



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118537** (13) **C2**  
(51) МПК (2018.01)**A61K 39/102** (2006.01)**A61K 39/39** (2006.01)**A61K 9/127** (2006.01)**A61K 47/50** (2017.01)**A61P 11/00****A61P 31/04** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2013 08922</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Абрахам Альберт (US),</b> <b>Кейл Деніел (US),</b> <b>Нікель Джейсон (US),</b> <b>Вайсс Крістіан (DE)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>20.12.2011</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>БАЙЄР ІНТЕЛЛЕКТУАЛ ПРОПЕРТІ ГМБХ,</b> Alfred-Nobel-Strasse 10, 40789, Monheim am Rhein, Germany (DE)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>11.02.2019</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Петров Андрій Володимирович, реєстр.</b> <b>№139</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/426,255</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2006/223769 A1, 05.10.2006 US 6693086 B1, 17.02.2004 WO 2005/079506 A2, 01.09.2005 WO 2009/120811 A1, 01.10.2009 WO 2010/130374 A1, 18.11.2010 Rice J.A., Carrasco-Medina L., Hodgins D.C., Shewen P.E. Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease / Anim. Health Res. Rev. – 2007, Dec. – 8(2). - P. 1 (abstract) KLINMAN, Dennis M. et. al. CpG motifs as immune adjuvants. Vaccine 1999, 17(1), P. 19-25
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>22.12.2010</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>25.10.2013, Бюл.№ 20</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>11.02.2019, Бюл.№ 3</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ <b>РСТ/EP2011/073414,</b> <b>20.12.2011</b>	

**(54) КОМПОЗИЦІЯ ІМУНОМОДУЛЯТОРА ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РЕСПІРАТОНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ У ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ****(57) Реферат:**

Винахід стосується композиції імуномодулятора для лікування респіраторного захворювання у великої рогатої худоби, викликаного *Mannheimia haemolytica*, яка включає катіонний ліпосомний засіб доставки, який включає [1-[2-[9-(Z)-октадеценілокси]-етил]-2-[8](Z)-гептадеценіл]-3-[2-[гідроксіетил]імідазолій хлорид та синтетичний нейтральний ліпід холестерин, та ізолюваний некодуєчий ДНК плазмідний вектор без генної вставки, виділений із *E. coli*.

UA 118537 C2



## ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід стосується методу імунної активації у особини виду великої рогатої худоби. Зокрема, даний винахід включає методи виклику системного, неспецифічного та антигенспецифічного імунних відгуків, які є корисними для застосування у тварин та захисту

5 проти інфекційного захворювання.

## ПЕРЕДУМОВИ ВІНАХОДУ

Велика рогата худоба є головною мішенню для багатьох типів вірусних, бактеріальних та паразитарних інфекцій. Сучасні виробничі фактори, такі як відлучення, перевезення худоби, негода та харчові потреби у м'ясному та молочному виробництві також можуть служити

10 факторами ризику, які підвищують частоту захворювання. Респіраторне захворювання великої рогатої худоби (РЗ ВРХ), або комплекс респіраторних захворювань ВРХ, як його часто називають, зустрічається як у молочній, так і у м'ясній худоби, і є однією з основних причин економічних збитків скотарства у всьому світі. Ці збитки виникають через хворобливість, падіж, зниження приросту ваги, витрати на лікування та запобігання, втрати у виробництві молока та

15 негативний вплив на характеристики туші.

Вважають, що патогенез РЗ ВРХ виникає з ряду стресових факторів середовища та фізіології, згаданих вище, в поєднанні зі збудниками інфекцій. *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*, *Pasteurella multocida* та *Histophilus somni* (раніше *Haemophilus somnus*) вважаються

20 частиною нормальної мікрофлори верхніх дихальних шляхів ВРХ. Навпаки, нижні дихальні шляхи є відносно стерильним середовищем, що підтримується багатьма імунологічними реакціями, що мають на меті запобігання проникненню мікроорганізмів. Якщо худоба піддається стресовим факторам середовища та фізіології, вроджена та набута імунні функції тварини порушуються, тим самим дозволяючи вищезгаданим мікроорганізмам розмножуватись та згодом заселяти нижні дихальні шляхи. Відомо, що різні віруси ВРХ чинять імунодепресивний

25 вплив у легенях, наприклад, вірус інфекційного ринотрахеїту ВРХ (infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV, IBR або BHV 1), вірус діареї ВРХ (bovine viral diarrhea virus, BVDV), респіраторно-синцитіальний вірус ВРХ (bovine respiratory syncytial virus, BRSV) та вірус парагрипу типу 3 (parainfluenza type 3 virus, PI3). Проте, *Mannheimia haemolytica* є набагато більш поширеним бактеріальним патогеном серед випадків РЗ ВРХ.

Теперішнє запобігання та лікування РЗ ВРХ складається з введення антибіотиків стаду худоби по прибутті на місця відгодівлі (тобто, метафілактика), лікування антибіотиками хворої худоби та щеплення проти вірусів РЗ ВРХ та бактерій, включаючи *M. haemolytica*.

Існують різні причини того, що теперішні програми щеплення та фармакотерапія на сьогоднішній день не є оптимальними для контролю РЗ ВРХ у худоби. По-перше, захисна система організму відіграє головну роль у боротьбі з інфекційним захворюванням у худоби. Загальноприйняті способи лікування включають введення антибіотиків для лікування або контролю бактеріальних інфекцій. Проте, немає в наявності схвалених способів фармакотерапії вірусних інфекцій. При РЗ ВРХ, у більшості випадків, є не лише бактеріальна інфекція, а й вірусна інфекція. По-друге, розклад щеплень часто недостатньо оптимальний. Для того, щоб респіраторна вакцина була оптимально ефективною, препарат слід вводити за 2-4 тижні до стресу або перевезення, що зазвичай є нездійсненним у промисловому скотарстві. Вакцини вводяться надто рано або надто пізно, щоб бути оптимально ефективними.

Тому існує потреба в методі стимуляції імунної системи і побудови наступального відгуку для зменшення або знищення хвороботворних організмів. Важливо, щоб цей метод був легким

45 для введення, працював самостійно або в поєднанні з вакцинами або добавками для підвищення ефективності таких вакцин, мав тривалу дію або не потребував додаткових ін'єкцій для підвищення імунітету. Даний винахід надає метод виклику неантигенспецифічного імунного відгуку у видів великої рогатої худоби, котрий є легким для введення, працює самостійно або в поєднанні з вакцинами, викликає захисний відгук проти одного або більше збудників інфекцій.

## ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Метод виклику імунного відгуку у особини виду великої рогатої худоби згідно даного винаходу включає введення до особини виду великої рогатої худоби ефективної кількості імуномодулюючої композиції для виклику імунного відгуку. Імуномодулююча композиція включає

50 ліпосомний засіб доставки та принаймні одну молекулу нуклеїнової кислоти. Крім того, імуномодулятор викликає неантигенспецифічний імунний відгук, який ефективний сам по собі, або поліпшує дію принаймні одного біологічного агента, такого як вакцина, при введенні перед такою вакциною, введенні разом з такою вакциною, введенні після вакцинації або змішуванні з вакциною.

Методи надають нові стратегії лікування для захисту видів ВРХ від інфекційних захворювань

60 та лікування популяцій, що мають інфекційне захворювання. Нарешті, метод згідно даного

винаходу надає швидший, триваліший та кращий захист проти захворювання, якщо імуномодулятор застосовується в комбінації з вакциною.

#### 1. Композиція

##### а. Імуномодулятор

В одному з варіантів реалізації винаходу імуномодулююча композиція включає ліпосомний засіб доставки та принаймні одну молекулу нуклеїнової кислоти, як описано в патенті США № 6,693,086, і включено сюди за посиланням.

Придатний ліпосомний засіб доставки включає ліпідну композицію, що здатна доставляти молекули нуклеїнової кислоти до тканин суб'єкта, що лікується. Ліпосомний засіб доставки переважно здатен залишатися стійким у суб'єкті протягом часу, достатнього для доставки молекули нуклеїнової кислоти та/або біологічного агента. В одному варіанті реалізації ліпосомний засіб доставки стійкий у суб'єкті-реципієнті принаймні протягом близько 5 хвилин. В іншому варіанті реалізації ліпосомний засіб доставки стійкий у суб'єкті-реципієнті принаймні протягом близько 1 години. У ще одному варіанті реалізації ліпосомний засіб доставки стійкий у суб'єкті-реципієнті принаймні протягом близько 24 годин.

Ліпосомний засіб доставки згідно даного винаходу включає ліпідну композицію, що здатна зливатися з плазматичною мембраною клітини для доставки молекули нуклеїнової кислоти до клітини. В одному варіанті реалізації при доставці комплексу нуклеїнова кислота:ліпосома згідно даного винаходу є принаймні близько 1 пікограма (пг) білка, вираженого на міліграм (мг) загального тканинного білка на мікрограм (мкг) нуклеїнової кислоти, що доставляється. В іншому варіанті реалізації трансфекційна ефективність комплексу нуклеїнова кислота:ліпосома становить принаймні близько 10 пг білка, вираженого на мг загального тканинного білка на мкг нуклеїнової кислоти, що доставляється; а в ще одному варіанті реалізації принаймні близько 50 пг білка, вираженого на мг загального тканинного білка на мкг нуклеїнової кислоти, що доставляється. Трансфекційна ефективність комплексу може становити лише 1 фемтограм (фг) білка, вираженого на мг загального тканинного білка на мкг нуклеїнової кислоти, що доставляється, з більш переважними вищими кількостями.

Переважний ліпосомний засіб доставки має діаметр близько 100-500 нанометрів (нм), в іншому варіанті реалізації близько 150-450 нм, а в ще одному варіанті реалізації близько 200-400 нм.

Придатні ліпосоми включають будь-які ліпосоми, такі як ті, що звичайно використовуються, наприклад, в методах доставки генів, відомих фахівцям з рівня техніки. Переважні ліпосомні засоби доставки включають багаточарові везикулярні (MLV) ліпіди та екструзійні ліпіди. Способи приготування MLV добре відомі з рівня техніки. Більш переважні ліпосомні засоби доставки включають ліпосоми, що мають полікатіонний ліпідний склад (тобто, катіонні ліпосоми) та/або ліпосоми, що мають холестеринний кістяк, кон'югований з поліетиленгліколем. Приклади катіонних ліпосомних композицій включають, але не обмежуються, N-[1-(2,3-диолеїлокси)пропіл]-N, N,N-триметиламонійхлорид (DOTMA) і холестерин, N-[1-(2,3-диолеїлокси)пропіл]-N, N,N-триметиламонійхлорид (DOTAP) і холестерин, 1-[2-(олеїлокси)етил]-2-олеїл-3-(2-гідроксиетил)імідазолінійхлорид (DOTIM) і холестерин, диметилдіоктадециламонійбромід (DDAB) і холестерин, та їх комбінації. Найбільш переважна ліпосомна композиція для використання в якості засобу доставки включає DOTIM та холестерин.

Придатна молекула нуклеїнової кислоти включає будь-яку нуклеотидну послідовність, таку як кодуюча або некодуюча послідовність, і ДНК або РНК. Кодуючі послідовності нуклеїнових кислот кодують принаймні частину білка або пептиду, тоді як некодуюча послідовність не кодує жодної частини білка або пептиду. Відповідно до даного винаходу, "некодуючі" нуклеїнові кислоти можуть включати регуляторні області транскрипційного блоку, такі як область промотора. Термін "порожній вектор" може вживатися взаємозамінно з терміном "некодуючий", і, зокрема, стосується послідовності нуклеїнової кислоти за відсутності частини, що кодує білок, такої як плазмідний вектор без генної вставки. Експресія білка, що кодується молекулою нуклеїнової кислоти, не є необхідною для досягнення неантигенспецифічного імунного відгуку; тому молекула нуклеїнової кислоти не обов'язково має бути функціонально зв'язана з послідовністю контролю транскрипції. Проте, можна отримати додаткові переваги (тобто, антигенспецифічний та підвищений імунітет), включивши до композиції послідовність нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК), яка кодує імуноген та/або цитокін.

Комплексоутворення ліпосоми з молекулою нуклеїнової кислоти може бути здійснене за допомогою стандартних методів з рівня техніки, або як описано в патенті США № 6,693,086, і включено сюди за посиланням. Придатна концентрація молекули нуклеїнової кислоти для додавання до ліпосоми включає концентрацію, ефективну для доставки достатньої кількості

молекули нуклеїнової кислоти до суб'єкта, так що викликається системний імунний відгук. В одному варіанті реалізації від близько 0.1 мкг до близько 10 мкг молекули нуклеїнової кислоти комбінується з близько 8 нмоль ліпосом, в іншому варіанті реалізації від близько 0.5 мкг до близько 5 мкг молекули нуклеїнової кислоти комбінується з близько 8 нмоль ліпосом, а в ще  
 5 одному варіанті реалізації близько 1.0 мкг молекули нуклеїнової кислоти комбінується з близько 8 нмоль ліпосом. В одному варіанті реалізації співвідношення нуклеїнових кислот до ліпідів (мкг нуклеїнової кислоти: нмоль ліпідів) у композиції становить принаймні близько 1:1 нуклеїнова кислота:ліпід за вагою (тобто, 1 мкг нуклеїнової кислоти: 1 нмоль ліпиду), а в іншому варіанті реалізації принаймні близько 1:5, а в ще одному варіанті реалізації принаймні близько 1:10, а в  
 10 подальшому варіанті реалізації принаймні близько 1:20. Співвідношення, виражені тут, ґрунтуються на кількості катіонного ліпиду в композиції, а не на загальній кількості ліпиду в композиції. В іншому варіанті реалізації співвідношення нуклеїнових кислот до ліпідів у композиції згідно винаходу становить від близько 1:1 до близько 1:80 нуклеїнова кислота:ліпід за вагою; а в іншому варіанті реалізації від близько 1:2 до близько 1:40 нуклеїнова кислота:ліпід  
 15 за вагою; а в подальшому варіанті реалізації від близько 1:3 до близько 1:30 нуклеїнова кислота:ліпід за вагою; а в ще одному варіанті реалізації від близько 1:6 до близько 1:15 нуклеїнова кислота:ліпід за вагою.

b. Біологічний агент

В іншому варіанті реалізації винаходу імуномодулятор включає ліпосомний засіб доставки,  
 20 молекулу нуклеїнової кислоти та принаймні один біологічний агент.

Придатні біологічні агенти є агентами, що є ефективними в запобіганні або лікуванні захворювання BPX. Такі біологічні агенти включають імуностимулюючі білки, імуногени, вакцини, протимікробні засоби або будь-яку їх комбінацію. Придатні імуностимулюючі білки є відомими білками, що підвищують імунітет. Лише як необмежувачий приклад, цитокіни, що  
 25 включають родину білків, є відомою родиною білків, що підвищують імунітет. Придатні імуногени є білками, котрі викликають гуморальний та/або клітинний імунний відгук, так що введення імуногену до суб'єкта підвищує імуногенспецифічний імунний відгук проти тих самих або схожих білків, що зустрічаються всередині тканин суб'єкта. Імуноген може включати патогенний антиген, що експресується бактерією, вірусом, паразитом або грибом. Переважні  
 30 антигени включають антигени, які викликають інфекційне захворювання у суб'єкта. Відповідно до даного винаходу, імуноген може бути будь-яким фрагментом білка, природного чи одержаного синтетично, котрий викликає гуморальний та/або клітинний імунний відгук. Так, розмір антигену чи імуногену може бути від 5-12 амінокислот до розміру білка повної довжини, включаючи проміжні розміри. Антиген може бути мультимерним або складеним білком.  
 35 Антигени можуть бути очищеними білковими антигенами, отриманими з природних або рекомбінантних клітин. Послідовності нуклеїнових кислот імуностимулюючих білків та імуногенів функціонально пов'язуються з послідовністю контролю трансляції, так що імуноген експресується у тканині суб'єкта, тим самим викликаючи імуногенспецифічний імунний відгук у суб'єкта, в доповнення до неспецифічного імунного відгуку.

В іншому варіанті реалізації винаходу біологічний агент є вакциною. Вакцина може включати живу, інфекційну, вірусну, бактеріальну або паразитарну вакцину, або вбиту, інактивовану, вірусну, бактеріальну або паразитарну вакцину. В одному варіанті реалізації одна або більше вакцин, живих або вбитих вірусних вакцин, може використовуватись у поєднанні з імуномодулюючою композицією згідно даного винаходу. Придатні вакцини включають ті, що  
 45 відомі з рівня техніки для видів BPX. Приклади вакцин, без обмеження, включають ті, що використовуються в рівні техніки для захисту від інфекційного ринотрахеїту BPX (IBR) (вірус герпесу BPX типу 1 (BHV1)), вірусу парагрипу типу 3 (PI3), респіраторно-синцитіального вірусу BPX (BRSV), вірусу діареї BPX (BVDV типу 1 та 2), *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis* та інших захворювань, відомих з рівня техніки. У прикладі реалізації вакцина для захисту проти  
 50 *Mannheimia haemolytica* може використовуватись у поєднанні з імуномодулюючою композицією згідно даного винаходу.

У ще одному варіанті реалізації винаходу біологічний агент є протимікробним засобом. Придатні протимікробні засоби включають: хінолони, переважно фторхінолони,  $\beta$ -лактами та макролід-стрептограмін-лінкозамідні (MLS) антибіотики.

Придатні хінолони включають бенофлоксацин, бінфлоксацин, циноксацин, ципрофлоксацин, клінафлоксацин, данофлоксацин, дифлоксацин, еноксацин, енрофлоксацин, флероксацин, геміфлоксацин, ібафлоксацин, левофлоксацин, ломефлоксацин, марбофлоксацин, моксифлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, орбіфлоксацин, пазуфлоксацин, прадофлоксацин, перфлоксацин, темафлоксацин, тосуфлоксацин, сарафлоксацин,  
 60 геміфлоксацин та спарфлоксацин. Переважні фторхінолони включають ципрофлоксацин,

енрофлоксацин, моксифлоксацин, данофлоксацин та прадофлоксацин. Придатні нафтиридони включають налідиксову кислоту.

Придатні β-лактами включають пеніциліни, такі як бензатинпеніцилін, бензилпеніцилін (пеніцилін G), феноксиметилпеніцилін (пеніцилін V), прокаїнпеніцилін, метицилін, оксацилін, нафцилін, флоксацилін, диклоксацилін, флуфлоксацилін, темоцилін, амоксицилін, ампіцилін, ко-амоксиклав (амоксицилін та клавуланова кислота), азлоцилін, карбеніцилін, тикарцилін, мезлоцилін, піперацилін; цефалоспорины, такі як цефалоній, цефалексин, цефазолін, цефеприм, цефтріаксон, цефотаксим, цефподоксим, цефіксим, цефтазидим, цефепім, цефпіром; карбапенеми та пенеми, такі як іміпенем, меропенем, ертапенем, фаропенем, дорипенем, монобактами, такі як азтреонам (азактам), тигемонам, нокардицин А, табтоксинін-В-лактами; та інгібітори β-лактамази, такі як клавуланова кислота, тазобактам та сульбактам. Переважні β-лактами включають цефалоспорины, зокрема, цефазолін.

Придатні антибіотики групи MLS включають будь-який макролід, лінкоміцин, кліндаміцин, пірліміцин. Переважним лінкозамідом є пірліміцин.

Інші протимікробні засоби включають 2-піридини, тетрацикліни, сульфонаміди, аміноглікозиди, триметоприм, диметридазоли, еритроміцин, фраміцетин, фуразолідон, різні плевомутиліни, такі як тіамулін, валнемулін, різні стрептоміцин, клопідол, саліноміцин, моненсин, галофугінон, нарасин, робенідин тощо.

## 2. Методи

### а. Методи імунної стимуляції

В одному варіанті реалізації винаходу імунний відгук викликається в особини виду великої рогатої худоби шляхом введення ефективної кількості імуномодуючої композиції до особини виду великої рогатої худоби. Ефективна кількість достатня для виклику імунного відгуку в особини виду великої рогатої худоби. Імуномодулятор включає ліпосомний засіб доставки та молекулу нуклеїнової кислоти.

В одному варіанті реалізації ефективна кількість імуномодулятора становить від близько 1 мікрограма до близько 1000 мікрограм на тварину. В іншому варіанті реалізації ефективна кількість імуномодулятора становить від близько 5 мікрограм до близько 500 мікрограм на тварину. У ще одному варіанті реалізації ефективна кількість імуномодулятора становить від близько 10 мікрограм до близько 100 мікрограм на тварину. У подальшому варіанті реалізації ефективна кількість імуномодулятора становить від близько 10 мікрограм до близько 50 мікрограм на тварину.

В іншому варіанті реалізації винаходу імунний відгук досягається в особини виду великої рогатої худоби введенням ефективної кількості імуномодулятора, який включає ліпосомний засіб доставки, ізолювану молекулу нуклеїнової кислоти та біологічний агент. Припускається, що біологічний агент може бути змішаний або введений разом з імуномодулятором, або незалежно від нього. Незалежне введення може бути до або після введення імуномодулятора. Також припускається, що більш ніж одне введення імуномодулятора або біологічного агента може використовуватись для розширення підвищеного імунітету. Більш того, більш ніж один біологічний агент може вводиться разом з імуномодулятором, вводиться перед імуномодулятором, вводиться після введення імуномодулятора, або паралельно.

### б. Захворювання

Методи згідно винаходу викликають імунний відгук у суб'єкта, так що суб'єкт захищений від захворювання, яке відповідає за виклик імунного відгуку. В даному контексті фраза "захищений від захворювання" означає послаблення симптомів захворювання; зниження частоти захворювання та зменшення клінічної або патологічної серйозності захворювання, або зниження виділення патогена, що викликає захворювання. Захист суб'єкта може означати здатність терапевтичної композиції згідно даного винаходу, при введенні до суб'єкта, запобігати виникненню захворювання, лікувати та/або полегшувати або зменшувати симптоми, клінічні ознаки, патологію або причини. Приклади клінічних ознак РЗ ВРХ включають ураження легенів, підвищення температури, депресію (напр. анорексію, знижену реакцію на зовнішні стимули, обвислі вуха), виділення з носа та характер дихання (напр., частота дихання, дихальне зусилля). Так, захист особини виду ВРХ від захворювання включає як запобігання виникненню захворювання (профілактичне лікування), так і лікування особини виду ВРХ, що має захворювання (терапевтичне лікування). Зокрема, захист суб'єкта від захворювання досягається викликом імунного відгуку в особини виду ВРХ шляхом запуску благотворного або захисного імунного відгуку, який може, в деяких випадках, додатково пригнічувати, знижувати, гальмувати або блокувати надто активний або шкідливий імунний відгук. Термін "захворювання" означає будь-яке відхилення від здорового стану особини виду ВРХ і включає стан, в якому

наявні симптоми захворювання, а також стани, в яких відхилення (напр., інфекція, мутація гену, генетичний дефект тощо) відбулося, але симптоми ще не проявились.

Методи згідно винаходу можуть використовуватись для запобігання захворюванню, стимуляції імунітету ефекторних клітин проти захворювання, знищення захворювання, полегшення захворювання, та запобігання вторинному захворюванню в результаті виникнення первинного захворювання.

Даний винахід також може поліпшувати набутий імунний відгук у тварини при введенні разом з вакциною порівняно з введенням самої вакцини. В загальному випадку вакцина, одноразово введена, не захищає тварину відразу, так як вона потребує часу для стимуляції набутого імунітету. Термін "поліпшення" означає, в контексті даного винаходу, виклик вродженого імунного відгуку у тварини до того, як вакцина починає захищати тварину, та/або продовження періоду захисту через набутий імунітет, наданий вакциною.

Методи згідно винаходу включають введення композиції для захисту від інфікування широким спектром патогенів. Композиція, що вводиться, може включати або не включати специфічний антиген для виклику специфічного відгуку. Припускається, що методи згідно винаходу будуть захищати суб'єкта-реципієнта від захворювання, що викликається інфекційними мікробними агентами, що включають, без обмеження, віруси, бактерії, гриби та паразити. Приклади вірусних інфекційних захворювань, без обмеження, включають ті, що виникають від зараження інфекційним ринотрахеїтом BPX (IBR) (вірус герпесу BPX типу 1 (BHV1)), вірусом парагрипу типу 3 (PI3), респіраторно-синцитіальним вірусом BPX (BRSV), вірусом діареї BPX (BVDV типу 1 та 2), аденовірусом BPX, коронавірусом BPX (BCV), каліцивірусом BPX, парвовірусом BPX, BHV4, реовірусом BPX, ентеровірусом BPX, риновірусом BPX, вірусом злоскисної катаральної лихоманки BPX, вірусом лейкозу BPX, вірусом сказу, вірусом везикулярного стоматиту (VSV), орбівірусом катаральної лихоманки ("синій язик"), їх рекомбінантами та іншими вірусами, відомими з рівня техніки. Приклади бактеріальних інфекцій, без обмеження, включають ті, що виникають від зараження грампозитивними та грамнегативними бактеріями та мікобактеріями, такими як *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium colinum*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium chauveoi*, *Clostridium septicum*, *Clostridium hemolyticum*, *Clostridium tetani*, *Mannheimia haemolytica*, *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Histophilus somni*, *Campylobacter fetus*, *Leptospira* spp., *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus anthrax*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium* spp., *Treponema* spp., *Corynebacterium*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium* spp., *Histophilus* spp., *Moraxella* spp., *Muellerius* spp., *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus anthracis* та іншими бактеріями, відомими з рівня техніки. Приклади грибних або грибкових інфекцій, без обмеження, включають ті, що виникають від зараження *Actinobacterium* spp., *Aspergillus* spp., *Histomonas* spp. та іншими інфекційними грибами або грибами, відомими з рівня техніки. Приклади паразитів включають, без обмеження, *Neospora* spp., *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Chorioptes* spp., *Cysticercus* spp., *Dermatophilus* spp., *Damalinia bovis*, *Dictylocaulus* spp., *Eimeria* spp., *Eperythrozoon* spp., *Haemonchus* spp., *Melophagus* spp., *Muellerius* spp., *Nematodirus* spp., *Oestrus* spp., *Ostertagia* spp., *Psoroptes* spp., *Sarcoptes* spp., *Serpens* spp., *Strongyloides* spp., *Toxoplasma* spp., *Trichuris* spp., *Trichophyton* spp., *Tritrichomas* spp., *Fascioloides* spp., *Anaplasma marginale* та інших паразитів, відомих з рівня техніки.

#### с. Суб'єкти

Методи згідно винаходу можуть застосовуватись до будь-якого суб'єкта або особи виду бичачих, домашнього або дикого. Зокрема, вони можуть застосовуватись до суб'єктів, що знаходяться на промисловому утриманні для розведення, м'ясного та молочного виробництва. Підходжі суб'єкти видів бичачих, без обмеження, включають антилоп, буйволів, яків, BPX та бізонів. В одному варіанті реалізації особина виду бичачих є BPX. Види BPX включають, без обмеження, корів, биків, телят, телиць, волів, м'ясну худобу або молочну худобу. Фахівець з рівня техніки визнає, що методи згідно винаходу будуть значною мірою сприятливі для худоби, що знаходиться на промисловому утриманні для розведення, м'ясного та молочного виробництва, оскільки вона особливо вразлива до впливу інфекційних агентів з навколишнього середовища.

#### d. Введення

Існує багато шляхів введення. Конкретний вибраний режим буде залежати, звичайно, від конкретних вибраних біологічних агентів, віку та загального стану здоров'я суб'єкта, конкретного стану, що лікується, та дозування, потрібного для терапевтичної ефективності. Методи згідно винаходу можуть провадитися з використанням будь-якого режиму введення, що виробляє

ефективні рівні імунного відгуку, не викликаючи клінічно неприйнятних побічних ефектів. Композиції можуть бути зручно представлені у вигляді одиної дози форми і можуть бути приготовані будь-яким зі способів, добре відомих з рівня техніки.

Щеплення видів ВРХ може здійснюватись у будь-якому віці. Вакцина може вводиться внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрішньошкірно, внутрішньочеревно, підшкірно, розпилом/аерозолем, перорально, внутрішньоочно, внутрішньотрахеально, внутрішньоносово або іншими способами, відомими з рівня техніки. Далі, припускається, що методи згідно винаходу можуть використовуватись на основі типових графіків щеплення. Імуномодулятор також може вводиться внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно, аерозолем, перорально, внутрішньоочно, внутрішньотрахеально, через ніс або іншими способами, відомими з рівня техніки. В одному варіанті реалізації імуномодулятор вводиться підшкірно. В іншому варіанті реалізації імуномодулятор вводиться внутрішньом'язово. В ще одному варіанті реалізації імуномодулятор вводиться як аерозоль. В подальшому варіанті реалізації імуномодулятор вводиться перорально.

В одному варіанті реалізації імуномодулятор вводиться сам до тварини перед зараженням (або інфікуванням). В іншому варіанті реалізації імуномодулятор вводиться сам до тварини після зараження (або інфікування). В ще одному варіанті реалізації імуномодулятор вводиться сам до тварини одночасно з зараженням (або інфікуванням). В подальшому варіанті реалізації імуномодулююча композиція вводиться одночасно разом з вакцинацією перед зараженням. В ще одному подальшому варіанті реалізації імуномодулююча композиція вводиться одночасно разом з вакцинацією одночасно з зараженням (або інфікуванням). Сумісне введення може включати введення вакцини та імуномодулятора в одному місці на тварині в двох різних точках, близьких одна до одної (напр., ін'єкції близько одна до одної на шиї тварини), з різних боків тварини в одному місці (напр., по одній з кожного боку шиї) або в різних місцях на одній тварині. В іншому варіанті реалізації імуномодулююча композиція вводиться перед вакцинацією та зараженням. В подальшому варіанті реалізації імуномодулююча композиція вводиться після вакцинації, але до зараження. В подальшому варіанті реалізації імуномодулятор вводиться після зараження тварини, що була вакцинована перед зараженням (або інфікуванням).

В одному варіанті реалізації імуномодулятор вводиться від близько 1 до близько 14 днів перед зараженням або від близько 1 до близько 14 днів після зараження. В одному варіанті реалізації імуномодулятор вводиться від близько 1 до близько 7 днів перед зараженням або від близько 1 до близько 7 днів після зараження. В ще одному варіанті реалізації імуномодулятор вводиться на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 день до зараження або на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 день після зараження.

Інші системи доставки можуть включати системи вивільнення з часом, відкладеного вивільнення чи сповільненого вивільнення. Такі системи дозволяють уникнути повторних введення композицій, тим самим підвищуючи зручність. Багато типів систем доставки наявні та відомі фахівцям з рівня техніки. Вони включають системи на полімерній основі, такі як полілактид-гліколід, кополіоксалати, полікапролактони, поліефіраміди, поліортоефіри, поліоксимасляну кислоту та поліангідриди. Мікрокапсули з вищенаведених полімерів, що містять лікарські засоби, описані, наприклад, в патенті США № 5,075,109. Системи доставки включають також не полімерні системи, такі як ліпіди, включаючи стерини, такі як холестерин, ефіри холестерину та жирних кислот, та нейтральні жири, такі як моно-, ди- і тригліцериди; гідрогелеві системи вивільнення; силіконові системи; системи на пептидній основі; воскові покриття; пресовані таблетки з використанням звичайних зв'язуючих та ексципієнтів; частково сплавлені імплантанти і тому подібне. Окремі приклади включають, але не обмежуються, ерозійні системи, в яких агент згідно винаходу міститься у формі всередині матриці, такі як описані в патентах США № 4,452,775, 4,675,189 та 5,736,152, та дифузійні системи, в яких активний компонент проникає з контрольованою швидкістю з полімеру, такі як описані в патентах США № 3,854,480, 5,133,974 та 5,407,686. Крім того, можуть використовуватись апаратні системи доставки на основі насоса, деякі з яких адаптовані для імплантації.

Так як різні зміни можуть бути внесені до вищенаведених композицій, препаратів та методів без відходу від обсягу винаходу, слід розуміти, що все, що міститься в вищенаведеному описі та в прикладах, що надаються нижче, слід розглядати як ілюстративне, а не в сенсі обмеження.

#### ВИЗНАЧЕННЯ

Термін "ефективна кількість" означає кількість, необхідну або достатню для реалізації бажаного біологічного ефекту. Наприклад, ефективна кількість імуномодулятора для лікування або запобігання інфекційному захворюванню є такою кількістю, яка необхідна для того, щоб викликати розвиток імунного відгуку при контакті з мікроорганізмом, тим самим викликаючи зниження кількості мікроорганізму всередині суб'єкта та переважно викорінення мікроорганізму. Ефективна кількість для кожного конкретного застосування може змінюватись залежно від таких



факторів, як захворювання або стан, що лікується, розмір суб'єкта або тяжкість захворювання або стану. Фахівець з рівня техніки може емпірично визначити ефективну кількість імуномодулятора без необхідності в непотрібних експериментах.

Термін "цитокін" означає родину білків, що підвищують імунітет. Родина цитокінів включає гематопоетичний фактор росту, інтерлейкіни, інтерферони, молекули надродини імуноглобулінів, молекули родини факторів некрозу пухлин та хемокіни (тобто, білки, що регулюють міграцію та активацію клітин, зокрема, фагоцитарних клітин). Приклади цитокінів включають, без обмеження, інтерлейкін-2 (IL-2), інтерлейкін-12 (IL12), інтерлейкін-15 (IL-15), інтерлейкін-18 (IL-18), інтерферон- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), та інтерферон- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ).

Термін "викликати" може використовуватися взаємозамінно з термінами активувати, стимулювати, породжувати чи підвищувати.

Термін "виклик імунного відгуку" у суб'єкта означає специфічний контроль чи вплив на активність імунного відгуку і може включати активацію імунного відгуку, підвищення імунного відгуку, посилення імунного відгуку та/або зміна імунного відгуку (така як виклик типу імунного відгуку, котрий у свою чергу змінює переважаючий тип імунного відгуку у суб'єкта від такого, що є шкідливим чи неефективним, до такого, що є благотворним чи захисним).

Термін "функціонально пов'язаний" означає з'єднання молекули нуклеїнової кислоти з послідовністю контролю транскрипції в такий спосіб, що молекула здатна експресуватись при трансфекції (тобто, трансформації, трансдукції або трансфекції) до клітини-носія. Послідовності контролю транскрипції є послідовностями, які контролюють ініціацію, елонгацію та термінацію транскрипції. Частково важливі послідовності контролю транскрипції є тими, що контролюють ініціацію транскрипції, такі як послідовності промотора, енхансера, оператора та репресора. Багато таких послідовностей контролю транскрипції відомі фахівцям з рівня техніки. Переважні послідовності контролю транскрипції включають ті, що функціонують у клітинах птахів, риб, ссавців, бактерій, рослин та комах. У той час як у винаході можуть використовуватись будь-які послідовності контролю транскрипції, послідовності можуть включати природні послідовності контролю транскрипції, пов'язані в природі з послідовністю, що кодує імуноген або імуностимулюючий білок.

Терміни "молекула нуклеїнової кислоти" та "послідовність нуклеїнової кислоти" можуть використовуватись взаємозамінно і включають ДНК, РНК або похідні як ДНК, так і РНК. Терміни включають також олігонуклеотиди та більші послідовності, включаючи як молекули нуклеїнових кислот, що кодують білок або його фрагмент, так і молекули нуклеїнових кислот, що містять регуляторні області, інтрони, або інші некодуючі ДНК та РНК. Типово олігонуклеотид має нуклеотидну послідовність від близько 1 до близько 500 нуклеотидів, і більш типово має принаймні близько 5 нуклеотидів у довжину. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одержана з будь-якого джерела, включаючи ссавців, риби, комах, бактеріальні, вірусні, рослинні або синтетичні джерела. Молекула нуклеїнової кислоти може бути отримана звичайними способами, відомими з рівня техніки, такими як технологія рекомбінантної ДНК (напр., полімеразна ланцюгова реакція (ПЦР), ампліфікація, клонування) або хімічний синтез. Молекули нуклеїнових кислот включають молекули природних нуклеїнових кислот та їх гомологи, включаючи, але не обмежуючись, природні алельні варіанти та модифіковані молекули нуклеїнових кислот, в яких нуклеотиди були вставлені, видалені, заміщені або інвертовані в такий спосіб, що такі модифікації здебільшого не заважають здатності молекули нуклеїнової кислоти кодувати імуноген або імуностимулюючий білок, корисний у методах згідно даного винаходу. Гомолог нуклеїнової кислоти можна одержати за допомогою багатьох способів, відомих фахівцям з рівня техніки (див., наприклад, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989), що включається сюди за посиланням. Методики скринінгу на імуногенність, таку як імуногенність патогенного антигена або активність цитокінів, відомі фахівцям з рівня техніки і включають багато методів аналізу in vitro та in vivo.

#### ПРИКЛАДИ

Наступні приклади ілюструють різні варіанти реалізації винаходу.

Приклад 1. Оцінка худоби, що отримує ДНК-імуномодулятор, перед або після розвитку природного респіраторного захворювання ВРХ.

Метою цього дослідження було визначення ефективності ДНК-імуномодулятора, введеного телятам перед та після розвитку природних випадків РЗ ВРХ.

Імуномодулятор

Імуномодулятор, що використовувався в цьому дослідженні, був композицією, що містила катіонний ліпід та некодуєчу ДНК. Ліпідні компоненти синтетичного імуномодулятора [1-[2-[9-(Z)-октадеценілокси]]-2-[8](Z)-гептадеценіл]-3-[гідроксиетил]імідазолійхлорид (DOTIM) та синтетичний нейтральний ліпід холестерин були комбіновані для отримання ліпосом діаметром

приблизно 200 нм (див. патент США 6,693,086). ДНК-компонент був некодуючою ДНК-плазмідом з 4242 парами основ, виробленою в *E. coli*, який, будучи заряджений негативно, асоціюється з позитивно зарядженими (катіонними) ліпосомами (див. патент США 6,693,086).

#### Досліджувані тварини

84 кастрованих телят-бичків голштинської породи у віці відлучення вибрали зі стада без поточної історії респіраторного захворювання. Кожне окреме теля спочатку оглянули і визнали здоровим. 84 телят були розділені на сім дослідних груп по 12 телят кожна. Тільки тварини, не щеплені від *Mannheimia haemolytica*, були включені в дослідження. Жодна з тварин не отримувала протимікробних засобів впродовж 30 діб до введення ДНК-імуномодулятора. Дослідним групам вводили різні дози вищеописаного ДНК-імуномодулятора в день експерименту, як зазначено в Таблиці 1.1 нижче. Схема розведення ДНК-імуномодулятора надана в Таблиці 1.2. ДНК-імуномодулятор вводився внутрішньом'язово, краніально до лівого плеча, вентрально до потиличної зв'язки і каудодорсально до яремного жолоба телят.

Як зазначено нижче, день експерименту -1 означає день початку дослідження після початкового відбору, в який телят оцінювали та визначали їх придатність для дослідження. День експерименту 0 є днем, наступним за днем -1 і так далі.

Таблиця 1.1

Графік введення імуномодулятора

Номер досліджу	ДНК-імуномодулятор Доза (мкг)	День введення імуномодулятора	Тварин на дослідну групу
1	500	-1	12
2	200	-1	12
3	50	-1	12
4	500	0	12
5	200	0	12
6	50	0	12
7	0 (контроль)	н/з	12

У значної частини телят спостерігались прояви різного ступеня РЗ ВРХ ранком дня 0. На 5 день було відмічено, що всі телята, що залишились у досліджуваній популяції, відповідають ознакам захворювання на РЗ ВРХ. Худобу видаляли з досліджуваної популяції, тільки якщо була показана евтаназія через тяжке РЗ ВРХ. Не спостерігалось жодних інших інфекційних/неінфекційних захворювань, які б вимагали видалення з цього дослідження.

#### Оцінка

На 1-5 дні експерименту телята оцінювались за різними показниками здоров'я. Наприклад, ректальна температура та середньодобова вага визначались для кожного з телят щодня впродовж дослідження. Тварин оцінювали приблизно в той самий час кожного дня (+/- 3 години) від 1 дня до 5 дня.

На 5 день всіх телят піддали евтаназії та розтину. Показники ураження легенів визначались (на основі ступеня затвердіння легенів, оціненого шляхом візуального огляду та ручної пальпації) для кожного окремого теляти під час розтину.

Загальні показники ураження легенів для кожного дня введення становили приблизно 11 % та 14 % для дня -1 та дня 0, відповідно. Показники ураження легенів 11.2 %, 9.0 %, 10.8 % та 19.9 % проявлялись для груп 500, 200, 50 та негативного контролю, відповідно. Найбільша різниця між контрольною групою та дослідною групою (200 мкг) становила приблизно 11 % зменшення.

Оцінки з поправкою на модель відображають сирі середні значення, скориговані для всіх змінних статистичної моделі (тобто, доза, день та доза x день), а також для загону, в якому телят утримували впродовж дослідження. Таким чином, оцінки з поправкою на модель можуть виявляти різниці, порівняні з сирими середніми значеннями.

Проводились також наступні бактеріологічні (культури з легенів) та вірусологічні (носові мазки) дослідження. З телят, що залишались (69), що були піддані евтаназії на 5 день, у 11.6 % було виявлено виділення вірусу герпесу ВРХ типу 1 (BHV-1) в носових виділеннях. Відносно культур з легенів усіх досліджуваних тварин, 41 % були позитивні щодо *Mh*, 31.3 % культур були позитивні щодо *Pasteurella multocida* (*Pm*), 10.8 % культур були позитивні як щодо *Mh*, так і до *Pm*, і жодного *Histophilus somni* не було виділено по досліджуваній популяції. Культивування *Mycoplasma bovis* не проводилось у цьому дослідженні.

## Результати

У цьому дослідженні доза ДНК-імуномодулятора (тобто, 500 мкг, 200 мкг та 50 мкг) досягла значного зниження показників ураження легенів порівняно з негативним контролем ( $P=0.1284$ ). Проте, день введення ДНК-імуномодулятора (тобто, день -1 або 0) не був значимо пов'язаний з показниками ураження легенів. Не спостерігалось статистичних відмінностей у показниках ураження легенів серед груп, що отримували дозу ДНК-імуномодулятора. Ректальна температура мала тенденцію до значимого зв'язку з дозою ДНК-імуномодулятора ( $P=0.1190$ ), але не була пов'язана з днем введення. Не спостерігалось помітних відмінностей між дозою ДНК-імуномодулятора та негативним контролем щодо середньодобового приросту ваги.

Була сильна тенденція ДНК-імуномодулятора до зниження ураження легенів порівняно з негативним контролем, що тим самим надає доказ того, що цей препарат має потенціал для захисту тканини легенів під час спалаху РЗ ВРХ. У цьому дослідженні день введення препарату не був пов'язаний з ураженням легенів, що означає, що не має значення, чи худоба отримує ДНК-імуномодулятор в переддень чи в той самий день, що й поява клінічних ознак, пов'язаних з РЗ ВРХ. Цей результат важливий, так як час контакту з патогенами РЗ ВРХ зазвичай невідомий у типових виробничих системах, і до того ж ускладнений впливом різних стресових факторів, яким худоба піддається впродовж виробничого циклу. Таким чином, забезпечення виробників препаратом, що надає гнучкості в часі введення, по відношенню до спалаху РЗ ВРХ, вкрай важливе для м'ясної та молочної промисловості.

Приклад 2. Оцінка худоби, що отримує ДНК-імуномодулятор одночасно або на наступний день після експериментального зараження *Mannheimia haemolytica*.

Метою цього дослідження було визначення ефективності ДНК-імуномодулятора, введеного телятам одночасно або на наступний день після експериментального зараження *Mannheimia haemolytica*.

## Імуномодулятор

Імуномодулятор, що використовувався в цьому дослідженні, був композицією, описаною вище в Прикладі 1.

## Досліджувані тварини

84 кастрованих телят-бичків голштинської породи у віці відлучення з вагою в середньому близько 300 фунтів (136 кг) вибрали зі стада без поточної історії респіраторного захворювання. Кожне окреме теля спочатку оглянули і визнали здоровим. 84 телят були розділені на сім дослідних груп по 12 телят кожна. Тільки тварини, не щеплені від *Mannheimia haemolytica*, були включені в дослідження. Жодна з тварин не отримувала протимікробних засобів впродовж 30 діб до введення ДНК-імуномодулятора. Дослідним групам вводили різні дози ДНК-імуномодулятора в день експерименту, як зазначено в Таблиці 2.1 нижче. Схема розведення ДНК-імуномодулятора надана в Таблиці 2.2. ДНК-імуномодулятор вводився внутрішньом'язово, краніально до лівого плеча, вентрально до потиличної зв'язки і каудодорсально до яремного жолоба телят.

Як зазначено нижче, день експерименту 0 означає день початку дослідження після початкового відбору, в який телят оцінювали та визначали їх перебування в доброму здоров'ї. День експерименту 1 є днем, наступним за днем 0 і так далі.

Таблиця 2.1

Графік введення імуномодулятора та зараження Mh

Номер досліджу	ДНК-імуномодулятор Доза (мкг)	День введення імуномодулятора	День зараження Mh	Тварин на дослідну групу
1	500	0	0	12
2	200	0	0	12
3	50	0	0	12
4	500	1	0	12
5	200	1	0	12
6	50	1	0	12
7	0 (контроль)	н/з	0	12

## Експериментальне зараження

В день 0, телята були заражені загальною кількістю  $3.12 \times 10^7$  колонієутворюючих одиниць (КУО) *Mannheimia haemolytica*. Інокулят вводився через дихальні шляхи. На 3 день було відмічено, що всі телята в досліджуваній популяції, відповідають ознакам захворювання на РЗ

ВРХ. Середній термін появи ознак становив один день.

#### Оцінка

Як і в попередньому прикладі, на 1-5 дні експерименту телята оцінювались за різними показниками здоров'я. Ректальна температура та середньодобова вага визначались для кожного з телят щодня впродовж дослідження. Тварин оцінювали приблизно в той самий час кожного дня. На 5 день всіх телят піддали евтаназії та розтину. Показники ураження легенів визначались для кожного окремого теляти під час розтину відповідно до формули, описаної в Прикладі 1.

#### Результати

У цьому дослідженні доза ДНК-імуномодулятора (тобто, 500 мкг, 200 мкг та 50 мкг) значно знизила показники ураження легенів порівняно з негативним контролем. Проте, нижчі дози (200 мкг та 50 мкг) перевершили дозу 500 мкг у зниженні ураження легенів. День введення ДНК-імуномодулятора (тобто, день 0 або 1) не був значимо пов'язаний з показниками ураження легенів. Не спостерігалось статистичних відмінностей у показниках ураження легенів серед груп, що отримували дозу ДНК-імуномодулятора. Ректальна температура була значно знижена у телят, яким вводили ДНК-імуномодулятор, порівняно з негативним контролем, але не була пов'язана з дозою. Не спостерігалось помітних відмінностей між дозою ДНК-імуномодулятора та негативним контролем щодо середньодобового приросту ваги.

Була сильна тенденція ДНК-імуномодулятора до зниження ураження легенів порівняно з негативним контролем, що тим самим надає доказ того, що цей препарат має потенціал для захисту тканини легенів під час спалаху РЗ ВРХ. У цьому дослідженні день введення препарату не був пов'язаний з ураженням легенів, що означає, що не мало значення, чи худоба отримувала ДНК-імуномодулятор в переддень чи в той самий день, що й поява клінічних ознак, пов'язаних з РЗ ВРХ. Цей результат важливий, так як час контакту з патогенами РЗ ВРХ зазвичай невідомий у типових виробничих системах, і до того ж ускладнений впливом різних стресових факторів, яким худоба піддається впродовж виробничого циклу. Таким чином, забезпечення виробників препаратом, що надає гнучкості в часі введення, по відношенню до спалаху РЗ ВРХ, вкрай важливе для м'ясної та молочної промисловості.

Приклад 3. Оцінка худоби, що отримує ДНК-імуномодулятор за два дні до або одночасно з експериментальним зараженням *Mannheimia haemolytica*.

Метою цього дослідження було визначення ефективності ДНК-імуномодулятора, введенного телятам за два дні до або одночасно з експериментальним зараженням *Mannheimia haemolytica*.

#### Імуномодулятор

Імуномодулятор, що використовувався в цьому дослідженні, був композицією, описаною вище в Прикладі 1.

#### Досліджувані тварини

96 кастрованих телят-бичків голштинської породи вагою в середньому близько 800-1000 фунтів (363-454 кг) вибрали зі стада без поточної історії респіраторного захворювання. Кожне окреме теля спочатку оглянули і визнали здоровим. 96 телят були розділені на вісім дослідних груп по 12 телят кожна. Тільки тварини, не щеплені від *Mannheimia haemolytica*, були включені в дослідження. Жодна з тварин не отримувала протимікробних засобів впродовж 30 діб до введення ДНК-імуномодулятора. Дослідним групам вводили різні дози ДНК-імуномодулятора в день експерименту, як зазначено в Таблиці 3.1 нижче. Схема розведення ДНК-імуномодулятора надана в Таблиці 3.2. ДНК-імуномодулятор вводився внутрішньом'язово, краніально до лівого плеча, вентрально до потиличної зв'язки і каудодорсально до яремного жолоба телят.

Як зазначено нижче, день експерименту -2 означає день початку дослідження, коли дослідним групам 1-3 вводили імуномодулятор. День експерименту 0 є через два дні після дня -2 і так далі.

Таблиця 3.1

## Графік введення імуномодулятора та зараження Mh

Номер досліджу	ДНК-імуномодулятор Доза (мкг)	День введення імуномодулятора	День зараження Mh	Тварин на дослідну групу
1	200	-2	0	12
2	50	-2	0	12
3	25	-2	0	12
4	200	0	0	12
5	50	0	0	12
6	25	0	0	12
7	0 (контроль)	-2	0	12
8	0 (контроль)	0	0	12

## Експериментальне зараження

5 В день 0, телята були заражені загальною кількістю  $1.9 \cdot 10^{10}$  КУО. Інокулят вводився через дихальні шляхи.

## Оцінка

Як і в попередніх прикладах, на 1-5 дні експерименту телята оцінювались за різними показниками здоров'я. На 5 день всіх телят піддали евтаназії та розтину. Показники ураження легенів визначались для кожного окремого теляти під час розтину.

## 10 Результати

У цьому дослідженні доза ДНК-імуномодулятора (тобто, 500 мкг, 200 мкг та 50 мкг) значно знизилла показники ураження легенів порівняно з негативним контролем. Проте, не спостерігалось статистичних відмінностей у показниках ураження легенів серед груп, що отримували дозу ДНК-імуномодулятора. День введення ДНК-імуномодулятора (тобто, день -2 або 0) був значимо пов'язаний з показниками ураження легенів. Значне зниження ураження легенів спостерігалось, коли імуномодулятор вводився в день 0 порівняно з днем -2.

15

Приклад 4. Сумісне введення імуномодулятора та вбитої вакцини Mh після зараження Mh.

Метою цього дослідження було визначення ефективності ДНК-імуномодулятора, введеного разом з убитою вакциною проти Mh телятам, яких піддали експериментальному зараженню *Mannheimia haemolytica*.

20

## Імуномодулятор

Імуномодулятор, що використовувався в цьому дослідженні, був композицією, описаною вище в Прикладі 1.

## Досліджувані тварини

25

81 телят-бичків голштинської породи у віці 12 тижнів вибрали зі стада без поточної історії респіраторного захворювання. Кожне окреме теля оглянули і визнали здоровим. Тільки тварини, не щеплені від *Mannheimia haemolytica*, були включені в дослідження. Жодна з тварин не отримувала протимікробних засобів впродовж 30 діб до введення інокуляту.

## Експериментальне інфікування та зараження

30

Зараження, або експериментальне інфікування, включає контакт з інокулятом *Mannheimia haemolytica*. Використовувались мікроорганізми в концентрації  $1.7 \cdot 10^8$  на тварину для першої інокуляції та  $2.4 \cdot 10^{10}$  на тварину для другої інокуляції. Також тварин заражали аерозолем через інший дихальний шлях. Концентрація мікроорганізмів в аерозольному інокуляті становила  $1.9 \cdot 10^{10}$  на тварину.

35

Ефективність імуномодулятора, як описано вище, введеного телятам, з наступним контактом з *Mannheimia haemolytica*, визначалась за допомогою дванадцяти дослідних груп, як детально наведено в Таблиці 3.

Таблиця 4.3

Дослідні групи.

Група	Цільова доза	Дні лікування		Кількість тварин
		День	Контакт	
T1	Вбита вакцина МН (олія) п/ш	0	+	7
T2	Вбита вакцина МН (олія) + імуномодулятор 500 мкг п/ш	0	+	7
T3	Вбита вакцина МН (олія) п/ш	7	+	6
T4	Вбита вакцина МН (олія) + імуномодулятор 500 мкг п/ш	7	+	7
T5	Імуномодулятор 500 мкг п/ш	7	+	7
T6	Імуномодулятор 500 мкг п/ш	13	+	7
T7	Імуномодулятор 500 мкг в/м	13	+	7
T8	Імуномодулятор 500 мкг п/ш	15*	+	7
T9	Контроль н/м	н/з	н/з	7
T10	Контроль ЗК	н/з	+	5
T11	Контроль ЗН	н/з	+	7
T12	Вбита вакцина МН (вода) + імуномодулятор 500 мкг п/ш	0	+	7

МН (олія) = вакцина проти *Mannheimia haemolytica* (Pulmo-Guard® PHM)

МН (вода) = вакцина проти *Mannheimia haemolytica* (One Shot®)

5 НЗ = Не змішані і не заражені аерозольно (для фонові макропатології)

ЗК = Заражені контактно та аерозольно

ЗН = Використані як заражені носії (заражені внутрішньотрахеально)

Всі тварини, окрім ЗН та НЗ, були заражені аерозольно

п/ш = Підшкірний шлях введення

10 в/м = Внутрішньом'язовий шлях введення

н/з = Не застосовно

\* Тварин у групі Т8 будуть лікувати після внутрішньоносового зараження

В день 0 дослідження всім тваринам у групах Т1, Т2 та Т12 вводили імуномодулятор підшкірно. Імуномодулятор вводили підшкірно в день 7 групам Т3, Т4 та Т5. Імуномодулятор вводили підшкірно в день 13 групі Т6 та внутрішньом'язово групі Т7. Імуномодулятор вводили підшкірно в день 15 групі Т8.

Всі тварини, що одержували вакцину, були щеплені відповідно до інструкцій на етикетці. Імуномодулятор та вакцину вводили якомога ближче один до одного біля лімфовузла (шия) – дві ін'єкції (одна для вакцини, а інша для імуномодулятора). Всі тварини, що отримували підшкірні ін'єкції, були вколоти біля лімфовузла у підлопатковій області.

В день експерименту 10, всіх телят Т11 вивозили за територію в трейлері для худоби протягом приблизно 24 годин, щоб піддати телят стресу. В день експерименту 11, 20 мл інокуляту, що містить *Mannheimia haemolytica*, ввели внутрішньотрахеально всім тваринам групи Т11, а через 4 години повторили з 25 мл інокуляту. В день експерименту 14, всіх телят, крім Т9, перемішали та вивозили за територію в трейлері для худоби протягом приблизно 24 годин, щоб піддати телят стресу. Всіх тварин, крім групи НЗ, перемішали в великому загоні на 12-16 годин у день експерименту 14, а потім повернули до їх окремих загонів (у кожної тварини був окремий загін). В день експерименту 15, 20 мл *Mannheimia haemolytica* ввели через інший дихальний шлях всім групам, крім Т9 і Т11. Впродовж дослідження всіх тварин щодня перевіряли на клінічні відхилення та падіж. Всі тварини мали нульові або низькі титри при перевірці перед купівлею тварин. Тварини мали високі титри перед лікуванням, що означає, що тварини стали серологічно позитивними за *Mannheimia haemolytica* перед одержанням лікування.

Результати

Тварини групи Т8 мали значно нижчі ураження легенів.

35 Дослідження наводить на думку, що існує початок раннього захисту (день 7), з вакциною чи без (групи Т4 та Т5 порівняно з Т3).

Приклад 5. Оцінка набутого імунітету у ВРХ, щепленої продажною живою вакциною при сумісному введенні з ДНК-імуномодулятором.

Метою цього дослідження було визначення, чи сумісне введення ДНК-імуномодулятора

підвищує набутий імунітет, наданий ослабленими живими вірусними вакцинами (ОЖВ).

Імуномодулятор

Імуномодулятор, що використовувався в цьому дослідженні, був композицією, описаною вище в Прикладі 1.

#### 5 Досліджувані тварини

72 кастрованих телят-бичків голштинської породи у віці відлучення вибрали зі стада без поточної історії респіраторного захворювання. 72 телят були розділені на шість дослідних груп по 12 телят кожна. Кожне окреме теля оглянули і визнали здоровим. У всіх телят були відсутні сироваткові антитіла до BHV-1, BVDV типів 1 і 2, та BRSV. Крім того, виявили, що всі телята не мають сироваткових антитіл до PI-3. Згодом визначили, що телята негативні щодо персистентної інфекції вірусної діареї BPX імуногістохімічними методами.

10 Дослідним групам вводили вакцину та різні дози ДНК-імуномодулятора внутрішньом'язово в день експерименту, як зазначено в Таблиці 5.1 нижче. Схема розведення ДНК-імуномодулятора надана в Таблиці 5.2. В день 0 дослідження всім тваринам у групах T1-T4 вводили імуномодулятор. Всі тварини, що одержували вакцину, були щеплені відповідно до інструкцій на етикетці. Імуномодулятор та вакцину вводили якомога ближче один до одного краніально до передньої частини плеча – дві ін'єкції (одна для вакцини, а інша для імуномодулятора).

Таблиця 5.1

Графік введення імуномодулятора та вакцини

Група	Цільова доза	День введення вакцини та/або імуномодулятора	Кількість тварин
T1	ОЖВ + імуномодулятор (500 мкг) в/м	0	12
T2	ОЖВ + імуномодулятор (200 мкг) в/м	0	12
T3	ОЖВ + імуномодулятор (100 мкг) в/м	0	12
T4	ОЖВ + імуномодулятор (50 мкг) в/м	0	12
T5	ОЖВ	0	12
T6	Без лікування	н/з	12

20 ОЖВ = вакцина проти Mannheimia haemolytica (Bovi-shield®) – ослаблена жива 4-компонентна вірусна респіраторна вакцина

в/м = Внутрішньом'язовий шлях введення

Оцінка

25 Імунологічне тестування проводилось на зразках відповідних гематологічних проб, відібраних у телят на 0, 13, 28, 27, 34 та 41 дні. Вимірювання клітинно-опосередкованого імунітету (КОІ) проводилось для кожної проби. Цільові патогени для цього дослідження були BHV-1, BVDV 1 і 2, та BRSV. Лабораторії використовували стандартизовані процедури та методи, в залежності від попередньо визначених цільових патогенів.

Результати

30 Були визначені дані з поправкою на модель для результатів КОІ на кожен день відбору зразків серед усіх дослідних груп. Серед усіх дослідних груп, типів клітин та антигенів не було виявлено статистичних відмінностей ( $P > 0.10$ ) при порівнянні груп, що лікувались комбінаціями ДНК-імуномодулятор – вакцина ОЖВ з худобою, що отримувала лише вакцину ОЖВ. Були зроблені оцінки для кожного з 4 вірусних патогенів РЗ BPX, представлених на відповідних діаграмах. Для цих статистичних оцінок всі порівняння робилися з дослідною групою "тільки ОЖВ".

35 Статистично значимі ( $P < 0.10$ ) кореляції лікування x день були виявлені для BVDV 1 (дні 28 і 35) та BVDV 2 (день 42). Не було виявлено значимих результатів ( $P > 0.10$ ) для BHV-1 у будь-який з перерахованих моментів часу. Дані щодо BRSV були виключені з аналізу через спостереження сероконверсії в дослідній групі негативного контролю. Слід відмітити, що для всіх статистичних оцінок всі порівняння робилися з дослідною групою "тільки ОЖВ".

40 Вага окремих тварин також визначалась протягом дослідження. Не було виявлено значимих результатів ( $P > 0.10$ ) по дослідних групах у порівнянні з групою "тільки ОЖВ".

45 У підсумку, ДНК-імуномодулятор не підвищував КОІ при сумісному введенні з ОЖВ вакциною порівняно з введенням самої ОЖВ вакцини. Проте, 500 мкг ДНК-імуномодулятора можуть підвищувати гуморальний імунітет при сумісному введенні з ОЖВ вакциною (особливо для BVDV). Тим не менш, слід відмітити, що незважаючи на брак достовірного поліпшення набутого імунітету, сумісне введення ДНК-імуномодулятора в дозах 500 мкг, 200 мкг, 100 мкг та

50 мкг не погіршує імунологічних ефектів, викликаних ОЖВ вакциною. До того ж, введення ДНК-імуномодулятора не чинить негативного впливу на продуктивність (напр., середньодобовий приріст).

Приклад 6. Оцінка набутого імунітету у ВРХ, щепленої продажною вакциною при сумісному введенні з ДНК-імуномодулятором.

Метою цього дослідження було визначення, чи сумісне введення ДНК-імуномодулятора підвищує набутий імунітет, наданий вакцинами, що містять інактивовані антигени.

Імуномодулятор

Імуномодулятор, що використовувався в цьому дослідженні, був композицією, описаною вище в Прикладі 1.

Досліджувані тварини

48 теличок голштинської породи у віці 3-5 місяців вибрали зі стада без поточної історії респіраторного захворювання. 48 теличок були розділені на шість дослідних груп по 8 тварин кожна. Кожну окрему тварину оглянули і визнали здоровою. У всіх тварин були відсутні сироваткові антитіла до BHV-1, BVDV типів 1 та 2. Також визначили, що телята негативні щодо персистентної інфекції вірусної діареї ВРХ за допомогою ПЦР. Тварин не відбирали за титрами РСН проти вірусів BRSV та PI3.

Дослідним групам вводили вакцину та різні дози ДНК-імуномодулятора внутрішньом'язово в день експерименту, як зазначено в Таблиці 5.1 нижче. Вакцина містила BHV1 та BVDV типу 1 і 2 як інактивовані антигени, та ослаблені живі віруси PI3 та BRSV. Імуномодулятор та вакцину вводили або окремо з одного боку тварини краніально до передньої частини плеча, або окремо з різних боків тварини в однаковій області, або змішували в одному шприці. Схема розведення ДНК-імуномодулятора надана в Таблиці 5.2.

Таблиця 6.1

Графік введення імуномодулятора та вакцини

Група	Цільова доза	День введення вакцини та/або імуномодулятора	Кількість тварин
T1	Плацебо (декстроза 5 %)	0	8
T2	Вакцина + декстроза в/м, окремо	0	8
T3	Вакцина + імуномодулятор (20 мкг) в/м, змішано	0	8
T4	Вакцина + імуномодулятор (200 мкг) в/м, змішано	0	8
T5	Вакцина + імуномодулятор (200 мкг) в/м, окремо з одного боку	0	8
T6	Вакцина + імуномодулятор (200 мкг) в/м, окремо з різних боків	0	8

Вакцина = комбінована (інактивована та ослаблена жива) 4-компонентна вірусна респіраторна вакцина (Risproval®)

в/м = Внутрішньом'язовий шлях введення

Оцінка

Імунологічне тестування проводилось на зразках відповідних гематологічних проб, відібраних у худоби на 0, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20, 23 та 27 дні. Цільові патогени для цього дослідження були BHV-1, BVDV 1 та 2. Лише для інформаційних потреб, визначались також титри антитіл проти вірусів BRSV та PI3. Лабораторії використовували стандартизовані реакції сироваткової нейтралізації (РСН) як процедури для попередньо визначених цільових патогенів.

Результати

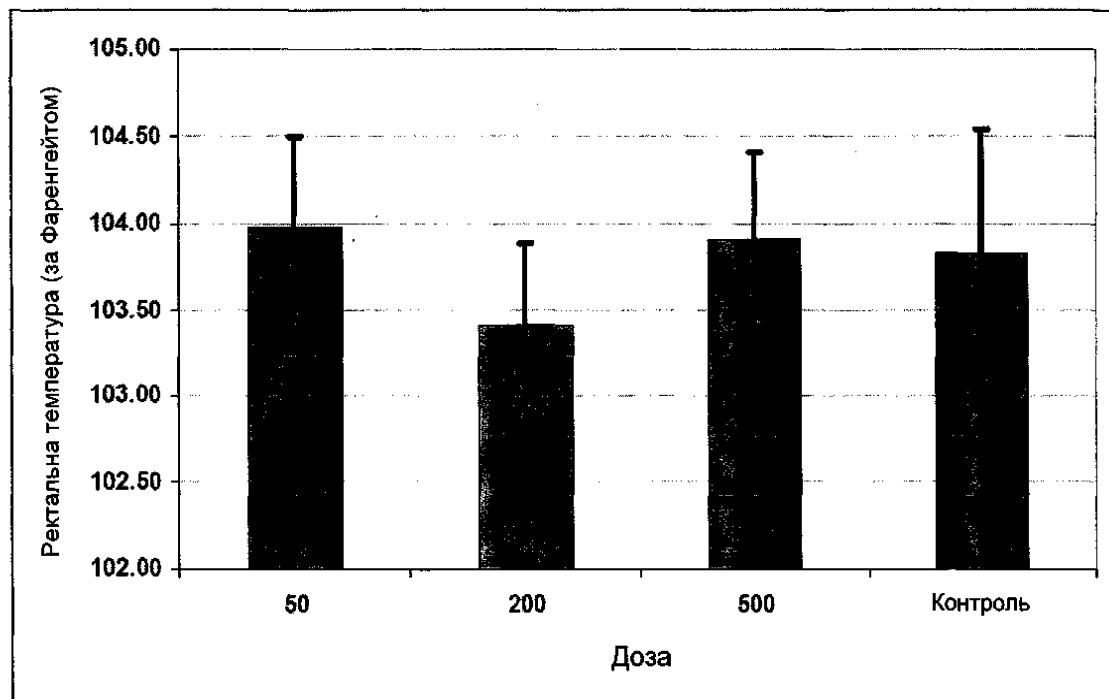
Статистично значимі ( $P < 0.010$ ) кореляції лікування x день були виявлені для BHV1 (день 27). Не було виявлено значимих результатів ( $P > 0.10$ ) для всіх інших моментів часу для BHV1 та для BVDV типу 1 і 2 у будь-який з перерахованих моментів часу. Результати щодо титрів BRSV та PI3 далі не оцінювалися через те, що тварини не були серологічно негативні на початку дослідження. Через те лікувальний ефект не можна було підтвердити. Слід відмітити, що для всіх статистичних оцінок всі порівняння робилися з дослідною групою "вакцина + декстроза 5 %".



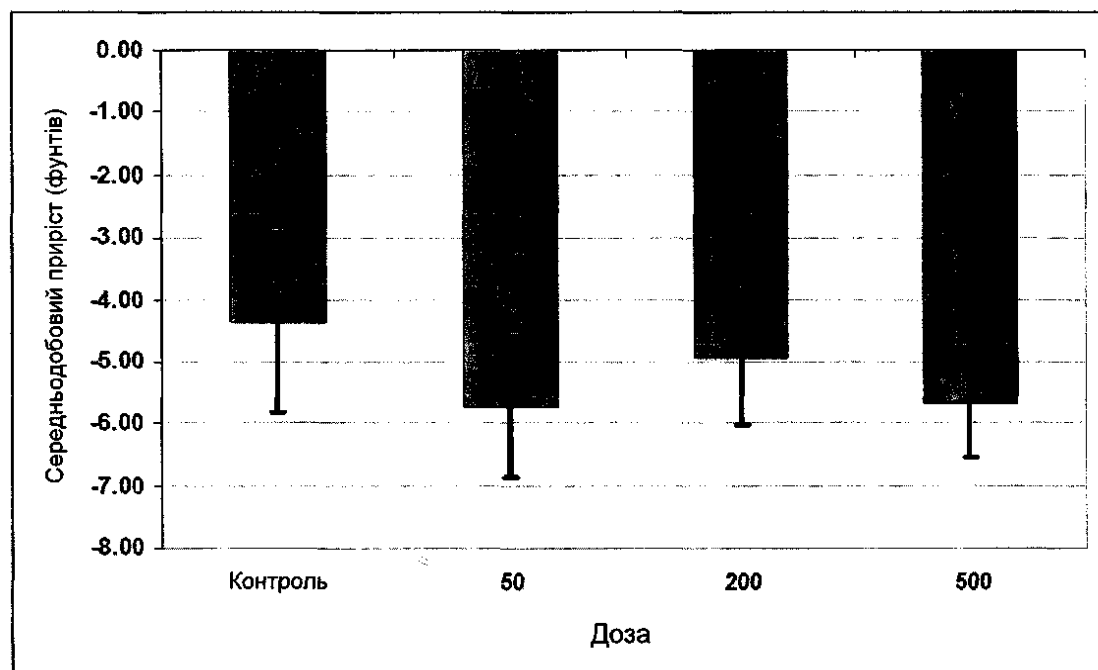
## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Композиція імуномодулятора для лікування респіраторного захворювання у великої рогатої худоби, викликаного *Mannheimia haemolytica*, де композиція імуномодулятора включає:
  - а) катіонний ліпосомний засіб доставки, який включає [1-[2-[9-(Z)-октадеценілокси]-етил]-2-[8](Z)-гептадеценіл]-3-[2-[гідроксіетил]імідазоліл хлорид та синтетичний нейтральний ліпід холестерин, де катіонний ліпосомний засіб доставки має приблизно 200 нм в діаметрі; і
  - б) молекулу нуклеїнової кислоти, де молекула нуклеїнової кислоти являє собою ізольований некодуючий ДНК плазмідний вектор без генної вставки, виділений із *E. coli*.
2. Композиція за пунктом 1, де ліпосомний засіб доставки додатково включає пари ліпідів, вибрані із групи, яка включає N-[1-(2,3-діолеїлокси)пропіл]-N,N,N-триметиламонійхлорид та синтетичний нейтральний ліпід холестерин; N-[1-(2,3-діолеїлокси)пропіл]-N,N,N-триметиламонійхлорид та синтетичний нейтральний ліпід холестерин та диметилдіоктадециламонійбромід та синтетичний нейтральний ліпід холестерин.
3. Композиція за пунктом 1 або 2, де зменшуються клінічні ознаки ураження легень та/або підвищеної температури.
4. Композиція за будь-яким з пунктів 1-3, для введення, вибраного із групи, яка включає внутрішньовенне, внутрішньом'язове, внутрішньошкірне, внутрішньочеревне, підшкірне, шляхом розпилення/аерозольне, пероральне, внутрішньоочне, внутрішньотрахеєчне та внутрішньоносове.
5. Композиція за пунктом 4, де композицію імуномодулятора вводять підшкірно великій рогатій худобі.
6. Композиція за пунктом 4, де композицію імуномодулятора вводять внутрішньом'язово великій рогатій худобі.
7. Композиція за будь-яким з пунктів 1-6, де композиція додатково включає біологічний агент, вибраний із групи, що включає білки, які стимулюють імунну систему, імуногени, вакцини, протимікробні засоби, та будь-яку їх комбінацію.
8. Композиція за пунктом 1, де композиція імуномодулятора містить від 0,1 до 10 мкг некодуючого ДНК плазмідного вектора у поєднанні з 8 нмоль ліпосомного засобу доставки.
9. Композиція за будь-яким з пунктів 1-8 для поліпшення набутого імунного відгуку у тварини, якій була введена вакцина.
10. Композиція за пунктом 9, де композицію імуномодулятора вводять сумісно з вакциною, або вводять після, до, або в суміші з вакциною.

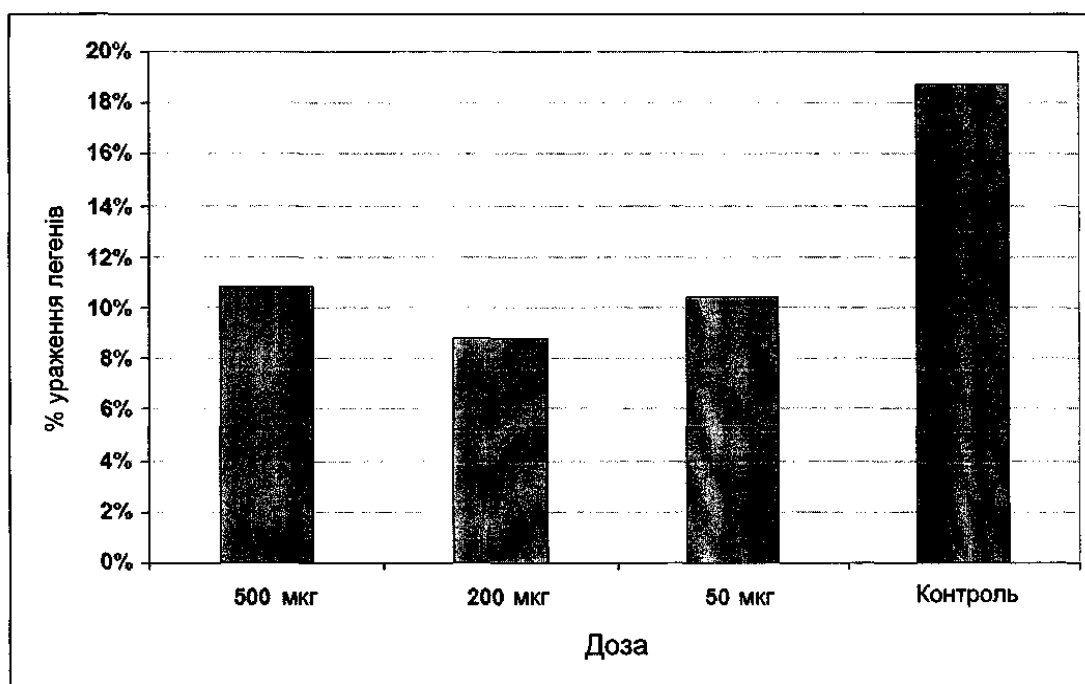
ФІГ. 1.1



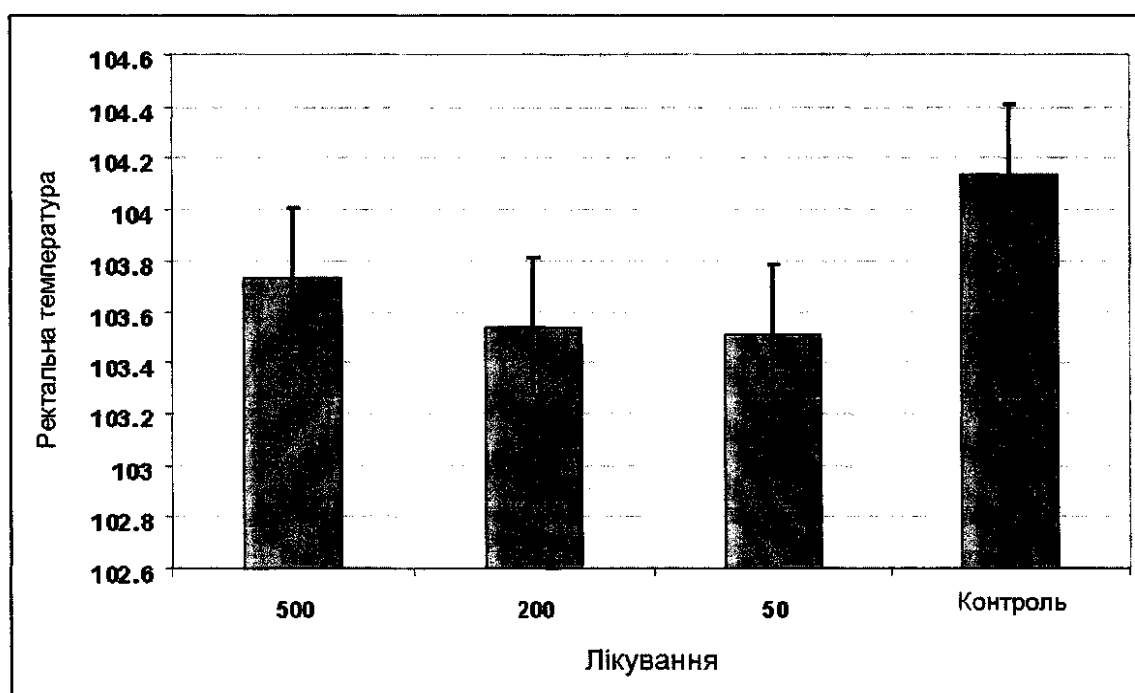
ФІГ. 1.2



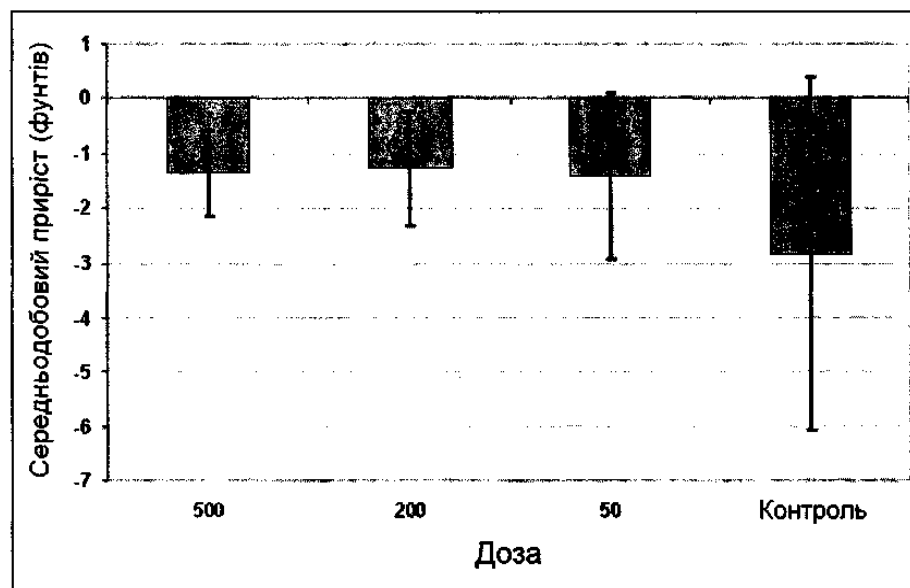
ФІГ. 1.3



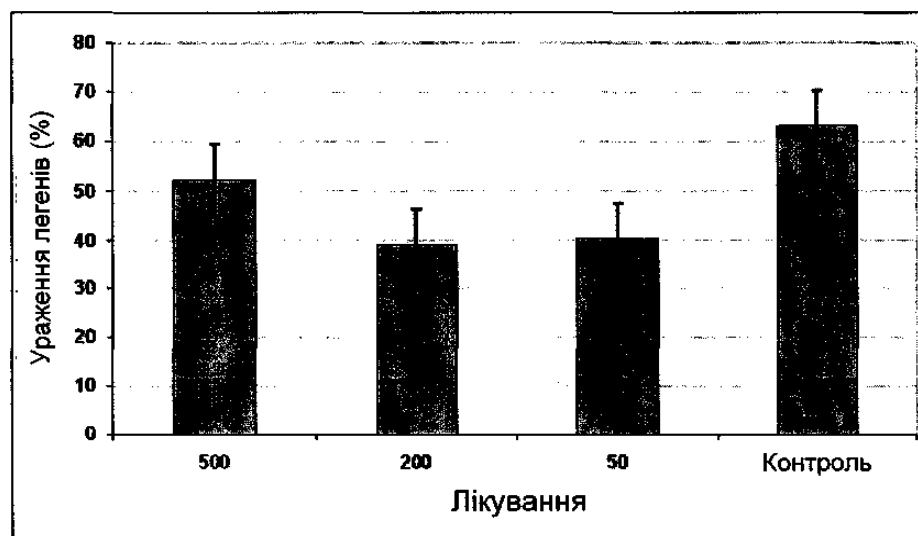
ФІГ. 2.1



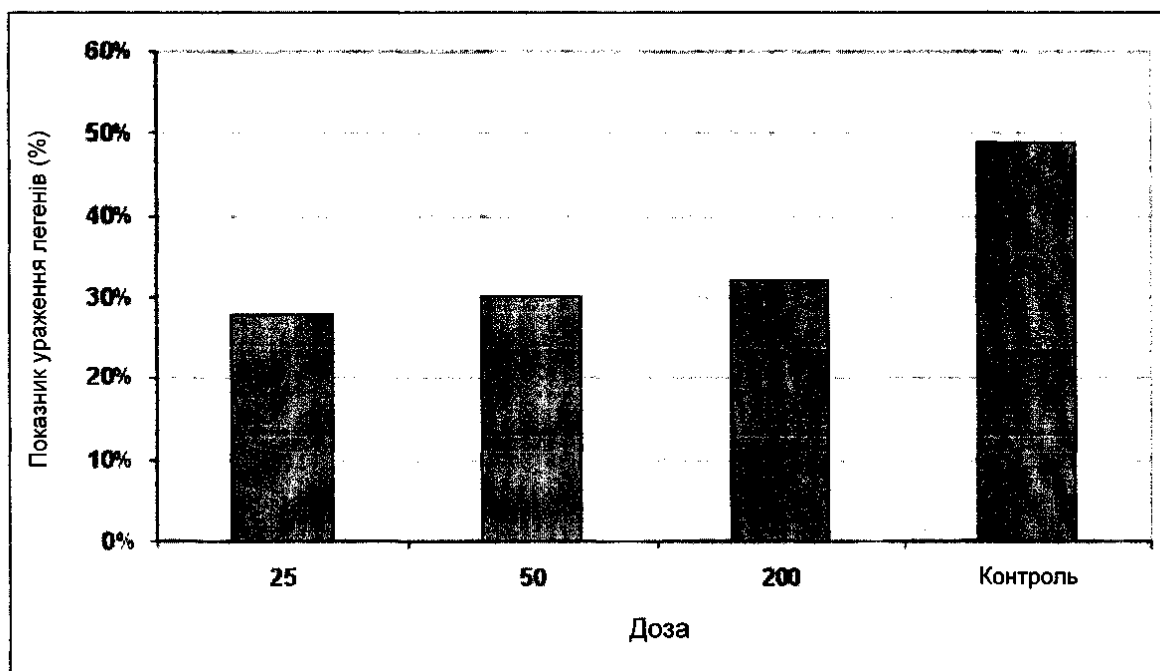
ФІГ. 2.2



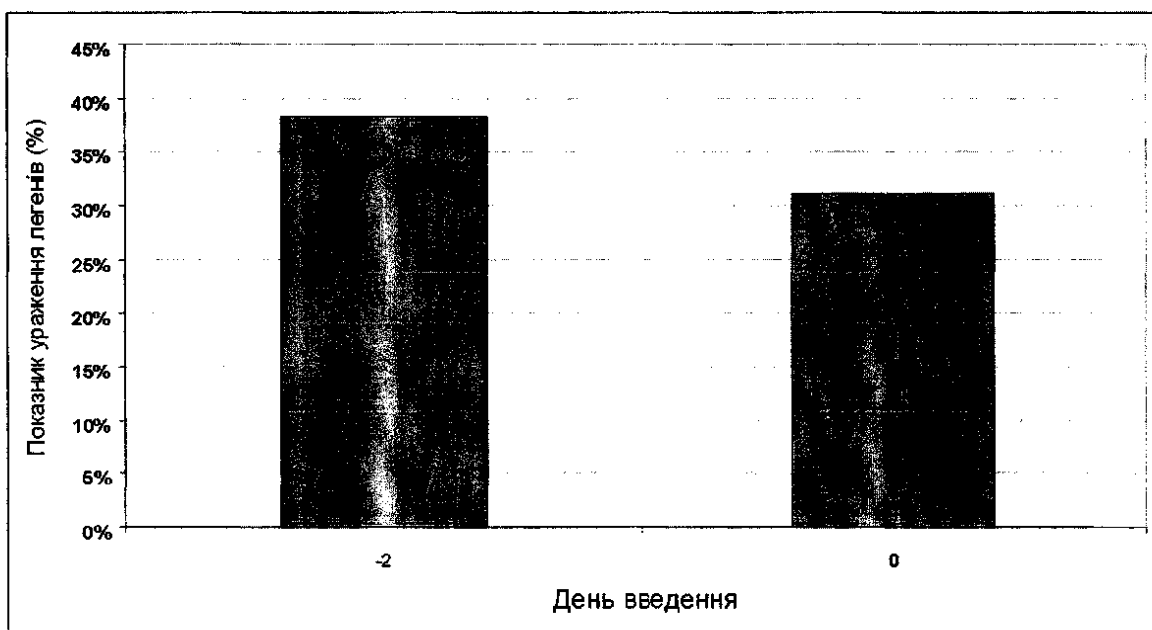
ФІГ. 2.3



ФІГ. 3.1



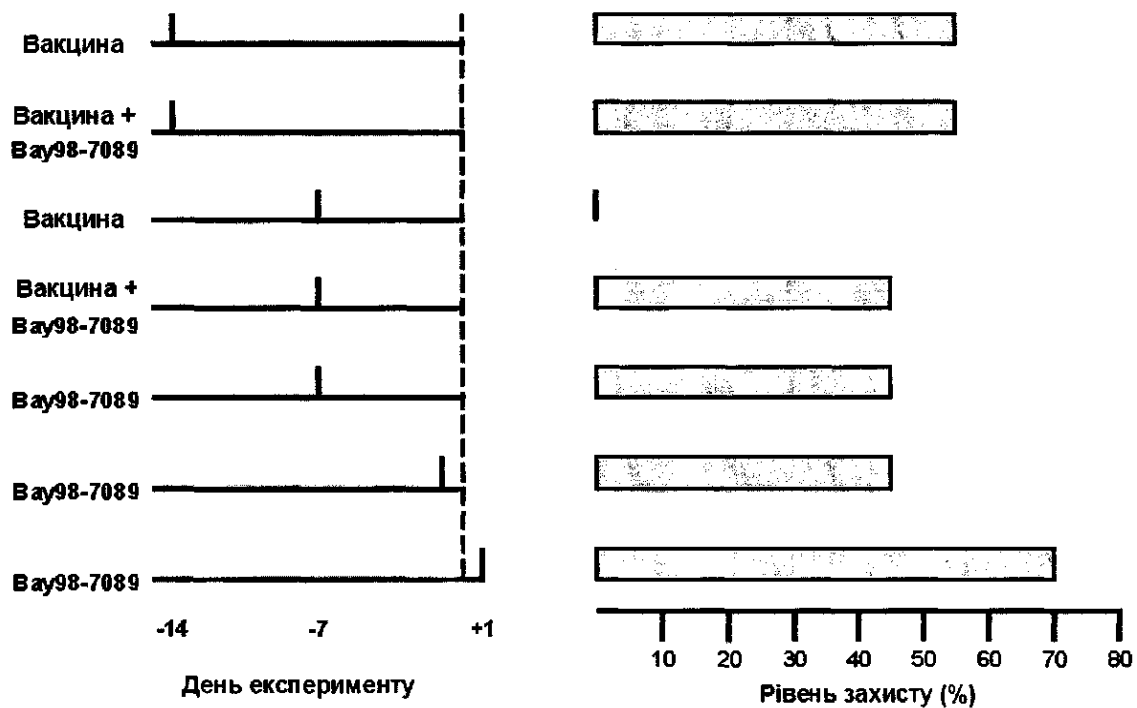
ФІГ. 3.2



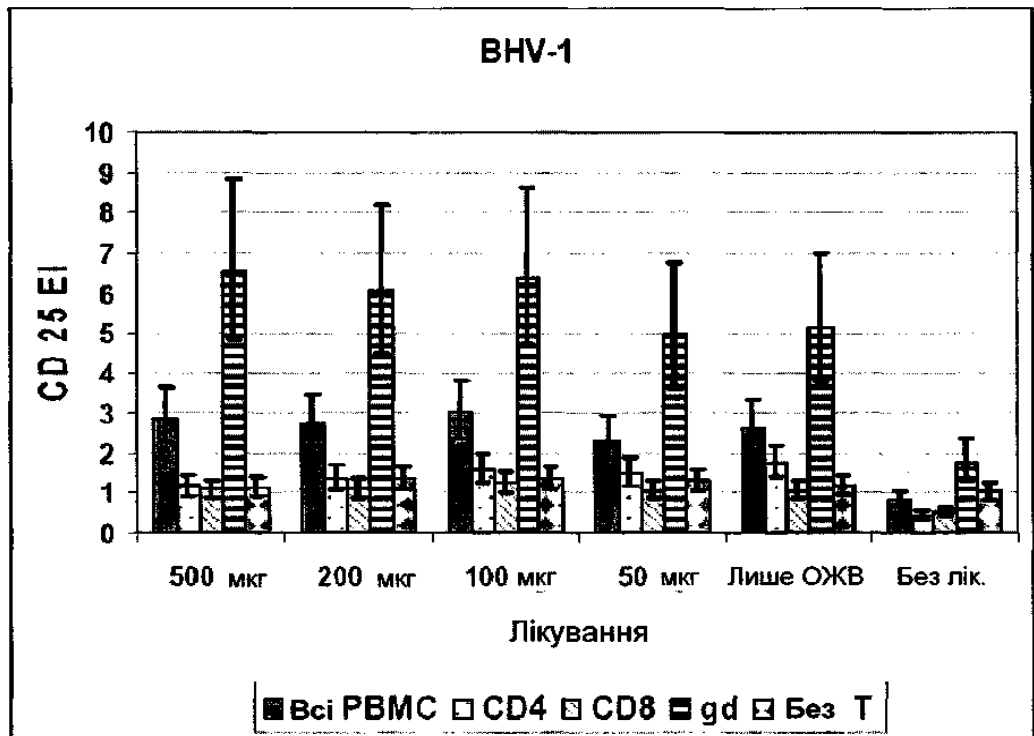
ФІГ. 4.1



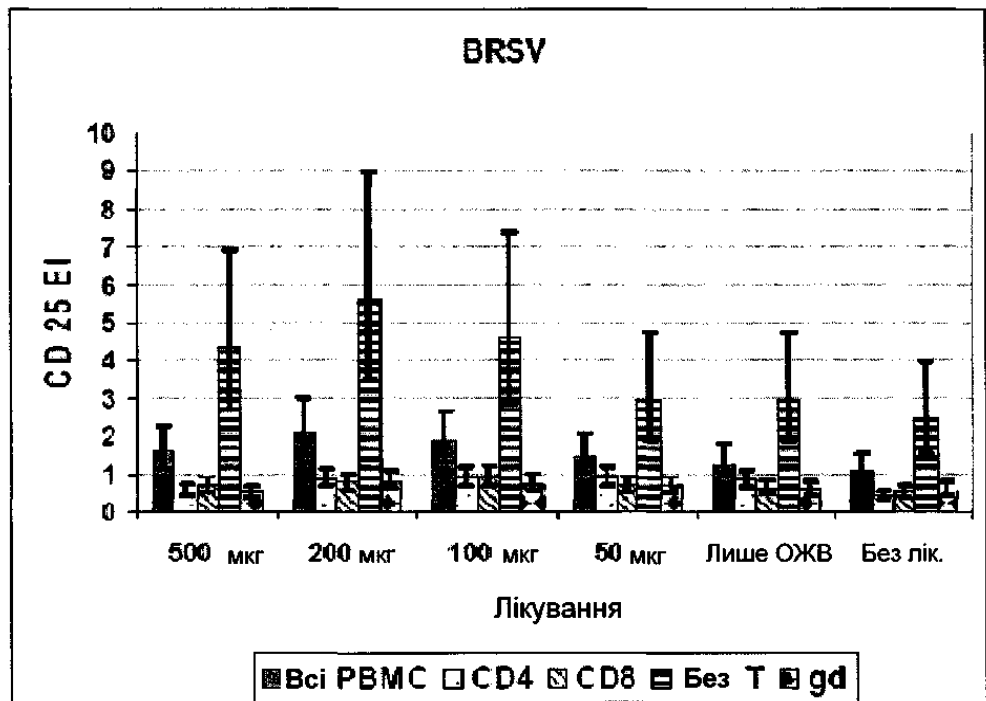
ФІГ. 4.2



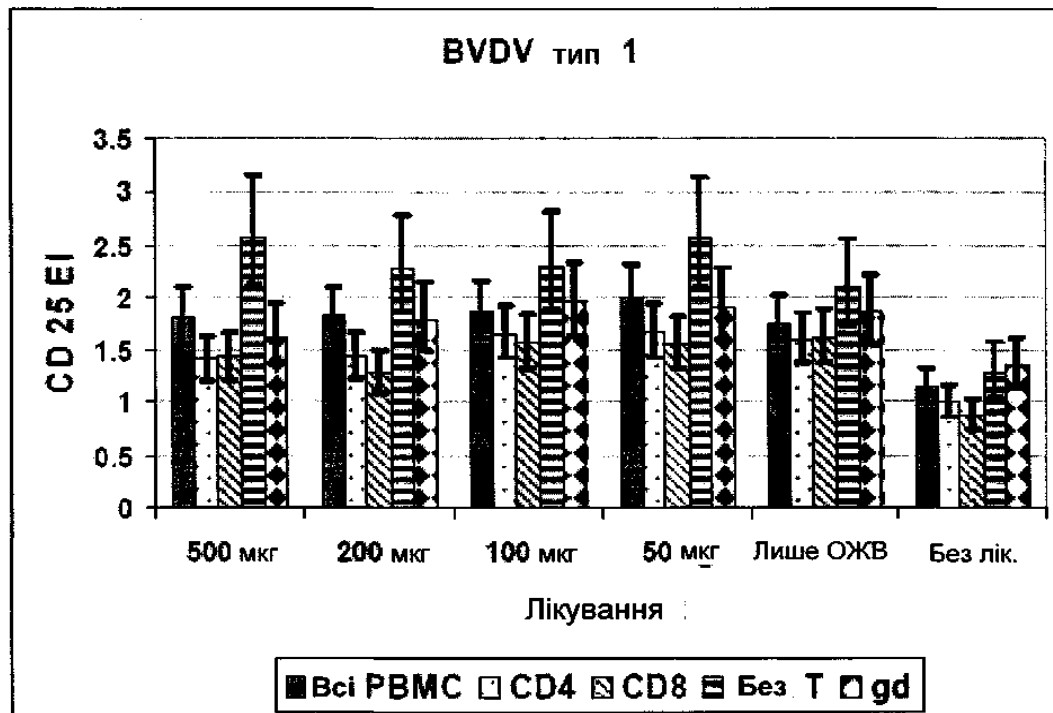
ФІГ. 5.1



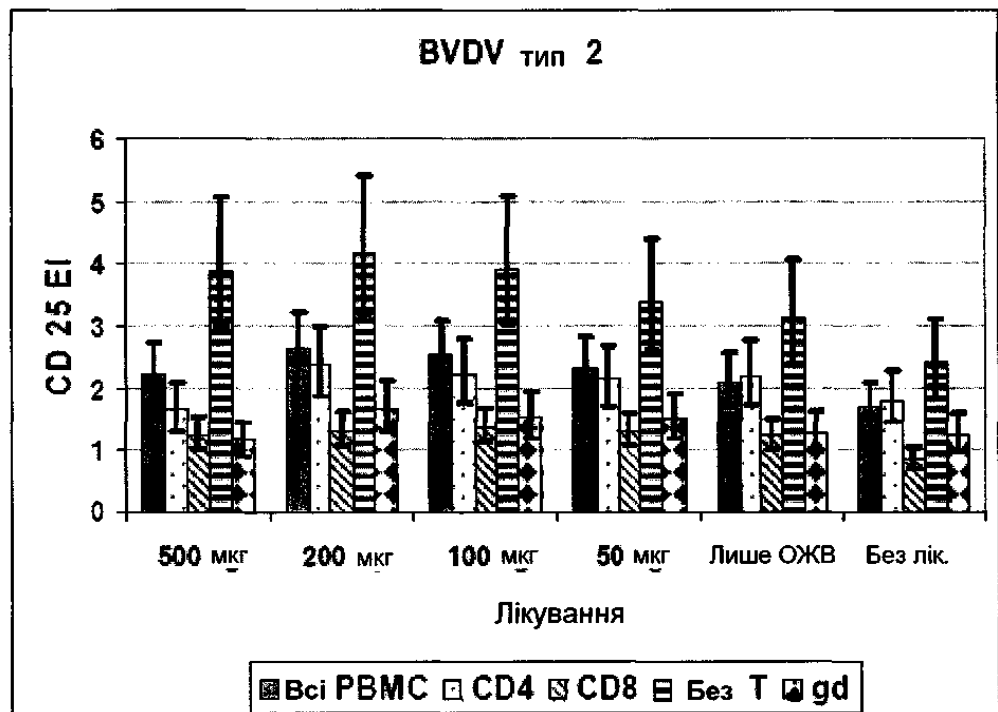
ФІГ. 5.2



ФІГ. 5.3

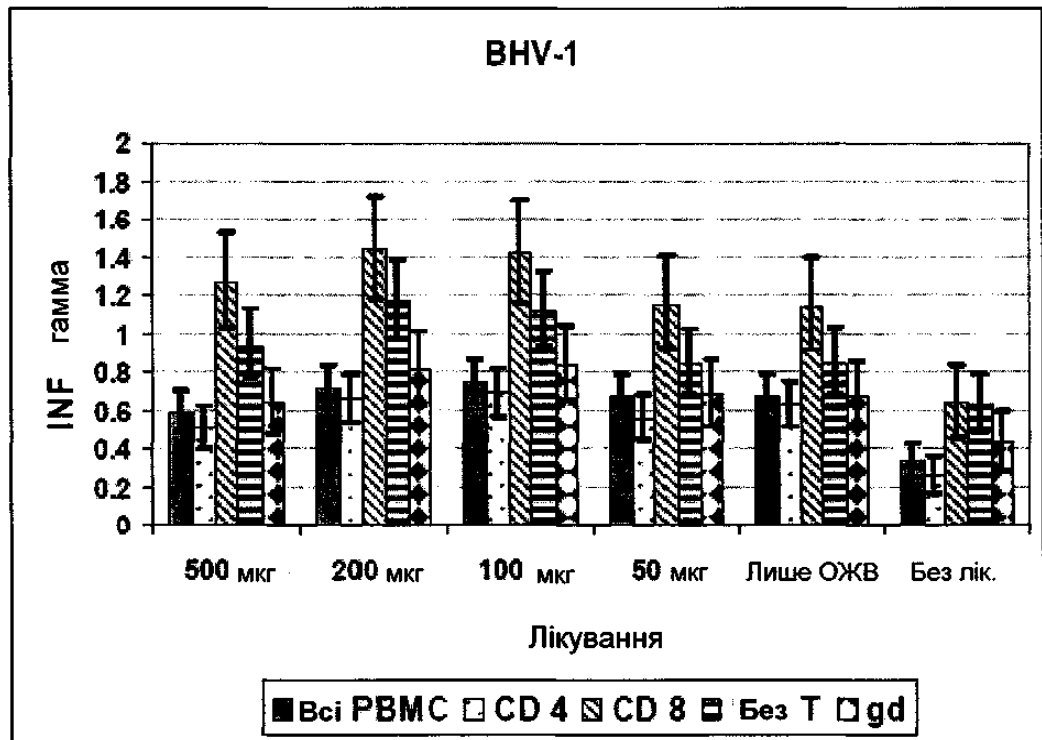


ФІГ. 5.4

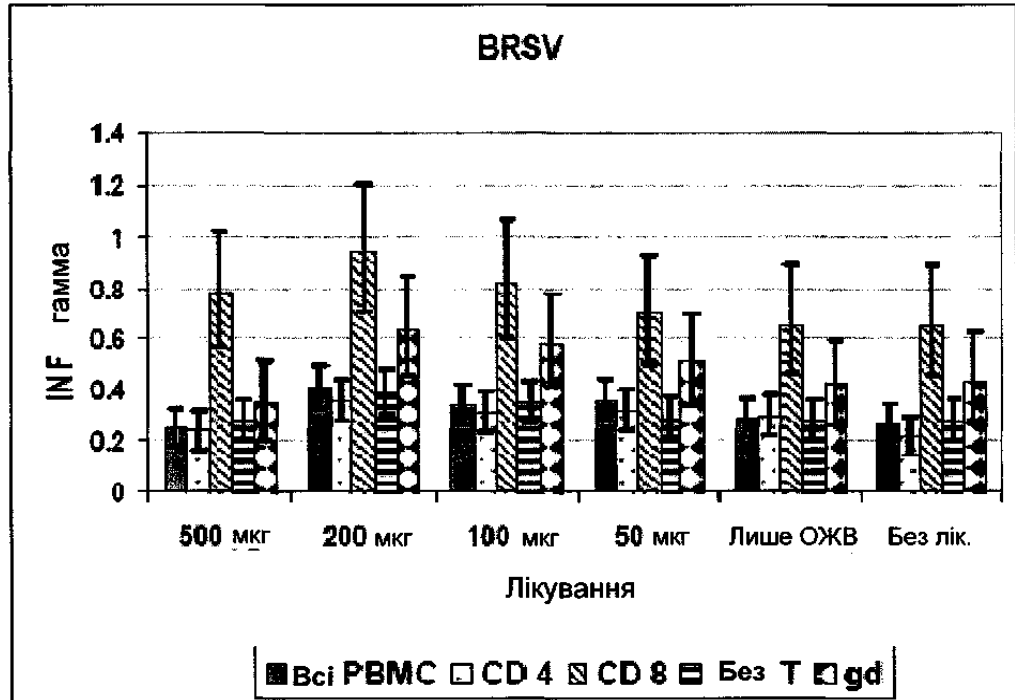




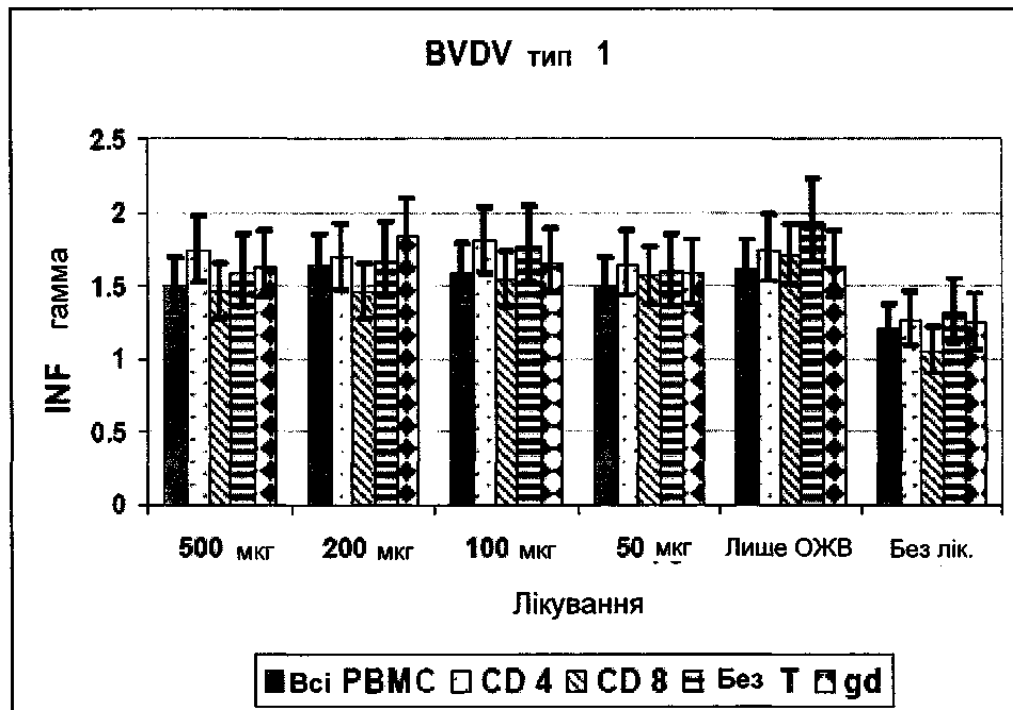
ФІГ. 5.5



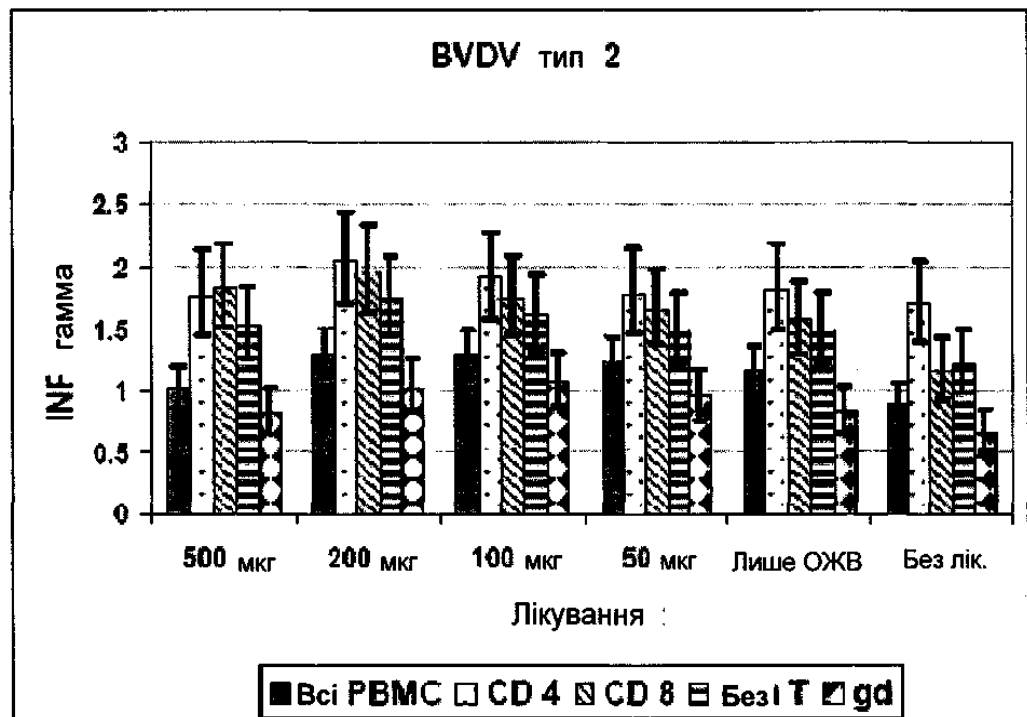
ФІГ. 5.6



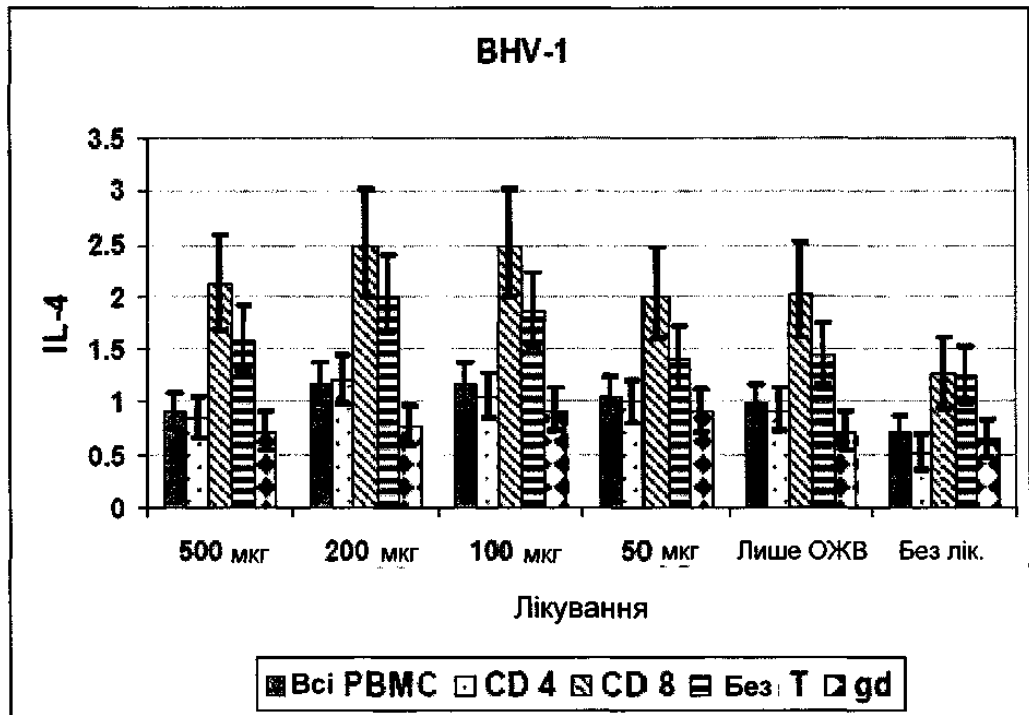
ФІГ. 5.7



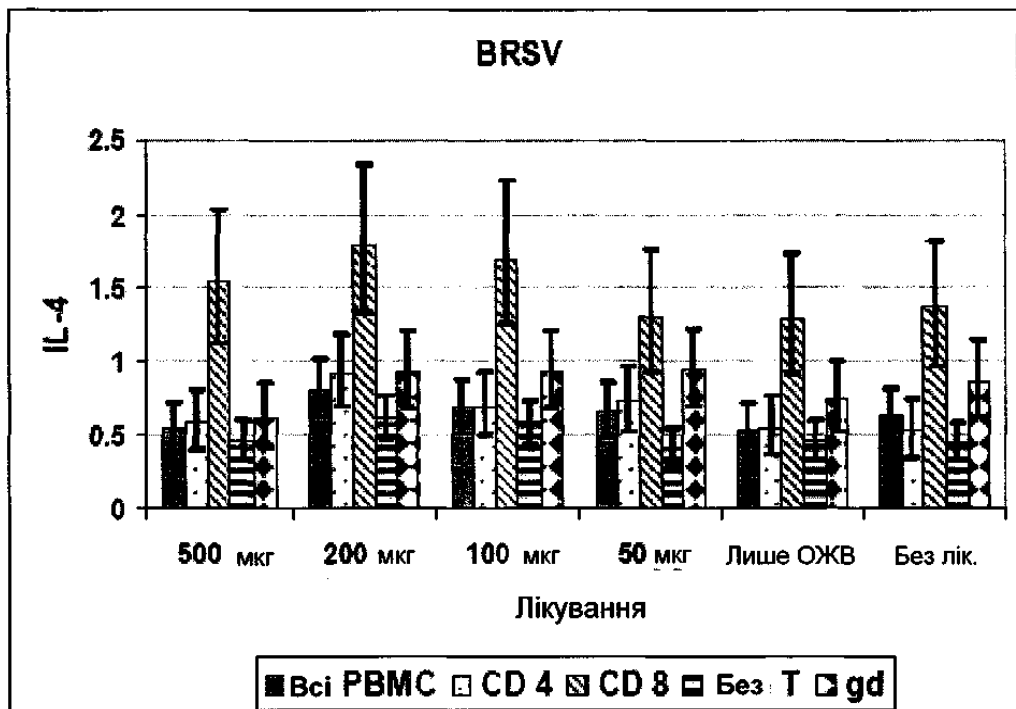
ФІГ. 5.8



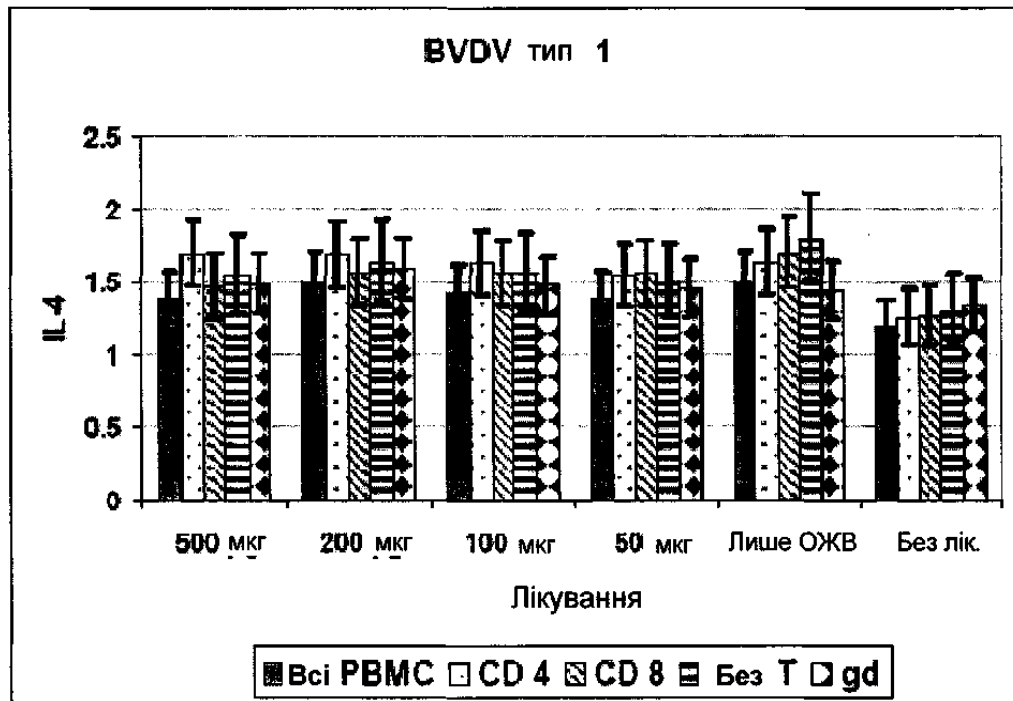
ФІГ. 5.9



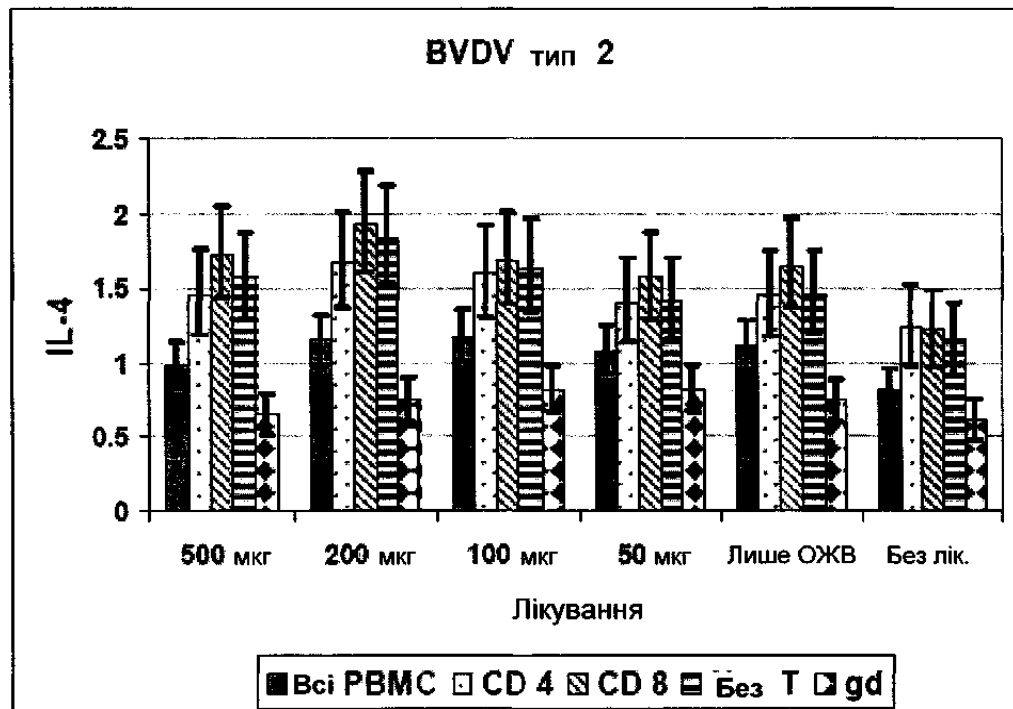
ФІГ. 5.10



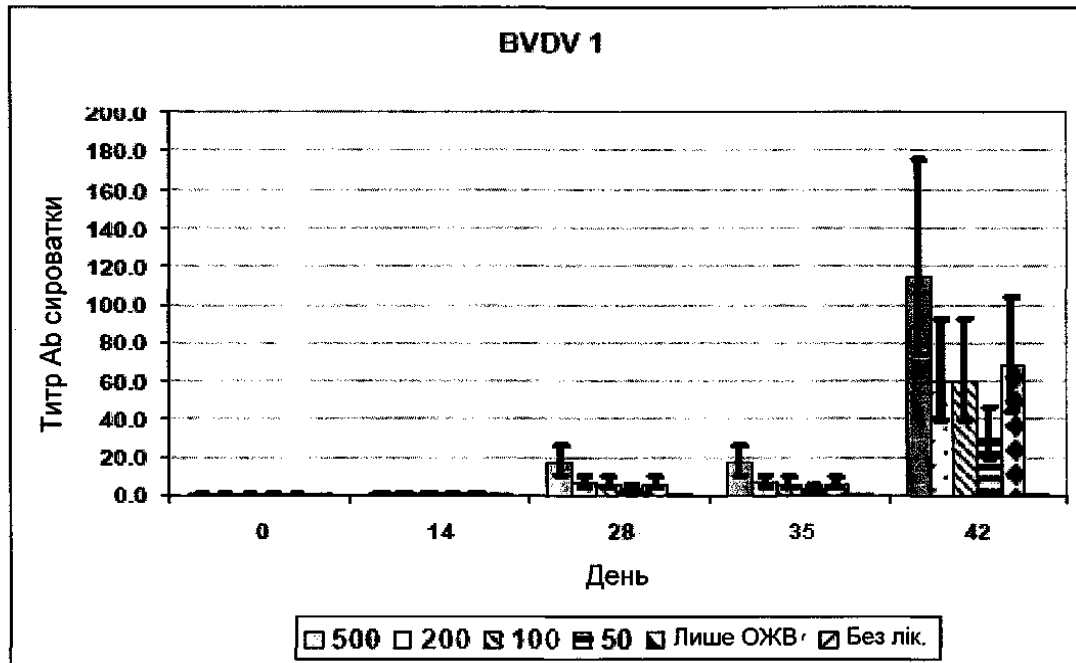
ФІГ. 5.11



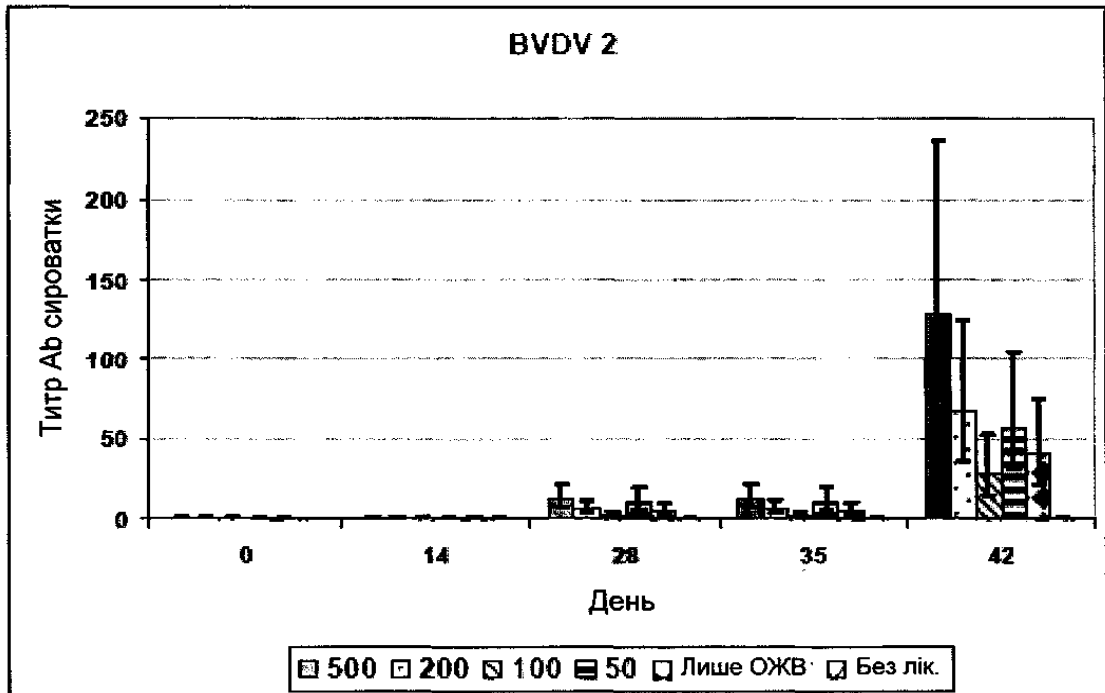
ФІГ. 5.12



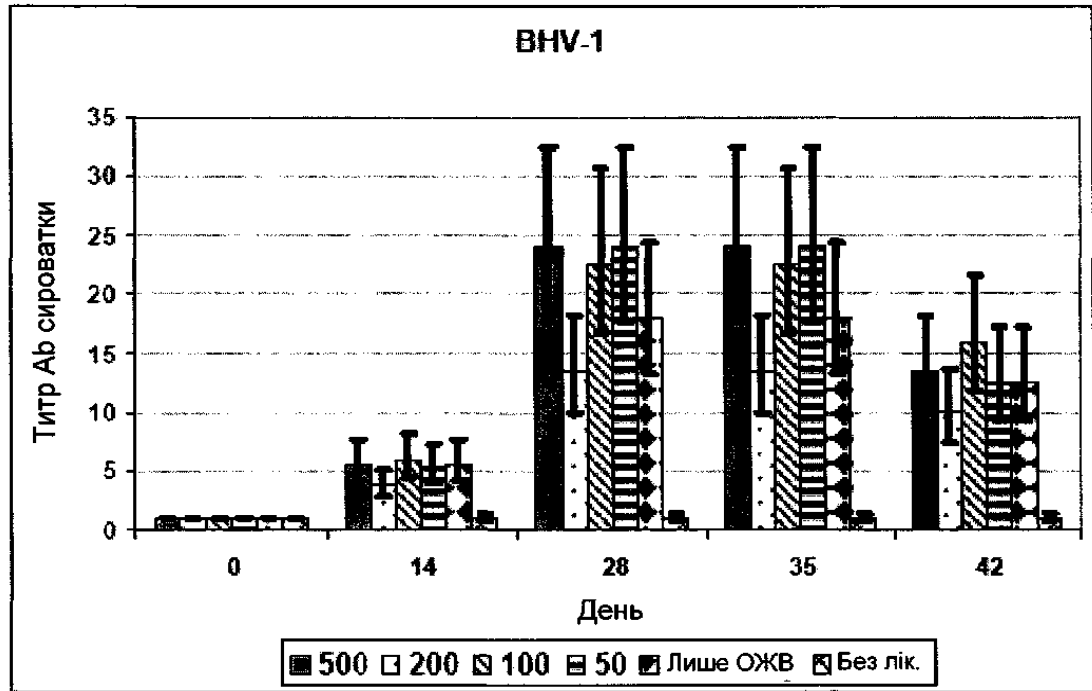
ФІГ. 5.13



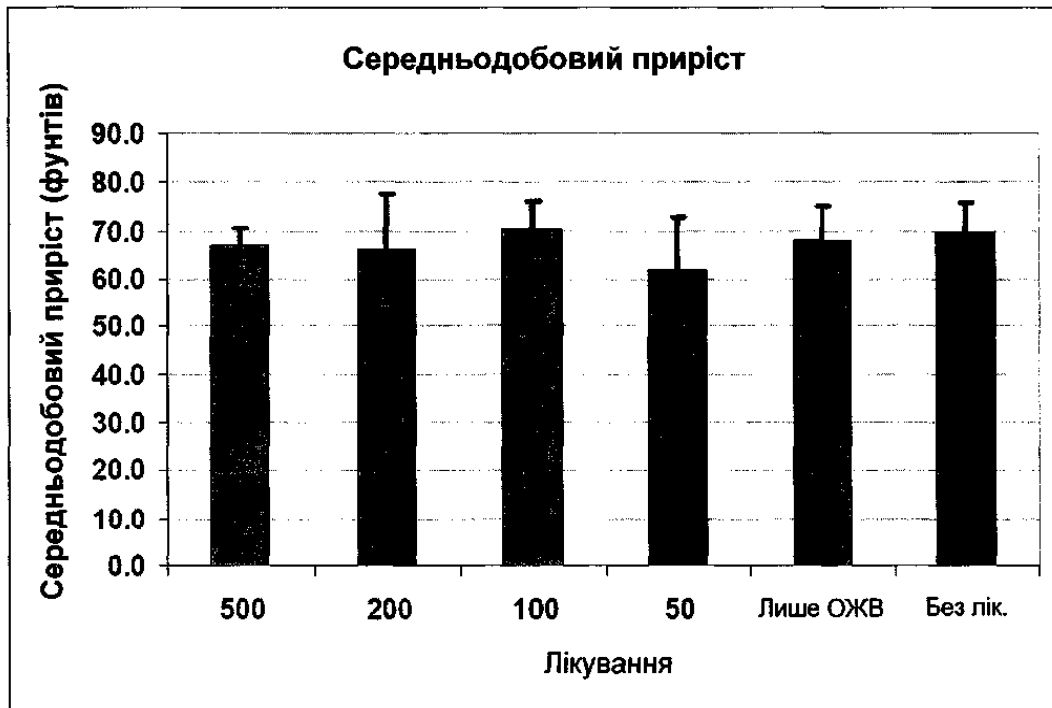
ФІГ. 5.14



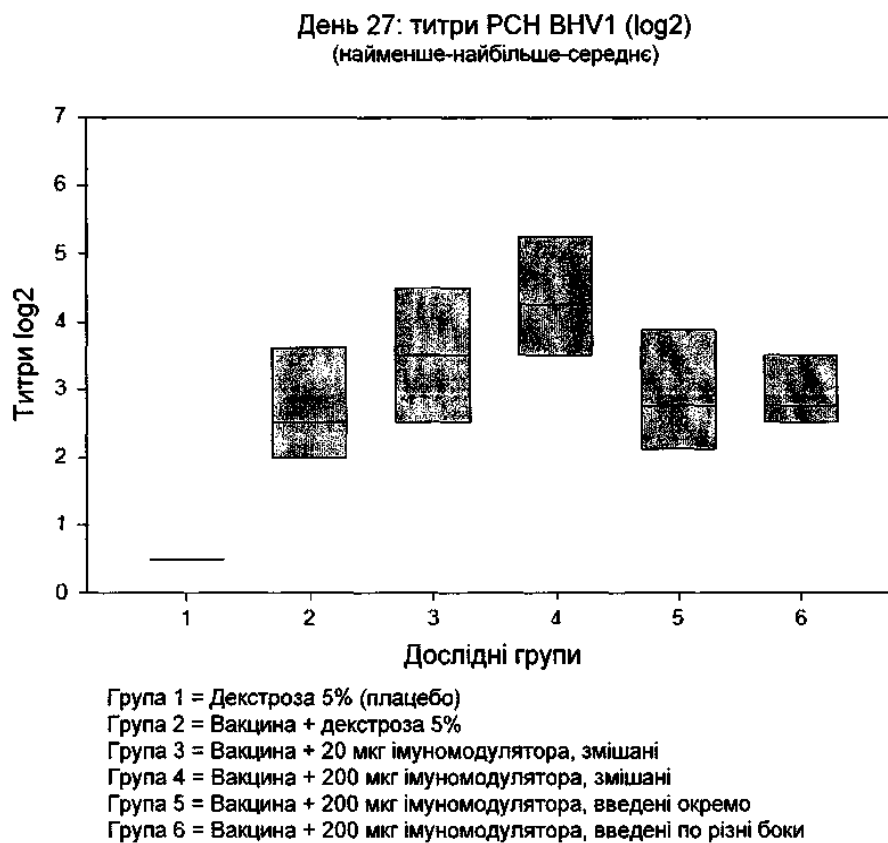
ФІГ. 5.15



ФІГ. 5.16



ФІГ. 6.1



Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601