4+CD8+ профиль).

Фигура 7. Влияние рациона на численность Т-хелперных CD4+ клеток как (секция А), цитотоксических CD8+ Т-клеток (секция В) и на соотношение CD4+/CD8+ (секция С) у PBMC на 21 день. Клеточные популяции выражены как % от общих CD3+ Т-клеток. Данные выражены как среднее значение \pm SD, а различные верхние индексы показывают статистически значимые различия при $p < 0,05$. *показывает статистический тренд при $p < 0,1$.

Фигура 8. Влияние рациона на численность цитотоксических CD8+ Т-клеток (секция А) и на соотношение CD4+/CD8+ Т-клеток (секция В) в MLN на 21 день. Клеточные популяции выражены как % от общих CD3+ Т-клеток. Данные выражены как среднее значение \pm SD, а различные верхние индексы показывают статистически значимые различия при $p < 0,05$. *показывает статистический тренд при $p < 0,1$.

Фигура 9. Влияние рациона на численность (CD4+CD8+) Т-клеток памяти в селезенке на 21 день. Клеточные популяции выражены как % от общих CD3+ Т-клеток. Данные

выражены как среднее значение \pm SD, а различные верхние индексы показывают статистически значимые различия при $p < 0,05$ для влияния рациона в вакцинированной группе; *показывает статистическую значимость при $p < 0,05$ для влияния вакцинации.

5 **Фигура 10.** Секреция IL-12 клетками PBMC. Клетки PBMC культивировали *ex vivo* в течение 72 часов, собирали кондиционированную среду и анализировали IL-12 с помощью ELISA. Данные выражены как среднее значение \pm SD, а различные верхние индексы показывают статистически значимые различия при $p < 0,05$ для влияния рациона среди групп обработки; *показывает статистическую значимость при $p < 0,05$ для влияния вакцинации.

10 **Фигура 11.** Влияния стимуляции фитогемагглютинином (PHA) на секрецию IL-12 (A) и IL-10 (B) у PBMC. Клетки PBMC культивировали *ex vivo* в течение 72 часов в присутствии PHA, собирали кондиционированную среду и анализировали IL-10 и IL-12 с помощью ELISA. Данные выражены как среднее значение \pm SD, а различные верхние индексы показывают статистически значимые различия при $p < 0,05$ для влияния рациона среди групп обработки; *показывает статистический тренд при $p < 0,1$ для влияния рациона.

15 **Фигура 12.** Влияния стимуляции липополисахаридом (LPS) на PBMC секрецию IL-12 (A), IL-6 (B) и IL-10 (C). Клетки PBMC культивировали *ex vivo* в течение 72 часов в присутствии LPS, собирали кондиционированную среду и анализировали IL-6, IL-10 и IL-12 с помощью ELISA. Данные выражены как среднее значение \pm SD, а различные верхние индексы показывают статистически значимые различия при $p < 0,05$ для влияния рациона среди групп обработки; *показывает статистическую значимость при $p < 0,05$ для влияния вакцинации.

20 **Фигура 13.** Влияния стимуляции при помощи Fluzone на секрецию IL-12 (A) и IL-10 (B) у PBMC. Клетки PBMC культивировали *ex vivo* в течение 72 часов в присутствии Fluzone, собирали кондиционированную среду и анализировали IL-10 и IL-12 с помощью ELISA. Данные выражены как среднее значение \pm SD, а различные верхние индексы показывают статистически значимые различия при $p < 0,05$ среди групп обработки; *показывает статистическую значимость при $p < 0,05$ для влияния вакцинации.

25 **Фигура 14.** Секреция IL-12 (A) и IL-10 (B) клетками селезенки. Клетки селезенки культивировали *ex vivo* в течение 72 часов, собирали кондиционированную среду и анализировали IL-6, IL-10 и IL-12 с помощью ELISA. Данные выражены как среднее значение \pm SD, а различные верхние индексы показывают статистически значимые различия при $p < 0,05$ для влияния рациона среди групп обработки; *показывает тренд при $p = 0,07$ для влияния вакцинации.

35

Фигура 15. Влияния стимуляции фитогемагглютинином (PHA) на секрецию в селезенке IL-12 (A) и IL-10 (B). Клетки селезенки культивировали *ex vivo* в течение 72 часов в присутствии PHA, собирали кондиционированную среду и анализировали IL-10 и IL-12 с помощью ELISA. Данные выражены как среднее значение \pm SD; различные верхние индексы показывают статистический тренд при $p=0,07$ среди групп обработки; *указывает на статистическую значимость при $p<0,05$ для влияния вакцинации.

Фигура 16. Влияния стимуляции липополисахаридом (LPS) на секрецию селезенки IL-12 (A) и IL-10 (B). Клетки селезенки культивировали *ex vivo* в течение 72 часов в присутствии LPS, собирали кондиционированную среду и анализировали IL-10 и IL-12 с помощью ELISA. Данные выражены как среднее значение \pm SD, а различные верхние индексы показывают статистически значимые различия при $p<0,05$ для влияния рациона среди групп обработки; *указывает на статистическую значимость при $p<0,05$ для влияния вакцинации.

Фигура 17. Действие стимуляции при помощи Fluzone на секрецию селезенки IL-12 (A) и IL-10 (B). Клетки селезенки культивировали *ex vivo* в течение 72 часов в присутствии Fluzone, собирали кондиционированную среду и анализировали IL-10 и IL-12 с помощью ELISA. Данные выражены как среднее значение \pm SD, а различные верхние индексы показывают статистически значимые различия при $p<0,05$ для влияния рациона среди групп обработки; *указывает на статистическую значимость при $p<0,05$ для влияния вакцинации.

Фигура 18. Частота возникновения лихорадки у детей в возрасте от 1 до 6 месяцев при любом из 1) вскармливания грудью; 2) вскармливания обычной смесью (RF) без добавления OPN (F0); 3) вскармливания RF с добавлением бычьего OPN в количестве ~ 65 мг OPN/л (F65) и 4) вскармливания RF с добавлением бычьего OPN в количестве ~ 130 мг OPN/л (F130). Частота возникновения представлена как процент времени, на протяжении которого младенцы, принадлежащие к каждой группе обработки, были записаны, как такие, у которых была лихорадка в течение периода одного календарного месяца (время записи на значения календарного месяца являются средними значениями, записанными за период клинического исследования).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Неожиданно было обнаружено, что остеопонтин (OPN) молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант при пероральном введении повышает специфическую иммунологическую реактивность у субъекта-млекопитающего и, тем самым, улучшает его специфический иммунный ответ на вакцинацию. Настоящее изобретение основывается на результатах первого исследования, в которых

задокументировано, что пероральное введение OPN может быть использовано для повышения специфической иммунологической реактивности, индуцированной у субъекта-млекопитающего путем вакцинации.

5 Настоящее изобретение предусматривает OPN молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант для применения в качестве лекарственного препарата для повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего, например, путем повышения иммунорезистентности, индуцированной вакцинацией против заболевания, при этом OPN и/или его активный укороченный вариант предназначены для перорального введения. В соответствии с одним вариантом осуществления активный укороченный OPN охватывает по меньшей мере один активный OPN пептид, полученный из OPN молока млекопитающих путем протеолитического расщепления. OPN или его активный укороченный вариант можно применять для перорального введения или до вакцинации млекопитающего, или одновременно с ней, или после нее, или в их комбинации.

10 15 OPN молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант способны усиливать гуморальный иммунитет у млекопитающего.

OPN молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант могут быть получены от любого из коровы, козы, овцы, верблюда, буйвола, дромадера, ламы и какой-либо их комбинации.

20 В соответствии с одним вариантом осуществления OPN молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант предназначены для применения в повышении иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего, где млекопитающим является человек. В соответствии с одним вариантом осуществления человек принадлежит к возрастной группе, выбранной из группы 0–5, 6–11, 12–18, 19–25 34, 35–44, 45–54, 55–64, 65–74, 75–84 и старше 84 лет по возрасту.

30 В соответствии с одним вариантом осуществления инфекционное заболевание выбрано из гриппа, дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита, кори, эпидемического паротита и краснухи, туберкулеза, гепатита В, менингита С, вируса папилломы человека, ротавируса, гриппа типа а, гриппа типа b, пневмококковой инфекции и опоясывающего лишая.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает вакцинную систему, содержащую вакцину и OPN молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант, для применения в профилактическом или терапевтическом лечении инфекционного заболевания у млекопитающего, где OPN молока млекопитающих и/или активный укороченный вариант предназначены для перорального введения, например,

или до вакцинации млекопитающего, или одновременно с ней, или после нее, или в их комбинации. Пероральное введение OPN молока млекопитающих и/или активного укороченного варианта повышает иммунорезистентность к инфекционному заболеванию у млекопитающего, индуцированную вакцинацией. Остеопонтин молока млекопитающих и/или активный укороченный вариант способны усиливать гуморальный иммунитет у вакцинированных.

В соответствии с одним вариантом осуществления вакцинная система содержит OPN и/или его активный укороченный вариант, полученные от коровы, козы, овцы, верблюда, буйвола, дромадера, ламы или какой-либо их комбинации.

10 В соответствии с одним вариантом осуществления вакцинной системы млекопитающим является человек.

В соответствии с одним вариантом осуществления вакцинной системы инфекционное заболевание выбрано из гриппа, дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита, кори, эпидемического паротита и краснухи, туберкулеза, гепатита В, менингита С, ротавируса, вируса папилломы человека, гриппа типа а, гриппа типа b, пневмококковой инфекции и опоясывающего лишая.

В соответствии с одним вариантом осуществления вакцинной системы вакцину выбирают из вакцины против дифтерии, вакцины против столбняка, вакцины против коклюша, вакцины против полиомиелита или комбинированной вакцины (например, ТаР/IPV вакцины), комбинированной вакцины против кори, эпидемического паротита и краснухи (например, MMR вакцины), вакцины против туберкулеза (например, BCG вакцины), вакцины против гепатита В, вакцины против менингита С, ротавируса (вакцины против ротавируса), вакцины против вируса папилломы человека (HPV); вакцины против гриппа типа а и типа b (например, вакцины от гриппа), вакцины против пневмококковой инфекции и вакцины против опоясывающего лишая.

В соответствии с одним вариантом осуществления вакцинной системы человек принадлежит к возрастной группе, выбранной из группы 0–5, 6–11, 12–18, 19–34, 35–44, 45–54, 55–64, 65–74, 75–84 и старше 84 лет по возрасту.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего, который включает введение вакцины и OPN молока млекопитающих и/или одного или несколько его активных укороченных вариантов млекопитающему, где OPN и/или его активный укороченный вариант вводят перорально. OPN молока млекопитающих и/или активный укороченный вариант способны усиливать гуморальный иммунитет у вакцинированного млекопитающего.

В соответствии с одним вариантом осуществления способа повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего млекопитающим является человек.

5 В соответствии с одним вариантом осуществления способа OPN или его активный укороченный вариант вводят до вакцинации млекопитающего, одновременно с ней, или после нее, или в их комбинации.

В соответствии с одним вариантом осуществления способа OPN или его активный укороченный вариант вводят в суточной дозе в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг массы тела до приблизительно 5 г/кг массы тела подвергаемого лечению субъекта.

10 В соответствии с одним вариантом осуществления способа повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у человека человек принадлежит к возрастной группе, выбранной из группы 0–5, 6–11, 12–18, 19–34, 35–44, 45–54, 55–64, 65–74, 75–84 и старше 84 лет по возрасту.

15 В соответствии с одним вариантом осуществления способа OPN или его активный укороченный вариант имеет происхождение от млекопитающего, выбранного из коровы, козы, овцы, верблюда, буйвола, дромадера, ламы и какой-либо их комбинации.

20 В соответствии с одним вариантом осуществления способа инфекционное заболевание выбрано из гриппа, дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита, кори, эпидемического паротита и краснухи, туберкулеза, гепатита В, менингита С, ротавируса, вируса папилломы человека; гриппа типа а, гриппа типа b, пневмококковой инфекции и опоясывающего лишая.

25 В соответствии с одним вариантом осуществления способа вакцину выбирают из вакцины против дифтерии, вакцины против столбняка, вакцины против коклюша, вакцины против полиомиелита или комбинированной вакцины (например, ТаР/IPV вакцины), комбинированной вакцины против кори, эпидемического паротита и краснухи (например, MMR вакцины), вакцины против туберкулеза (например, BCG вакцины), вакцины против гепатита В, вакцины против менингита С, ротавируса (вакцины против ротавируса), вакцины против вируса папилломы человека (HPV),
30 вакцины против гриппа типа а и типа b (например, вакцины от гриппа), вакцины против пневмококковой инфекции и вакцины против опоясывающего лишая.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение решает вопрос необходимости усиления иммунного ответа у субъектов-млекопитающих, в частности у вскармливаемых смесью младенцев и
35 грудных детей, у взрослых с пониженным иммунным потенциалом (например, у

субъектов с нарушенным иммунитетом) и пожилых людей. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что OPN молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант при пероральном введении субъекту повышает иммунологическую реактивность у млекопитающего, тем самым, улучшая эффективность вакцинации млекопитающего.

I Остеопонтин молока млекопитающих (OPN) и/или его активный укороченный вариант

I. i Структура OPN молока млекопитающих

В соответствии с первым вариантом осуществления настоящее изобретение предусматривает OPN молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант для применения в повышении иммунологической реактивности к инфекционным заболеваниям и, в частности, индуцированной вакциной иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего.

OPN молока млекопитающих представляет собой растворимый молочный белок, получаемый в результате секреции из молочной железы. Несмотря на то, что OPN молока млекопитающих секретируется в виде полипептида, имеющего молекулярную массу приблизительно 60 кДа (по результатам определения с помощью SDS-PAGE), было обнаружено, что он сосуществует в молоке с укороченными формами OPN. В отличие от альтернативных (транскрипционных), сплайсированных изоформ OPN, экспрессируемых в других тканях, OPN молока млекопитающего присутствует в только одной сплайсированной изоформе; в то время как укороченные формы OPN молока являются результатом протеолитического расщепления данной секретируемой полипептидной изоформы. OPN молока, как полноразмерный полипептид, так и его укороченные формы, представляют собой высокофосфорилированные и высокогликозилированные полипептиды. Посттрансляционная структура фосфорилирования и гликозилирования OPN, как известно, является тканеспецифической и регулирует его физиологические свойства. Высокий уровень и структура фосфорилированных и гликозилированных полипептидных изоформ OPN молока представляет собой отличительную особенность, важную для его функциональных свойств (Bissonnette et al 2012).

OPN молока в соответствии с настоящим изобретением происходит от млекопитающего и может быть получен, например, из молока коровы, козы, овцы, верблюда, буйвола, дромадера или ламы. Полипептид OPN молока содержит ряд высоко консервативных мотивов последовательности, в частности, мотив RGD, который характеризуется связывающими альфа-интегрин свойствами. Расположение данных мотивов, которое является консервативным среди полипептидов OPN молока млекопитающих,

идентифицируют относительно OPN коровы, чья аминокислотная последовательность первичного продукта трансляции представлена в таблице 1.

Таблица 1: Аминокислотная последовательность OPN коровы [SEQ ID NO 1]

| | | | | | |
|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| MRIAVICFCL | LGIASALPVK | PTSSGSSEEK | QLNNKYPDAV | ATWLKPDPSQ | KQTFLLAPQNS |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| VSSEETDDNK | QNTLP ^S KS ^S NE | SPEQTDDLDD | DDDN ^S QDVN ^S | ND ^S DDAETTD | DPDH ^S DESHH |
| 130 | 140 | 150 | 160 | * | 170 |
| SDESDEVD ^F P | TDIPTIAVFT | PFIPTESAND | GRGDSVAYGL | KRSRKKFRRS | NVQSPDATEE |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| DFTSHIESEE | MHDAPK ^S KTSQ | LTDH ^S SKETNS | SELSKELTPK | AKDKNKHSNL | IESQENSKLS |
| 250 | 260 | 270 | | | |
| QEFH ^S LEDKL | DLDHK ^S SEEDK | HLKIRI ^S HEL | DSASSEVN | | |

UniProtKB: P31096

Сигнальный пептид: аминокислоты 1-16

Зрелый полноразмерный OPN: аминокислоты 17-278

*= R¹⁶³/S¹⁶⁴ прогнозируемый сайт расщепления тромбина и предполагаемый сайт расщепления при укорочении *in vivo*

мотивы FPTDIPT и RGDSVAYGLK (подчеркнутая последовательность): прогнозируемые сайты связывания интегрин

Сайты фосфорилирования*: T или S остатки подчеркнуты и выделены курсивом

Сайты O-гликолизирования*: T остатки выделены жирным шрифтом

*Sørensen et al 1995

- 5 Если OPN молока млекопитающих получен из молока коровы, OPN, как правило, содержит по меньшей мере один активный укороченный полипептид OPN в дополнение к зрелому полноразмерному полипептиду OPN. Как правило, один или несколько активных укороченных полипептидов OPN имеют молекулярную массу примерно 40 кДа (по результатам определения с помощью SDS-PAGE). Как правило, один или несколько активных укороченных полипептидов OPN получены из полноразмерного полипептида OPN путем расщепления *in vivo* пептидной связи в положении, которое является C-концевым по отношению к мотиву RGD. Как правило, по меньшей мере один или несколько активных укороченных OPN молока коровы получены из полноразмерного зрелого полипептида OPN, где зрелый OPN имеет аминокислотную последовательность, которая была определена как последовательность, идентичная остаткам 17–278 из SEQ
- 10

ID NO: 1. OPN молока коровы представляет собой секретлируемый полипептид, имеющий сигнальный пептид (соответствующий аминокислотным остаткам 1-16 из SEQ ID NO: 1), который котрансляционно отщепляется с образованием зрелого полноразмерного полипептида. Если OPN молока коровы содержит полноразмерный полипептид OPN, он, как правило, имеет аминокислотную последовательность с остатками 17-278 из SEQ ID NO: 1. Полагают, что один активный укороченный OPN молока коровы получен от полипептида OPN коровы (SEQ ID NO: 1) в результате расщепления пептида в сайте расщепления тромбина или поблизости от него (Таблица 1) с образованием укороченного на С-конце полипептида OPN, имеющего молекулярную массу примерно 40 кДа (по результатам определения с помощью SDS-PAGE), который сохраняет мотив RGD.

В соответствии с одним вариантом осуществления OPN молока млекопитающих содержит зрелый полноразмерный полипептид OPN, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100% идентична SEQ ID NO: 1; и/или один или несколько активных укороченных полипептидов OPN, имеющих аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100% идентичны полипептиду, имеющему последовательность, выбранную из любой группы аминокислотных остатков 17-161, 17-162, 17-163, 17-164 и 17-165 из SEQ ID NO: 1.

В контексте настоящего изобретения термин "идентичность последовательности" касается количественной меры степени идентичности между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, предпочтительно одинаковой длины. Если две подлежащие сравнению последовательности имеют различную длину, они должны быть выровнены до наилучшего соответствия. Идентичность последовательности может быть рассчитана как $(N_{ref}-N_{dif}) \cdot 100 / N_{ref}$, где N_{dif} представляет собой общее количество неидентичных остатков в двух последовательностях при выравнивании, и где N_{ref} представляет собой количество остатков эталонных последовательностей. Таким образом, ДНК-последовательность AGTCAGTC будет иметь последовательность, которая на 75% идентична с последовательностью AATCAATC ($N_{dif}=2$ и $N_{ref}=8$). Гэп считают как неидентичность специфического(их) остатка(ов), т. е. ДНК-последовательность AGTGTC будет иметь последовательность, которая на 75% идентична с ДНК-последовательностью AGTCAGTC ($N_{dif}=2$ и $N_{ref}=8$). Идентичность последовательности может быть рассчитана, например, с использованием соответствующих BLAST-

программ, таких как BLASTp-алгоритм, представленный Национальным центром биотехнологической информации (NCBI), США.

5 OPN молока млекопитающих может содержать активный укороченный полипептид OPN (tOPN) или полноразмерный полипептид OPN (fOPN), или две формы могут присутствовать в различных соотношениях. Например, соотношение tOPN/fOPN может находиться в диапазоне от 0:100 до 100:0, более предпочтительно соотношение представляет собой любое из 5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70:30, 75:35, 80:20, 85:15, 90:10 и 95:5. Как правило, соотношение в молоке коровы составляет 75% tOPN к 25% fOPN, где tOPN имеет молекулярную массу примерно 40 кДа (по результатам определения с помощью SDS-PAGE).

В соответствии со следующим вариантом осуществления OPN молока млекопитающих представляет собой укороченный OPN, где укороченный OPN содержит по меньшей мере один активный пептид OPN, получаемый из OPN молока млекопитающих (например, OPN молока коровы с SEQ ID No. 1) путем протеолитического расщепления. OPN млекопитающего, при прохождении через желудочно-кишечный тракт субъекта-млекопитающего, подвергается действию протеолитических ферментов, в частности, эндопротеаз: пепсина, трипсина и химотрипсина. Активные пептиды OPN, в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой пептиды которые сохраняют активность после воздействия протеаз, как правило, присутствующих в желудочно-кишечном тракте млекопитающего. Активные пептиды OPN, как правило, могут включать пептиды, содержащие все интегрин-связывающие мотивы или их часть, как правило, имеющие длину от 5 до 16 аминокислотных остатков.

25 I. ii *OPN молока млекопитающих повышает специфические иммунные ответы, индуцированные у млекопитающего в результате вакцинации*

OPN молока млекопитающих в соответствии с настоящим изобретением содержит полноразмерный полипептид OPN (fOPN) и/или по меньшей мере один активный укороченный полипептид или пептид (tOPN) OPN, который способен повышать иммунологическую реактивность млекопитающего и, тем самым, повышать специфический иммунный ответ, индуцированный у млекопитающего в результате воздействия инфекционного заболевания (и необязательно в результате заражения инфекционным заболеванием) или в результате вакцинации. Специфический иммунный ответ у млекопитающего, подвергаемого воздействию инфекционного заболевания (заражению инфекционным заболеванием), или у вакцинированного млекопитающего, включает продуцирование популяции молекул антител, которые избирательно взаимодействуют с антигеном, присутствующим в агенте инфекционного заболевания

(примеры инфекционных заболеваний и их агентов подробно описаны в II i) или в вакцине. Термин "активный" в отношении укороченного полипептида или пептида OPN по настоящему изобретению определяют как способность повышения специфического иммунного ответа млекопитающего на инфекционное заболевание или вакцинацию.

5 Титр специфических антител, индуцированных вакцинацией, обычно применяют как *in vivo* показатель комплексного иммунного ответа при вакцинации, а также показатель клинической защиты, которую можно обеспечить, который является специфичным для данной вакцины (Albers et al. 2013).

10 Влияние введения OPN молока коровы на специфический иммунный ответ, индуцированный у млекопитающего вакцинацией, проиллюстрировано в примере 1. В данном примере поросята, которых кормили рационом со смесью с добавленным OPN молока коровы, отвечали на вакцину Fluzone путем продуцирования Fluzone-специфических IgG в течение 21 дня, чей титр в образцах сыворотки крови поросят был значимо выше, чем в сыворотке поросят, которых кормили контрольной смесью, в
15 то же время соответствуя уровням IgG, наблюдаемым у поросят, получавших молоко свиньи, которое содержит нативный свиной OPN.

Специфический иммунный ответ у вакцинированного млекопитающего может быть определен путем непосредственного или опосредованного детектирования и количественного определения антител, присутствующих в образце жидкости организма, полученном от млекопитающего, которые могут образовывать комплекс с
20 антигеном(ами) вакцины. Если вакцина представлена в форме частиц, например, цельноклеточная инактивированная вакцина, можно применять количественный тест агглютинации (клеточного слипания) для определения серийного разбавления образца жидкости организма, который содержит достаточное количество специфических
25 антител, чтобы индуцировать клеточное слипание цельноклеточной вакцины. Если вакцина является растворимой, например вакцина на основе белковых субъединиц или пептидов, то подходящим способом детектирования специфических антител является твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Применение способа ELISA для детектирования антител проиллюстрировано в примере 1.3, в котором специфические к
30 вакцине Fluzone антитела IgG детектируют с применением анализа ELISA, специфичного для свиньи.

I. iii OPN молока млекопитающих повышает гуморальную иммунологическую реактивность млекопитающего

35 К удивлению, пероральное введение OPN, например в форме OPN-добавки в рационе, индуцирует сильную стимуляцию гуморального иммунитета, например, обеспечивая

повышенные уровни антиген-специфических IgG у вакцинированных млекопитающих и, в целом, более высокий уровень IgG. Это проиллюстрировано в примере 1, где поросят, получающих рацион со смесью с OPN-добавкой, сравнивают с поросятами на 5 рационах со смесью или выращенных свиноматкой. Причина данного ответа, как полагают, лежит в ряде модификаций иммунной системы, наблюдаемой у поросят, получающих рацион с OPN-смесью. Во-первых, поросята, получающие рацион с OPN-добавкой, имеют повышенные уровни IL-10 по сравнению с поросятами, вскормленными контрольной смесью или выращенными свиноматкой, что способствует индукции Th2 ответа и стимулирует дифференцировку В-клеток в секретирующие антитела клетки, что приводит к более высоким уровням IgG. OPN-индуцированное продуцирование IL-10 также играет ключевую роль в ингибировании последующих Th1-ответов, таких как активация макрофагов и провоспалительные ответы.

Во-вторых, повышенные уровни IL-12, обнаруженные в сыворотке поросят, вскармливаемых OPN-смесью, будут стимулировать дифференцировку Th1 клеток, что, в свою очередь, приведет к активации дифференцированных В-клеток, индуцируя у них секрецию антител (IgG). Индуцирование данного гуморального ответа у поросят, получающих рацион с OPN-добавкой, отражается в значительно повышенных уровнях CD4-секретирующих Т-хелперных клеток и относительно более низких уровнях CD8-секретирующих цитотоксических Т-клеток, по сравнению с лимфоцитарным профилем 15 клеток, полученных от поросят, вскармливаемых смесью или выращенных свиноматкой. Популяция Т-хелперных клеток посредством Th1 и Th2 систем вносит свой вклад в наблюдаемый гуморальный ответ и в существенной мере в повышенные уровни антиген-специфического IgG после вакцинации. В случае поросят-младенцев, выращенных на рационе со смесью, добавление OPN в рацион улучшает ответ на вакцинацию до уровней, наблюдаемых у поросят, вскормленных свиноматкой. Данные исследования свидетельствуют о том, что добавление OPN в рацион может усиливать и 25 повышать иммунный ответ на вакцинацию и, таким образом, улучшать иммунитет на антиген во вводимой вакцине. Данный вывод подтверждается тем фактом, что титр антител, индуцированных вакцинацией, по меньшей мере относительно коррелирует с защитой против заболевания, обеспечиваемой вакцинацией (Plotkin, SA., 2008).

I iv OPN молока млекопитающих повышает иммунорезистентность к инфекционному заболеванию у млекопитающего

Пероральное введение OPN молока млекопитающих, в соответствии с настоящим изобретением, млекопитающим, в частности младенцам человека, повышает их 35 иммунорезистентность к инфекционным заболеваниям. Это четко продемонстрировано в клиническом испытании, описанном в примере 2, в котором частоту инфекционных

событий отслеживали путем измерения и детектирования повышенной температуры тела (гипертермии) у младенца в качестве диагностического симптома подхваченного младенцем инфекционного заболевания, которое вызвано инфекционным агентом (например, вирусным, бактериальным, грибковым или эукариотическим патогенным агентом, таким как протозойная инфекция).

I v Получение OPN молока млекопитающих, приемлемого для введения

OPN молока млекопитающих, который присутствует в молоке лактирующего млекопитающего, может быть очищен с получением обогащенного источника OPN, который может иметь степень чистоты по меньшей мере от приблизительно 50% до приблизительно 60% по меньшей мере от приблизительно 60% до приблизительно 70% или по меньшей мере от приблизительно 70% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления он имеет степень чистоты по меньшей мере от приблизительно 80% до приблизительно 90%, тогда как в других вариантах осуществления источник OPN молока имеет степень чистоты по меньшей мере от приблизительно 90% до приблизительно 95% или больше. В определенных вариантах осуществления очищенный источник OPN молока имеет степень чистоты по меньшей мере приблизительно 95%, например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% или больше.

В конкретных вариантах осуществления источник OPN является очищенным препаратом OPN молока коровы, таким как, например, Lacprodan OPN-10® (Arla Foods Ingredients, Виби, Дания) (смотри также патент США №7259243). Lacprodan OPN-10® содержит примерно 22% (мас./мас.) полноразмерного OPN молока коровы и примерно 65% (мас./мас.) изоформы OPN молока коровы (укороченного OPN).

I vi Состав и дозировка OPN молока млекопитающих

OPN молока млекопитающих в соответствии с настоящим изобретением, например, OPN молока коровы, можно вводить в суточной дозе в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг массы тела до приблизительно 5 г/кг массы тела подвергаемого лечению субъекта. Для младенцев суточная доза OPN находится, как правило, в диапазоне приблизительно 5-50 мг/кг массы тела, предпочтительно 25-50 мг/кг массы тела для младенцев, имеющих массу тела в диапазоне массы от 3 до 10 кг. Как правило, рекомендуют вводить 0,5-5 г OPN в день для взрослого, например, в ежедневном объеме дозировки 100-250 мл. Лекарственная форма может содержать OPN молока млекопитающего в диапазоне 0,1 мг – 10 г на лекарственную форму. Например, пероральная лекарственная форма может содержать количество OPN в диапазоне 1 мг – 1 г на лекарственную форму. Альтернативно, пероральная лекарственная форма

может содержать количество OPN в диапазоне 10 мг – 800 мг на лекарственную форму. Пероральная лекарственная форма может, например, содержать количество OPN в диапазоне 25 мг – 500 мг на лекарственную форму.

5 OPN молока млекопитающих можно вводить в форме пищевой добавки, при этом добавка содержит OPN молока в количестве в диапазоне 0,01-90% (мас./мас.). Например, пищевая добавка может содержать OPN молока в количестве в диапазоне 0,1-80% (мас./мас.). Альтернативно, пищевая добавка может содержать OPN молока в количестве в диапазоне 1-70% (мас./мас.).

10 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пищевая добавка содержит OPN молока в количестве в диапазоне 5-60% (мас./мас.). Например, пищевая добавка может содержать OPN молока в количестве в диапазоне 10-50% (мас./мас.). Альтернативно, пищевая добавка может содержать OPN молока в количестве в диапазоне 0,1-20% (мас./мас.).

15 В других вариантах осуществления настоящего изобретения пищевая добавка содержит OPN молока в количестве в диапазоне 0,001-5% (мас./мас.). Например, пищевая добавка может содержать OPN молока в количестве в диапазоне 0,005-2% (мас./мас.). Альтернативно, пищевая добавка может содержать OPN молока в количестве в диапазоне 0,01-1% (мас./мас.). Пищевая добавка может, например, содержать OPN молока в количестве в диапазоне 0,05–0,5% (мас./мас.). Как правило, готовый к
20 потреблению пищевой напиток содержит OPN молока в количестве в диапазоне от 0,005% до 0,05% (мас./мас.).

Пищевые добавки, содержащие OPN молока, могут быть предварительно упакованы в жидкой или порошкообразной форме (например, баночный или бутилированный жидкий напиток). В некоторых вариантах осуществления порошкообразную форму
25 добавляют в продукт питания или напиток для внесения дополнительных питательных веществ. В определенных вариантах осуществления питательные напитки составляют, например, с фруктами, овощами, йогуртом, молоком и/или мороженым. В некоторых вариантах осуществления пищевые добавки смешивают до консистенции пюре. В определенных вариантах осуществления питательные напитки обогащают, например,
30 белком, витаминами, минералами, антиоксидантами, пробиотиками и/или пребиотиками. В определенных вариантах осуществления питательные напитки не содержат лактозу и/или глютен. В некоторых вариантах осуществления пищевые добавки являются органическими. Примеры детских питательных напитков включают PEDIASURE®, PEDIASmart® и RESOURCE® Just For Kids. Примеры питательных
35 напитков для взрослых включают ENSURE®, BOOST®, NESTLE®, CARNATION®, INSTANT BREAKFAST®, GLUCERNA®, GLYTROL®, NUTREN® и PEPTAMEN®. Пищевые

добавки также включают молоко, как соевое молоко, так и коровье молоко (например, цельное, с наполовину снятыми сливками или с низким содержанием жира, со снятыми сливками или обезжиренное (например, Cravendale), без лактозы (например, LACTOFREE®).

5 I vii *Введение OPN молока млекопитающих*

OPN молока млекопитающих, составленный для перорального введения млекопитающему (включая пищевые добавки или напитки, содержащие OPN молока млекопитающих), как описано в I v, можно вводить млекопитающему либо до вакцинации, либо одновременно с ней, либо после нее, либо в их комбинации.

10 Предпочтительно, пероральное введение OPN молока начинают до вакцинации и введение продолжают по меньшей мере до того, как проводят вакцинацию. Если введение OPN молока начинают до вакцинации, предпочтительно, чтобы введение начинали по меньшей мере за 1–21 день до вакцинации, как правило по меньшей мере за 1-7 дней до вакцинации, и продолжали по меньшей мере до проведения вакцинации.

15 Преимущественно, период введения OPN молока может быть впоследствии продлен после вакцинации по меньшей мере на дополнительные 1-4 недели. Если вакцинация млекопитающего включает вторичную вакцинацию, период введения OPN молока (или составов с ним) предпочтительно продлевают по меньшей мере до проведения вторичной вакцинации.

20 **II Вакцины**

II. i *Вакцины для профилактического и терапевтического лечения млекопитающих*

Вакцины могут выполнять как профилактическую, так и терапевтическую функции, таким образом, профилактическое или терапевтическое лечение можно применять для повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего и, тем самым, снижения риска инфекции или лечения существующей инфекции.

В соответствии с одним вариантом осуществления вакцину применяют для повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию, при этом вакцина содержит иммуноген, способный индуцировать иммуногенный ответ у субъекта-млекопитающего. Иммуноген может содержать суспензию живого (предпочтительно ослабленного) или инактивированного инфекционного агента (например, микроорганизма, такого как бактерия или вирус, паразит или другой патоген), который вызывает инфекционное заболевание. Альтернативно, иммуноген может содержать иммуногенный полипептид, например, полипептид, полученный из инфекционного агента, который может быть антигеном и который, следовательно, активировать иммунный ответ у животного. В других вариантах осуществления иммуноген может представлять собой нуклеиновую

кислоту, такую как рекомбинантный вектор (включая ДНК-векторы или плазмиды, ретровирусные векторы и лентивирусные векторы), которая кодирует антиген и может быть введена, например, как часть ДНК-вакцины.

5 В одном варианте осуществления иммуноген получен из патогена, выбранного из вирусных, бактериальных, грибковых или протозойных патогенов у млекопитающих (например, людей). Инфекционные заболевания, подлежащие лечению вакциной в соответствии с настоящим изобретением, включают дифтерию, столбняк, коклюш и полиомиелит (которые, как правило, лечат комбинированной вакциной, например, ТаР/IPV вакциной; MMR: корь, эпидемический паротит и краснуху (например, MMR
10 вакциной); туберкулез (например, BCG вакциной); гепатит В (например, вакциной против гепатита В); менингит С (например, вакциной против менингита С); вирус папилломы человека (HPV) как агент, вызывающий цервикальный/анальный рак и генитальные бородавки (например, HPV вакциной); грипп типа а и типа b (например, вакциной от гриппа); пневмококковую инфекцию (вакциной против пневмококковой
15 инфекции); ротавирус (вакциной против ротавируса) и опоясывающий лишай (вакциной против опоясывающего лишая). Вакцинация против опоясывающего лишая в значительной степени ограничена для пожилых людей, в то время как вакцинация против всех других перечисленных заболеваний является актуальной для всех возрастных групп, хотя вакцинацию преимущественно проводят в раннем детстве.

20 II ii Состав вакцины для профилактического и терапевтического лечения

Вакцина обычно содержит терапевтически эффективную дозу иммуногена (например, антигена инфекционного агента, опухолевого антигена, клеток неподвижных опухолей) и, предпочтительно, адъювант и/или фармацевтически приемлемый носитель. Термин "адъювант" касается соединения или смеси, которые повышают иммунный ответ на
25 антиген. Адъювант может служить, например, как тканевое депо, которое медленно высвобождает антиген, а также как активатор лимфоидной системы, который повышает иммунный ответ (смотри Hood et al., Immunology, Second Ed., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, CA, p. 384). Примеры адъювантов включают, но не ограничиваются этим, адъювант Фрейнда (полный и неполный), сапонин, минеральные
30 гели, такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, поверхностно-активные вещества (например, лизолецитин), плюроновые полиолы (например, карбопол), полианионы, полипептиды (например, бычий сывороточный альбумин, яичный альбумин), масляные или углеводородные эмульсии (например, маннида моноолеат (Aracel A)), гемоцианины лимфы улитки, динитрофенол и потенциально полезные
35 человеческие адъюванты, такие как BCG (бацилла Кальмета-Герена) и *Corynebacterium parvum*.

II iii *Протокол иммунизации и дозировка*

Вакцины вводят способом, совместимым с дозированным составом, и с такой частотой и количеством, которое будет профилактически или терапевтически эффективным и иммуногенным. Вакцину, как правило, будут вводить как преинфекционную вакцину, но могут давать в качестве постинфекционной вакцины. В соответствии с одним вариантом осуществления стандартный протокол иммунизации включает первичную вакцинацию, после которой могут последовать одна или несколько вторичных вакцинаций, вводимых через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше недель. Подлежащее введению количество зависит от возраста и массы подлежащего лечению субъекта, включая, например, способность иммунной системы индивидуума формировать иммунный ответ и степень необходимой защиты. Подходящие диапазоны дозировки составляют порядка нескольких сотен микрограммов полипептидов однократной или многократной субъединичной вакцины на вакцинацию с предпочтительным диапазоном от приблизительно 0,1 мкг до 1000 мкг, например, в диапазоне от приблизительно 1 мкг до 300 мкг и особенно в диапазоне от приблизительно 4 мкг до 100 мкг.

II iv *Введение вакцины*

Пригоден любой из общепринятых способов введения вакцины, включая пероральное, назальное или мукозальное введение или в твердой форме, содержащей активные ингредиенты (такой как таблетки, суппозитории или капсулы), или в форме физиологически приемлемой дисперсии, такой как спрей, порошок или жидкость, или парентеральное введение путем инъекции, например, применяемой подкожно, внутривенно, или внутримышечно, или трансдермально.

Вакцинные составы, подходящие для введения в виде суппозиториев, включают традиционные связывающие вещества и носители (например, клейстеризованный маисовый крахмал, олиалкиленгликоли или триглицериды); такие суппозитории могут быть сформированы из смесей, содержащих активный ингредиент в диапазоне от 0,5% до 10%, предпочтительно 1-2%. Пероральные составы включают такие обычно используемые наполнители, как, например, фармацевтического качества маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и тому подобное. Данные композиции принимают форму растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул, составов или порошков пролонгированного высвобождения и преимущественно содержат 10-95% активного ингредиента, предпочтительно 25-70%.

III *Группы населения, отвечающие на пероральное введение OPN молока млекопитающих*

Настоящее изобретение направлено на пероральное введение OPN молока млекопитающих для повышения специфического иммунного ответа, индуцированного у

млекопитающего путем воздействия инфекционного заболевания (и необязательно, инфицирования ним) или вакцинации. Млекопитающее может быть выбранным из свиньи, жвачного животного, лошади, кошачьих, собачьих и примата. Предпочтительно млекопитающим является субъект-человек. Группами населения, для которых пероральное введение OPN молока млекопитающих является особенно эффективным, являются новорожденные или маленькие младенцы, особенно во время периода вакцинации от детских болезней (смотри Iii); а также индивидуумы с иммунной системой, которая или снижена, или нарушена, или ухудшена, как и в случае некоторых взрослых и пожилых людей. Субъект-человек, принадлежащий к данным группам населения, может быть выбран из индивидуумов, принадлежащих к возрастным группам 0–5, 6–11, 12–18, 19–34, 35–44, 45–54, 55–64, 65–74, 75–84 и старше 84 лет по возрасту.

ПРИМЕР 1

1. Протокол

1.1 Исследуемая группа животных и схема исследования

Беременных свиноматок (~84 дня беременности; n = 3), которые ранее не были вакцинированы, получали от Midwest Research Swine (Гибсон, Миннесота). Пробы крови отбирали у свиноматок для исследования FZ-специфического IgG с помощью ELISA анализа (FZ представляла собой Fluzone™ – вакцина против гриппа человека). Для исследования отбирали свиноматок с самыми низкими титрами FZ-специфических IgG. После получения отобранных свиноматок вакцинировали LitterGuard LT-C (бактерин-анатоксин *Clostridium perfringens* тип C и *Escherichia coli*; Pfizer Animal Health, Экстон, Пенсильвания), RespiSure1 One (бактерин *Mycoplasma hyopneumoniae*; Pfizer) и Rhinogen BPE (бактерин-анатоксин *Bordetella bronchiseptica*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*; Intervet Inc., Милсборо, Делавер) с последующей вторичной вакцинацией за 2 недели до опороса. Свиноматки не получали вакцинацию против вируса свиного гриппа (SIV). Свиноматок размещали в родильных ящиках и держали на рационе для беременных, обогащенном антибиотиком (BMD). Свиноматкам давали возможность опороситься естественным путем, и поросята получали молозиво в течение 4 часов после родов, в пределах этого периода поросята принимали антитела, присутствующие в молозиве свиноматки и приобретали пассивный иммунитет к распространенным инфекциям, к которым свиноматок вакцинировали.

1.2 Группы животных с различными рационами и программа вакцинации

Поросят затем рандомизировали на три группы рационов, получавших или смесь-заменитель молока свиноматки (FF; n=10), или смесь с добавлением 140 мг/л OPN молока коровы (Lacprodan OPN-10, поставляемый Arla Food Ingredients Group I/S,

Sønderhøj 10 – 12, 8260 Viby J, Дания) (OPN; n=12) (смесь-заменитель молока свиноматки представляла собой LiquiWean, которая была получена от Milk Specialties, Данди, Иллинойс), в то время как третья группа поросят (n=7) выращивалась свиноматкой (SR) и служила в качестве контрольной группы (фигура 1). FF и OPN поросят индивидуально размещали в индивидуальные клетки в помещениях с контролируемой окружающей средой (25°C). Смесь-заменитель молока свиноматки (на основе белка коровьего молока) готовили ежедневно и предлагали 22 раза с расходом 360 мл/кг/сутки.

На 7-й день половина поросят в каждой группе с различным рационом (SR, FF, OPN) вакцинировали (SRV, FFV, OPNV) 0,25 мл внутримышечной инъекции вакцины против гриппа человека (Fluzone™, Sanofi Pasteur, Свифтуотер, Пенсильвания). На 14-й день вакцинированные поросята получали вторичную вакцинацию (в дозе, равной первой вакцинации).

1.3 Анализ концентраций сывороточных антител в сыворотке, полученной из образцов крови

Образцы крови собирали на 7-й день (исходный уровень, до вакцинации) и на 14-й день, путем прокола яремной вены, и еще раз на 21-й день путем внутрисердечной пункции (непосредственно перед эвтаназией).

Fluzone-специфические IgG оценивали в сыворотке, полученной из всех взятых образцов крови, с использованием ELISA, разработанного в нашей лаборатории. Если кратко, то на плоскодонные планшеты (Nunc, Рочестер, Нью-Йорк) наносили покрытие при помощи диализированной вакцины Fluzone™ в разведении 1:80 в буфере для нанесения покрытия [0,5 М буфер карбонат/бикарбонат натрия, pH 9,6] и инкубировали в течение ночи при 4°C. После инкубирования лунки блокировали 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS) в фосфатном буферном солевом растворе (PBS) в течение 1 часа при комнатной температуре (RT). Лунки промывали три раза PBS/0,05% Твин-20 перед добавлением 50 мкл разведенного в сыворотке PBS/10% FBS и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Планшеты снова промывали PBS/Твином с последующим добавлением козьего антитела к свиному IgG, конъюгированного с пероксидазой (Bethyl Laboratories, Монтгомери, Техас) в разведении 1:400 в PBS/10% FBS в течение 1 часа при 37°C. TMB (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) и инкубировали в течение 20 минут при RT с последующим добавлением 50 мкл 2 н. серной кислоты. Поглощение для каждой лунки измеряли на 450 нм, используя SpectraMax M2e (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния). Образцы положительной исходной сыворотки, которые содержали известные количества Fluzone-специфического IgG, вносили в каждый планшет в разведениях, находящихся в

диапазоне 1:2000-1:80000 и использовали для создания стандартной кривой для концентрации Fluzone-специфического IgG. Fluzone-специфический IgG выражали в относительных единицах, рассчитанных по линейной части стандартной кривой.

5 Концентрации общих IgG и IgM в сыворотке, полученной из взятых образцов крови, измеряли с использованием коммерчески доступных наборов ELISA (Bethyl Laboratories, Монтгомери, Техас).

1.4 Статистический анализ концентраций антител в сыворотке

10 Уровни циркулирующего в крови иммуноглобулина (FZ-специфического IgG, общего IgG и общего IgM) исследовали с использованием анализа повторных измерений, с полиномиальными контрастами для времени в SAS (версия 9.2, SAS Institute Inc., Кэри, Северная Каролина). Анализ проводили в полном наборе данных и разрозненно в вакцинированных и невакцинированных группах. Результаты измерений, выполненных на образцах крови, взятых на 21 день, исследовали с использованием Proc Mixed анализа с наполнением исходного как случайной величины. Основными анализируемыми эффектами были рацион, вакцинация и взаимодействие рациона и вакцинации. Взаимодействие исключали из модели, если оно не было статистически значимым. Данные представляли как средние значения \pm SD. Сравнения с $p < 0,05$ были признаны значимыми, а с $p < 0,1$ – как тренд.

1.5 Сбор образцов ткани от исследуемой группы животных.

20 Перед эвтаназией на 21-ый день после родов поросят усыпляли телазолом (7 мг/кг массы тела, IM, Fort Dodge Animal Health, Форт Додж, Айова) и периферическую кровь собирали в обвязанные вакуумные пробирки с гепарином с помощью внутрисердечной пункции. Поросят затем подвергали эвтаназии с помощью инъекции пентобарбитала натрия (72 мг/кг массы тела, Fatal Plus, Vortech Pharmaceuticals, Дирборн, Мичиган).
25 Тонкую кишку отрезали от пилорического сфинктера и илеоцекального клапана, и измеряли общую длину кишечника, и кишечник разрезали на уровне 10% и 85% от проксимального конца с получением 3 сегментов, соответствующих двенадцатиперстной кишке, тощей кишке и подвздошной кишке, соответственно. Образцы селезенки и лимфатических узлов подвздошной кишки (MLN) также вырезали
30 для выделения мононуклеарных клеток.

1.6 Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC)

Периферическую кровь первоначально разбавляли RPMI-1640 (2:1; Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк), затем наслаивали на Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), и центрифугировали при 400 x g в течение 40 минут при
35 20°C. PBMC собирали из границы раздела градиента и промывали три раза в буфере

для промывки (сбалансированный солевой раствор Хэнка, без Ca⁺⁺, без Mg⁺⁺, Life Technologies) с добавлением 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma-Aldrich, Сант-Луис, Миссури), 0,01 М EDTA (Sigma-Aldrich), 50 мкг/мл гентамицина (Life Technologies), и 1000 ед./мл пенициллина (10000 ед./мл в исходном растворе, Sigma-Aldrich), и 100 мкг/мл стрептомицина (10 мг/мл в исходном растворе, Sigma-Aldrich). Оставшиеся эритроциты в осадке лизировали буфером для лизиса (0,15 М NH₄Cl, 10 мМ KHCO₃ и 0,1 мМ Na₂EDTA). PBMC суспендировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS, 2 мМ глутамин, 50 мкг/мл гентамицина, 1 мМ пирувата натрия (Life Technologies), 20 мМ HEPES (Life Technologies) и 20 мМ 1000 ед./мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина. Количество жизнеспособных клеток оценивали с помощью автоматизированного счетчика клеток Countess® (Life Technologies). Клетки затем использовали для фенотипической идентификации клеток с помощью проточной цитометрии или *ex vivo* клеточной стимуляции.

1.6 Выделение общих иммунных клеток из селезенки и MLN

Образцы селезенки и MLN помещали в буфер для сбора (сбалансированный солевой раствор Хэнка (HBSS), 50 мкг/мл гентамицина, 0,01 М 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), 1000 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) и промывали три раза PBS (Life Technologies) + антибиотики (50 мкг/мл гентамицина, 1000 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). Ткани потом гомогенизировали в HBSS и нарезали, используя Gentle MACS (Miltenyi Biotech, Оберн, Калифорния). Тканевые гомогенаты профильтровывали через 100 мкм (BD Falcon, Сан-Хосе, Калифорния) с последующим фильтрованием через фильтр с порами 40 мкм (BD Falcon). Выделенные клетки промывали три раза в буфере для промывки после лизиса эритроцитов и суспендировали в полной среде (RPMI-1640, 10% FBS, 2 мМ глутамин, 50 мкг/мл гентамицина, 1 мМ пирувата натрия, 20 мМ HEPES и 20 мМ 1000 ед./мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина). Количество жизнеспособных клеток оценивали, как описано выше.

1.7 Фенотипическая идентификация PBMC и общие иммунциты, выделенные из MLN и селезенки

Фенотипы субпопуляций мононуклеарных клеток из периферической крови, MLN и селезенки контролировали проточной цитометрией (BD™ LSRII, Biosciences) с использованием панели mAb, меченных флуоресцеином (FITC) или фикоэритрином (PE). Т-лимфоциты идентифицировали с помощью мышинных антител к CD4 свиньи (FITC, клон 74-12-4) и мышинных антител к CD8 свиньи (PE, клон 76-2-11) (BD Biosciences). Десять мкл каждого из антител добавляли к 1×10^6 клеток из каждого образца. Процедуры окрашивания проводили на льду и, по возможности, образцы

удаляли со света. Вкратце, каждую лунку блокировали 5% мышинной сывороткой (Southern Biotec) и 200 мкг/мл очищенного мышинового IgG (Invitrogen) в течение 5 минут каждый раз. После центрифугирования в лунки добавляли CD3, и инкубировали в течение 20 минут (50 мкл: CD3:PE-Cy5), и снова центрифугировали. Добавляли CD4:FITC и CD8:PE (10 мкл каждого) и инкубировали в течение дополнительных 15 минут перед центрифугированием. Клетки промывали PBS/1% BSA/0,1% азида натрия и потом фиксировали 2% параформальдегидом. Клетки оценивали с использованием проточного цитометра LSRII (BD™, Biosciences). Процент субпопуляций Т-клеток определяли с использованием программного обеспечения FlowJo 7.9 (FlowJo, Ашленд, Орегон). CD3+ события считали Т-клетками. CD3+CD4+CD8- события считали Т-хелперными клетками, CD3+CD4-CD8+ и CD3+CD4+CD8+ считали цитотоксическими Т-клетками и Т-клетками памяти, соответственно. CD3-CD4-CD8+ события отмечали как естественные клетки-киллеры.

1.7 *Ex vivo* стимулирование мононуклеарных клеток периферической крови и клеток селезенки

Анализ *ex vivo* стимулирования проводили в качестве показателя функциональной способности иммунной системы. В общей сложности 2×10^6 /мл мононуклеарных клеток из крови и клеток из селезенки высевали в 96-луночные планшеты в конечном объеме 200 мкл культуральной среды (среды RPMI, включавшей 20% эмбриональную телячью сыворотку, 2 mM L-глутамин, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) в течение 72 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂. В лунки добавляли либо 50 мкл раствора 10 мкг/мл фитогемагглютина (PHA), либо 50 мкл раствора 0,8 мкг/мл липополисахарида (LPS), либо 18 мкл раствора 180 мкг/мл Fluzone™ в присутствии или при отсутствии OPN (10 мкл 10 мкг/мл). После 72-часового периода инкубирования планшеты центрифугировали и собирали надосадочные жидкости для измерения секреции цитокинов.

1.8 Измерение секреции цитокинов в *ex vivo* простимулированных клетках:

Секрецию цитокинов измеряли, используя коммерчески доступные наборы для IL-10, IL-6 и IL-12/IL-23 p40 (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота). Вкратце, на 96-луночные планшеты наносили покрытие в течение ночи при 4°C иммобилизуемыми антителами с использованием концентраций, рекомендованных производителем. Планшеты промывали 0,05% Твин в PBS и затем блокировали с использованием 1% BSA в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре. После 3 промывок 0,05% Твин в PBS в лунки добавляли 100 мкл неразбавленной надосадочной жидкости и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Лунки промывали снова перед добавлением детектируемого антитела, разбавленного 1:180 в 1% BSA в PBS, и

планшет инкубировали в течение 2 часов. Раствор конъюгата стрептавидин - пероксидаза хрена добавляли в лунки и инкубировали в течение 20 минут с последующим добавлением субстрата реакции TMB (OptEIA, BD Biosciences). После 20 минут инкубирования реакцию останавливали при помощи 50 мкл 2 н. H₂SO₄.
5 Поглощение измеряли в планшет-ридере при длине волны 450 нм.

2. Результаты

2.1 Кормление поросят смесью с добавлением OPN не оказывало никакого влияния на прирост их массы тела

10 Поросята во всех группах демонстрировали нормальный прирост массы тела. Добавление к смеси OPN или вакцинации не влияло на прирост массы тела поросят (фигура 2). Показатели массы тела в SR группе (вставка на фигуре 2) были сопоставимыми со вскармливаемыми смесью от рождения на 15 день, в то время как на 16 день их массы тела были больше, чем у FF или OPN.

15 *2.2 FluzoneTM-специфические IgG у поросят, вскармливаемых смесью, повышался при рационе с добавлением OPN до уровней у поросят, выращенных свиноматкой.*

Титр Fluzone-специфических IgG в сыворотке, полученной от поросят 7, 14 и 21-ого
20 дневного возраста, измеряли с помощью ELISA. Образец положительного контроля применяли как стандартную кривую для расчета относительных количеств FZ-специфического IgG, а значения представляли в виде произвольных единиц (фигура 3). В целом, статистика повторных измерений демонстрировала влияние вакцинации (p=0,0005) и времени (p=0,0001), но не влияние рациона. Дополнительный полиномиальный анализ трендов влияния времени показывал значимые линейные и квадратические (p<0,05) контрасты. Апостериорные статистические анализы
25 невакцинированной группы показывали, что циркулирующий в крови FZ-специфический IgG был, как правило, низким и не зависел от рациона. Тем не менее, концентрация FZ-специфического IgG значительно снижалась (p<0,05) с 7-го дня по 14-ый день и 21-ый день. Вакцинация не оказывала никакого влияния на сывороточные уровни FZ-специфического IgG после первой дозы FZ. К 21-ому дню,
30 после вторичной инъекции дозы антигена, данной на 14 день, животные из всех 3 групп обработки отвечали на FZ-вакцину. Концентрация FZ-специфического IgG у OPNV поросят была аналогичной у SRV поросят, и обе были значимо выше (p<0,05), чем у FFV поросят (при этом измеренные уровни в 3 группах составляли 371 ± 329, 400 ± 171 и 137 ± 157, соответственно).

35 *2.3 Титр общих IgG и IgM в сыворотке вакцинированных и невакцинированных поросят снижался с течением времени.*

Уровень общего IgG в сыворотке, измеренный с помощью ELISA (фигура 4), не зависел от рациона или вакцинации. Тем не менее, устойчивое снижение измеренных уровней общего IgG с течением времени было статистически значимым ($p < 0,01$) со значимым линейным изменением после анализа повторных измерений ($p < 0,002$). Анализ с помощью алгоритма Proc Mixed на 21 день показывал трендовый характер ($p = 0,09$) более высоких уровней общего IgG у вакцинированных поросят по сравнению с невакцинированными ($7,5 \pm 2,5$ и $5,9 \pm 2,7$ мг/мл, соответственно). Кроме того, вакцинация увеличивала уровни общего IgG в OPN группе в ~ 2 -раза (96%), но изменения, наблюдаемые у FF и SR поросят (0 и 10%, соответственно), были сравнительно небольшими. Данное увеличение уровней общего IgG отражало лучшую способность вырабатывать адаптивный иммунный ответ у поросят, получавших кормовую добавку OPN. Концентрация общего IgM не зависела от рациона или вакцинации, но изначально снижалась во время послеродового периода ($p < 0,001$; с линейными и квадратическими контрастами при $p < 0,0001$). На фигуре 5 показаны уровни общего IgM после объединения данных от невакцинированных и вакцинированных групп в пределах каждой обработки согласно рациону.

2.4 Рацион и вакцинация влияли на фенотипический профиль лимфоцитов

Фенотипы мононуклеарных субпопуляций в образцах селезенки, PBMC и MLN, взятых на 21-й день, определяли с помощью проточной цитометрии с использованием панели mAb, меченных флуоресцеином (FITC) или фикоэритрином (PE). Клетки идентифицировали как цитотоксические Т-клетки, Т-хелперные клетки, двойные положительные Т-клетки памяти или естественные клетки-киллеры (NKC) (фигура 6), как описано в примере 1.7. Фенотипический профиль лимфоцитов в анализе PBMC и статистическом анализе (причем взаимодействие рацион*вакцинация удалено как незначимое) представлен в таблице 1. Т-хелперные (CD4+) клетки, которые играют активную роль в адаптивных иммунных ответах, давали ответ на рацион, но не на вакцинацию. Уровень Т-хелперных клеток был значимо выше у OPN, нежели у FF и SR животных (49,4% против 42,2% и 41,3%, соответственно, фигура 7A). Цитотоксические Т-клетки (CD8+), важные в иммунной защите организма против цитозольных патогенов, также не зависели от вакцинации, в то время как влияние рациона демонстрировало тренд к различию. Анализ различия средних значений, полученных методом наименьших квадратов, показывал, что % Т-цитотоксических клеток в SR группе был значимо выше, чем у OPN ($p = 0,018$), и выше, чем у FF на уровне тренда ($p = 0,06$) (фигура 7B). Для лучшего понимания влияния рациона на популяцию мононуклеарных клеток рассчитывали соотношение Т-хелперных к Т-цитотоксическим клеткам (фигура 7C). Соотношение Т-хелперных к Т-цитотоксическим клеткам в PBMC у

OPN ($2,73 \pm 0,89$) и FF ($2,24 \pm 0,90$) поросят были значимо выше, чем соотношение у SR животных ($1,71 \pm 0,48$). Данное увеличение в соотношении Т-хелперных к Т-цитотоксическим клеткам показывало, что иммунная система стимулировалась к выработке вакцино-специфических антител у вакцинированных животных, в частности, у тех поросят, которые получали рацион с добавлением OPN.

Влияние вакцинации на популяцию Т-клеток памяти (двойные положительные по CD4+ и CD8+) было значимым, в то время как рацион проявлял лишь тренд ($p=0,052$). Вакцинация в результате приводила к 21% снижению в % CD3+ клеток, как и в случае с CD4+CD8+ клетками памяти. Популяция NK клеток (CD4+CD3+CD8-) в PBMC изменялась после вакцинации со значимым ($p<0,05$) увеличением с 14,8% у невакцинированных животных до 23,7% у вакцинированных животных, но не было никакого влияния рациона.

Таблица 1. Распределение лимфоцитов в PBMC как % CD3+ клеток (Т-клеток) или CD3-клеток (естественных клеток-киллеров).

| | Цитотоксические Т-клетки (CD3+CD4-CD8+) | Т-клетки памяти (CD3+CD4+CD8+) | Т-хелперные клетки (CD3+CD4+CD8-) | NK клетки (CD3-CD4-CD8+) |
|------------|--|-----------------------------------|---|-----------------------------|
| SR | $23,4 \pm 1,17$ | $21,3 \pm 2,58$ | $41,0 \pm 7,62$ | $20,0 \pm 19,4$ |
| FF | $19,8 \pm 5,77$ | $15,1 \pm 4,67$ | $39,0 \pm 4,77$ | $10,3 \pm 4,04$ |
| OPN | $16,9 \pm 3,59$ | $14,5 \pm 4,10$ | $49,5 \pm 8,47$ | $15,2 \pm 6,31$ |
| SRV | $26,0 \pm 8,89$ | $12,6 \pm 3,34$ | $38,9 \pm 3,29$ | $32,4 \pm 14,6$ |
| FFV | $20,7 \pm 6,46$ | $12,2 \pm 4,47$ | $43,0 \pm 7,14$ | $24,2 \pm 15,1$ |
| OPNV | $21,1 \pm 4,56$ | $13,2 \pm 3,92$ | $48,0 \pm 5,0$ | $19,0 \pm 7,66$ |
| Статистика | Рацион: $p=0,054$ | Рацион: $p=0,052$. | Рацион: $p<0,01$ | Рацион: Н.З. |
| | Вакцинация: Н.З. | Вакцинация: $p<0,01$ | Вакцинация: Н.З. | Вакцинация: $p<0,03$ |
| | | Рацион*вак.: $p<0,04$ | | |

Данные выражены как среднее значение \pm SD

Иммуноциты выделяли из MLN, как описано в примере 1.7, и клеточные популяции выявляли как % CD3+ и % CD3- (таблица 2). Вакцинация не оказывала значимого влияния на какие-либо из исследованных MLN иммуноцитов. Количество Т-цитотоксических клеток в OPN группе (13,7%) имело сильно сходство с количеством в SR группе (12,0%), и они обе значимо отличались от FF животных (16,6%, фигура 8А). Рацион не изменял % CD3+ клеток, как в случае с Т-хелперами, но он значимо ($p<0,05$) изменял популяцию Т-цитотоксических клеток. Аналогичным образом, значения соотношения Т-хелперных/Т-цитотоксических клеток у OPN и SR были

5 сопоставимыми и значимо превышали FF (фигура 8B). Повышенное соотношение CD4+/CD8+ клеток, наблюдаемое у РВМС, отражало повышенный адаптивный гуморальный ответ на вакцинацию у поросят, получавших OPN в рационе. Популяция NK клеток у SR поросят была большей, чем в обеих группах со смесью, но статистическая значимость была достигнута на уровне тренда ($p < 0,06$).

Таблица 2. Распределение MLN лимфоцитов как % CD3⁺ (Т-клеток) или CD3⁻ клеток (естественных клеток-киллеров).

| | Цитотоксические Т-клетки (CD3+CD4-CD8+) | Т-клетки памяти (CD3+CD4+CD8+) | Т-хелперные клетки (CD3+CD4+CD8-) | NK клетки (CD3-CD4-CD8+) |
|------------|---|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| SR | 13,6 ± 3,09 | 14,6 ± 2,71 | 55,3 ± 5,47 | 3,1 ± 1,59 |
| FF | 16,3 ± 1,51 | 15,5 ± 3,19 | 53,9 ± 2,46 | 2,0 ± 0,69 |
| OPN | 14,4 ± 2,33 | 13,3 ± 4,36 | 60,3 ± 5,12 | 2,1 ± 0,82 |
| SRV | 10,5 ± 3,89 | 15,6 ± 9,39 | 61,7 ± 13,9 | 3,1 ± 0,86 |
| FFV | 16,8 ± 2,92 | 15,3 ± 5,15 | 57,2 ± 3,75 | 1,9 ± 0,51 |
| OPNV | 12,9 ± 3,15 | 17,3 ± 4,68 | 57,9 ± 3,82 | 1,9 ± 1,62 |
| Статистика | Рацион: $p < 0,005$ | Рацион: Н.З. | Рацион: Н.З. | Рацион: $p = 0,056$ |
| | Вакцинация: Н.З. | Вакцинация: Н.З. | Вакцинация: Н.З. | Вакцинация: Н.З. |

Данные выражены как среднее значение ± SD

10

Распределение мононуклеарных клеток, выделенных из селезенки, показано в таблице 3. Т-хелперные и Т-цитотоксические клетки в селезенке подвергались влиянию вакцинации, но не обработке согласно рациону. % от CD3⁺ в виде клеток памяти подвергались влиянию рациона и вакцинации. Вакцинация увеличивала популяцию клеток памяти, которые важны в развитии адаптивного (гуморального) ответа. Примечательно, обе вскармливаемые смесью группы (OPN и FF группы) имели значимо более высокие уровни клеток памяти, чем SR (фигура 9). NK клетки были значимо более высокими у невакцинированных SR животных по сравнению со всеми другими группами обработки. Вакцинация не влияла на уровни NK в селезенке. Соотношение Т-хелперных (CD4+)/Т-цитотоксических (CD8+) клеток также, по видимому, повышалось в селезенке у вакцинированных поросят, в частности, у тех, которых кормили SR или OPN, что отражало индуцирование адаптивного гуморального ответа.

25

Таблица 3. Распределение лимфоцитов в селезенке как % CD3⁺ (Т-клеток) или CD3⁻ клеток (естественных клеток-киллеров).

| | Цитотоксические Т-клетки (CD3+CD4- CD8+) | Т-клетки памяти (CD3+CD4+CD8+) | Т-хелперные клетки (CD3+CD4+CD8-) | НК клетки (CD3-CD4-CD8+) |
|------------|--|-----------------------------------|---|-----------------------------|
| SR | 13,6 ± 3,09 | 4,7 ± 0,99 | 55,3 ± 6,98 | 10,7 ± 4,16 ^a |
| FF | 13,0 ± 5,79 | 8,6 ± 4,02 | 46,0 ± 15,7 | 4,4 ± 1,10 ^b |
| OPN | 13,9 ± 3,61 | 8,6 ± 3,52 | 44,9 ± 6,91 | 4,1 ± 2,70 ^b |
| SRV | 10,5 ± 3,89 | 5,94 ± 0,58 | 61,7 ± 13,9 | 5,9 ± 0,89 ^b |
| FFV | 12,5 ± 4,52 | 13,0 ± 2,97 | 48,2 ± 7,30 | 4,7 ± 1,47 ^b |
| OPNV | 10,8 ± 2,43 | 10,6 ± 2,19 | 49,1 ± 5,87 | 5,8 ± 2,80 ^b |
| | | | | Рацион: p<0,005 |
| Статистика | Рацион: Н.З. | Рацион: p<0,01 | Рацион: Н.З. | Вакцинация: Н.З. |
| | Вакцинация: p<0,05 | Вакцинация: p<0,01 | Вакцинация: p<0,04 | Рацион*вак.: p<0,02 |

¹ Данные выражены как среднее значение ± SD

2.5 *Ex vivo* стимулирование и секреция цитокинов выделенными иммунными клетками:

Для того, чтобы оценить клеточные иммунные ответы РВМС и клеток селезенки, выделенные клетки инкубировали в течение 72 часов с РНА, LPS или Fluzone. Фитогемагглютинин (РНА), растительный лектин и липополисахарид (LPS), компонент бактериальной клеточной стенки, являются митогенами, которые активируют Т-клетки и В-клетки, соответственно. Активация иммунных клеток приводит к секреции цитокинов. Интерлейкин 6 (IL-6), также известный как интерферон-бета 2, представляет собой плейотропный α-спиральный цитокин, который имеет важное значение для перехода от острого воспаления или в приобретенный иммунитет, или в хроническое воспалительное заболевание. Интерлейкин 10 (IL-10) представляет собой противовоспалительный Th2 цитокин, в то время как интерлейкин-12 (IL-12) представляет собой провоспалительный Th1 цитокин, также известный как фактор стимуляции естественных клеток-киллеров (NKSF) или фактор созревания цитотоксических лимфоцитов. Культивирование клеток *ex vivo* проводили в присутствии или при отсутствии 10 мкг/мл OPN в культуральных средах. Добавление OPN не оказывало значимого влияния на секрецию анализируемых цитокинов, поэтому данные от OPN-обработанных и необработанных клеток объединяли. Данные с концентрациями цитокина (пг/мл) для всех обработок РВМС и селезенки подытожены в таблицах 4 и 5, соответственно. Статистически значимые данные затем объединяли на основе статистических различий, и они представлены на фигурах 10-17.

Мононуклеарные клетки периферической крови: у нестимулированных PBMC концентрация IL-6 и IL-10 была ниже уровня детектирования (таблица 4). IL-12 детектировали в надосадочной жидкости нестимулированных клеток, и эффекты как рациона, так и вакцинации были статистически значимыми ($p < 0,05$) (фигура 10). IL-12 был наиболее высоким в PBMC у OPNV группы по отношению ко всем другим группам обработки. РНА стимулирование цитокинов у PBMC не подвергалось влиянию вакцинации. Тем не менее, влияние рациона на секрецию IL-12 было статистически значимым с наиболее высокой секрецией, наблюдаемой у OPNV (фигура 11A). Секреция IL-10 проявляла тренд к различию среди групп рационов, при этом клетки, полученные от группы OPN, имели тренд к повышению, нежели от SR и FF поросят (фигура 11B).

Концентрации IL-6 и IL-12 были значимо выше ($p < 0,05$) в LPS-стимулированных PBMC, полученных от поросят, вскармливаемых OPN, по отношению к SR и FF группам, независимо от вакцинации (фигура 12A и B, соответственно). Аналогичную картину наблюдали при LPS-стимуляции секреции IL-10, где воздействие OPN в результате приводило к более высокой концентрации IL-10. Кроме того, вакцинация в результате приводила к более высоким уровням IL-10 в группах OPN и SR (фигура 12C).

Эффект стимулирования Fluzone на IL-12 был зависимым от вакцинации, со статистически значимым взаимодействием между рационом и вакцинацией (фигура 13A). Вакцинация в результате приводила к пониженной секреции IL-12 у SRV и FFV, в то время как группа OPN оставалась неизменной. Секреция IL-10 в Fluzone-стимулированных клетках была выше в OPN-вскармливаемой группе по сравнению с SR и FF, в то время как у вакцинированных поросят была более низкая концентрация IL-10 (фигура 13B).

Иммунные клетки селезенки: клетки, выделенные из селезенки, стимулировали РНА, LPS и Fluzone и измеряли продуцирование цитокинов в надосадочной жидкости, собранной после 72 часов инкубирования (таблица 5). Клетки селезенки не продуцировали какой-либо IL-6 в ответ на стимул, использованный в исследовании. IL-12, с другой стороны, находили в надосадочной жидкости нестимулированных клеток (фигура 14A). Клетки из групп SR и FF секретировали более высокие количества IL-12, в то время как с рационом OPN и вакцинацией был тренд ($p = 0,07$) к снижению концентрации IL-12. Концентрация IL-10 в надосадочных жидкостях нестимулированных клеток была наиболее высокой в группе SRV (фигура 14B). Секреция IL-12 и IL-10 клетками селезенки в ответ на РНА стимулирование была аналогичной. Вакцинация снижала концентрацию IL-12 (фигура 15A) и IL-10 (фигура 15B) по сравнению с уровнями, обнаруженными в невакцинированных группах. Более

того, OPN группа имела значимо более низкие уровни обоих цитокинов, чем SR и FF группы. Аналогичным образом, секреция IL-12 в ответ на LPS была значимо выше в надосадочной жидкости клеток, полученных от невакцинированных, нежели вакцинированных поросят ($p < 0,05$) (фигура 16A). Клетки, полученные из группы OPN, секретировали наиболее низкое количество IL-12 по отношению к SR и FF группам. Секреция IL-10 в LPS-стимулированных клетках не подвергалась влиянию вакцинации, но была выше в SR группе, чем в FF и OPN группах (фигура 16B). При Fluzone-стимулировании секреция IL-12 и IL-10 была наиболее низкой в вакцинированной группе ($p < 0,05$), а клетки, выделенные из OPN животных, секретировали меньше IL-12, чем SR и FF (фигура 17).

В заключение, если поросята получали рацион со смесью с добавлением OPN, клетки их желудков подвергались воздействию постоянной концентрации OPN. Это полностью отличалось для выращенных свиноматкой поросят, у которых уровень OPN, который они получали, падал, поскольку поставку молозива свиноматкой заменяли молоком свиноматки, и был ниже 140 мг/л, который обеспечивали в рационе со смесью с добавлением OPN. Поросята, получавшие смесь с добавлением OPN, характеризовались иммунными клетками (PBMC), которые секретировали больше IL-12 и IL-10, при инкубировании *ex vivo*, как при отсутствии, так и в присутствии иммунных стимуляторов, по сравнению с клетками, полученными от вскармливаемых смесью или выращенных свиноматкой поросят. Это свидетельствовало о том, что рацион с OPN оказывал влияние на клетки PBMC, стимулируя секрецию IL-12 и IL-10. Способность PBMC от поросят, вскармливаемых смесью с OPN, секретировать IL-12 (провоспалительный) и IL-10 (противовоспалительный) при стимулировании РНА (Т-клеточная активация) и LPS (В-клеточная активация) позволяет предположить о наличии иммунного механизма, направленного на поддержание иммунного баланса.

ПРИМЕР 2

Клиническое исследование с OPN-10 Lactrodan®, вводимым младенцам

2.1 Схема исследования

Двойное слепое рандомизированное клиническое исследование проводили в г. Шанхай, Китай, для оценки эффектов от добавления OPN коровы к смеси. Матери выбирали или грудное вскармливание, или вскармливание смесью для своего младенца в возрасте от 1 до 6 месяцев. Группы были следующими ($n=60$ /группа):

- 1) младенцы на грудном вскармливании
- 2) младенцы, которых кормили обычной смесью (RF) без добавления OPN (F0)
- 3) RF с добавлением OPN коровы дозой ~65 мг OPN/л (F65)

4) RF с добавлением OPN коровы дозой ~130 мг OPN/л (F130)

* Основные уровни OPN, обнаруженные в (без добавки) обычной смеси, составляли ~15 мг OPN/л.

5 Антропометрию регистрировали ежемесячно, а образцы венозной крови забирали проколом вены в возрасте 1, 4 и 6 месяцев. Анализировали гематологию, иммунные параметры, аминокислоты в плазме и азот мочевины крови (BUN).

2.2 Результаты исследования

10 Частота возникновения гипертермии у младенцев в ответ на инфекцию (такую как вирусная, бактериальная, грибковая или амебная инфекция) значительно увеличивалась у младенцев, получавших обычную смесь (F0), по сравнению с
15 младенцами на грудном вскармливании (фигура 18). Добавление OPN к обычной смеси в количестве 65 мг OPN/л или 130 мг OPN/л снижало высокую частоту возникновения гипертермии, наблюдаемую при вскармливании обычной смесью, до уровней, более приближенных к низким уровням частоты возникновения, наблюдаемым у младенцев
на грудном вскармливании. Группа младенцев, получавших обычную смесь (F0), была единственной группой, которая показывала статистически значимое увеличение частоты возникновения гипертермии, по сравнению с младенцами на грудном вскармливании.

20 Ссылки:

Albers et al. 2013 Monitoring immune modulation by nutrition in the general population: identifying and substantiating effects on human health. *British J Nutrition* 110(2):1-22.

Bissonnette et al 2012; Proteomic analysis and immunodetection of the bovine milk osteopontin isoforms. *Journal of Dairy Science*, 95(2): 567-579.

25 **Plotkin, SA, 2008**; Correlates of Vaccine-Induced Immunity. *Vaccines* 47:401-409.

Sørensen et al 1995 Posttranslational modifications of bovine osteopontin: Identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites; *Protein Science* 4: 2040-2049

Формула изобретения

- 5 1. Остеопонтин молока млекопитающих и/или один или несколько его активных укороченных вариантов для применения в качестве лекарственного препарата для повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего, где остеопонтин и/или его активный укороченный вариант предназначен для перорального введения.
- 10 2. Остеопонтин молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант для применения по п. 1, где молоко млекопитающего выбрано из молока коровы, козы, овцы, верблюда, буйвола, дромадера, ламы и какой-либо их комбинации.
- 15 3. Остеопонтин молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант для применения по п. 1 или п. 2, где остеопонтин и/или его активный укороченный вариант усиливает гуморальный иммунитет у млекопитающего.
4. Остеопонтин молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант для применения по любому из пп. 1-3, где млекопитающим является человек.
- 20 5. Остеопонтин молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант для применения по любому из пп. 1-4, где человек принадлежит к возрастной группе, выбранной из 0-5, 6-11, 12-18, 19-34, 35-44, 45-54, 55-64, 65-74, 75-84 и старше 84 лет.
- 25 6. Молоко млекопитающего и/или его активный укороченный вариант для применения по любому из пп. 1-5, где иммунорезистентность к инфекционному заболеванию у млекопитающего является индуцированной вакцинацией.
- 30 7. Молоко млекопитающего и/или его активный укороченный вариант для применения по любому из пп. 1-5, где инфекционное заболевание выбрано из гриппа, дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита, кори, эпидемического паротита и краснухи, туберкулеза, гепатита В, менингита С, ротавируса, вируса папилломы человека, гриппа типа а, гриппа типа b, пневмококковой инфекции и опоясывающего лишая.

8. Пищевая композиция, содержащая молоко млекопитающего и/или один или несколько его активных укороченных вариантов по любому из пп. 1-7.
- 5 9. Вакцинная система, содержащая вакцину и остеопонтин молока млекопитающих и/или один или несколько его активных укороченных вариантов, для применения в профилактическом или терапевтическом лечении инфекционного заболевания у млекопитающего, где остеопонтин и/или его активный укороченный вариант предназначены для перорального введения; где введение остеопонтина и/или его активного укороченного варианта повышает иммунорезистентность, индуцированную вакциной.
- 10 10. Вакцинная система для применения по п. 9, где остеопонтин молока млекопитающих и/или его активный укороченный вариант усиливает гуморальный иммунитет у млекопитающего.
- 15 11. Вакцинная система для применения по п. 9 или п. 10, где остеопонтин и/или его активный укороченный вариант выбраны из такового от коровы, козы, овцы, верблюда, буйвола, дромадера, ламы и какой-либо их комбинации.
- 20 12. Вакцинная система для применения по любому из пп. 9-11, где остеопонтин и/или его активный укороченный вариант предназначены для перорального введения до вакцинации млекопитающего, одновременно с ней, или после нее, или в их комбинации.
- 25 13. Вакцинная система для применения по любому из пп. 9-12, где млекопитающим является человек.
- 30 14. Вакцинная система для применения по любому из пп. 9-13, где инфекционное заболевание выбрано из гриппа, дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита, кори, эпидемического паротита и краснухи, туберкулеза, гепатита В, менингита С; ротавируса, вируса папилломы человека; гриппа типа а, гриппа типа b, пневмококковой инфекции и опоясывающего лишая.
- 30 15. Вакцинная система для применения по любому из пп. 9-14, где человек принадлежит к возрастной группе, выбранной из 0-5, 6-11, 12-18, 19-34, 35-44, 45-54, 55-64, 65-74, 75-84 и старше 84 лет.

Формула изобретения

измененная на международной стадии

- 5 1. Остеопонтин молока млекопитающего для применения в качестве лекарственного препарата для повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего, где остеопонтин предназначен для перорального введения.
- 10 2. Остеопонтин молока млекопитающего для применения по п. 1, где молоко млекопитающего выбрано из молока коровы, козы, овцы, верблюда, буйвола, дромадера, ламы и какой-либо их комбинации.
- 15 3. Остеопонтин молока млекопитающего для применения по п. 1, где остеопонтин является коровьим и содержит полипептид остеопонтина, имеющий аминокислотную последовательность с остатками 17–278 из SEQ ID NO: 1, и активный укороченный полипептид остеопонтина массой 40 кДа, полученный из полипептида OPN в результате расщепления пептидной связи *in vivo* в положении, которое является С-концевым относительно мотива RGD.
- 20 4. Остеопонтин молока млекопитающего для применения по п. 1, где остеопонтин является коровьим и содержит полипептид остеопонтина, имеющий аминокислотную последовательность с остатками 17–278 из SEQ ID NO: 1, и активный укороченный полипептид остеопонтина, где аминокислотная последовательность представляет собой остатки 17–163 из SEQ ID NO: 1.
- 25 5. Остеопонтин молока млекопитающего для применения по п. 1 или п. 2, где остеопонтин усиливает гуморальный иммунитет у млекопитающего.
6. Остеопонтин молока млекопитающего для применения по любому из пп. 1-5, где млекопитающим является человек.
- 30 7. Остеопонтин молока млекопитающего для применения по любому из пп. 1-6, где человек принадлежит к возрастной группе, выбранной из 0–5, 6–11, 12–18, 19–34, 35–44, 45–54, 55–64, 65–74, 75–84 и старше 84 лет.
8. Остеопонтин молока млекопитающего для применения по любому из пп. 1-7, где иммунорезистентность к инфекционному заболеванию у млекопитающего является индуцированной вакцинацией.
- 35 9. Остеопонтин молока млекопитающего для применения по любому из пп. 1-7, где инфекционное заболевание выбрано из гриппа, дифтерии,

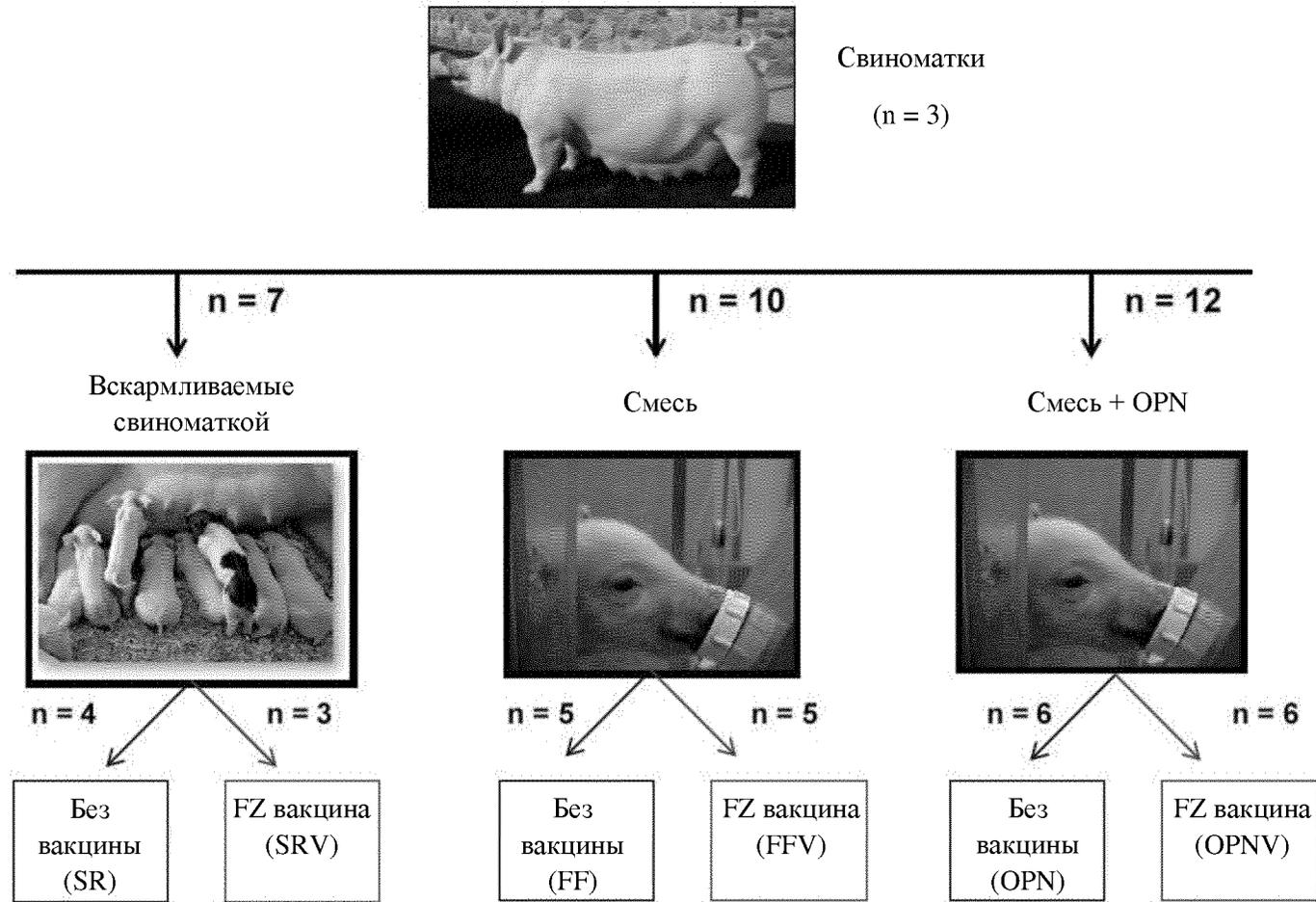
столбняка, коклюша, полиомиелита, кори, эпидемического паротита и краснухи, туберкулеза, гепатита В, менингита С, ротавируса, вируса папилломы человека, гриппа типа а, гриппа типа в, пневмококковой инфекции и опоясывающего лишая.

- 5 10. Пищевая композиция, содержащая молоко млекопитающего, для применения по любому из пп. 1-9.
11. Вакцинная система, содержащая вакцину и остеопонтин молока млекопитающего, для применения в профилактическом или терапевтическом лечении инфекционного заболевания у млекопитающего, где остеопонтин предназначен для перорального введения; где введение остеопонтина повышает иммунорезистентность, индуцированную вакциной.
- 10 12. Вакцинная система для применения по п. 11, где остеопонтин молока млекопитающего усиливает гуморальный иммунитет у млекопитающего.
13. Вакцинная система для применения по п. 11 или п. 12, где остеопонтин выбран из такового от коровы, козы, овцы, верблюда, буйвола, дромадера, ламы и какой-либо их комбинации.
- 15 14. Вакцинная система для применения по п. 11, где остеопонтин является коровьим и содержит полипептид остеопонтина, имеющий аминокислотную последовательность с остатками 17–278 из SEQ ID NO: 1, и активный укороченный полипептид остеопонтина массой 40 кДа, полученный из полипептида OPN в результате расщепления пептидной связи *in vivo* в положении, которое является С-концевым относительно мотива RGD.
- 20 15. Вакцинная система для применения по п. 11, где остеопонтин является коровьим и содержит полипептид остеопонтина, имеющий аминокислотную последовательность с остатками 17–278 из SEQ ID NO: 1, и активный укороченный полипептид остеопонтина, где аминокислотная последовательность представляет собой остатки 17–163 из SEQ ID NO: 1.
- 25 16. Вакцинная система для применения по любому из пп. 11-15, где остеопонтин предназначен для перорального введения до вакцинации млекопитающего, одновременно с ней или после нее или в их комбинации.
- 30 17. Вакцинная система для применения по любому из пп. 11-16, где млекопитающим является человек.
18. Вакцинная система для применения по любому из пп. 11-17, где инфекционное заболевание выбрано из гриппа, дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита, кори, эпидемического паротита и краснухи,
- 35

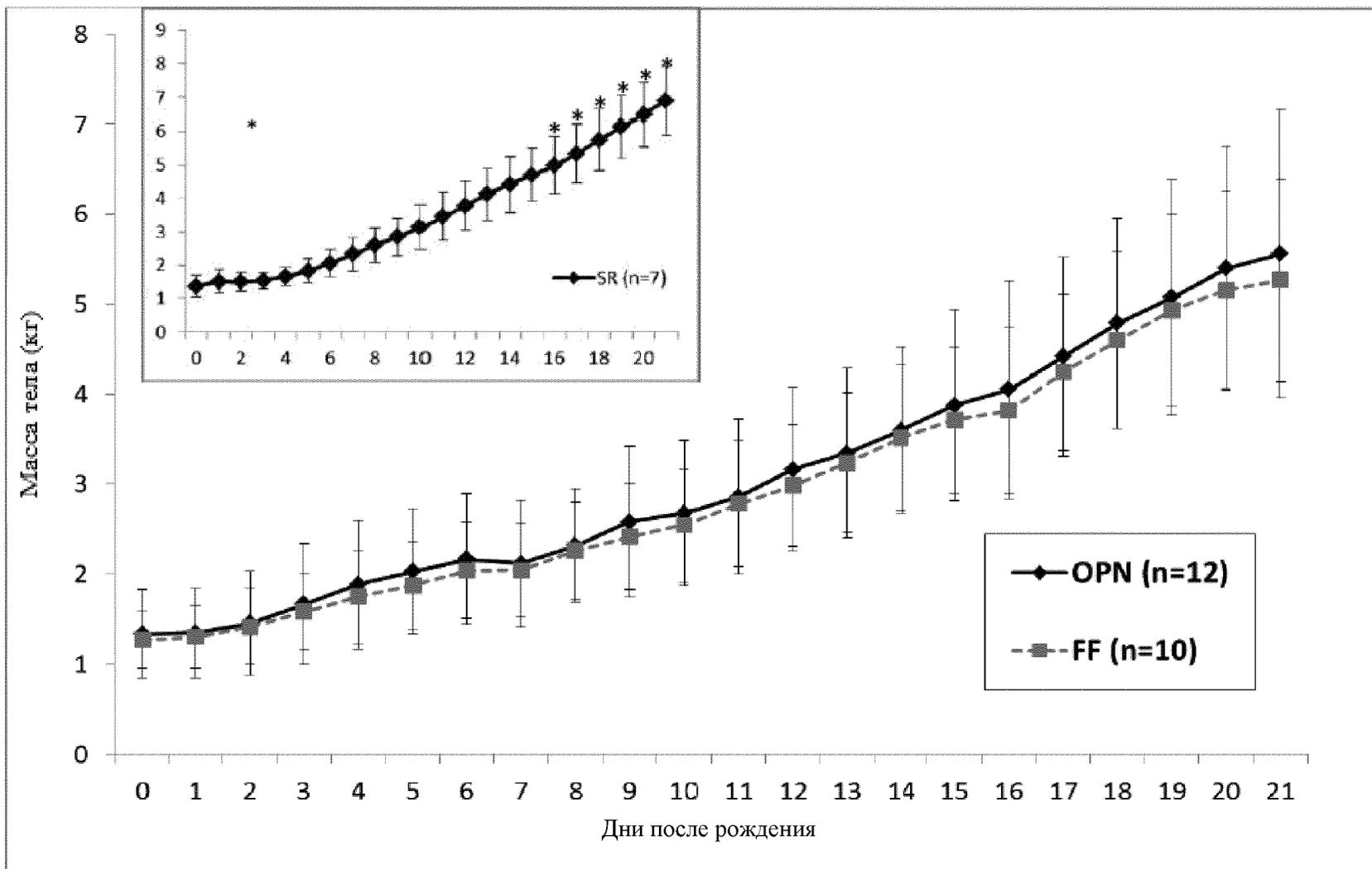
Формула изобретения
измененная на международной стадии

туберкулеза, гепатита В, менингита С; ротавируса, вируса папилломы человека; гриппа типа а, гриппа типа b, пневмококковой инфекции и опоясывающего лишая.

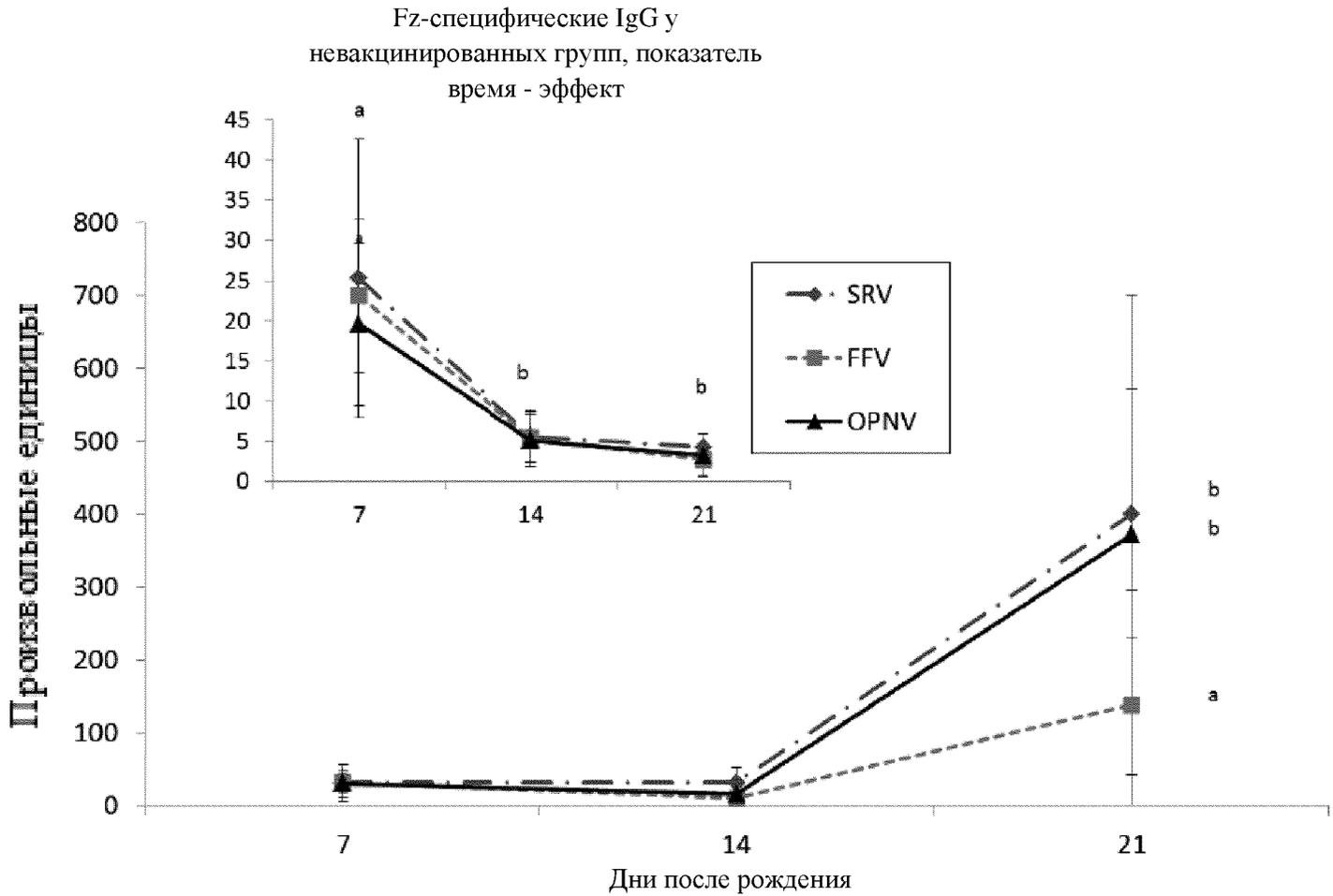
- 5 19. Вакцинная система для применения по любому из пп. 11-18, где человек принадлежит к возрастной группе, выбранной из 0-5, 6-11, 12-18, 19-34, 35-44, 45-54, 55-64, 65-74, 75-84 и старше 84 лет.



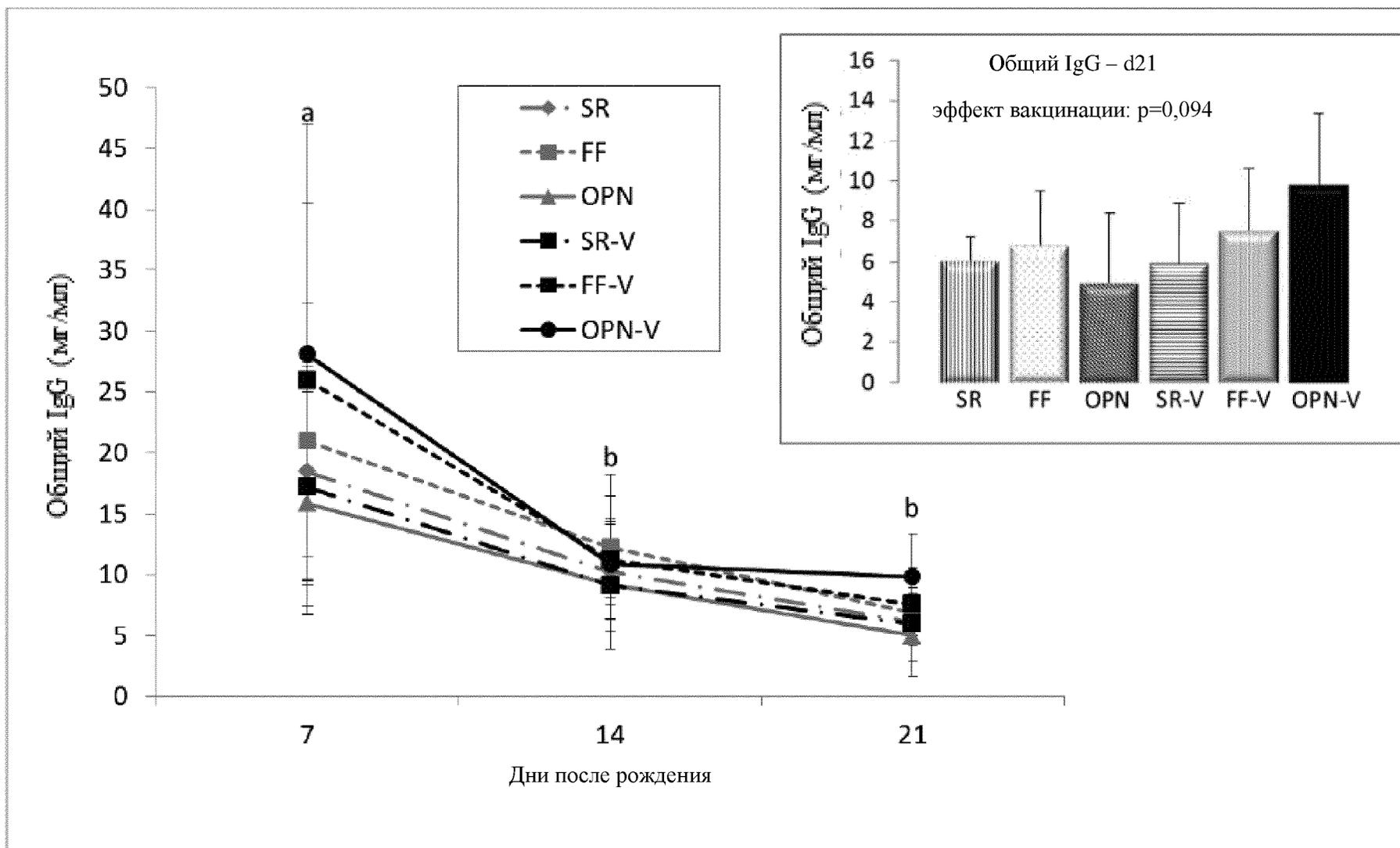
Фигура 1



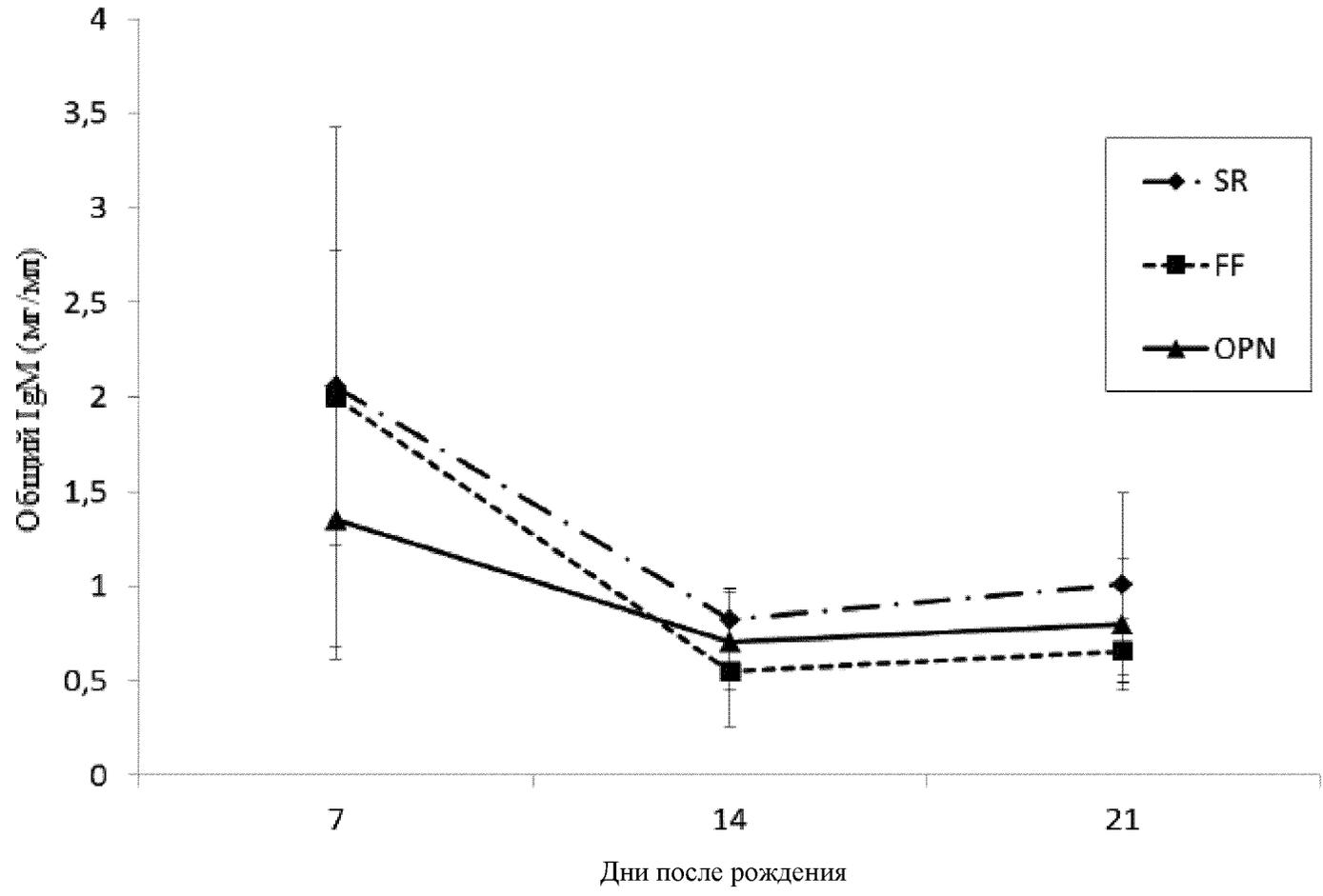
Фигура 2



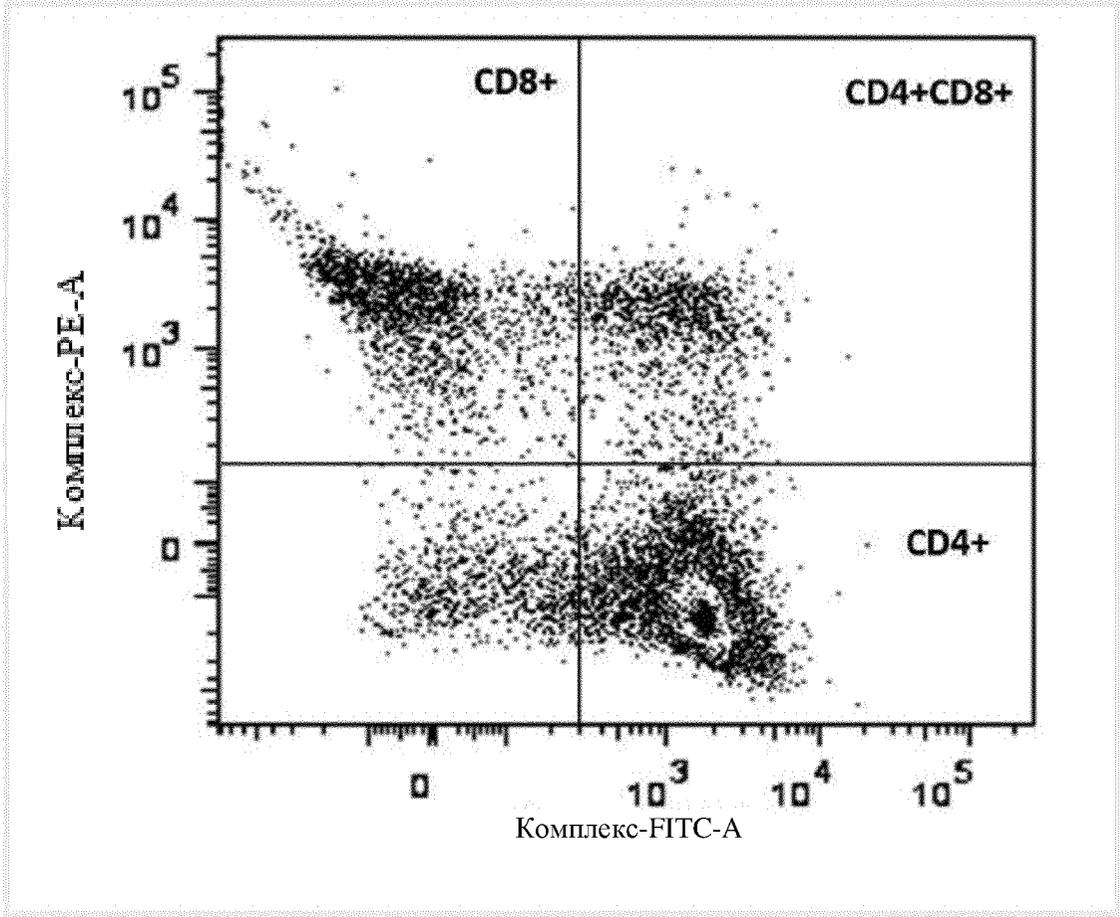
Фигура 3



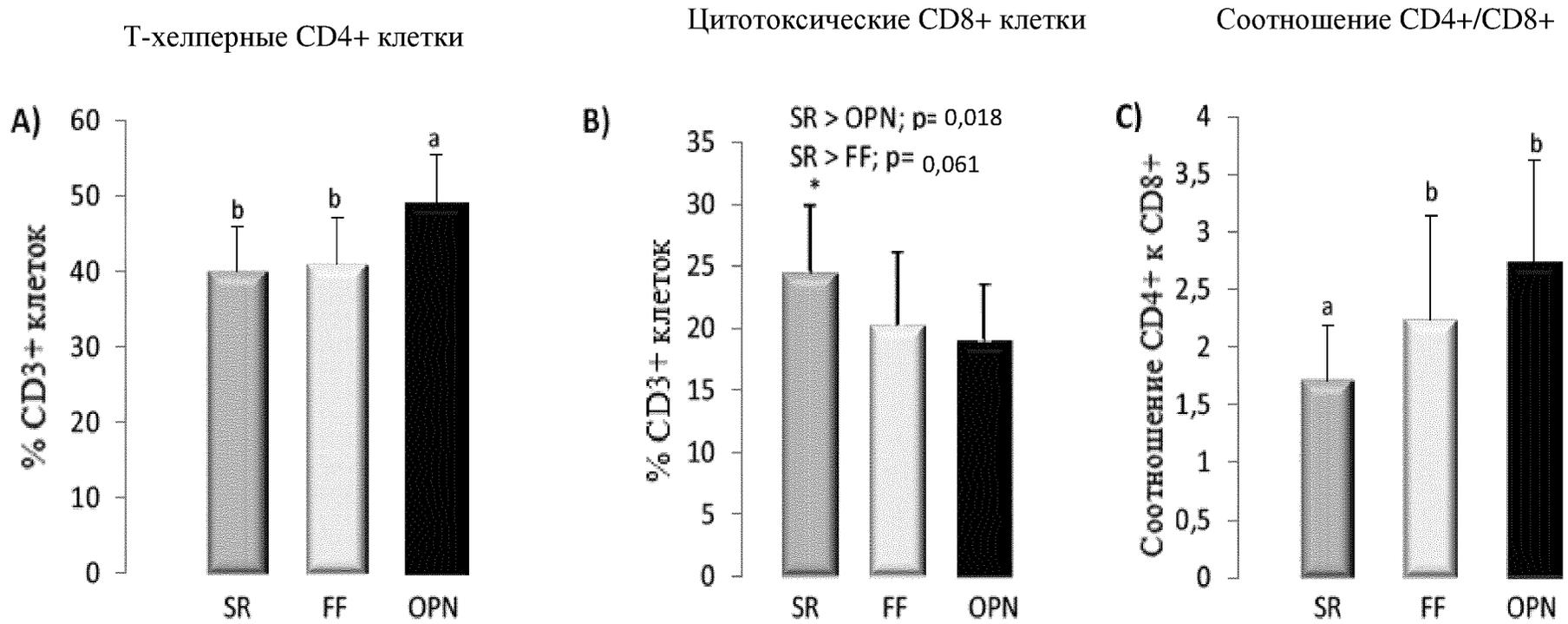
Фигура 4



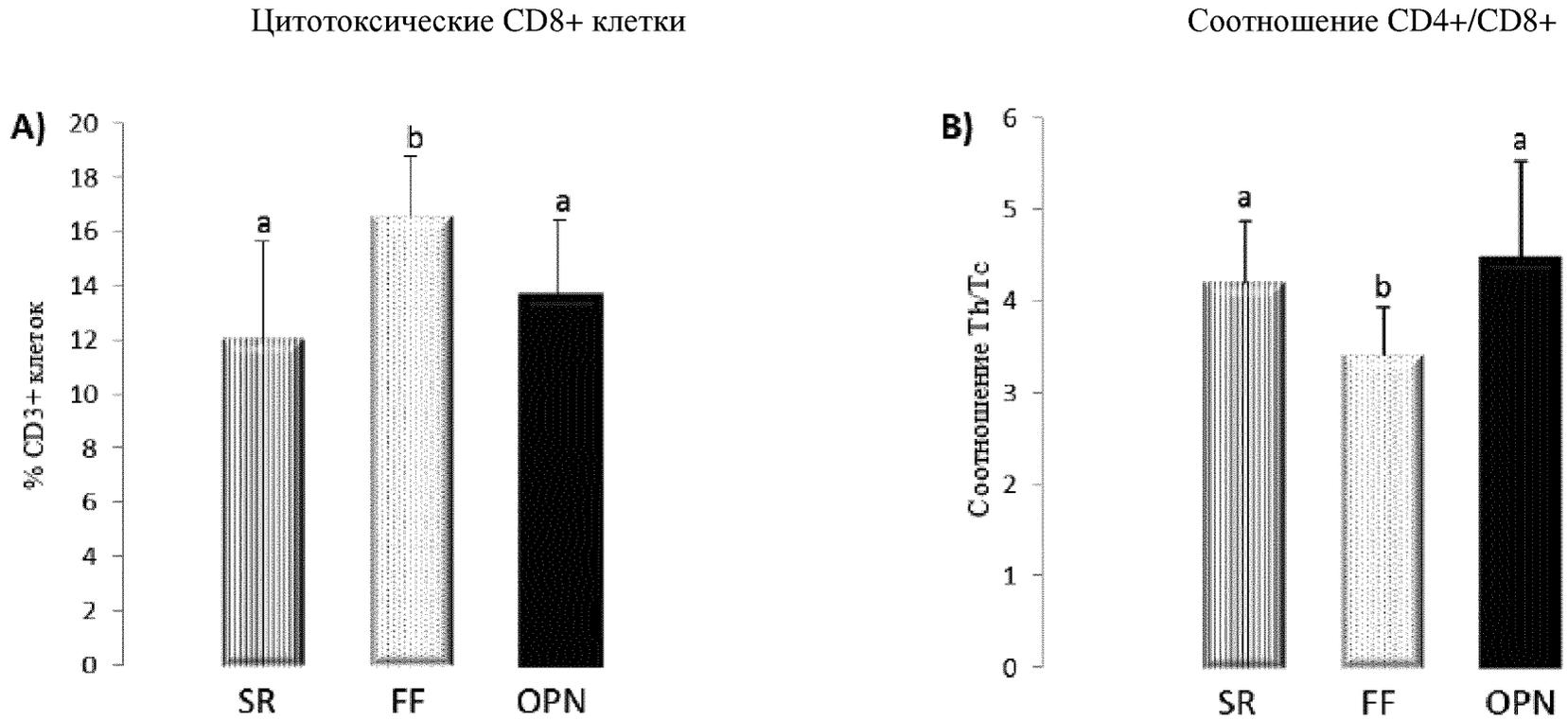
Фигура 5



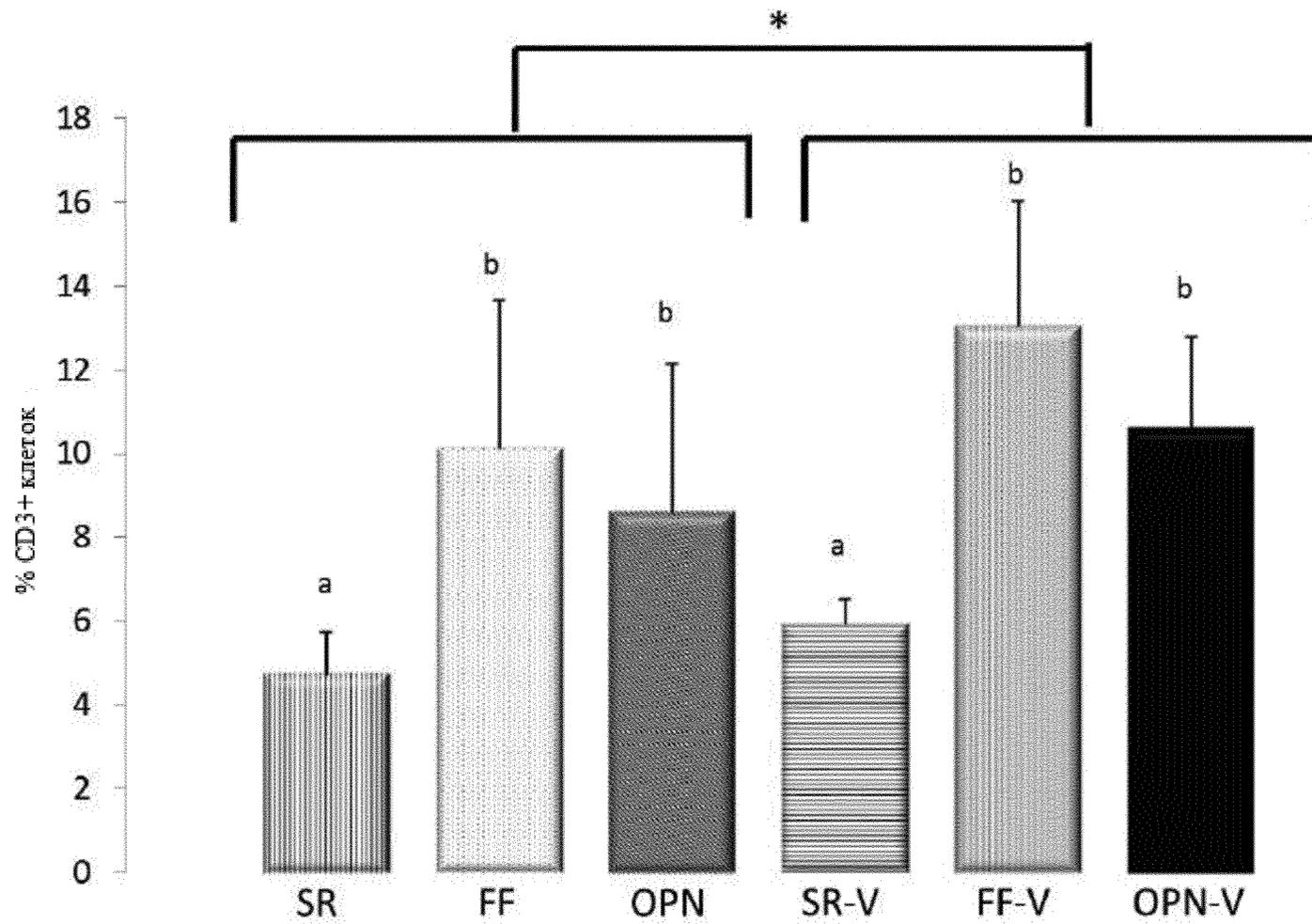
Фигура 6



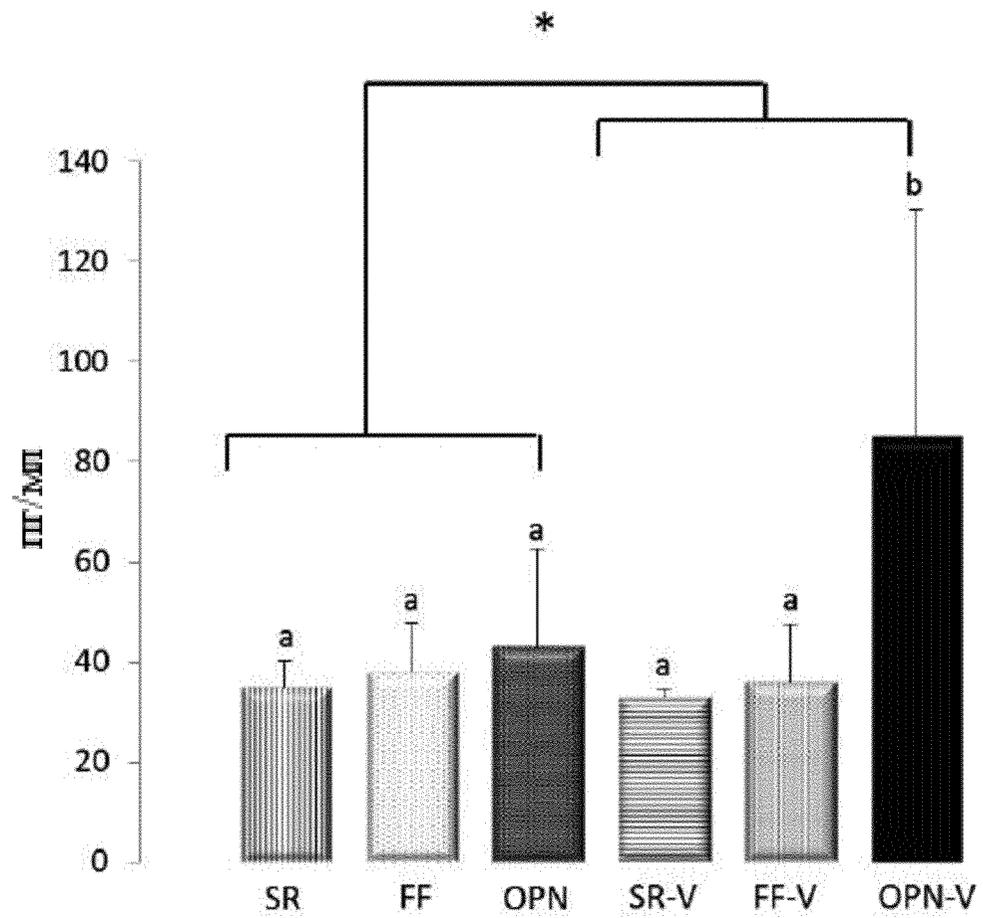
Фигура 7



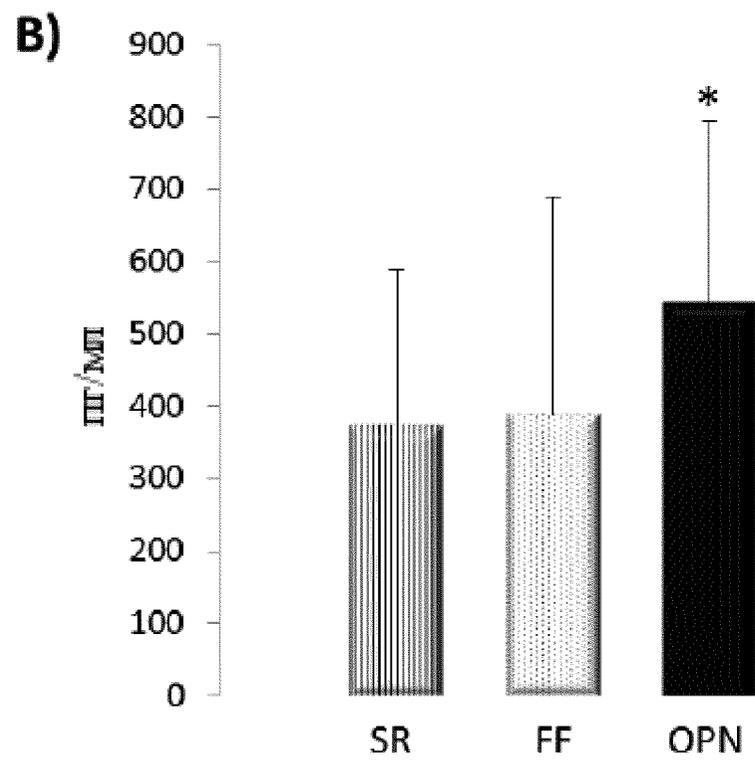
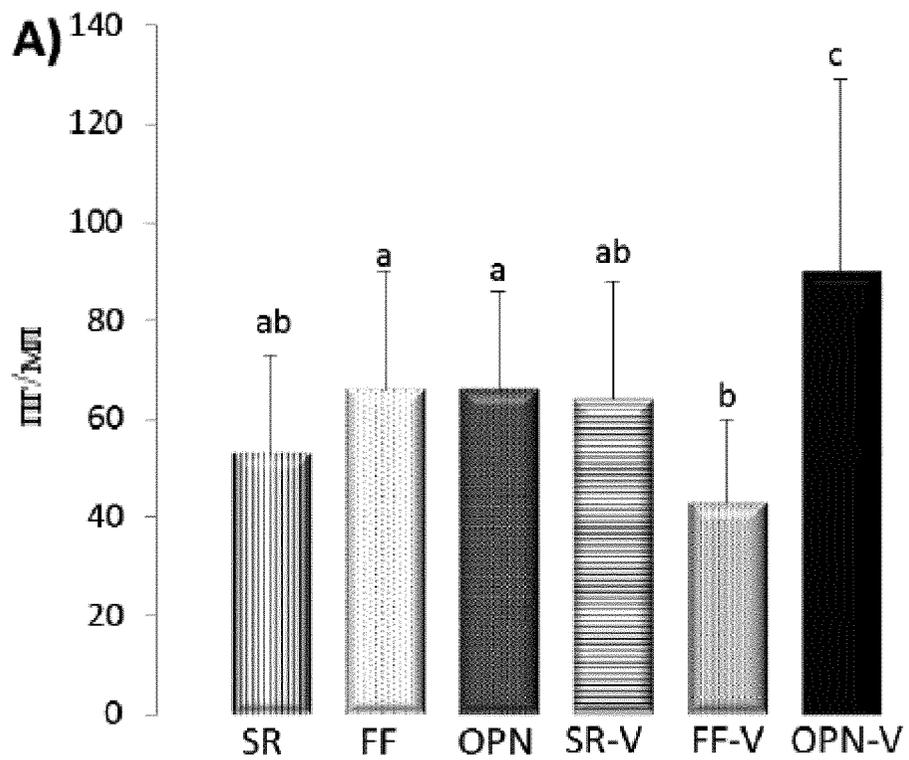
Фигура 8



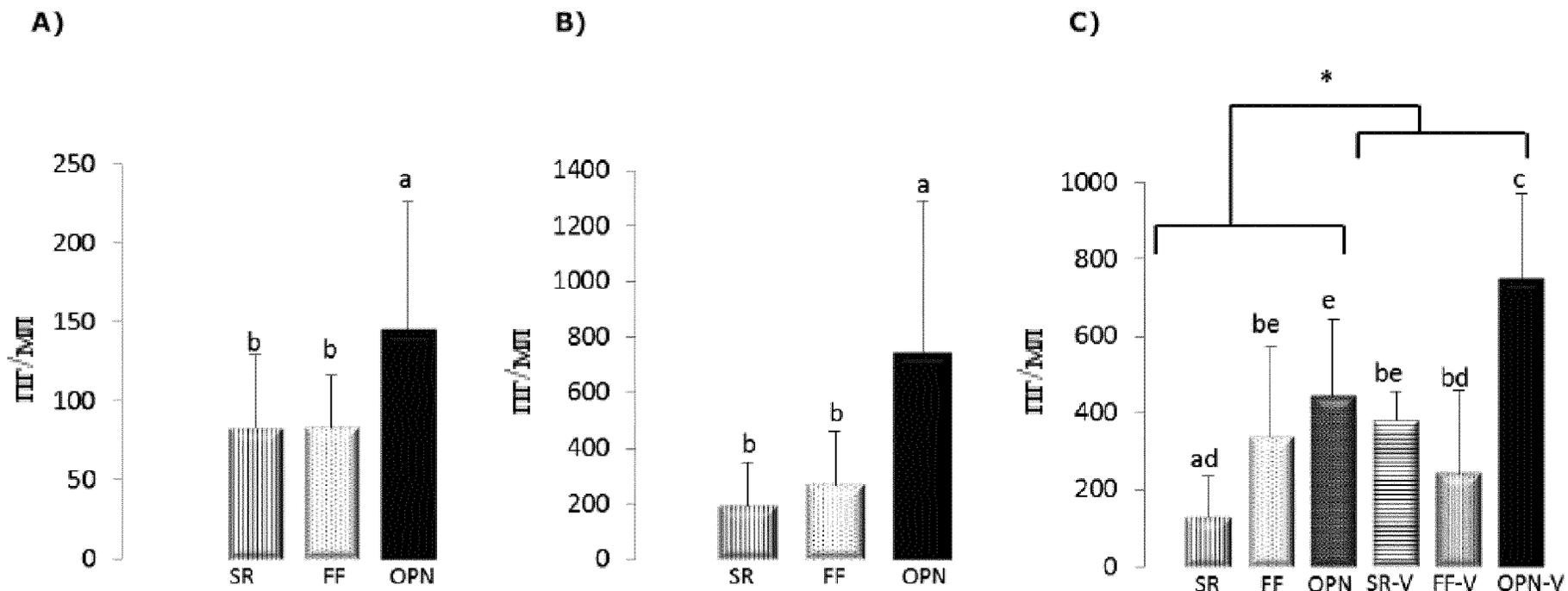
Фигура 9



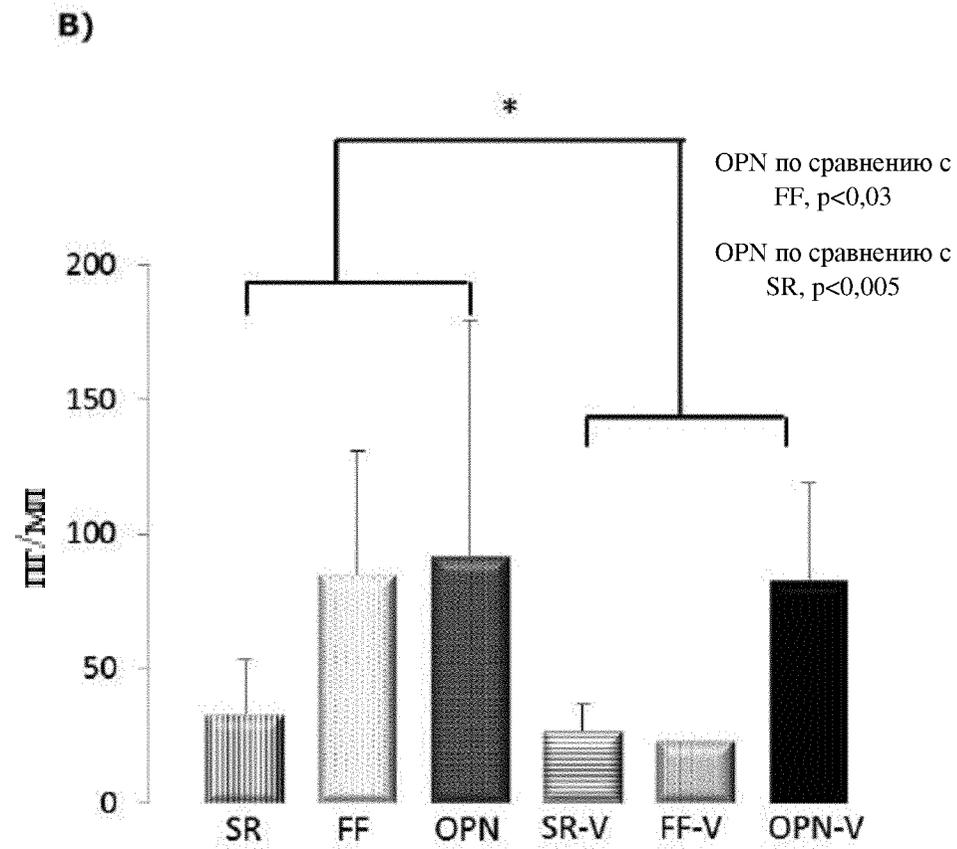
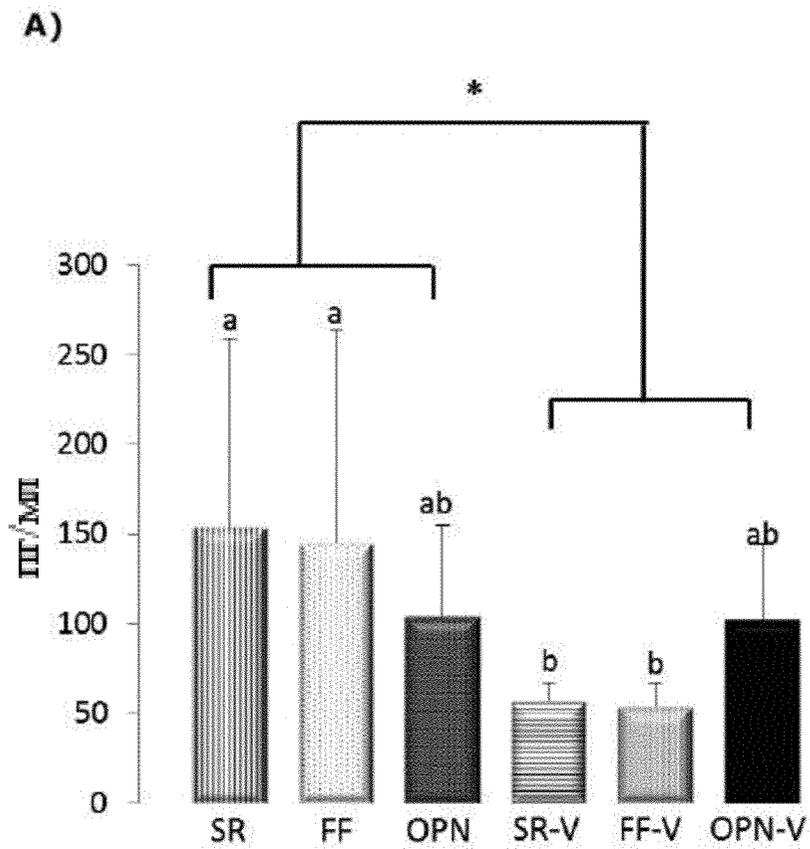
Фигура 10



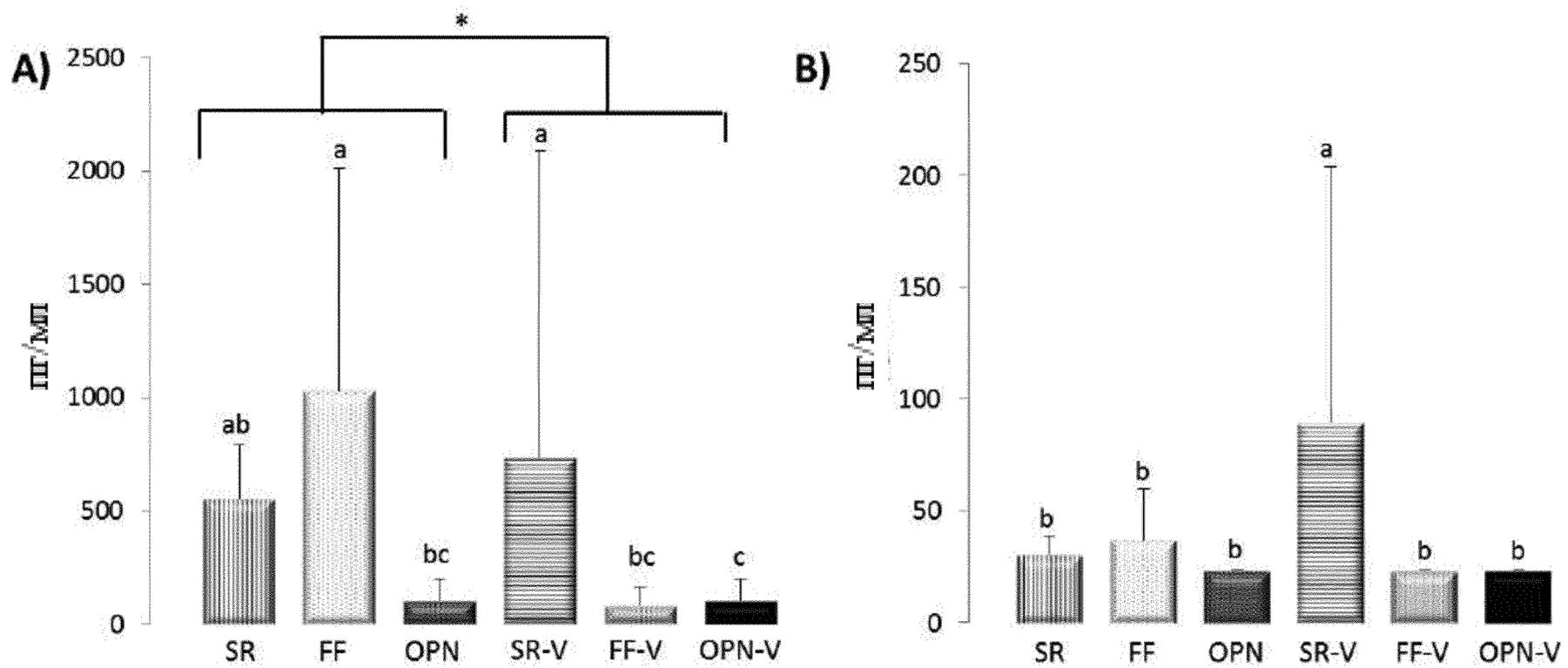
Фигура 11



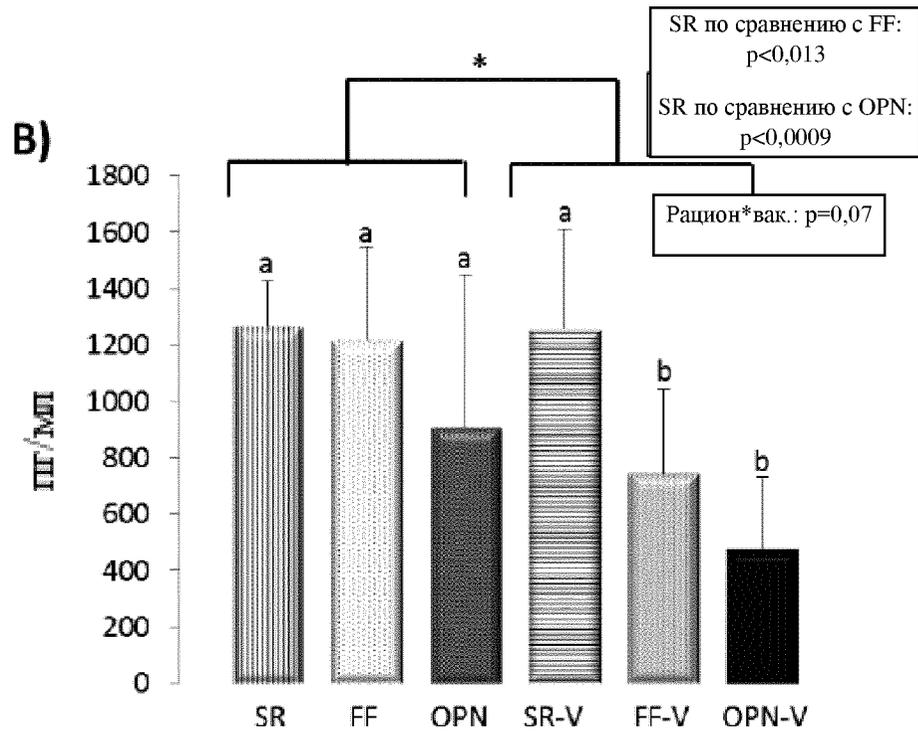
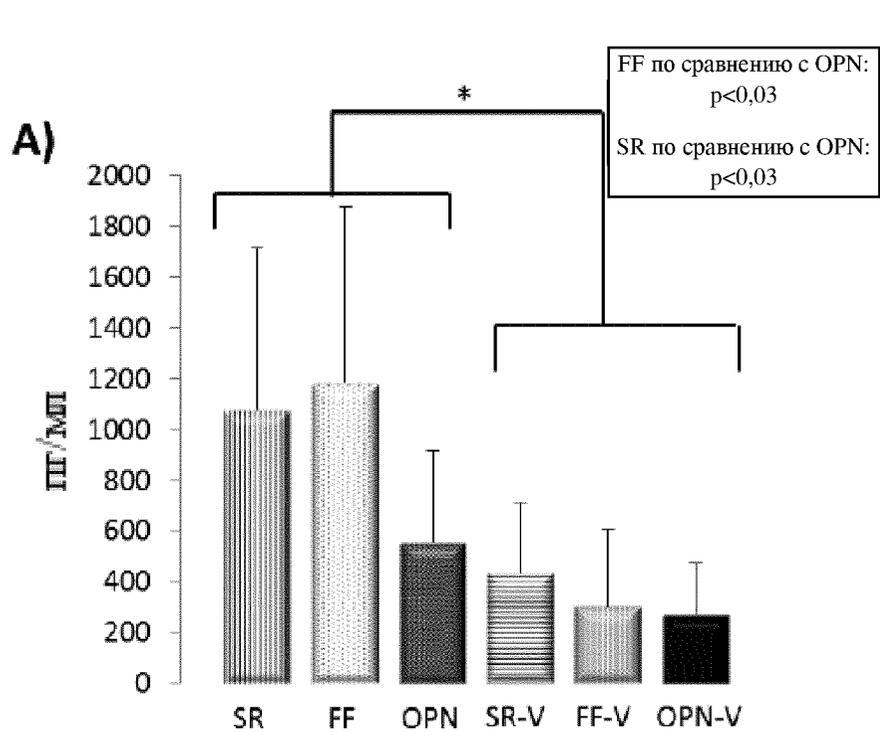
Фигура 12



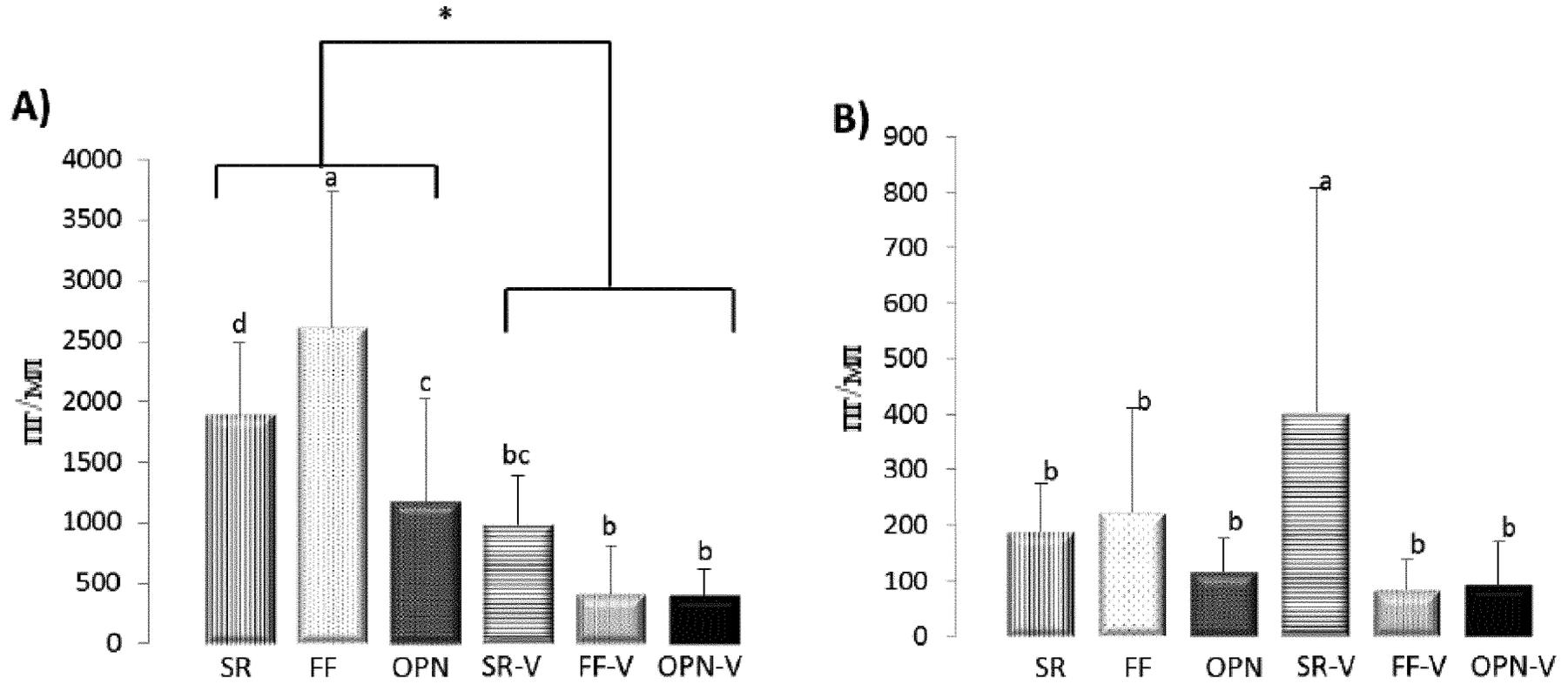
Фигура 13



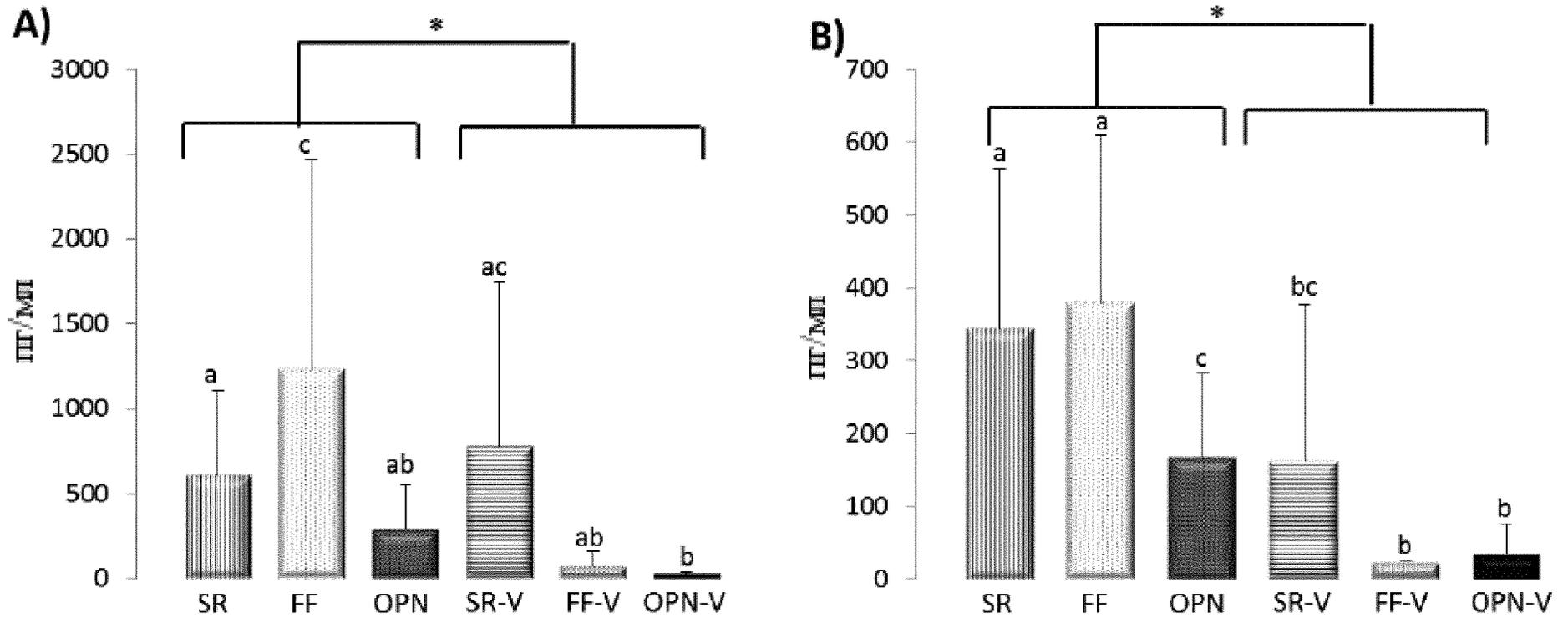
Фигура 14



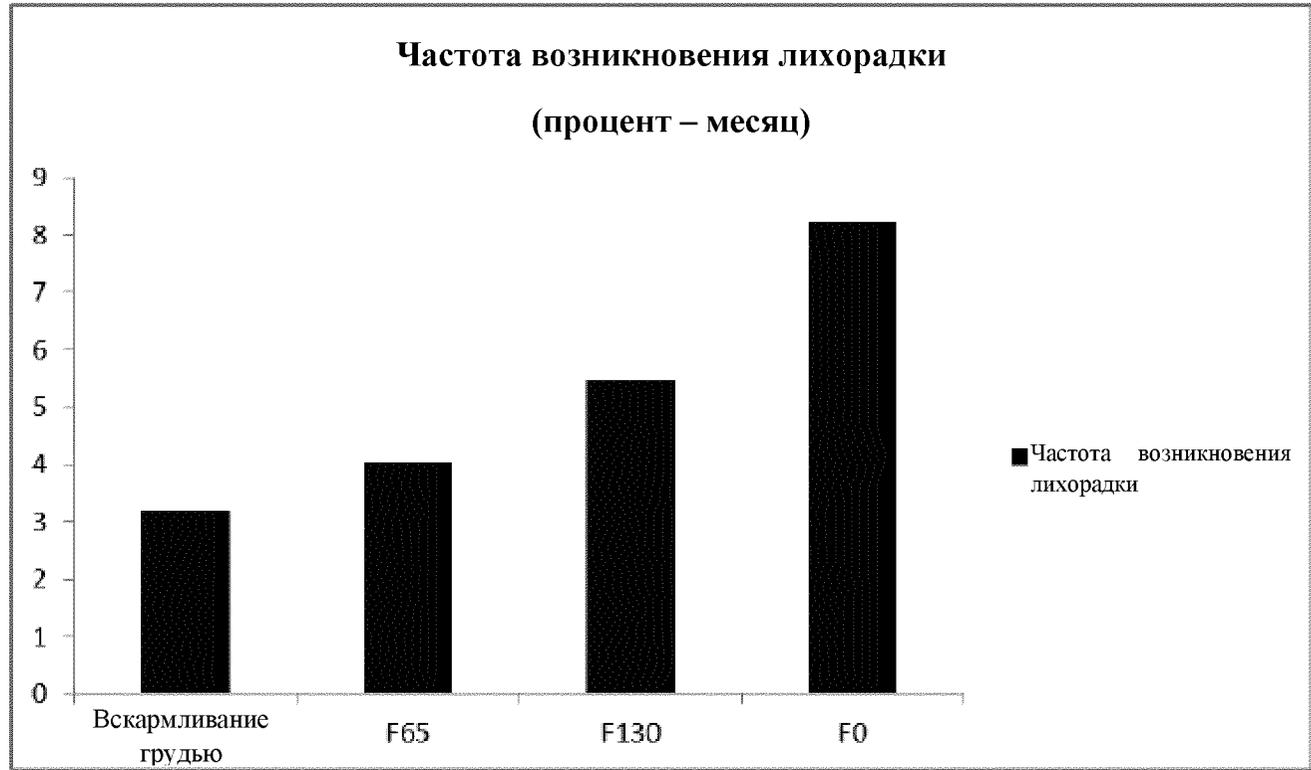
Фигура 15



Фигура 16



Фигура 17



Фигура 18