



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 86405

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 39/12

A61K 39/295

A61P 31/14 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВАКЦИНАЦІЇ ПРОТИ ІНФЕКЦІЇ СІМ'ЯНИКІВ, ВИКЛИКАНОЇ ВІРУСОМ БИЧАЧОЇ ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ

1

(21) а200609917

(22) 04.03.2005

(24) 27.04.2009

(86) РСТ/IB2005/000610, 04.03.2005

(31) 60/553,867

(32) 17.03.2004

(33) US

(46) 27.04.2009, Бюл.№ 8, 2009 р.

(72) ЕЛЛСВОРТ МАЙКЛ ААРОН, ТАКЕР КАССИУС
МАКАЛЛІСТЕР, ГІВЕНС МОРІС ДАНІЕЛЬ

(73) ФАРМАЦІЯ ЕНД АПДЖОН КОМПАНІ ЛЛС

(56) FRAY M D ET AL: "The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control" ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE, vol. 60-61, no. Special Issue, 2 July 2000 (2000-07-02), pages 615-627

BOLIN S R: "Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination." THE VETERINARY CLINICS OF NORTH AMERICA. FOOD ANIMAL PRACTICE. NOV 1995, vol. 11, no. 3, November 1995 (1995-11), pages 615-625

(57) 1. Спосіб профілактики інфекції сім'яників, викликаной вірусом BVDV, у сприйнятливої самця тварини, який передбачає:

введення тварині ефективної кількості вакцини, вибраної з групи, яка складається з інактивованої вакцини BVDV типу 1, інактивованої вакцини BVDV типу 2, модифікованої живої вакцини BVDV типу 1 і модифікованої живої вакцини BVDV типу 2.

2. Спосіб за п. 1, де тварина вибрана з групи, яка складається з биків, баранів і кабанів.

3. Спосіб за п. 2, де тварина являє собою бика.

4. Спосіб за п. 1, де вакцина включає одночасно і модифіковану живу вакцину BVDV типу 1, і модифіковану живу вакцину BVDV типу 2.

5. Спосіб за п. 4, де щонайменше одна модифікована жива вакцина BVDV одержана з цитопатичного вірусу.

6. Спосіб за п. 4, де щонайменше одна модифікована жива вакцина BVDV одержана з нецитопатичного вірусу.

7. Спосіб за п. 4, де обидві модифіковані живі вакцини BVDV одержані з цитопатичного вірусу.

8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, де вакцина включає щонайменше один додатковий антиген, виб-

2

раний з групи, яка складається з бичачого вірусу герпесу (BHV-1); вірусу парагрипу типу 3 (PIV3); бичачого респіраторного синцитіального вірусу (BRSV); *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira borgpetersenii hardio-prajitno*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans pomona*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-bovis*, *Leptospira Bratislava*, *Campylobacter fetus*, *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycobacterium bovis* і *Mycobacterium dispar*.

9. Спосіб за п. 8, де вказані додаткові антигени включають бичачий вірус герпесу (BHV-1); вірус парагрипу типу 3 (PIV3) і бичачий респіраторний синцитіальний вірус (BRSV).

10. Застосування вакцини, вибраної з групи, яка складається з інактивованої вакцини BVDV типу 1, інактивованої вакцини BVDV типу 2, модифікованої живої вакцини BVDV типу 1 і модифікованої живої вакцини BVDV типу 2, для одержання лікарського засобу для профілактики інфекції сім'яників BVDV у сприйнятливої самця тварини із збільшеним ризиком інфекції сім'яників BVDV.

11. Застосування за п. 10, де тварина вибрана з групи, яка складається з биків, баранів і кабанів.

12. Застосування за п. 11, де тварина являє собою бика.

13. Застосування за п. 10, де вакцина одночасно включає і модифіковану живу вакцину BVDV типу 1, і модифіковану живу вакцину BVDV типу 2.

14. Застосування за п. 13, де щонайменше одна модифікована жива вакцина BVDV одержана з цитопатичного вірусу.

15. Застосування за п. 13, де щонайменше одна модифікована жива вакцина BVDV одержана з нецитопатичного вірусу.

16. Застосування за п. 13, де обидві модифіковані живі вакцини BVDV одержані з цитопатичного вірусу.

17. Застосування за будь-яким з пп. 10-16, де вакцина включає щонайменше один додатковий антиген, вибраний з групи, яка складається з бичачого вірусу герпесу (BHV-1); вірусу парагрипу типу 3 (PIV3); бичачого респіраторного синцитіального вірусу (BRSV); *Leptospira canicola*, *Leptospira*

(13) C2

(11) 86405

(19) UA

grippotyphosa, *Leptospira borgpetersenii* hardio-prajitno, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans pomona*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-bovis*, *Leptospira Bratislava*, *Campylobacter fetus*, *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*,

Pasteurella multocida, *Mycobacterium bovis* і *Mycobacterium dispar*.

18. Застосування за п. 17, де вказані додаткові антигени включають бичачий вірус герпесу (BHV-1); вірус парагрипу типу 3 (PIV3) і бичачий респіраторний синцитіальний вірус (BRSV).

Способи за даним винаходом належать до способів профілактики інфекції сім'яників вірусом бичачої вірусної діареї шляхом імунізації сприйнятливих самців тварин проти інфекції.

Вірус бичачої вірусної діареї (BVDV) являє собою економічно значущий патоген великої рогатої худоби і інших сприйнятливих тварин, який може виділятися з сім'ям хронічно і гостро інфікованих биків і самців інших сприйнятливих тварин. Цей патоген викликає у сприйнятливих тварин захворювання шлунково-кишкового тракту, респіраторної і репродуктивної систем.

Хоч шлунково-кишкові і респіраторні захворювання, викликані високо патогенними штамами BVDV більш значущі з клінічної точки зору, проте репродуктивні втрати внаслідок BVDV можуть бути набагато більш значущими з економічної точки зору. У літературних джерелах, що описують передачу BVDV, указано, що вірус в сім'ї биків може інфікувати сприйнятливих запліднених корів, спричиняючи зниження частоти вагітності, ранню загибель зародка, викидні і народження телят, хронічно інфікованих BVDV.[1-3]

Хронічно інфіковані бики найчастіше інфікують сприйнятливих запліднених корів, оскільки їх сім'я містить високу концентрацію вірусу (10 [7, 6] інфікуючих доз клітинної культури (50%)/мл) (ССГО₅₀/мл).[3] При порівнянні інфікованих сім'яників гостро інфікованих імунокомпетентних биків виділяли більш низькі концентрації вірусу (5-75 ССГО₅₀/мл) в сім'ї, але вони також здатні передавати BVDV.[4] В одному з досліджень повідомлялося, що 25-50 ССГО₅₀/мл вірусу в сім'ї інфікували 5% запліднених нетелей, і подальша горизонтальна передача BVDV від інфікованих нетелей вагітним коровам того ж стада призводила до хронічної інфекції їх плодів.[5]

Дві групи дослідників повідомили, що гостра інфекція биків після статевого дозрівання може викликати хронічну інфекцію BVDV, яка локалізується в сім'яниках.[6, 7] Один незвичайний випадок виник у серопозитивного, бика, що не мав віремії, якого тримали на станції штучного запліднення в Новій Зеландії. Бика доставили в центр штучного запліднення після безрезультатних спроб виділення BVDV з крові. Незважаючи на присутність нейтралізуючих антитіл до BVDV, бик постійно виділяв низькі рівні вірусу в сім'я (2×10³ ССГО₅₀/мл) протягом 11 місяців, після чого тварину забили. Джерело гострої інфекції було невідоме. При розтині вірус був виділений тільки з сім'яників бика.[6] Вірус в сім'ї цього бика призвів до інфекції і подальшої сероконверсії 1 з 3 запліднених серонегативних нетелей.[8] При другій штучно викликаній інфекції BVDV був виявлений за допомогою зворотної «гніздової» полімерної ланцюгової реакції (RT-nPCR) в сім'ї 2 з 3 биків, що не мали віремії,

після статевого дозрівання протягом періоду до 7міс, але вірус не можна було виділити стандартними способами тканинної культури. Сім'я, зібране через 5міс. після первинного контакту і введене внутрішньовенно, викликало інфекцію BVDV у одного серонегативного теляти. Сім'я, взяте в день контакту і через 7 міс. після контакту, не викликало інфекції ще у двох інших серонегативних телят.[7]

У двох дослідженнях було зазначено, що бики з гострою інфекцією можуть виділяти BVDV в сім'я з прийнятною концентрацією, рухливістю і морфологією сперматозоїдів.[4, 5] В іншому дослідженні було виявлене зниження рухливості, збільшення віцевих дефектів, маленькі голівки сперматозоїдів і проксимальні краплі (було виявлено у биків з гострою інфекцією).[9]

Незалежно від невідомості відносно деталей передачі при природному розмноженні і впливу на фертильність биків, зрозуміло, що інфікування сім'яників BVDV у сприйнятливих самців тварин є значущою економічною втратою в зв'язку з репродуктивними втратами внаслідок передачі BVDV коровам.

Вірусні інфекції сім'яників представляють серйозну проблему для лікування або профілактики за допомогою імунізації, оскільки відомо, що сім'яники є імунологічно ізольованими. На здивування, автори винаходу показали, що імунізація є ефективним способом боротьби з інфекцією сім'яників BVDV серед сприйнятливих тварин

Фіг.1 Процент зразків біопсії тканини сім'яників, позитивних у відношенні BVDV після антигенної стимуляції BVDV типу 2. Надписи: VI = виділення вірусу, PCR = полімеразна ланцюгова реакція, ІНС = імуногістохімія, а, b - відмінності процентних часток з різними підрядковими буквами є статистично значущими (P≤0,05).

Винахід належить до способу профілактики або лікування інфекції сім'яників BVDV у сприйнятливого самця тварини, який передбачає введення тварині ефективної кількості вакцини, вибраної з групи, яка складається з інактивованої вакцини BVDV типу 1, інактивованої вакцини BVDV типу 2, модифікованої живої вакцини BVDV типу 1 і модифікованої живої вакцини BVDV типу 2.

Винахід також належить до вакцини, вибраної з групи, яка складається з інактивованої вакцини BVDV типу 1, інактивованої вакцини BVDV типу 2, модифікованої живої вакцини BVDV типу 1 і модифікованої живої вакцини BVDV типу 2, для використання як лікарського засобу для профілактики інфекції сім'яників BVDV у сприйнятливого самця тварини.

Винахід, крім того, належить до застосування вакцини, вибраної з групи, яка складається з інактивованої вакцини BVDV типу 1, інактивованої вакцини BVDV типу 2, модифікованої живої вакци-

ни BVDV типу 1 і модифікованої живої вакцини BVDV типу 2, для одержання лікарського засобу для профілактики інфекції сім'яників BVDV у сприйнятливих самців тварини.

Винахід також належить до способу профілактики інфекції сім'яників BVDV у сприйнятливої самця тварини, який передбачає ідентифікацію тварини з підвищеним ризиком інфекції сім'яників BVDV, і введення тварині ефективної кількості вакцини, вибраної з групи, яка складається з інактивованої вакцини BVDV типу 1, інактивованої вакцини BVDV типу 2, модифікованої живої вакцини BVDV типу 1 і модифікованої живої вакцини BVDV типу 2.

Винахід також належить до вакцини, вибраної з групи, яка складається з інактивованої вакцини BVDV типу 1, інактивованої вакцини BVDV типу 2, модифікованої живої вакцини BVDV типу 1 і модифікованої живої вакцини BVDV типу 2, для одержання лікарського засобу для профілактики інфекції сім'яників BVDV у сприйнятливої самця тварини з підвищеним ризиком інфекції сім'яників BVDV.

Винахід, крім того, належить до застосування вакцини, вибраної з групи, яка складається з інактивованої вакцини BVDV типу 1, інактивованої вакцини BVDV типу 2, модифікованої живої вакцини BVDV типу 1 і модифікованої живої вакцини BVDV типу 2, для одержання лікарського засобу для профілактики інфекції сім'яників BVDV у сприйнятливої самця тварини з підвищеним ризиком інфекції сім'яників BVDV.

Винахід також належить до виробу, який містить посудину або посудини, що включають вакцину BVDV, вибрану з групи, яка складається з інактивованої вакцини BVDV типу 1, інактивованої вакцини BVDV типу 2, модифікованої живої вакцини BVDV типу 1 і модифікованої живої вакцини BVDV типу 2; і інструкцію по застосуванню вакцини BVDV для профілактики інфекції сім'яників BVDV у сприйнятливої самця тварини.

Сприйнятливим самцям тварин можуть включати биків, баранів і кабанів. У переважному варіанті здійснення твариною є бик.

Вакцини і вироби можуть включати одночасно як модифіковану живу вакцину BVDV типу 1, так і модифіковану живу вакцину BVDV типу 2.

Вакцини можуть бути одержані з цитопатогенного і нецитопатогенного вірусу.

Необов'язково, вакцини і вироби за винаходом можуть включати щонайменше один додатковий антиген, вибраний з групи, яка складається з бичачого вірусу герпесу (BHV-1); вірусу парагрипу типу 3 (PIV3); бичачого респіраторного синцитіального вірусу (BRSV); *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-prajitno*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans pomona*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-bovis*, *Leptospira Bratislava*, *Campylobacter fetus*, *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycobacterium bovis* і *Mycobacterium dispar*.

У переважному варіанті здійснення вакцини і вироби за винаходом можуть включати щонайменше один додатковий антиген, вибраний з групи, яка складається з бичачого вірусу герпесу (BHV-1);

вірусу парагрипу типу 3 (PIV3) і бичачого респіраторного синцитіального вірусу (BRSV).

Винахід належить до способу лікування або профілактики інфекції сім'яників вірусами BVDV у сприйнятливої самця тварини. Спосіб за даним винаходом ефективний для профілактики або зниження інфекції сім'яників, викликані інфекцією BVDV типу 1 і 2.

«Вірус бичачої вірусної діареї» («BVDV») являє собою дрібний, одонитковий РНК вірус (з позитивним геномом) сімейства *Flaviviridae* і роду *Pestivirus*. Були описані два біотики BVDV, цитопатичний (CP) і нецитопатичний (NC), на основі присутності або відсутності видимого цитопатичного ефекту *in vitro* при інфікуванні моношарів сприйнятливих клітин. У більшості випадків нецитопатичний біотип виділений при спалахах захворювання в полі. На основі значних відмінностей вірусної РНК штами вірусу бичачої вірусної діареї можна також розділити на 2 окремих види (тобто, генотипи), тип 1 і тип 2.

Термін «сприйнятлива тварина» означає будь-яку тварину, яка сприйнятлива до інфекцій BVDV, наприклад, велика рогата худоба, вівці і свині.

Термін «сприйнятливий самець тварини» означає будь-якого самця тварини, який сприйнятливий до інфекцій BVDV сім'яників, наприклад, самець великої рогатої худоби, овець і свиней. Невихолощені самці великої худоби називаються «биками». Невихолощені самці овець називаються «баранами». Невихолощені самці свиней називаються «кабанами».

Термін «запобігання» або «контроль» відносно інфекції сім'яників означає зниження або усунення ризику інфекції сім'яників сприйнятливої самця тварини вірулентними типами 1 і 2 BVDV; ослаблення або зменшення симптомів інфекції або прискорення одужання після інфекції. Вакцинація вважається терапевтичною, якщо спостерігається зниження вірусного або бактеріального навантаження за даними біопсії сім'яників або при наявності вірусу в сім'ї.

Термін «інфекція» може означати гостру або хронічну інфекцію BVDV.

«Гостра» або «транзиторна» інфекція BVDV виникає при контакті імунокомпетентної сприйнятливої тварини з цитопатичним або нецитопатичним штамом BVDV. Хоч частіше за все зустрічається субклінічна інфекція, проте можуть спостерігатися такі симптоми як депресія, відсутність апетиту, ерозії слизової і покриття виразками ротової порожнини, діарея і смерть. Імунокомпетентна тварина з гострою інфекцією може передати вірус сприйнятливій тварині, але набагато менш ефективно, ніж хронічно інфіковані тварини.

Гостра інфекція сім'яників належить до гострої або транзиторної інфекції сім'яників сприйнятливої самця тварини, що виникла внаслідок транзиторної системної інфекції. У деяких повідомленнях вказується на те, що бик з гострою інфекцією може виділяти вірус в сім'я, зберігаючи прийнятну концентрацію, рухливість і морфологію сперматозоїдів. Однак в інших повідомленнях автори спостерігали зниження рухливості сперматозоїдів і збільшення кількості вінцевих дефектів, маленьких

голівки сперматозоїдів і проксимальних крапель, що супроводжують гостру інфекцію.

Хронічна інфекція BVDV виникає при інфікуванні сприйнятливої тварини нецитопатичним штамом BVDV перед розвитком імунотолерантності приблизно на 125-й день вагітності. У тварин з хронічною інфекцією розвивається імунотолерантність до штаму, яким вони були інфіковані, і вони діють як резервуар патогену і звичайно виділяють великі кількості вірусу з сечею, фекаліями, сім'ям, слиною, слізною рідиною і носовим слизом протягом всього життя.

Хронічна інфекція сім'яників належить до хронічної інфекції сім'яників сприйнятливої самця тварини, викликаній в гострій або хронічній системній інфекції.

Вакцина, що використовується в даному винаході, включає вірус BVDV типу 1 і/або 2 і прийнятний у ветеринарії носій.

Звичайно, вірусні вакцини ділять на 2 класи:

Живі вакцини, що містять живі віруси, які були піддані обробці або вирощувалися таким чином, щоб зробити їх менш патогенними (ослабленими), і вакцини, що містять убиті (інактивовані) вірусні частинки. У контексті вірусу BVDV, власне вірус може бути цитопатичним або нецитопатичним. На основі значних відмінностей вірусної РНК штами вірусу вірусної діареї можна також розділити на 2 окремих види (тобто, генотипи), тип 1 і тип 2. Таким чином, в принципі існують вісім основних класів вакцини BVDV, але, проте, більшість комерційних вакцин основані на цитопатогенних вірусах.

Серед вакцин BVDV, які в цей час є в продажі, є вакцини, в яких вірус був підданий хімічній інактивації [McClurkin, et al., Arch. Virol. 58:119 (1978); Fernelius, et al., Am. J. Vet. Res. 33:1421-1431 (1972); і Kolar, et al., Am. J. Vet. Res. 33:1415-1420 (1972)]. У разі цих вакцин для досягнення первинної імунізації, звичайно потрібне введення множинних доз і імунітет, що досягається, має коротку тривалість і не захищає від передачі ембріону [Bolin, Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11:615-625 (1995)]. Повідомлялося, що у овець застосовна субодиночна вакцина, основана на очищеному білку E2 (Bruschke, et al., Vaccine 15:1940-1945 (1997)). На жаль, виявилось, що ця вакцина є єдиною вакциною, що захищає ембріон від інфекції, і цей захист обмежується одним штамом гомологічного вірусу.

Крім того, були одержані вакцини модифікованого живого вірусу (MLV), використовуючи вірус BVD, який був ослаблений повторним пасажом в коров'ячих або свинячих клітинах [Coggins, et al., Cornell Vet. 51:539 (1961); і Phillips, et al., Am. J. Vet. Res. 36:135 (1975)] або хімічно викликаними мутаціями, які додають вірусу температурно-чутливий фенотип [Lobmann, et al., Am. J. Vet. Res. 45:2498 (1984); і Lobmann, et al., Am. J. Vet. Res. 47:557-561 (1986)]. Однократна доза вакцини MLV виявилася достатньою для імунізації, і тривалість імунітету у вакцинованої великої рогатої худоби може тривати протягом декількох років [Coria, et al., Can. J. Con. Med. 42:239 (1978)]. Крім того, повідомлялося про перехресний захист у телят, вакцинованих вакцинами типу MLV [Martin, et al., In Proceedings of the Conference Res. Workers' Anim. Dis.,

75:183 (1994)]. Однак міркування безпеки, наприклад, можлива ембріональна передача вірусу, викликали великий неспокій щодо застосування цих вакцин [Bolin, Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11:615-625 (1995)].

У переважному варіанті здійснення компонент BVDV типу 1 є модифікованим живим цитопатогенним (штам *срBVD-1 NADL* (National Animal Disease Center Міністерство сільського господарства США, Еймс, Айова, ATCC VR-534)). В іншому переважному варіанті здійснення компонент BVDV типу 2 є модифікованим живим цитопатогенним (*срBVD-2*, штам 53637, ATCC № POTA-4859). Як описано в одночасно поданій заявці на патент США № 60/490834, поданій 29.07.03, обидва ізоляти містять вставку в області NS2-3. Ослаблений вірус штаму *срBVDV-1* містить вставку кодуючої послідовності 3' *Bos taurus DnaJ1* тимідину в нуклеотидному положенні 4993 (нумерація послідовності NADL), яка являє собою третій нуклеотид кодону, що кодує гліциновий залишок в положенні 1536 амінокислоти. Ослаблений *срBVDV-2* містить вставку кодуючої послідовності 3' *Bos taurus DnaJ1* в тому ж геномному сайті. В інших переважних варіантах здійснення модифіковані живі антигени є висушеними, ліофілізованими або вітрифікованими.

В одному з варіантів здійснення композиції вакцини за даним винаходом включають ефективну кількість одного або декількох описаних вище вірусів BVD, переважно штам *срBVD-1 NADL* вірусу (штам вірусу *срBVD-1 NADL* - National Animal Disease Center Міністерства Сільського Господарства США, Еймс, Айова ATCC VR-534), 53637 *срBVD-2* штам, (ATCC № POTA-4859), штам C-13 IBRV вірусу (Cutter Laboratories); штам Reisinger вірусу PIV3 (Univ. Nebraska); штам 375 вірусу BRSV, (Veterinary Medical Research Institute, Еймс, Айова). Очищені вакцини BVD можна використовувати безпосередньо в композиції вакцини або переважно віруси BVD можуть бути піддані подальшій модифікації шляхом серійних пасажів *in vitro*. Звичайно, вакцина містить від приблизно 1×10^2 до приблизно 1×10^{10} бляшкоутворювальних або TCID₅₀ одиниць вірусу разом з прийнятим у ветеринарії носієм і, необов'язково, разом з ад'ювантом, в об'ємі від 0,1 до 5мл, і переважно приблизно 2мл. Точна кількість вірусу в композиції вакцини, ефективна для одержання захисного ефекту, може бути визначена ветеринарним лікарем. Прийнятні у ветеринарії носії, що придатні для використання в композиціях вакцин, можуть являти собою будь-які носії, описані тут нижче.

Звичайно, вакцина містить від приблизно 1×10^2 до приблизно 1×10^{10} бляшкоутворювальних або колонієутворювальних одиниць вірусу з прийнятим у ветеринарії носієм і ад'ювантом, в об'ємі від 0,1 до 5мл, і переважно приблизно 2мл. Точна кількість вірусу в композиції вакцини, ефективна для одержання захисного ефекту, може бути визначена ветеринарним лікарем. Прийнятні у ветеринарії носії, що придатні для використання в композиціях вакцин, можуть являти собою носії, описані тут нижче. Звичайним шляхом введення є внутрішньом'язова або підшкірна ін'єкція в об'ємі від приблизно 0,1 до приблизно 5мл вакцини. Ком-

позиції вакцин за даним винаходом можуть також включати додаткові активні інгредієнти, такі як інші композиції вакцин проти BVDV, наприклад, композиції вакцин, описані в WO 95/12682, WO 99/55366, Патент США №6,060,457, Патент США №6,015,795, Патент США №6,001,613, і Патент США №5,593,873.

Вакцинацію можна здійснити одним щепленням або за допомогою множинного щеплення. При бажанні, у щеплених тварин можна зібрати сироватку і дослідити на наявність антитіл до вірусу BVD. В іншому варіанті здійснення даного винаходу композиції вакцин використовують для лікування інфекцій сім'яників, викликаних BVDV. Відповідно, даний винахід належить до способів контролю або профілактики інфекцій у тварин, викликаних вірусами BVD типів 1 або 2, або поєднанням типу 1 і типу 2, шляхом введення тварині ефективної кількості вірусу BVDV за даним винаходом. В іншому варіанті здійснення композиції вакцини за даним винаходом ефективні для поліпшення фертильності стада і для зниження ризику інфекції сім'яників у сприйнятливих самців тварин.

При здійсненні способів за даним винаходом, композицію вакцин за даним винаходом вводять великій рогатій худобі переважно внутрішньом'язовим або підшкірним шляхами, хоч також можна використовувати інші шляхи введення, такі як, наприклад, пероральний, інтраназальний шляхи введення (наприклад, аерозолем або іншим безголковим способом введення), введення в лімфатичний вузол, внутрішньошкірний, внутрішньочеревинний, ректальний або вагінальний шляхи введення, або поєднання цих шляхів. Переважним є внутрішньом'язове введення в область шиї тварини. Можуть бути потрібні схеми повторної імунізації, і можна підібрати схеми дозування для забезпечення оптимальної імунізації.

Під «імуногенним» мають на увазі здатність вірусу BVD викликати імунну відповідь у тварини проти вірусів BVD типу 1 або типу 2, або проти обох вірусів BVD типу 1 або типу 2. Імунна відповідь може являти собою клітинну імунну відповідь, опосередковану передусім цитотоксичними Т-клітинами, або гуморальну імунну відповідь, опосередковану передусім хелперними Т-клітинами, що, в свою чергу, активує В-клітини, приводячи до продукції антитіл.

Відповідно до даного винаходу, віруси переважно атенуюють серійними пасажами в клітинній культурі перед використанням в імуногенній композиції. Способи модифікації добре відомі фахівцям в даній галузі.

Композиції вакцин, що використовуються в способах за даним винаходом, можуть також включати активні інгредієнти, такі як інші імуногенні композиції проти BVDV, наприклад, імуногенні композиції проти BVDV, описані в одночасно поданій заявці № 08/107908, WO 95/12682, WO 99/55366, Патент США №6,060,457, Патент США №6,015,795, Патент США №6,001,613 і Патент США №5,593,873.

Крім того, об'єкти за даним винаходом можна здійснити введенням інших антигенів, а не BVDV типів 1 і/або 2 («комбінована вакцина»); такі антигени включають, але ними не обмежуються, *Lepto-*

spira canicola, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira borgpetersenii hardio-prajitno*, *Leptospira ictero-haemorrhagia*, *Leptospira interrogans pomona*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-bovis*, *Leptospira bratislava*, *Campylobacter fetus Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycobacterium bovis* і *Mycobacterium dispar*. У декількох переважних варіантах здійснення джерелом комбінованої вакцини є Bovi-Shield® GOLD™ IBR-BVD, Bovi-Shield® GOLD™ 3, Bovi-Shield® GOLD™ 5, Bovi-Shield® GOLD™ IBR-BVD-BRSV-LP, Bovi-Shield® GOLD™ FP 5 L5, Bovi-Shield® GOLD™ FP 5 VL5 або Preguard® GOLD FP 10 (Pfizer, Inc.).

Крім того, імуногенні композиції і композиції вакцин, що використовуються в способах за даним винаходом, можуть включати один або більше прийнятних у ветеринарії носіїв. Термін «прийнятний у ветеринарії носій», що використовується тут, включає будь-який і кожний розчинник, дисперсійне середовище, покриття, ад'ювант, солюбілізуючий агент, розріджувач, консервант, антибактеріальний і протигрибковий засіб, ізотонічний агент, агент, що затримує всмоктування, і тому подібні. Розріджувачі можуть включати воду, сольовий розчин, декстрозу, етанол, гліцерин і тому подібне. Ізотонічні агенти можуть включати, нарівні з іншими, хлорид натрію, декстрозу, маніт, сорбіт і лактозу. Стабілізатори, нарівні з іншими, включають альбумін. Ад'юванти включають, але ними не обмежуються, нарівні з багатьма іншими, ад'ювантну систему RIBI (Ribi Inc.), галуни, гель гідроксиду алюмінію, холестерин, емульсії «масло-в-воді», емульсії «вода-в-маслі», такі як, наприклад, повний і неповний ад'юванти Фрейнда, блокспівполімери (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), AMPHIGEN® ад'ювант, сапонін, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) або інші фракції сапоніну, монофосфорильний ліпід A, ліпідаміновий ад'ювант Avridine, термолабільний ентеротоксин з *E.coli* (рекомбінантний або інший), холерний токсин або мурамідипептид. Композиція вакцини може, крім того, включати один або більше інших імуномодуляторних агентів, таких як, наприклад, інтерлейкіни, інтерферони або інші цитокіни. Композиції вакцин, що використовуються в способах за даним винаходом, можуть також включати гентаміцин і мертіолат. Хоч фахівець в даній галузі може легко визначити кількість і концентрацію ад'ювантів і добавок, які можна використати в контексті даного винаходу, даний винахід належить до композицій, що включають від приблизно 50мг до приблизно 2000мг ад'юванту, і переважно приблизно від 500мг до 2мл дозу композиції вакцин. В іншому переважному варіанті здійснення, даний винахід належить до композицій вакцин, що включають від приблизно 1мг/мл до приблизно 60мг/мл антибіотика, і більш переважніше менше ніж приблизно 30мг/мл антибіотика.

Композиції вакцин, що використовуються в способах за даним винаходом, можуть бути одержані в різноманітних формах в залежності від шляху введення. Наприклад, композиції вакцин можуть бути одержані в формі стерильних водних розчинів або дисперсій, які придатні для ін'єкційно-

го введення, або одержані в ліофілізованих формах, використовуючи методики ліофілізації. Ліофілізовані композиції вакцин звичайно зберігаються приблизно при 4°C, і можуть бути розчинені в стабілізуючому розчині, наприклад, сольовому розчині або HEPES, разом або без ад'юванту.

Композиції вакцин за даним винаходом можна вводити тваринам для індукції імунної відповіді проти вірусів BVD типу 1 або типу 2, або проти обох вірусів BVD типу 1 і типу 2. Відповідно, ще один варіант здійснення даного винаходу належить до способів стимуляції імунної відповіді проти вірусів BVD типу 1 і типу 2 або проти поєднання вірусів BVD типу 1 і типу 2 шляхом введення тварині ефективної кількості описаної вище імуногенної композиції за даним винаходом. Під терміном «тварина» розуміють будь-яку тварину, яка сприйнятлива до інфекцій BVDV, таку як бик, вівця і свиня.

Відповідно до способів за даним винаходом, переважна імуногенна композиція для введення тварині, включає штам srNADL вірусу BVDV і/або штам sr53637 вірусу BVDV. Імуногенна композиція, що містить вірус BVDV, переважно живий, модифікований декількома пасажами в культурі, вводиться великій рогатій худобі, переважно, внутрішньом'язовим або підшкірним шляхами, хоч також можна використовувати інші шляхи введення, такі як, наприклад, пероральний, інтраназальний шляхи введення, введення в лімфатичний вузол, внутрішньошкірний, внутрішньочеревинний, ректальний або вагінальний шлях введення, або поєднання цих шляхів введення.

Протоколи імунізації можуть бути оптимізовані, використовуючи процедури, добре відомі в даній галузі. Тваринам можна вводити одиночну дозу або, альтернативно, можна провести 2 або більше щеплень з інтервалами 2-10 тижнів. В залежності від віку тварини, імуногенну композицію або композицію вакцин можна вводити повторно. Наприклад, даний винахід передбачає вакцинацію здорової великої рогатої худоби до віку 6міс. і ревакцинацію у віці 6міс. У ще одному прикладі, даний винахід передбачає вакцинацію великої рогатої худоби перед злучанням, приблизно за 5 тижнів до злучання (або перед введенням в стадо) і, необов'язково, знов приблизно за 2 тижні до злучання або під час вагітності для захисту ембріона проти інфекції, викликаной BVDV типів 1 і 2. Однократні дози композицій за даним винаходом можна також вводити приблизно через 3-4 тижні після першої дози. Передбачена також ревакцинація 1 раз на півроку однією дозою комбінованої вакцини для профілактики інфекції ембріона вірусом BVDV.

Ступінь і природу імунних відповідей, що індукуються у великої рогатої худоби, можна оцінити різноманітними методиками. Наприклад, у щеплених тварин можна взяти сироватки і дослідити наявність антитіл, специфічних для вірусів BVDV, наприклад, звичайним аналізом нейтралізації вірусу.

Термін «ефективна кількість» належить до кількості комбінованої вакцини, достатньої для того, щоб викликати імунну відповідь у тварини, якій вона введена. Імунна відповідь може включати, без обмеження, індукцію клітинного і/або гумора-

льного імунітету. Кількість вакцини, яка є терапевтично ефективною, може змінюватися в залежності від конкретного вірусу, що використовується, стану великої рогатої худоби і/або ступеня інфекції, і її може визначити ветеринарний лікар.

Інактивовані або модифіковані живі вакцини, що використовуються в способі за даним винаходом, можуть бути одержані, з використанням різноманітних способів, які відомі в даній галузі.

Наприклад, ізоляти BVDV можуть бути одержані безпосередньо з маток інфікованих корів, з використанням відомих методик.

Ізоляти BVDV можуть бути атенуйовані, використовуючи різноманітність відомих способів, включаючи, наприклад, серійні пасажі. У доповнення до модифікованих живих вірусних ізолятів, продукт вакцин, що використовується в способах за даним винаходом, може також включати відповідну кількість одного або декількох ад'ювантів, що звичайно використовуються. Відповідні ад'юванти можуть включати, але ними не обмежуються, мінеральні гелі, наприклад гідроксид алюмінію; поверхнево-активні речовини, такі як лізолецитин; глікозиди, наприклад, похідні сапоніну, такі як Quil A або GPI-0100; плурононі поліолі; поліаніони; неіонні блок-співполімери, наприклад, Pluronic F-127 (B.A.S.F., USA); пептиди; мінеральні масла, наприклад, Montanide ISA-50 (Seppic, Paris, France), карбопол, Amphigen, Amphigen Mark II (Hydronics, USA), Alhydrogel, масляні емульсії, наприклад, емульсією мінерального масла, такого як BayolF/Arlacel A і воду, або емульсією рослинної олії, воду і емульгатор, такий як лецитин; галуни; цитокіни биків; холестерин і поєднання ад'ювантів. У переважному варіанті здійснення, сапонін, що містить емульсію масла у воді, зазнає звичайної мікрофлюїдизації.

Особливо переважним джерелом вірусу BVDV типу 1 і 2 для використання в способі за даним винаходом є лінія вакцинних продуктів Bovi-Shield® GOLD™ (PFIZER INC.), що містить штам NADL вірусу BVDV (придбаний в National Animal Disease Center (NADC), USDA, Еймс, Айова) і штам 53637 вірусу BVDV типу 2 (Univ. Guelph, Guelph, Ont.) (ATCC No. PTA-4859).

Переважно, штамми NADL і 53637 являють собою модифіковані живі штамми. Відповідно до даного винаходу, штамми за даним винаходом можуть бути доповнені комерційно доступними ад'ювантами, переважно Quil A-Cholesterol-Amphigen (Hydronics, USA). Переважна доза імуногенних композицій і композицій вакцин за даним винаходом становить приблизно 2,0мл. У композиції, що використовуються в способах за даним винаходом, можна включити консерванти. Консерванти, які можуть використовуватися в даному винаході, включають гентаміцин і мертіолат. Можна також додати носій, переважно PBS. Одержання модифікованих живих вакцин, таке як атенування вірулентних штамів пасажем в культурі, відоме в даній галузі.

Модифіковані живі ізоляти BVDV можна також поєднувати з наступними бактеріями і вірусами, включаючи, але ними не обмежуючись, бичачий вірус герпесу (BHV-1); бичачий респіраторний синцитіальний вірус (BRSV), вірус парагрипу (PIV3),

Leptospira canicola, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira borgpetersenii* hardio-prajitno, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans pomona*, *Leptospira borgpetersenii* hardjo-bovis, *Leptospira Bratislava*, *Campylobacter fetus*, *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycobacterium bovis* і *Mycobacterium dispar*.

Відповідно до даного винаходу, ефективна кількість BVDV або комбінованої вакцини, введена сприйнятливим самцям тварин, забезпечує ефективний імунітет проти інфекції сім'яників, викликової BVDV типу 2. В одному з варіантів здійснення, вакцина вводиться телятам двома дозами з інтервалом приблизно 3-4 тижні. Наприклад, перше введення виконується, коли вік тварини складає від приблизно 1 до приблизно 3 міс. Друге введення виконується приблизно через 1-4 тижні після першого введення комбінованої вакцини.

В іншому переважному варіанті здійснення введення виконується приблизно за 4-5 тижнів перед виведенням тварини або перед доставкою в устанovu штучного запліднення. Введення подальших доз вакцини переважно здійснюється щорічно. В іншому переважному варіанті здійснення, тварину, вакциновану до віку приблизно 6 місяців, потрібно повторно вакцинувати після 6-місячного віку. Введення подальших доз вакцини переважно здійснюється щорічно, хоч даним винаходом також передбачається подальше введення доз вакцини 1 раз на 2 роки і 1 раз на півроку.

Ефективна кількість вакцини залежить від інгредієнтів вакцини і схеми введення. Звичайно, коли у вакцинні використовується препарат модифікованого живого BVDV, то кількість вакцини, що містить від приблизно 10^2 до приблизно 10^{10} TCID₅₀ одиниць на дозу BVDV, і переважно від приблизно 10^4 до приблизно 10^7 TCID₅₀ одиниць на дозу BVDV типів 1 і 2, ефективно для однократного введення сприйнятливим самцям тварин. Переважно, вакцина, яка забезпечує ефективний імунітет, містить приблизно 10^4 - 10^7 TCID₅₀ одиниць/дозу BVDV типів 1 і 2, а переважніше приблизно 10^5 TCID₅₀ одиниць/дозу при однократному введенні сприйнятливій тварині. Введення подальших доз вакцини переважно проводять на щорічній основі. Тварин, вакцинованих до віку приблизно 6 міс, слід ревакцинувати у віці після 6 міс. Введення подальших доз вакцини переважно проводять щорічно.

Відповідно до даного винаходу, при введенні переважного продукту Bovi-Shield® GOLD™ (Pfizer Inc.), продукт вводять переважно однократно в кількості від приблизно 0,1 до приблизно 5,0 мл, переважно від приблизно 1,5 мл до приблизно 2,5 мл і переважніше приблизно 2 мл. Введення подальших доз вакцини переважно проводять щорічно. Тварин, вакцинованих до віку приблизно 6 міс, слід ревакцинувати після 6-місячного віку. Введення подальших доз вакцини переважно проводять щорічно.

Відповідно до даного винаходу, введення може здійснюватися відомими шляхами, включаючи пероральний, інтраназальний, місцевий, трансдермальний і парентеральний (наприклад, внутрішньовенний, внутрішньочеревинний, внутрішньоскірний, підшкірний або внутрішньом'язовий).

Переважним шляхом введення є внутрішньом'язовий або підшкірний шлях введення.

Даний винахід також передбачає однократну первинну дозу з подальшою щорічною ревакцинацією, яка виключає неомінію; повернення додаткових доз телятам перед щорічною ревакцинацією для створення і/або підтримки імунітету проти інфекції.

Вакцини, що вводяться відповідно до даного винаходу, можуть включати додаткові компоненти, такі як ад'ювант (наприклад, мінеральні гелі, наприклад гідроксид алюмінію; поверхнево-активні речовини, такі як холестерин, лізолецитин; глікозиди, наприклад похідні сапоніну, такі як Quil A, QS-21 або GPI-0100; плурононі поліолі; поліаніони; неіонні блок-співполімери, наприклад Pluronic F-127; пептиди; мінеральні масла, наприклад, Montanide ISA-50, карбопол, Amphigen®, Alhydrogel, масляні емульсії, наприклад емульсію мінерального масла, такого як BayolF/Arlacel A і воду, або емульсію рослинної олії, воду і емульгатор, таку як лецитин; галуни; цитокіни бика і поєднання ад'ювантів).

Відповідно до даного винаходу, введення ефективної кількості вакцини, введене сприйнятливим самцям тварин у віці приблизно 3 міс, забезпечує ефективний імунітет проти інфекції сім'яників.

У переважному варіанті здійснення вакцину вводять внутрішньом'язово. У ще одному переважному варіанті здійснення вакцину вводять підшкірно. Більш того, переважно, щоб доза вакцини містила від приблизно 1 мл до приблизно 7 мл, і переважно приблизно 2 мл, причому щоб кожний мл містив від приблизно 10^2 до приблизно 10^7 TCID₅₀ одиниць на дозу вірусу. Комбіновану вакцину бажано вводити тварині двічі; один раз у віці від приблизно 1 до приблизно 3 міс. і інший раз приблизно через 3-5 тижнів. Даний винахід також передбачає щорічну ревакцинацію однократною дозою.

Винахід, крім того, належить до способу профілактики інфекції сім'яників BVDV, який передбачає:

а) ідентифікацію тварини з підвищеним ризиком інфекції сім'яників BVDV; і

б) введення тварині ефективної кількості вакцини, вибраної з групи, яка складається з убитої вакцини BVDV типу 1, убитої вакцини BVDV типу 2, модифікованої живої вакцини BVDV типу 1, модифікованої живої вакцини BVDV типу 2.

Для ідентифікації тварини з підвищеним ризиком інфекції BVDV фахівець дізнається, що тварина має підвищений ризик інфекції, якщо інфекція BVDV з'являється в раніше неінфікованому стаді, або якщо сприйнятлива тварина контактує з іншою сприйнятною твариною з інфекцією BVDV. BVDV передається від тварини до тварини фекально-оральним способом. Вірусне навантаження, необхідне для виникнення симптомів інфекції, корелює з типом і штамом вірусу BVD, і це корелює зі швидкістю поширення в стаді. Інфікованих тварин можна ідентифікувати по симптомах захворювання. Загальні прояви інфекції BVDV можуть включати: масові викидні, неродючість, нерівномірні статеві цикли, випадки ранньої загибелі плоду,

висихання плоду в матці, пригнічення імунітету, дизентерію, тромбоцитопенію і гіпоплазію мозку. Симптоми захворювання звичайно передують лейкопенії і зусилля дослідження до цього часу були зосереджені на ідентифікації цього факту.

Серологічні дослідження показали, що висока процентна частка великої рогатої худоби, інфікованої BVDV, в тому числі та частина, яка вважається хронічно інфікованою (PI), залишається клінічно безсимптомною. Тому, переважним способом ідентифікації інфікованих тварин є виявлення присутності самого вірусу, а не відстеження симптомів. Було розроблено декілька різних

способів тестування для виявлення вірусу BVDV і/або для виявлення тварин, інфікованих BVDV. Ці способи тестування включають: зворотну «гніздову» полімерну ланцюгову реакцію, імуноферментний аналіз (ELISA), стандартні методи виділення вірусу і імуногістохімію (Haines et al., "Monoclonal Antibody-Based Immunohistochemical Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues," Vet. Pathol., 29:27-32 (1992)).

Як PCR, так і методи виділення вірусу, завдяки властивій їм чутливості, здатні виявити дуже низькі рівні BVDV. Імуногістохімія зразків тканини, таких як зразки біопсії, одержані вищипом на вусі, є ефективною методикою виявлення тварин з PI. Технологія ELISA також ефективна, хоч вона менш чутлива, і добре придатна як універсальний діагностичний інструмент для виявлення інфекції BVDV у тварин, оскільки є недорогою, дає результати в короткий проміжок часу і для її проведення не потрібні висококваліфіковані фахівці і високоспеціалізоване лабораторне обладнання.

Способи ELISA для виявлення інфекції BVDV описані в літературі [див. патент США №6174667 і WO 99/15900, Huchzermeier et al., і патентну заявку США 20030143573], і порівнювалися з іншими способами ("Comparison of an Antigen Capture Enzyme-Linked Assay with Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction і Cell Culture Immunoperoxidase Tests for the Diagnosis of Ruminant Pestivirus Infections," Vet. Microbiol., 43:75-84 (1995)).

Даний винахід далі проілюстрований, але цим не обмежений, наступними прикладами.

Приклад 1

Захист сім'яників: Аналіз дослідження

Ряд вакцин Bovi-Shield® GOLD™ 5, складених і з BVDV типу 1, і з BVDV типу 2, був впроваджений в тваринницьку промисловість в листопаді 2003 р. для оптимізації рівня захисту плодів, який забезпечує вакцинація проти BVDV типу 2. Тут представлені результати передліцензійного дослідження ефективності, що оцінює ефективність вакцинації Bovi-Shield® GOLD™ 5 в період перед статевим дозріванням в профілактиці інфекції сім'яників в умовах активної антигенної стимуляції з викорис-

танням BVDV типу 2 (¹⁰), в порівнянні з плацебо (Bovi-Shield®-PI3-BRSV).

Проводили додаткову оцінку стану всіх бичків (n=17), включених в дослідження більш широкої антигенної стимуляції з використанням BVDV типу 2, для визначення ефективності вакцинації Bovi-Shield® GOLD™ 5 в профілактиці інфекції сім'яників, викликаній BVDV. Всі телята в первинному дослідженні являли собою 3-4-місячних, позбавлених молозива телят (бичків і теличок). На 28-й день після вакцинації препаративною формою, що містить мінімальні імунізуючі дози (рівні мінімальної імунізуючої дози встановлюються перед ліцензуванням вакцини і відображають більш низький об'єм антигенного вірусу, ніж той, який присутній в кінцевому продукті. Визначення мінімальної імунізуючої дози допомагає гарантувати те, що коли продукт буде використовуватися на рівнях, що випускаються, він буде послідовно стимулювати адекватний захист проти захворювання) і BVDV типу 1, і BVDV типу 2, у всіх телят, що були вакциновані і одержували плацебо контроль, проводили інтраназальну антигенну стимуляцію штамом 24515 нецитопатичного BVDV типу 2. Штам 24515 був виділений в Канаді при важкому спалаху BVD, внаслідок якого загинуло більше 40% худоби в уражених стадах. Після антигенної стимуляції, у всіх 10 контрольних телят розвинулося важке захворювання, що характеризувалося тривалою віремією (9-14 днів), лихоманкою в діапазоні від 105,6°F до 107,2°F протягом 4-9 днів, лейкопенією (1-9 днів), тромбоцитопенією (<100000 на 1мкл), розвитком ускладнень (в діапазоні 4-9 днів) і високою смертністю (померли 7 з 10 (70%) контрольних телят). Навпаки, тільки у 1 вакцинованого теляти розвинулася віремія, у 6 лихоманка продовжувалася протягом 1 або 2 днів, у 1 була лейкопенія протягом 1 дня, у жодного не було тромбоцитопенії і жоден не помер. Всього 18 з 20 вакцинованих телят залишалися здоровими протягом дослідження, і тільки у 2 телят в 1-й день проявлялася депресія. Ці 2 спостереження не були пов'язані з попередньою або одночасною віремією, лихоманкою, лейкопенією або тромбоцитопенією."

Оцінки інфекції сім'яників BVDV починали приблизно через 2 тижні після антигенної стимуляції. Як показано в табл. 1, зразки сім'яників брали при розтині у 2 плацебо контролів на 41-й день дослідження, а зразки біопсії від кожного з 5 контролів, що залишилися, і 10 телят, вакцинованих Bovi-Shield® GOLD™ 5, брали на 42-й день. Другий зразок також одержували у 7 телят, вакцинованих Bovi-Shield® GOLD™ 5, які ще були доступні, на 56-й день. Всі зразки тестували на BVDV, використовуючи способи виділення в культурі тканини, ампліфікації нуклеїнової кислоти (RT-nPCR) і імуногістохімічного тестування. У персоналу, що бере і тестує зразки сім'яників, не було інформації про включення тварини в ту або іншу групу лікування.

Таблиця 1

Структура дослідження: Захист сім'яників після антигенної стимуляції з використанням BVDV типу 2

Група лікування	Кількість бичків	Внутрішньом'язова вакцинація		Інтраназальна антигенна стимуляція*		День взяття зразків тканини
		День	Доза	День	Доза	
Плацебо контролю	7	0	2мл	28	5мл	41,42**
Bovi-Shield® GOLD™ 5	10	0	2мл	28	5мл	42,56***

* Ізолят 24515 одержали в University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.

** У двох з 7 вакцинованих плацебо бичків зразки брали при розтині на 41-й день, а у інших 5 бичків зразки брали на 42-й день.

*** У всіх 10 бичків зразки брали на 42-й день, а другий зразок одержували у 7 телят на 56-й, день.

Виділення вірусу і аналізи PCR виконували в лабораторії Auburn University Veterinary Pathobiology and Clinical Sciences Laboratory, а імуногістохімічний аналіз - в University of Nebraska-Lincoln Veterinary Diagnostic Center. Дані аналізував представник Pfizer Animal Health, Veterinary Medicine and Research, Biometrics, Technology and Quality, з використанням категоріальної процедури (SAS/STAT Software Changes and Enhancements through Release 6.12, SAS Institute, Cary, NC, or SAS/STAT User's Guide Version 8 і SAS Procedures Guide Version 8). Точний критерій Фішера використовували для порівняння частки тварин в кожній групі лікування щонайменше з одним позитивним

результатом тесту на BVDV. При доцільності, розраховували описові статистичні показники.

У табл.2 і на Фіг.1 підсумовані процентні частки виявлення BVDV в зразках біопсії сім'яників в групах лікування. Нуклеїнова кислота або антиген BVDV були виявлені в 6 із 7 (85,7%) зразках сім'яників, взятих у вакцинованих плацебо підданих антигенній стимуляції бичків. Навпаки, ні нуклеїнова кислота, ні антиген BVDV не були виявлені ні в одному із зразків тканини сім'яників (0,0%), взятих після антигенної стимуляції у бичків, вакцинованих Bovi-Shield® GOLD™, тобто, відмінність статистично значуща ($P \leq 0,05$).

Таблиця 2

Узагальнення результатів аналізу BVDV для зразків тканини сім'яників

Група лікування	Кількість бичків	Кількість BVDV позитивних			BVDV позитивні	% позитивних бичків
		VI	PCR	IHC		
Плацебо контролю	7	5	6	4	6	85,7% ^a
Bovi-Shield® GOLD™ 5	10	0	0	0	0	0,0% ^b

VI = виділення вірусу, PCR = полімеразна ланцюгова реакція, IHC = імуногістохімія

^{a, b} Відмінність процентів в стовпчику з різними надрядковими позначеннями більш дрібними буквами є статистично значущою ($P \leq 0,05$)

Результати дослідження демонструють і безпечність, і ефективність вакцинації бичків Bovi-Shield® GOLD™ 5. Вакцина, складена з мінімальними рівнями імунізуючої дози BVDV типу 1 і 2, не тільки не викликала інфекції сім'яників, але також ефективно захищала бичків в період перед статевим дозріванням проти інфекції сім'яників після активної антигенної стимуляції BVDV типу 2.

Застосування Bovi-Shield® GOLD™ 5 у бичків в період перед статевим дозріванням може бути важливим компонентом програм боротьби з BVD при роботах з телицями і молочними коровами. Своєчасна вакцинація може допомогти захистити бичків проти гострих інфекцій, що було пов'язано з транзитною і хронічною інфекцією сім'яників і подальшою передачею BVDV в сім'ї сприйнятливим коровам. Крім того, вакцинація бичків в період перед статевим дозріванням для профілактики

гострої інфекції BVDV в період після статевого дозрівання може допомогти збереженню якості сім'я, але яка, як було показано, уражає (знижена рухливість і морфологічні аномалії) протягом перших 60 днів після гострої інфекції BVDV.[9]

Хоч представлені тут результати демонструють успішний захист проти антигенної стимуляції BVDV типу 2, слід було б чекати, що аналогічні результати спостерігалися би після антигенної стимуляції BVDV типу 1.

Приклад 2

Захист сім'яників проти антигенної стимуляції BVDV типу 1: Аналіз дослідження

Дослідження було зроблене для оцінки ефективності Bovi-Shield® GOLD™ 5 в профілактиці інфекції сім'яників в умовах активної антигенної стимуляції з використанням BVDV типу 1. Організація дослідження являла собою генералізовану

рандомізовану блокову організацію з односторонньою структурою лікування. Весь лабораторний персонал дослідження не мав інформації про лікування.

У дослідження були включені 45 інтактних бичків м'ясної породи в період перед статевим дозріванням. Вік телят складав від 9 до 15 міс. Всі тварини були серонегативними відносно вірусу BVD типу 1 і 2, негативними відносно виділення вірусу BVD в сироватці і негативними по зворотній транскрипції - полімеразній ланцюговій реакції (RT-nPCR) по сироватці. На 42-й день мінімальні квадратичні середні величини маси тіла телят в групі плацебо (n=23) і у випробуваній групі (n=22) були відповідно 625,7±30,94 фунти і 613,5±35,96 фунти. Тварин вакцинували або плацебо (Bovi-Shield® IBR-PI3-BRSV), або Bovi-Shield® GOLD™ 5 (IBR-BVDV1-BVDV2-PI3-BRSV).

Через 28 днів після вакцинації препаративною формою, що містить мінімальні імунізуючі дози, у

всіх вакцинованих телят і тварин з групи контролю проводили інтраназальну антигенну стимуляцію штамом SD-1 нецитопатичного вірусу BVDV типу 1a, виділеного в університеті Auburn. Інтраназальну антигенну стимуляцію виконували гіпервентиляцією бичків протягом 30 секунд за допомогою розміщення пластикового мішка над ніздрями, і потім закапуючи 5мл вірусу, вирощеного в середовищі MEM з солями Earle, з додаванням 10% (об./об.) кінської сироватки, бікарбонату натрію (0,75мг/мл), L-глутаміну (0,29мг/мл) і антибіотиків (100 одиниць пеніциліну G, 100мкг стрептоміцину і 0,25мкг амфотерицину В/мл). Кінська сироватка не містила вірус B VD, за даними виділення вірусу і RT-nPCR.

Оцінки сім'яникової інфекції, викликаной BVDV, виконували на 42-й і 93-й день. Основна структура дослідження представлена нижче в табл. 3.

Таблиця 3

Структура дослідження: Захист сім'яників після антигенної стимуляції з використанням B VDV типу 1

Група лікування	Кількість бичків	Внутрішньом'язова вакцинація		Інтраназальна антигенна стимуляція*		День взяття зразків тканини
		День	Доза	День	Доза	
Плацебо контролі	23	0	2мл	28	5мл	42,93
Bovi-Shield® GOLD™ 5	22	0	2мл	28	5мл	42,93

Після антигенної стимуляції, сироватку тварин в обох групах тестували для виявлення присутності вірусу. За даними виділення вірусу з сироватки, у 18 телят в групі плацебо була віремія на 34-й день, у 9 з цих 18 віремія була також на 35-й день. У 5 телят в групі Bovi-Shield® GOLD™ 5 віремія була тільки на 34-й день. Жоден з інших тестів виділення вірусу не був позитивним у телят з будь-якої групи лікування в будь-який день дослідження.

Тести RT-nPCR також використовували для визначення наявності віремії у телят. У групі плацебо було 3, 9, 12 і 6 телят з позитивними результатами відповідно на 34, 35, 36 і 37-й день. В групі Bovi-Shield® GOLD™ 5 було 1, 1, 2 і 1 теля з позитивними результатами відповідно на 34, 35, 36 і 37-й день. Жоден інший з сироваткових тестів RT-nPCR не був позитивним у телят з будь-якої групи лікування в будь-який день дослідження.

В обох груп вимірювали величини мінімальної квадратичної середньої температури. Відмінність середніх величин була статистично значущою (P≤0,05) тільки на 36-й день (104,0°F для групи плацебо і 102,9°F для групи Bovi-Shield® GOLD™ 5).

Результати тестування, проведеного на зразках біопсії тканини сім'яників на 93-й день, показані

в табл. 4. Зразки від 6 з 23 телят (26,1%) в групі плацебо були позитивними при тестуванні RT-nPCR, тоді як всі зразки від 22 телят в групі Bovi-Shield® GOLD™ 5 були негативними. Всі зразки біопсії тканини і у групі плацебо, і у групі Bovi-Shield® GOLD™ 5 були негативними відносно виділення вірусу.

Зразки біопсії тканини від 5 з 23 телят (21,7%) в групі плацебо і у 0 з 22 телят в групі Bovi-Shield® GOLD™ 5 були позитивними при IHC тестуванні.

Всі зразки сім'я телят в обох групах лікування були негативними при тестуванні RT-nPCR для виявлення вірусу BVD на 42-й день (табл. 4). На 93-й день, 10 з 23 (43,5%) телят в групі плацебо були позитивними при тесті RT-nPCR, але всі 22 теляти в групі Bovi-Shield® GOLD™ 5 були негативними. Вірус не був виділений ні з одного зразка сім'я у будь-якої групи лікування на 42-й або 93-й день (табл. 4).

У групі плацебо 10 з 23 телят були позитивними щонайменше по одному тесту. 4 з цих 10 телят були позитивними тільки по одному тесту (RT-nPCR сім'я на 93-й день). 1 теля було позитивним по двох тестах (RT-nPCR біопсії сім'яників і RT-nPCR сім'я на 93-й день). 5 телят були позитивними за трьома тестами (RT-nPCR біопсії сім'яників, RT-nPCR сім'я і IHC біопсії на 93-й день).

Таблиця 4

Узагальнення результатів аналізу BVDV для зразків тканини сім'яників і зразків сім'я

Група	Кількість телят	Кількість позитивних за BVDV**			Кількість позитивних за BVDV***		Кількість позитивних за BVDV*		Позитивні за BVDV**	% позитивних телят
		VI	PCR	ІНС	VI	PCR	VI	PCR		
Плацебо	23	0	6	5	0	0	0	10	10	43,5% ^a
Bovi-Shield GOLD	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0%

VI=виділення вірусу, PCR=полімеразна ланцюгова реакція, ІНС=імуногістохімія

^{a, b} Відмінність процентів в стовпчику з різними надрядковими позначеннями більш дрібними буквами є статистично значущою ($P \leq 0,0002$)

** Зразки біопсії тканини сім'яників на 93-й день

*** Зразки сім'я на 42-й день

* Зразки сім'я на 93-й день

Для кожної тварини визначали присутність вірусу BVD або в сім'ї, або в біопсіях сім'яників в будь-яку точку часу, підсумовували по групі лікування і аналізували, використовуючи точний критерій Фішера, як описано в прикладі 1.

У даному дослідженні вакцинація бичків Bovi-Shield® GOLD™ 5 запобігала хронічній інфекції сім'яників вірусом BVD типу 1 і подальшому виділенню вірусу в сім'ї. Відмінність між тваринами, що одержували плацебо і вакцину щонайменше за одним позитивним тестом, що оцінюється двостороннім точним критерієм Фішера, була статистично значущою ($P=0,0002$).

Всі наведені вище патенти, патентні заявки і публікації повністю включені сюди як посилання в тій мірі, в якій вони не суперечать представленому тут опису.

Даний винахід не обмежується в об'ємі певними описаними варіантами здійснення, які призначені тільки для ілюстрації окремих аспектів винаходу. Функціонально еквівалентні композиції і способи знаходяться в межах об'єму винаходу. Дійсно, різні модифікації винаходу, в доповнення до показаних і описаних тут, стануть очевидними фахівцям в даній галузі з попереднього опису. Такі модифікації призначені для включення в об'єм прикладеної формули винаходу.

Посилання

1. Meyling A, Jensen AM. Transmission of bovine virus diarrhea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Veterinary Microbiology* 1988;17:97-105.

2. Kirkland PD, Mackintosh SG, Moyle A. The outcome of widespread use of

semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Veterinary Record* 1994;135:527-529.

3. McGowan MR, Kirkland PD. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *British Veterinary Journal* 1995; 151:263-270.

4. Kirkland PD, Richards SG, Rothwell JT, et al. Replication of bovine viral diarrhea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Veterinary Record* 1991;128:587-590.

5. Kirkland PD, McGowan MR, Mackintosh SG, et al. Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Veterinary Record* 1997; 140:124-127.

6. Voges H, Horner GW, Rowe S, et al. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. *Veterinary Microbiology* 1998;61:165-175.

7. Givens MD, Heath AM, Brock KV, et al. Detection of bovine viral diarrhea virus in semen obtained from inoculation of seronegative postpubertal bulls. *AJVR* 2003;64:428-434.

8. Niskanen R, Alenius S, Belak K, et al. Insemination of susceptible heifers with semen from a nonviraemic bull with persistent bovine virus diarrhea virus infection localized in the testes. *Reproduction in Domestic Animals* 2002;37:171-175.

9. Paton DJ, Goodey R, Brockman S, et al. Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Veterinary Record* 1989;124:63-64.

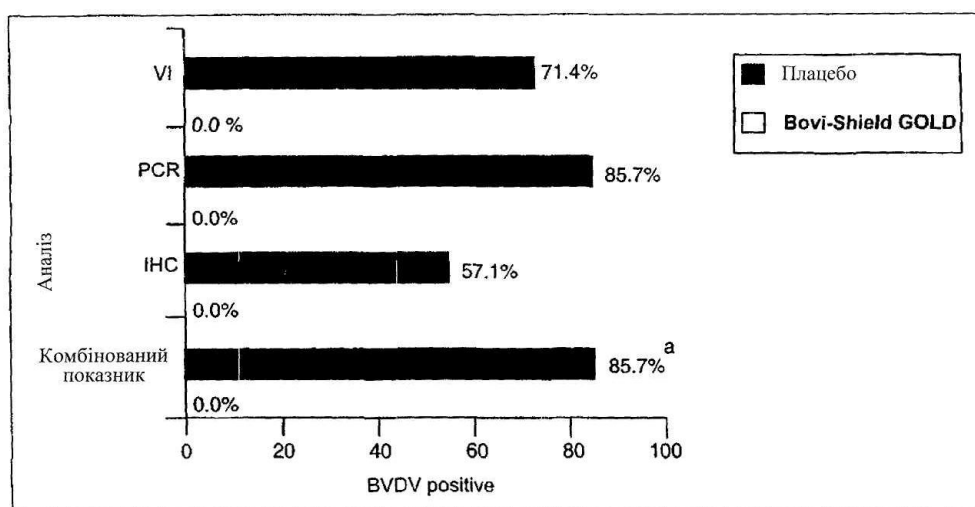


Fig. 1