

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034654**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.03.03**

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

**(21)** Номер заявки  
**201690057**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.07.04**

---

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ ОСТЕОПОНТИНА КОРОВЬЕГО МОЛОКА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ИММУНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ**

---

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

**(32)** 2013.07.05

**(33)** EP; US

**(43)** 2016.07.29

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

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

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
АРЛА ФУДС АМБА (DK)

**(56)** WO-A1-9856405

WO-A2-0063241

КНАЖОЕЕ V. ET AL.: "Novel roles of osteopontin and CXC chemokine ligand 7 in the defence against mycobacterial infection", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 143, no. 2, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 260-268, XP009174921, ISSN: 0009-9104, \*cf. summary at page 260\*

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

**(74)** Представитель:  
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнагьев  
А.В. (RU)

---

**(57)** Изобретение касается применения остеопонтина коровьего молока, и/или его активного укороченного варианта, или его активного пептида для повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего, принадлежащего к возрастной группе 0-6 месяцев. Изобретение также касается применения набора, содержащего вакцину и остеопонтин коровьего молока, для повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию, индуцированному вакциной, у млекопитающего, принадлежащего к возрастной группе 0-6 месяцев, где остеопонтин коровьего молока и/или один или более его активных укороченных вариантов предназначен для перорального введения.

---

**B1**

**034654**

**034654**

**B1**

### Область изобретения

Изобретение касается улучшения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего, например субъекта-человека, а также повышения эффективности вакцинации для профилактического или терапевтического лечения инфекционного заболевания у млекопитающих, принадлежащих к возрастной группе 0-6 месяцев, таких как люди. Было обнаружено, что пероральное введение остеопонтинина (OPN) коровьего молока или его активной укороченной части повышает иммунорезистентность млекопитающего и повышает иммунный ответ, индуцированный вакцинацией у млекопитающего, тем самым повышая профилактическую или терапевтическую эффективность вакцинации.

### Уровень техники изобретения

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, 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, 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 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 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, плаценту, 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 повреждение 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.

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.

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

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.

#### Краткое описание чертежей

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

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

фиг. 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-й день между группами с обработкой различными рационами;

фиг. 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;

фиг. 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;

фиг. 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<sup>+</sup> лимфоциты (цитотоксические Т-клетки, имеющие CD3+CD4-CD8<sup>+</sup> профиль), CD4<sup>+</sup> лимфоциты (Т-хелперные клетки, имеющие CD3+CD4+CD8<sup>-</sup> профиль), CD4+CD8<sup>+</sup> лимфоциты (Т-клетки памяти, имеющие CD3+CD4+CD8<sup>+</sup> профиль);

фиг. 7 - влияние рациона на численность Т-хелперных CD4<sup>+</sup> клеток как (секция А), цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток (секция В) и на соотношение CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (секция С) у PBMC на 21-й день. Клеточные популяции выражены как % от общих CD3<sup>+</sup> 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  $p < 0,1$ ;

фиг. 8 - влияние рациона на численность цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток (секция А) и на соотношение CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т-клеток (секция В) в MLN на 21-й день. Клеточные популяции выражены как % от общих CD3<sup>+</sup> 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  $p < 0,1$ ;

фиг. 9 - влияние рациона на численность (CD4+CD8<sup>+</sup>) Т-клеток памяти в селезенке на 21-й день. Клеточные популяции выражены как % от общих CD3<sup>+</sup> 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;

фиг. 10 - секреция IL-12 клетками PBMC. Клетки PBMC культивировали *ex vivo* в течение 72 ч, 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;

фиг. 11 - влияния стимуляции фитогемагглютинином (PHA) на секрецию IL-12 (A) и IL-10 (B) у PBMC. Клетки PBMC культивировали *ex vivo* в течение 72 ч 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;

фиг. 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 ч 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;

фиг. 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 ч 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;

фиг. 14 - секреция IL-12 (A) и IL-10 (B) клетками селезенки. Клетки селезенки культивировали *ex vivo* в течение 72 ч, 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;

фиг. 15 - влияния стимуляции фитогемагглютинином (PHA) на секрецию в селезенке IL-12 (A) и IL-10 (B). Клетки селезенки культивировали *ex vivo* в течение 72 ч 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;

фиг. 16 - влияния стимуляции липополисахаридом (LPS) на секрецию селезенки IL-12 (A) и IL-10 (B). Клетки селезенки культивировали *ex vivo* в течение 72 ч 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;

фиг. 17 - действие стимуляции при помощи Fluzone на секрецию селезенки IL-12 (A) и IL-10 (B). Клетки селезенки культивировали *ex vivo* в течение 72 ч 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;

фиг. 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  $\sim 65$  мг OPN/л (F65) и 4) вскармливания RF с добавлением бычьего OPN в количестве  $\sim 130$  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) коровьего молока и/или его активный укороченный вариант при пероральном введении повышает иммунорезистентность млекопитающего, принадлежащего к возрастной группе 0-6 месяцев.

В соответствии с первым аспектом изобретения предложено применение остеопонтин коровьего молока, имеющего аминокислотную последовательность с остатками 17-278 из SEQ ID NO: 1, и/или одного или более его активных укороченных вариантов в качестве перорального лекарственного препарата для повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего, принадлежащего к возрастной группе 0-6 месяцев.

В соответствии со вторым аспектом изобретения предложено применение набора, содержащего вакцину и остеопонтин коровьего молока, имеющий аминокислотную последовательность с остатками 17-278 из SEQ ID NO: 1, и/или один или более его активных укороченных вариантов, для повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию, индуцированному вакциной, у млекопитающего, принадлежащего к возрастной группе 0-6 месяцев, где остеопонтин коровьего молока и/или один или более его активных укороченных вариантов предназначен для перорального введения.

В одном воплощении изобретения активный укороченный полипептид остеопонтин представляет собой полипептид массой 40 кДа, полученный из полипептида OPN в результате расщепления пептидной связи *in vivo* в положении, которое является С-концевым относительно мотива RGD.

В еще одном воплощении изобретения активный укороченный полипептид остеопонтин представляет собой полипептид, где аминокислотная последовательность представляет собой остатки 17-163 из SEQ ID NO: 1.

В еще одном воплощении изобретения остеопонтин коровьего молока усиливает гуморальный иммунитет у млекопитающего.

В предпочтительном воплощении изобретения млекопитающим является человек.

В еще одном воплощении изобретения иммунорезистентность к инфекционному заболеванию у млекопитающего является индуцированной вакцинацией.

В еще одном воплощении изобретения инфекционное заболевание представляет собой грипп, включая грипп типа а и грипп типа b.

### Подробное описание изобретения

Изобретение решает вопрос необходимости усиления иммунного ответа у субъектов-млекопитающих, в частности у вскармливаемых смесью младенцев и грудных детей, принадлежащих к возрастной группе 0-6 месяцев. Авторами изобретения было обнаружено, что OPN коровьего молока и/или его активный укороченный вариант при пероральном введении субъекту повышает иммунологическую реактивность у млекопитающего, тем самым, улучшая эффективность вакцинации млекопитающего.

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

I. i) Структура OPN коровьего молока.

В соответствии с первым вариантом осуществления настоящее изобретение предусматривает OPN коровьего молока 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 табл. 1

Таблица 1: Аминокислотная последовательность OPN коровы [SEQ ID NO 1]					
10	20	30	40	50	60
MRIAVICFCL	LGIASALPVK	PTSSGSSEEK	QLNKNYPDAV	ATWLKPDPSQ	KQTFLAPQNS
70	80	90	100	110	120



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.

I. ii) OPN коровьего молока повышает специфические иммунные ответы, индуцированные у млекопитающего в результате вакцинации.

OPN коровьего молока в соответствии с 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 изобретению определяют как способность повышения специфического иммунного ответа млекопитающего на инфекционное заболевание или вакцинацию.

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).

Влияние введения OPN молока коровы на специфический иммунный ответ, индуцированный у млекопитающего вакцинацией, проиллюстрировано в примере 1. В данном примере поросят, 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 то же время соответствия уровням IgG, наблюдаемым у поросят, получавших молоко свиной, 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 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 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 вакцине Fluzone антитела IgG детектируют с применением анализа ELISA, специфичного для свиной.

I. iii) OPN коровьего молока повышает гуморальную иммунологическую реактивность млекопитающего.

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 рационе 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 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 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 коровьего молока повышает иммунорезистентность к инфекционному заболеванию у млекопитающего.

Пероральное введение OPN коровьего молока в соответствии с настоящим изобретением млекопитающим, в частности младенцам человека, повышает их 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 коровьего молока, приемлемого для введения.

OPN коровьего молока, 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 источника OPN является очищенным препаратом OPN молока коровы, таким как, например, Lactrodan OPN-10® (Arla Foods Ingredients, Виби, Дания) (см. также патент США № 7259243). Lactrodan 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 коровьего молока.

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

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.).

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.).

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 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 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, 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®, PEDI-ASMART® и RESOURCE® Just For Kids. Примеры питательных 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®).

#### I. vii) Введение OPN коровьего молока.

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

#### 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, активирует 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.

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/ІРV вакциной); ММR: корь, эпидемический паротит и краснуху (например, ММR вакциной); туберкулез (например, ВСG 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 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.

##### 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 антиген. Адъювант может служить, например, как тканевое депо, которое медленно высвобождает антиген, а также как активатор лимфоидной системы, который повышает иммунный ответ (см. 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 гели, такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, поверхностно-активные вещества (например, лизолецитин), плуроновые полиолы (например, карбопол), полианионы, полипептиды (например, бычий сывороточный альбумин, яичный альбумин), масляные или углеводородные эмульсии (например, маннида моноолеат (Agacel A)), гемоцианины лимфы улитки, динитрофенол и потенциально полезные 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 прединфекционную 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 до 1000 мкг, например в диапазоне от приблизительно 1 до 300 мкг и особенно в диапазоне от приблизительно 4 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, пиллель, капсул, составов или порошков пролонгированного высвобождения и преимущественно содержат 10-95% активного ингредиента, предпочтительно 25-70%.

III. Группы населения, отвечающие на пероральное введение OPN коровьего молока Настоящее изобретение направлено на пероральное введение OPN коровьего молока 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 коровьего молока является особенно эффективным, являются новорожденные или маленькие младенцы, особенно во время периода вакцинации от детских болезней (см. I ii)); 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-специфического IgG. После получения отобранных свиноматок вакцинировали LitterGuard LT-C (бактерин-анатоксин *Clostridium perfringens* тип C и *Escherichia coli*; Pfizer Animal Health, Экстон, Пенсильва-

ния), RespiSure1 One (бактерии *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 ч 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 (фиг. 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 [0,5М 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 ч 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 ч 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 ч при 37°C. TMB (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) и инкубировали в течение 20 мин при RT с последующим добавлением 50 мкл 2н. 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.

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.

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-й 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.

Перед эвтаназией на 21-й 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). 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 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, Пискаутауэй, Нью-Джерси), и центрифугировали при  $400 \times g$  в течение 40 мин при  $20^\circ\text{C}$ . PBMC собирали из границы раздела градиента и промывали три раза в буфере для промывки (сбалансированный солевой раствор Хэнка, без  $\text{Ca}^{++}$ , без  $\text{Mg}^{++}$ , Life Technologies) с добавлением 2% бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma-Aldrich, Сант-Луис, Миссури), 0,01M 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 (0,15M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$  и 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ). PBMC суспендировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS, 2 mM глутамин, 50 мкг/мл гентамицина, 1 mM пирувата натрия (Life Technologies), 20 mM HEPES (Life Technologies) и 20 mM 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, 0,01M 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 Biotec, 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 mM глутамин, 50 мкг/мл гентамицина, 1 mM пирувата натрия, 20 mM HEPES и 20 mM 1000 ед./мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина). Количество жизнеспособных клеток оценивали, как описано выше.

#### 1.7) Фенотипическая идентификация PBMC и общие иммуноциты, 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 мышиных антител к CD4 свиньи (FITC, клон 74-12-4) и мышиных антител к CD8 свиньи (PE, клон 76-2-11) (BD Biosciences). Десять мкл каждого из антител добавляли к  $1 \times 10^6$  клеток из каждого образца. Процедуры окрашивания проводили на льду и, по возможности, образцы удаляли со света. Вкратце, каждую лунку блокировали 5% мышиной сывороткой (Southern Biotec) и 200 мкг/мл очищенного мышиного IgG (Invitrogen) в течение 5 мин каждый раз. После центрифугирования в лунки добавляли CD3 и инкубировали в течение 20 мин (50 мкл: CD3:PE-Cy5) и снова центрифугировали. Добавляли CD4:FITC и CD8:PE (10 мкл каждого) и инкубировали в течение дополнительных 15 мин 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  $2 \times 10^6$ /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 ч при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . В лунки добавляли либо 50 мкл раствора 10 мкг/мл фитогемагглютинина (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  $4^\circ\text{C}$  иммобилизуемыми антителами с использованием концентраций, рекомендованных производителем. Планшеты промывали 0,05% Твин в PBS и затем блокировали с ис-

пользованием 1% BSA в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. После 3 промывок 0,05% Твин в PBS в лунки добавляли 100 мкл неразбавленной надосадочной жидкости и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Лунки промывали снова перед добавлением детектируемого антитела, разбавленного 1:180 в 1% BSA в PBS, и планшет инкубировали в течение 2 ч. Раствор конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена добавляли в лунки и инкубировали в течение 20 мин с последующим добавлением субстрата реакции ТМВ (OptEIA, BD Biosciences). После 20 мин инкубирования реакцию останавливали при помощи 50 мкл 2н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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.

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

2.2) Fluzone™-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-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 (фиг. 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 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- и 21-й день. Вакцинация не оказывала никакого влияния на сывороточные уровни FZ-специфического IgG после первой дозы FZ. К 21-му дню, 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  $371\pm 329$ ,  $400\pm 171$  и  $137\pm 157$  соответственно).

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 (фиг. 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-й 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 фиг. 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) (фиг. 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 табл. 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, фиг. 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 ( $p=0,06$ ) (фиг. 7B). Для лучшего понимания влияния рациона на популяцию мононуклеарных клеток рассчитывали соотношение Т-хелперных к Т-цитотоксическим клеткам (фиг. 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 вакцинос-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 ± 1,17	21,3 ± 2,58	41,0 ± 7,62	20,0 ± 19,4
FF	19,8 ± 5,77	15,1 ± 4,67	39,0 ± 4,77	10,3 ± 4,04
OPN	16,9 ± 3,59	14,5 ± 4,10	49,5 ± 8,47	15,2 ± 6,31
SRV	26,0 ± 8,89	12,6 ± 3,34	38,9 ± 3,29	32,4 ± 14,6
FFV	20,7 ± 6,46	12,2 ± 4,47	43,0 ± 7,14	24,2 ± 15,1
OPNV	21,1 ± 4,56	13,2 ± 3,92	48,0 ± 5,0	19,0 ± 7,66
<b>Статистика</b>	Рацион: $p=0,054$ Вакцинация: Н.З.	Рацион: $p=0,052$ . Вакцинация: $p<0,01$	Рацион: $p<0,01$ Вакцинация: Н.З.	Рацион: Н.З. Вакцинация: $p<0,03$
		Рацион*вак.: $p<0,04$		

Данные выражены как среднее значение ±SD.

Иммуноциты выделяли из MLN, как описано в примере 1.7, и клеточные популяции выявляли как % CD3+ и % CD3- (табл. 2). Вакцинация не оказывала значимого влияния на какие-либо из исследованных MLN иммуноцитов. Количество Т-цитотоксических клеток в OPN группе (13,7%) имело сильное сходство с количеством в SR группе (12,0%), и они обе значимо отличались от FF животных (16,6%, фиг. 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 сопоставимыми и значимо превышали FF (фиг. 8В). Повышенное соотношение CD4+/CD8+ клеток, наблюдаемое у PBMC, 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
<b>Статистика</b>	Рацион: $p<0,005$ Вакцинация: Н.З.	Рацион: Н.З. Вакцинация: Н.З.	Рацион: Н.З. Вакцинация: Н.З.	Рацион: $p=0,056$ Вакцинация: Н.З.

Данные выражены как среднее значение ±SD.

Распределение мононуклеарных клеток, выделенных из селезенки, показано в табл. 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, что обе вскармливаемые смесью группы (OPN и FF группы) имели значимо более высо-

кие уровни клеток памяти, чем SR (фиг. 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.

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-)	NK клетки (CD3-CD4-CD8+)
SR	13,6 ± 3,09	4,7 ± 0,99	55,3 ± 6,98	10,7 ± 4,16 <sup>a</sup>
FF	13,0 ± 5,79	8,6 ± 4,02	46,0 ± 15,7	4,4 ± 1,10 <sup>b</sup>
OPN	13,9 ± 3,61	8,6 ± 3,52	44,9 ± 6,91	4,1 ± 2,70 <sup>b</sup>
SRV	10,5 ± 3,89	5,94 ± 0,58	61,7 ± 13,9	5,9 ± 0,89 <sup>b</sup>
FFV	12,5 ± 4,52	13,0 ± 2,97	48,2 ± 7,30	4,7 ± 1,47 <sup>b</sup>
OPNV	10,8 ± 2,43	10,6 ± 2,19	49,1 ± 5,87	5,8 ± 2,80 <sup>b</sup>
				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

<sup>1</sup> Данные выражены как среднее значение ±SD.

## 2.5) Ex vivo стимулирование и секреция цитокинов выделенными иммуноцитами.

Для того чтобы оценить клеточные иммунные ответы РВМС и клеток селезенки, выделенные клетки инкубировали в течение 72 ч 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 плеiotропный 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 табл. 4 и 5 соответственно. Статистически значимые данные затем объединяли на основе статистических различий, и они представлены на фиг. 10-17.

Мононуклеоные клетки периферической крови: у нестимулированных РВМС концентрация IL-6 и IL-10 была ниже уровня детектирования (табл. 4). IL-12 детектировали в надосадочной жидкости нестимулированных клеток, и эффекты как рациона, так и вакцинации были статистически значимыми (p<0,05) (фиг. 10). IL-12 был наиболее высоким в РВМС у OPNV группы по отношению ко всем другим группам обработки. РНАФ стимулирование цитокинов у РВМС не подвергалось влиянию вакцинации. Тем не менее, влияние рациона на секрецию IL-12 было статистически значимым с наиболее высокой секрецией, наблюдаемой у OPNV (фиг. 11А). 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 (фиг. 11В).

Концентрации IL-6 и IL-12 были значимо выше (p<0,05) в LPS-стимулированных РВМС, полученных от поросят, вскармливаемых OPN, по отношению к SR и FF группам, независимо от вакцинации (фиг. 12А и В, 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 (фиг. 12С).

Эффект стимулирования Fluzone на IL-12 был зависимым от вакцинации со статистически значимым взаимодействием между рационом и вакцинацией (фиг. 13А). 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 (фиг. 13В).

Иммунные клетки селезенки: клетки, выделенные из селезенки, стимулировали PHA, LPS и Fluzone и измеряли продуцирование цитокинов в надосадочной жидкости, собранной после 72 ч инкубирования (табл. 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 (фиг. 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 (фиг. 14B). Секрция IL-12 и IL-10 клетками селезенки в ответ на PHA стимулирование была аналогичной. Вакцинация снижала концентрацию IL-12 (фиг. 15A) и IL-10 (фиг. 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, секрция IL-12 в ответ на LPS была значимо выше в надосадочной жидкости клеток, полученных от невакцинированных, нежели вакцинированных поросят ( $p<0,05$ ) (фиг. 16A). Клетки, полученные из группы OPN, секретировали наиболее низкое количество IL-12 по отношению к SR и FF группам. Секрция IL-10 в LPS-стимулированных клетках не подвергалась влиянию вакцинации, но была выше в SR группе, чем в FF и OPN группах (фиг. 16B). При Fluzone-стимулировании секрция 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 (фиг. 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 молока 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 иммуноцитами (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 секрцию IL-12 и IL-10. Способность PBMC от поросят, вскармливаемых смесью с OPN, секретировать IL-12 (провоспалительный) и IL-10 (противовоспалительный) при стимулировании PHA (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 Lacprodan®, 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.

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.

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 младенцами на грудном вскармливании (фиг. 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.

#### 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.

Plotkin S.A., 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

1. Применение остеопонтин коровьего молока, имеющего аминокислотную последовательность с остатками 17-278 из SEQ ID NO: 1, и/или одного или более его активных укороченных вариантов в качестве перорального лекарственного препарата для повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию у млекопитающего, принадлежащего к возрастной группе 0-6 месяцев.

2. Применение по п.1, где активный укороченный полипептид остеопонтин представляет собой полипептид массой 40 кДа, полученный из полипептида OPN в результате расщепления пептидной связи *in vivo* в положении, которое является С-концевым относительно мотива RGD.

3. Применение по п.1, где активный укороченный полипептид остеопонтин представляет собой полипептид, где аминокислотная последовательность представляет собой остатки 17-163 из SEQ ID NO: 1.

4. Применение по п.1 или 2, где остеопонтин коровьего молока усиливает гуморальный иммунитет у млекопитающего.

5. Применение по любому из пп.1-4, где млекопитающим является человек.

6. Применение по любому из пп.1-5, где иммунорезистентность к инфекционному заболеванию у млекопитающего является индуцированной вакцинацией.

7. Применение по любому из пп.1-6, где инфекционное заболевание представляет собой грипп, включая грипп типа а и грипп типа b.

8. Применение набора, содержащего вакцину и остеопонтин коровьего молока, имеющий аминокислотную последовательность с остатками 17-278 из SEQ ID NO: 1, и/или один или более его активных укороченных вариантов для повышения иммунорезистентности к инфекционному заболеванию, индуцированному вакциной, у млекопитающего, принадлежащего к возрастной группе 0-6 месяцев, где остеопонтин коровьего молока и/или один или более его активных укороченных вариантов предназначен для перорального введения.

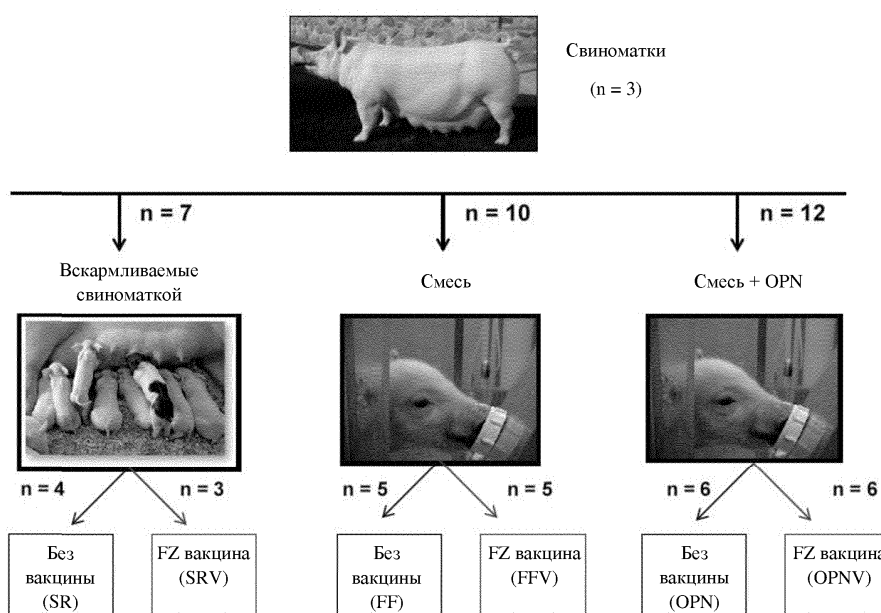
9. Применение набора по п.8, где остеопонтин коровьего молока усиливает гуморальный иммунитет у млекопитающего.

10. Применение набора по п.8, где активный укороченный полипептид остеопонтин представляет собой полипептид массой 40 кДа, полученный из полипептида OPN в результате расщепления пептидной связи *in vivo* в положении, которое является С-концевым относительно мотива RGD.

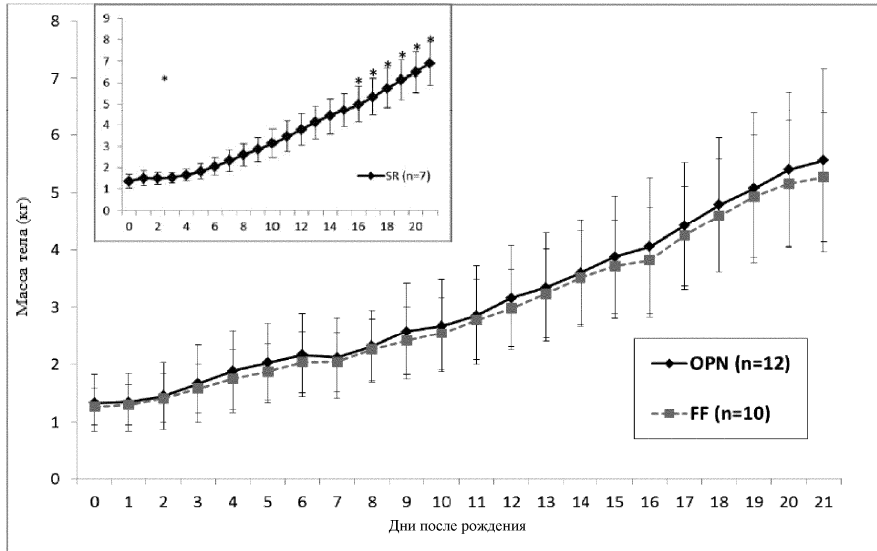
11. Применение набора по п.8, где активный укороченный полипептид остеопонтин представляет собой полипептид, где аминокислотная последовательность представляет собой остатки 17-163 из SEQ ID NO: 1.

12. Применение по любому из пп.8-11, где млекопитающим является человек.

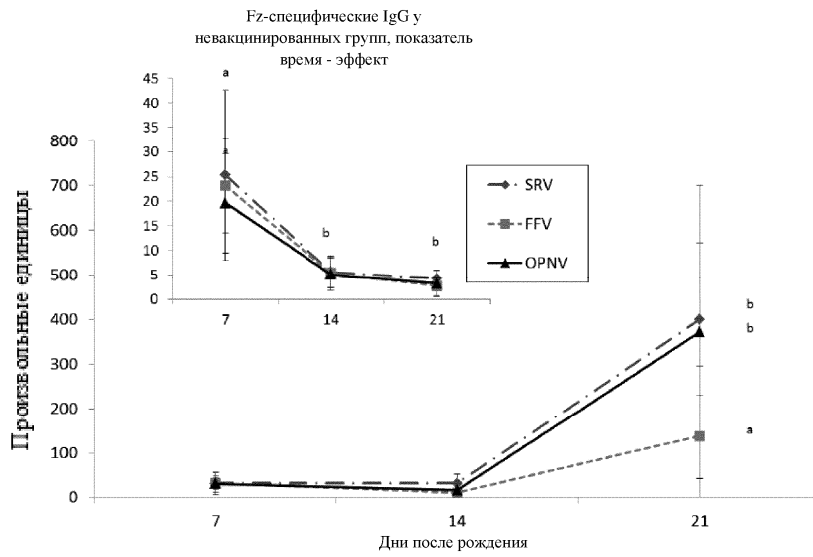
13. Применение набора по любому из пп.8-12, где инфекционное заболевание представляет собой грипп, включая грипп типа а и грипп типа b.



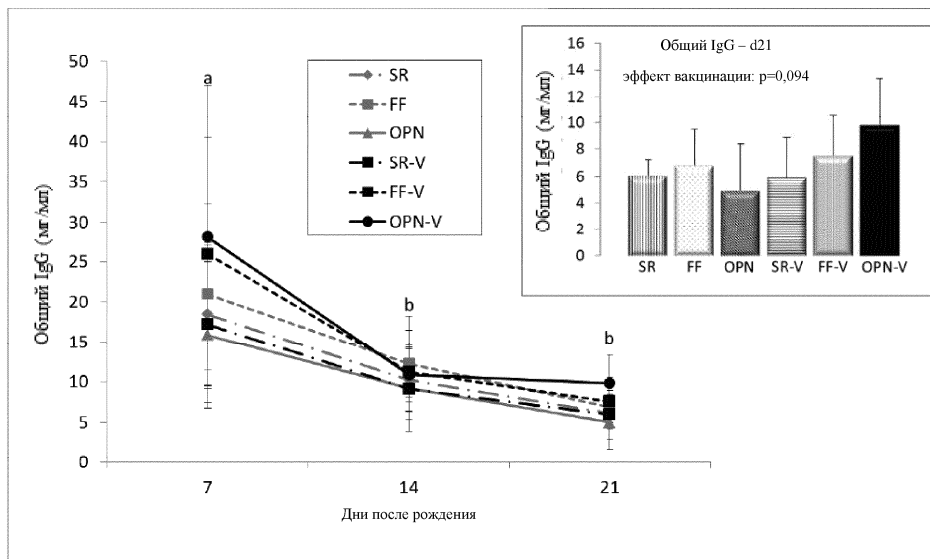
Фиг. 1



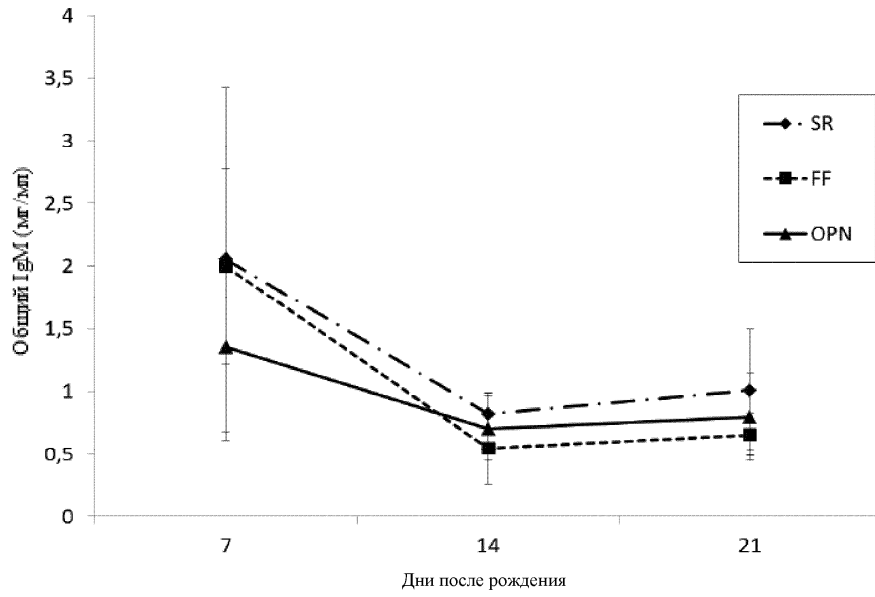
Фиг. 2



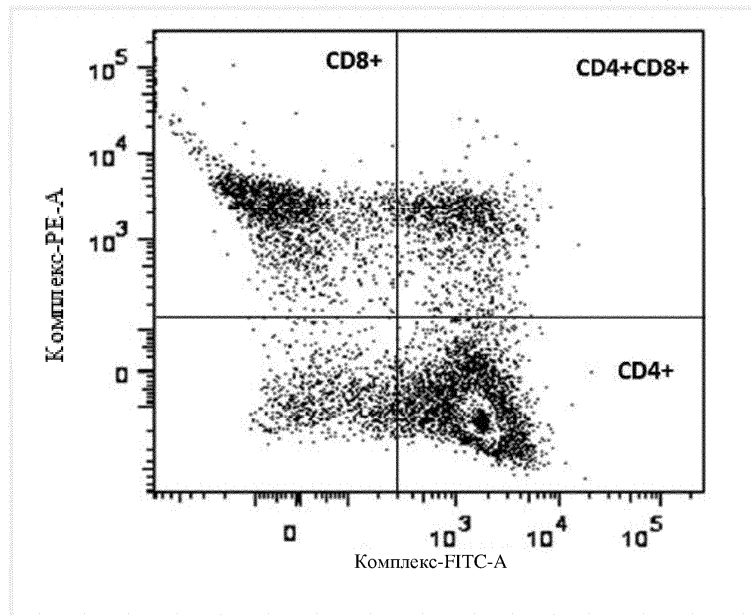
Фиг. 3



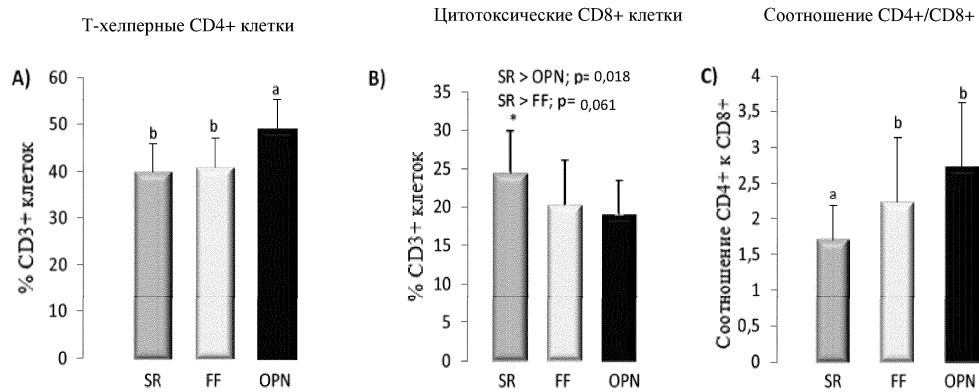
Фиг. 4



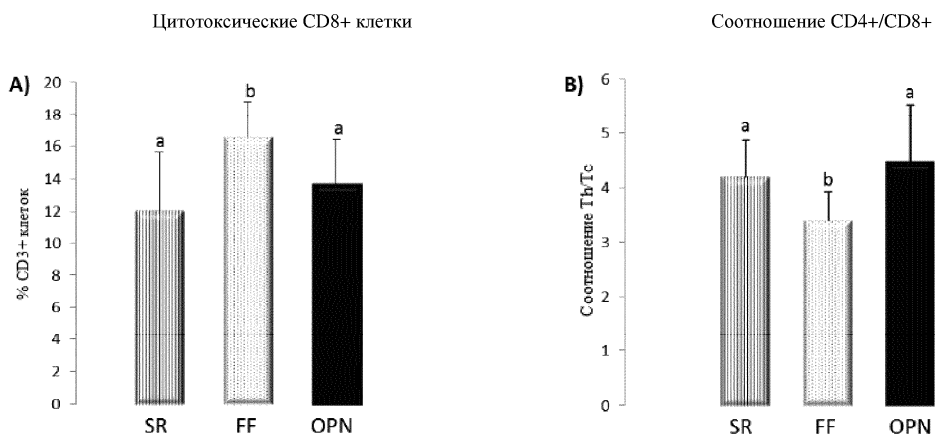
Фиг. 5



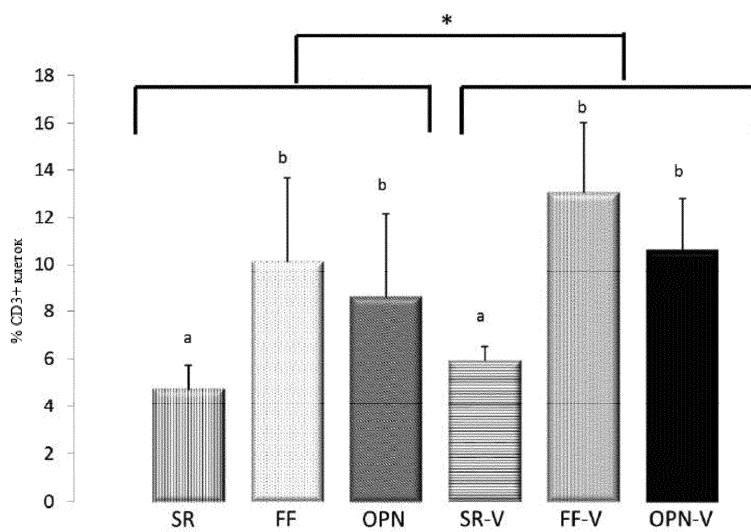
Фиг. 6



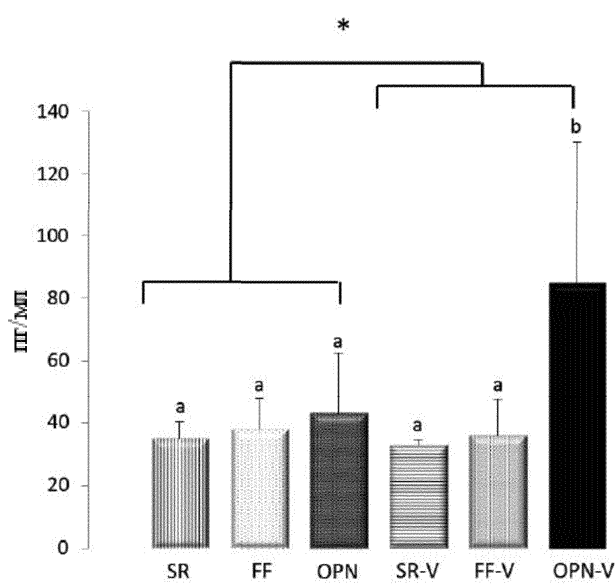
Фиг. 7



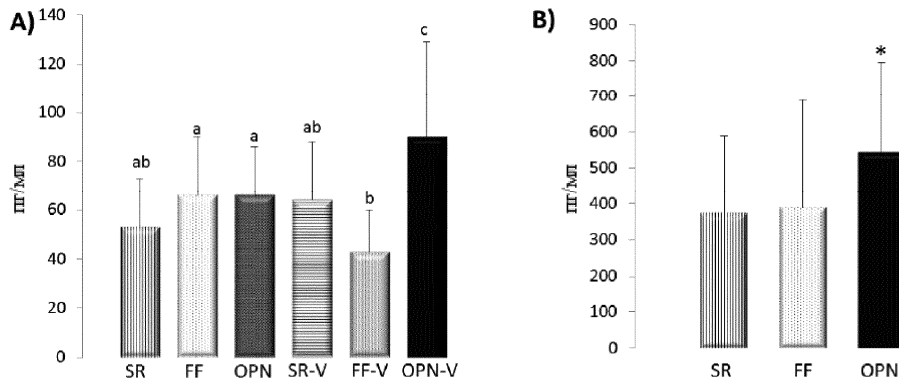
Фиг. 8



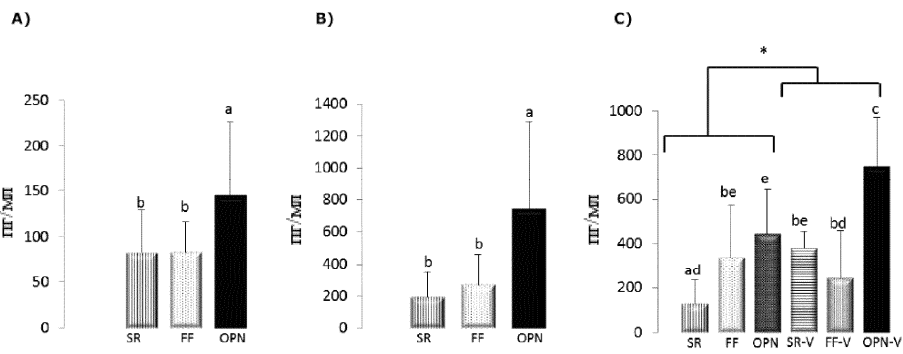
Фиг. 9



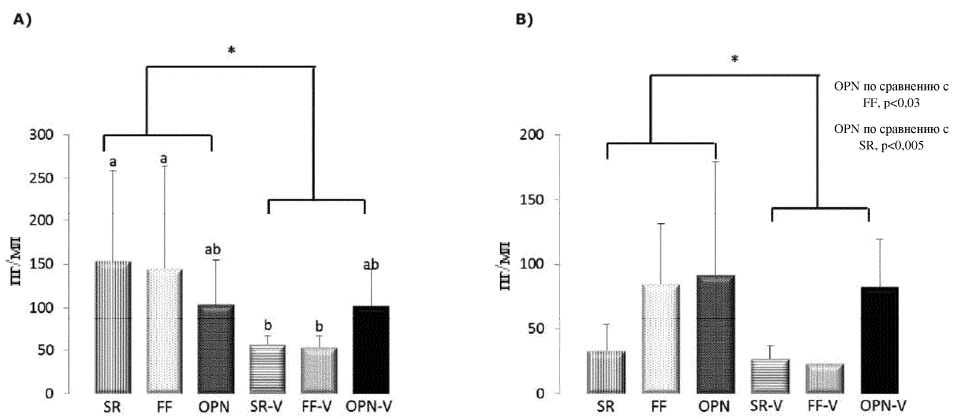
Фиг. 10



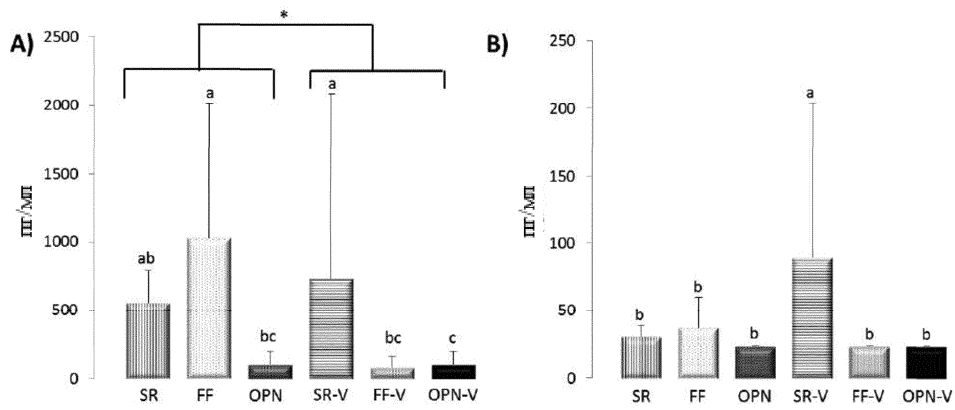
Фиг. 11



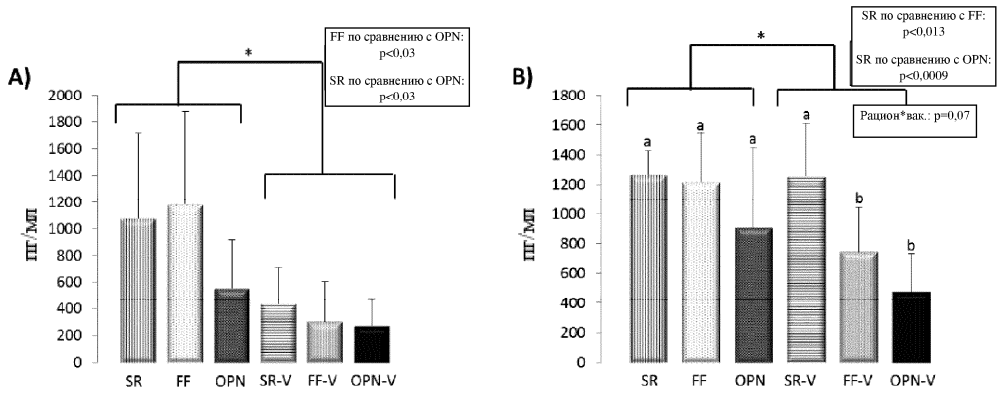
Фиг. 12



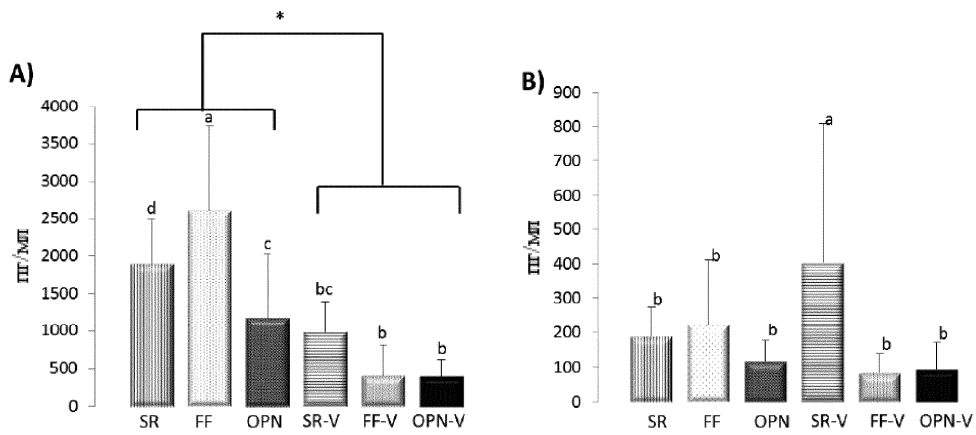
Фиг. 13



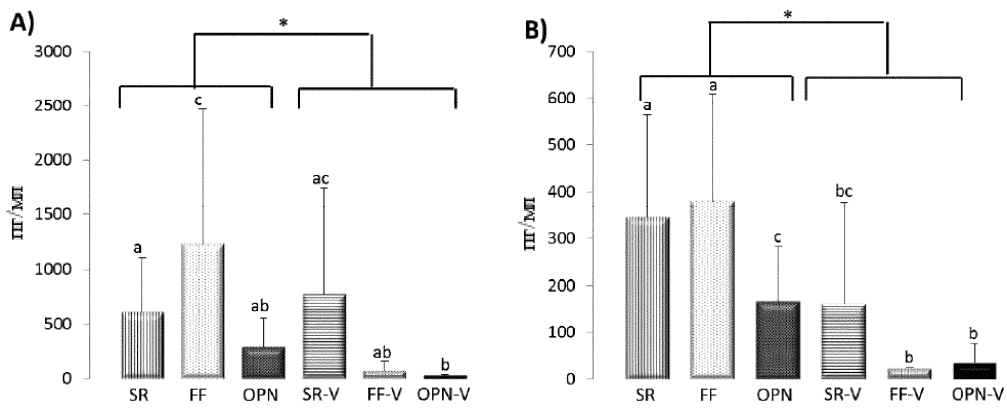
Фиг. 14



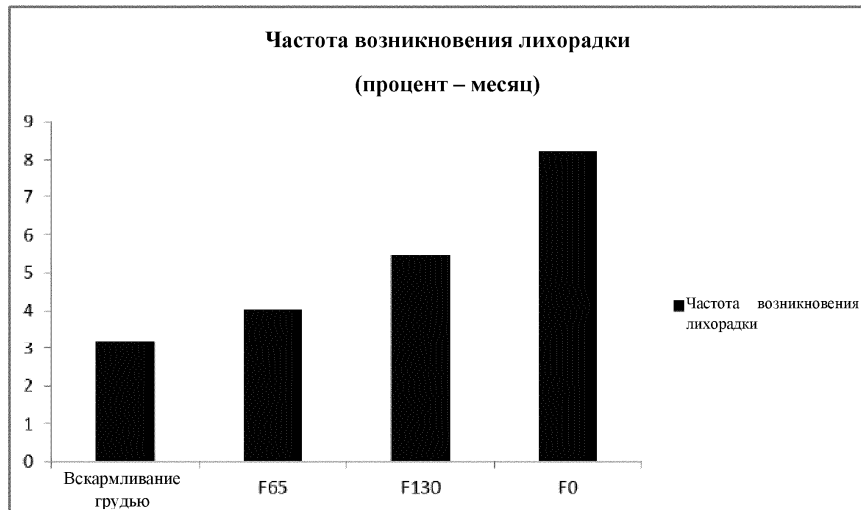
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

