



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 87815

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 39/012 (2006.01)

A61P 33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ІМУНОГЕННА АБО ВАКЦИННА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЗАХИСТУ ВІД КОКЦИДІОЗУ ТА СПОСІБ ІНДУКУВАННЯ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ У КУРЧАТ

1

2

(21) a200506633

(22) 08.12.2003

(24) 25.08.2009

(86) PCT/US2003/038903, 08.12.2003

(31) 60/432,298

(32) 09.12.2002

(33) US

(46) 25.08.2009, Бюл.№ 16, 2009 р.

(72) МАКДУГАЛД ЛЕРІ Р., US, ФУЛЕР АЛБЕРТА Л., US

(73) ЮНІВЕРСИТЕТ ОФ ДЖОРДЖІА РІСЬОРЧ ФАУНДЕЙШН ІНК., US

(56) US 5055292, 08.10.1991.

R.B. WILLIAMS: 'The development efficacy and epidemiological aspects of ParacoxTM, a new coccidiosis vaccine for chickens' MALLINCKRODT VETERINARY pages 1 - 16, XP002977824.

WILLIAMS R.B. ET AL.: 'A new protocol for a challenge test to assess the efficacy of live anticoccidial vaccines for chickens' VACCINE vol. 18, 2000, pages 1178 - 1185, XP002977825.

US 4438097, 20.03.1984.

EP A1 0506211, 30.09.1992.

(57) 1. Імуногенна або вакцинна композиція для захисту від кокцидіозу, який викликається Eimeria acervulina, Eimeria maxima, Eimeria mitis, Eimeria tenella, що складається з фармацевтично прийнятного ексципієнту і суміші спорульованих ооцист, ізольованих з ранодозріваючих ліній E. acervulina, E. maxima, E. mitis, E. tenella, де суміш складається з близько 500 ооцист E. acervulina, близько 50-100 ооцист E. maxima, близько 500 ооцист E. mitis і близько 100-250 ооцист E. tenella.

2. Композиція за п.1, яка складається з близько 500 ооцист E. acervulina, близько 100 ооцист E. maxima, близько 500 ооцист E. mitis і близько 100 ооцист E. tenella.

3. Композиція за п.1, де суміш спорульованих ооцист складається з близько 500 ооцист E. acervulina, близько 50 ооцист E. maxima, близько 500 ооцист E. mitis і близько 250 ооцист E. tenella.

4. Імуногенна або вакцинна композиція для захисту від кокцидіозу, який викликається E. acervulina, E. maxima, E. mitis, E. tenella, яка складається з фармацевтично прийнятного ексципієнту і суміші спорульованих ооцист, де суміш складається з

спорульованих ооцист, ізольованих з ранодозріваючих ліній E. acervulina, E. maxima, E. mitis, E. tenella, в якій на кожних 10 спороцист E. acervulina доводиться 1-2 спороцисти E. maxima, близько 10 спороцист E. mitis і близько 2-10 спороцист E. tenella.

5. Композиція за п.4, в якій на кожних 10 спороцист E. acervulina доводиться близько 2 спороцист E. maxima, близько 10 спороцист E. mitis і близько 2 спороцист E. tenella.

6. Спосіб викликання імунної відповіді у курчат, що включає введення ефективної кількості імуногенної або вакцинної композиції за п.1.

7. Спосіб індукування імунологічної або захисної відповіді у курчат, що включає введення ефективної кількості імуногенної або вакцинної композиції за п.1.

8. Спосіб викликання імунної відповіді у курчат, що включає введення ефективної кількості імуногенної або вакцинної композиції за п.4.

9. Спосіб індукування імунологічної або захисної відповіді у курчат, що включає введення ефективної кількості імуногенної або вакцинної композиції за п.4.

10. Спосіб за п.6, в якому ефективна кількість складає близько 500 ооцист E. acervulina, близько 50-100 ооцист E. maxima, близько 500 ооцист E. mitis і близько 100-250 ооцист E. tenella.

11. Спосіб за п.7, в якому ефективна кількість складає близько 500 ооцист E. acervulina, близько 50-100 ооцист E. maxima, близько 500 ооцист E. mitis і близько 100-250 ооцист E. tenella.

12. Спосіб за п.6, в якому ефективна кількість складає близько 500 ооцист E. acervulina, близько 100 ооцист E. maxima, близько 500 ооцист E. mitis і близько 100 ооцист E. tenella.

13. Спосіб за п.7, в якому ефективна кількість складає близько 500 ооцист E. acervulina, близько 100 ооцист E. maxima, близько 500 ооцист E. mitis і близько 100 ооцист E. tenella.

14. Спосіб за п.8, в якому ефективна кількість суміші спорульованих ооцист складає на кожних 10 спороцист E. acervulina близько 2 спороцист E. maxima, близько 10 спороцист E. mitis і близько 2 спороцист E. tenella.

(13) C2

(11) 87815

(19) UA

15. Спосіб за п.9, в якому ефективна кількість суміші споруюваних ооцист складає на кожних 10 спороцист *E. acervulina* близько 2 спороцист *E. maxima*, близько 10 спороцист *E. mitis* і близько 2 спороцист *E. tenella*.

16. Спосіб за п.6, в якому ефективна кількість, достатня для опору тварини ударній дозі, складає приблизно 100000-500000 ооцист *E. acervulina*, приблизно 10000-100000 *E. maxima*, приблизно 100000-500000 ооцист *E. mitis* або приблизно 10000-100000 ооцист *E. tenella*.

17. Спосіб за п.7, в якому ефективна кількість, достатня для опору тварини ударній дозі, складає приблизно 100000-500000 ооцист *E. acervulina*, приблизно 10000-100000 *E. maxima*, приблизно

100000-500000 ооцист *E. mitis* або приблизно 10000-100000 ооцист *E. tenella*.

18. Спосіб за п.8, в якому ефективна кількість, достатня для опору тварини ударній дозі, складає приблизно 100000-500000 ооцист *E. acervulina*, приблизно 10000-100000 *E. maxima*, приблизно 100000-500000 ооцист *E. mitis* або приблизно 10000-100000 ооцист *E. tenella*.

19. Спосіб за п.9, в якому ефективна кількість, достатня для опору тварини ударній дозі, складає приблизно 100000-500000 ооцист *E. acervulina*, приблизно 10000-100000 *E. maxima*, приблизно 100000-500000 ооцист *E. mitis* або приблизно 10000-100000 ооцист *E. tenella*.

Ця заявка заявляє пріоритет попередньої заявки США №60/432,298, що має назву «Кокцидіальна вакцина та методи її приготування і використання», поданої 9 грудня 2002 р., розкриття якої включено повністю як посилання в дану заявку. Вищезгадана заявка і всі документи, цитовані тут чи під час їх виконання («документи додатка»), і всі документи, які цитуються або на які посилаються в документах додатка, разом з будь-якими промисловими інструкціями, описами, специфікаціями продуктів і інструкціями з їх використання для будь-яких продуктів, згаданих тут чи у будь-яких документах, включених як посилання сюди, є включеними сюди посиланнями і можуть бути використані в практиці винаходу.

Даний винахід відноситься до приготування імуногенних препаратів і вакцин проти захворювань, спричинених кокцидіями. Даний винахід забезпечує також одержання ослабленої вакцини проти кокцидіозу.

Рівень техніки

Кокцидіоз - це захворювання, яке виникає внаслідок зараження одним чи кількома з багатьох видів кокцидій, які відносяться до типу Protozoa, і є внутрішньоклітинними найпростішими паразитами підтипу Арісотріхеа, роду *Eimeria*. Рід *Eimeria* включає види, які мають велике економічне значення при розведенні домашніх птахів, таких як кури, качки, гуси, цесарки, павичі, фазани, голуби й індики. Хоча кокцидіози зустрічаються практично у всіх видів птахів, паразити специфічні для кожного хазяїна, і кожен вид паразитує в одному чи в обмеженій групі близьких видів хазяїнів. З іншого боку, відомо, що хазяїни-птахи є притулком більш ніж одного виду кокцидій. До видів роду *Eimeria*, що викликають кокцидіози, відносяться *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. hagani*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. mitvati*, *E. necatrix*, *E. praecox* і *E. tenella*. Одним з видів, які найчастіше виявляються у смітті птахоферм для бройлерів є *E. acervulina*. Цей вид має величезний репродуктивний потенціал і розглядається як патогенний, оскільки призводить до значного зниження приросту ваги птаха, більш швидкого перетравлювання корму і викликає значне ураження верхнього відділу тонкого кишечника.

Серед домашніх птахів найбільш вразливі до кокцидіозу кури, що приводить до значних еконо-

мічних втрат, хоча втрати можуть бути також і серед індичок, гусей, качок і цесарок. Кокцидіоз призводить також до значних втрат серед фазанів і перепелів, які утримуються у неволі. Вплив кокцидіозної інфекції може приймати добре помітну форму спустошливої смертності поголів'я, але іншим небажаним ефектом є захворюваність і/чи втрата ваги в результаті інфекції.

Під час життєвого циклу паразит *Eimeria* проходить ряд стадій (див. як огляд патент США №6100241). Життєвий цикл починається, коли курча проковтує паразита в інфекційній стадії, відомій як споруювана ооциста, при скльовуванні корму з ґрунту чи вдихаючи пил. Стінка споруюваної ооцисти руйнується за рахунок комбінації механічного перемелювання і хімічного впливу в шлунково-кишковому тракті, що приводить до звільнення спороцисти. Спороциста потрапляє в дванадцятипалу кишку, де вона піддається впливу жовчі і травних ферментів, що супроводжується виходом зі спороцисти двох спорозоїдів.

Спорозоїди рухливі і шукають придатні епітеліальні клітини хазяїна для того, щоб проникнути в них і розмножитися. Після інфекції епітеліальної клітини паразит входить у шизонтну фазу життєвого циклу, роблячи від 8-16 до більше 200 мерозоїдів на шизонт. Після двох-пяти таких безстатевих циклів розмноження внутрішньоклітинні мерозоїди виростають і перетворюються в статеву форму, відому як самка (чи макрогаметоцит) і самець (чи мікрогаметоцит). Після запліднення макрогаметоцита мікрогаметами, що звільняються з мікрогаметоцита, формується зигота, яка створює навколо себе стінку цисти. Знову утворена ооциста виходить з інфікованого курчати з фекаліями.

За придатних умов (потрібній температурі, вологості і достатній кількості кисню в повітрі) ооциста проходить споруюляцію і входить в інфекційну стадію, перетворюючись у форму, готову до інфікування нового хазяїна, внаслідок чого захворювання поширюється. Таким чином, для переходу паразита від птаха до птаха не потрібний проміжний хазяїн.

У результаті інфікування паразитом *Eimeria* травного тракту у курей може знижуватися вага тіла, збільшуватися перетравлювання їжі, припинятися кладка яєць, і в деяких випадках настає

смерть. Збільшення інтенсивності виробництва індичок може супроводжуватися серйозними втратами, обумовленими наявністю цього паразита; дійсно, кокцидіоз став економічно важливим паразитарним захворюванням.

У минулому було використано кілька методів у намаганні контролювати кокцидіоз. До появи хіміо-терапевтичних агентів основним застосовуванним методом було поліпшення санітарних умов з використанням дезінфікантів разом з механічним видаленням підстилки, однак звичайно залишалося достатньо ооцист для передачі захворювання. Введення кокцидіостатичних агентів у корм чи питну воду в поєднанні з якісним обслуговуванням привело до деякого успіху в контролі захворювання. Було, однак, виявлено, що у таких агентів з роками відбувається зниження ефективності в зв'язку з розвитком ліній кокцидій, резистентних до агентів. Більш того, було виявлено, що деякі хіміо-терапевтичні агенти зберігаються в м'ясі, роблячи його непридатним для споживання.

Патенти США №4 438 097; 4 639 372; 4 808 404; 5 055 292; 5 068 104, 5 387 414; 5 602 033; 5 614 195; 5 636 181; 5 637 487; 5 674 484; 5 677 438; 5 709 862; 5 780 289; 5 795 741; 5 814 320; 5 843 722; 5 846 527; 5 885 568; 5 932 225; 6 001 363 і 6 100 241 мають відношення до кокцидіозних вакцин, включаючи живі і рекомбінантні вакцини. Однак у існуючих кокцидіозних вакцин є окремі недоліки, такі як знижена ефективність, перехресна інфекція з іншими паразитами (наприклад, *Clostridium* spp.) і погана ефективність для птахів. Таким чином, існує потреба в більш ефективних кокцидіозних вакцинах зі зниженою чи відсутньою перехресною інфекційністю, яка не впливає несприятливо на ефективність для птахів.

Цитування чи ототожнення будь-якого документа цієї заявки не допускається, оскільки такий документ є таким, що випереджає даний винахід.

Цей винахід заснований, зокрема, на ослабленій кокцидіозній вакцині, яка ефективна щодо вірулентного виклику, має знижену перехресну інфекційність з *Clostridium* spp. і кращу ефективність для птахів, визначену за швидкостями перетравлювання їжі в порівнянні з іншими кокцидіозними вакцинами.

Винахід відноситься до суміші споркульованих ооцист з рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*. Споркульовані ооцисти були ізолювані з насінної культури, зібраної з одного чи більше курчат, висіяної з культурою рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*, тобто одне чи більше курча були засіяні однією з ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*, що привело до наявності чотирьох груп курчат, кожна з яких була заражена різним видом *Eimeria*. Ізолювані споркульовані ооцисти були об'єднані для одержання суміші споркульованих ооцист з рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*.

У кращому втіленні винаходу були узяті SPF курчата у віці від 2 до 8 тижнів. В іншому кращому втіленні для виробництва насінної культури одне курча було засіяне ооцистами в кількості від близько 100 до близько 15000. Ще в одному кращому

втіленні споркульовані ооцисти з насінної культури були ізолювані шляхом центрифугування.

Даний винахід забезпечує також перевірку споркульованих ооцист, характерних для рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*.

Винахід відноситься до суміші споркульованих ооцист із рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*, яка складається з приблизно 10-1000 споркульованих ооцист *E.acervulina*, приблизно 10-100 ооцист *E.maxima*, приблизно 10-1000 ооцист *E.mitis* і приблизно 10-1000 ооцист *E.tenella*. Доцільна також суміш із приблизно 500 ооцист *E.acervulina*, приблизно 50-100 ооцист *E.maxima*, близько 500 ооцист *E.mitis* і близько 100-500 ооцист *E.tenella*. Ще краща суміш із приблизно 500 ооцист *E.acervulina*, близько 500 ооцист *E.maxima*, приблизно 500 ооцист *E.mitis* і близько 100 ооцист *E.tenella*.

Винахід також відноситься до конкретного співвідношення споркульованих ооцист, ізолюваних з рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*, де співвідношення *E.acervulina*:*E.maxima*:*E.mitis*:*E.tenella* становить від 10:1 до 2:10:2 до 10 (наприклад, на кожні 10 спороцист *E.acervulina* присутні близько 1-2 спороцист *E.maxima*, близько 10 спороцист *E.mitis* і від 2 до 10 спороцист *E.tenella*). Доцільне також співвідношення

E.acervulina:*E.maxima*:*E.mitis*:*E.tenella* приблизно 5:1:5:1 (наприклад, 10:2:10:2).

Винахід також відноситься до тестування ефективності суміші споркульованих ооцист із рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*. Переважно тестування відноситься до введення тварині ударної одноразової дози приблизно від 100000 до 500000 ооцист *E.acervulina*, приблизно від 10000 до 100000 ооцист *E.maxima*, приблизно від 100000 до 500000 ооцист *E.mitis* і приблизно від 10000 до 100000 ооцист *E.tenella*. У кращому втіленні ударна доза складає приблизно 200000 ооцист *E.acervulina*, приблизно від 20000 до 50000 ооцист *E.maxima*, близько 200000 ооцист *E.mitis* і приблизно від 20000 до 50000 ооцист *E.tenella*.

Даний винахід відноситься до імунізації курей, переважно курчат-бройлерів. Однак методи приготування вакцини, описані тут, можуть бути екстрапольовані на інших тварин, інфікованих *Eimeria*, зокрема, таких птахів як (але не обмежуючись цим списком) качки, гуси, цесарки, павичі, фазани, голуби, перепели й індички.

Винахід включає імуногенну чи вакцинну композицію, яка містить суміш споркульованих ооцист, ізолюваних з рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*. У кращому втіленні суміш складається з приблизно 10-100 ооцист *E.acervulina*, приблизно 10-100 ооцист *E.maxima*, приблизно 10-1000 ооцист *E.mitis* і приблизно 10-1000 ооцист *E.tenella*. Краща суміш із приблизно 500 ооцист *E.acervulina*, приблизно 50-100 ооцист *E.maxima*, приблизно 500 ооцист *E.mitis* і приблизно 100-500 ооцист *E.tenella*. Ще кращою є суміш із приблизно 500 ооцист *E.acervulina*, приблизно 100

ооцист *E.maxima*, приблизно 500 ооцист *E.mitis* і приблизно 100 ооцист *E.tenella*.

Винахід також відноситься до імуногенної чи вакцинної композиції, яка містить конкретне співвідношення споруваних ооцист, ізольованих з рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*, де відношення *E.acervulina*:*E.maxima*:*E.mitis*:*E.tenella* становить від приблизно 10:1 до 2:10:2 (наприклад, на кожні 10 спорист *E.acervulina* присутні від 1 до 2 спорист *E.maxima*, приблизно 10 спорист *E.mitis* і приблизно 2-10 спорист *E.tenella*). Краще співвідношення *E.acervulina*:*E.maxima*:*E.mitis*:*E.tenella* є приблизно рівним 5:1:5:1 (тобто, 10:2:10:2).

Винахід також забезпечує викликання імунної відповіді або індукцію імунологічної чи захисної відповіді, що включає введення ефективної кількості імуногенної чи вакцинної суміші, яка складається зі споруваних ооцитів, ізольованих з рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella* для викликання чи індукції відповіді у тварин. Переважно тваринами, у даному випадку, є птахи, такі як (але не обмежуючись цим списком) кури, качки, гуси, цесарки, павичі, фазани, голуби, перепели й індички. У найкращих втіленнях птахами є кури, переважно курчата-бройлери. Спосіб викликання імунної відповіді чи індукції імунологічної відповіді може також включати введення ад'юванта, цитокіну або того і іншого.

Переважаючою ефективною кількістю для викликання імунної відповіді чи індукції імунологічної або захисної відповіді є від приблизно 10 до 1000 ооцист *E.acervulina*, від приблизно 10 до приблизно 100 ооцист *E.maxima*, від приблизно 10 до 1000 ооцист *E.mitis* і від приблизно 10 до 1000 ооцист *E.tenella*. Переважаючою ефективною кількістю становить близько 500 ооцист *E.acervulina*, близько 50-100 ооцист *E.maxima*, приблизно 500 ооцист *E.mitis* і приблизно від 100 до 500 ооцист *E.tenella*. Краща комбінація ефективної кількості - це приблизно 500 ооцист *E.acervulina*, приблизно 100 ооцист *E.maxima*, приблизно 500 ооцист *E.mitis* і близько 100 ооцист *E.tenella*. В іншому втіленні ефективної кількості достатньо для опору ударній дозі від приблизно 100000 до приблизно 500000 ооцист *E.acervulina*, від приблизно 10000 до приблизно 100000 ооцист *E.maxima*, від приблизно 10000 до 500000 ооцист *E.mitis* чи від приблизно 10000 до 100000 ооцист *E.tenella* на тварину. Краще, якщо ударна доза становить від приблизно 200000 ооцист *E.acervulina*, від приблизно 20000 до приблизно 50000 ооцист *E.maxima*, приблизно 200000 ооцист *E.mitis* чи від приблизно 20000 до приблизно 50000 ооцист *E.tenella*.

Ефективна кількість для викликання імунної відповіді чи індукції імунологічної або захисної відповіді може бути також виражена як співвідношення споруваних ооцист із рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*, де співвідношення *E.acervulina*:*E.maxima*:*E.mitis*:*E.tenella* складає приблизно 10:1 до 2:10:2 до 10 (наприклад, на кожні 10 спорист *E.acervulina* припадає приблизно 1-2 спориста *E.maxima*, близько 10 спорист *E.mitis* і приблизно 2-10 спорист

E.Tenella). Доцільне співвідношення *E.acervulina*:*E.Maxima*:*E.mitis*:*E.tenella* приблизно 5:1:5:1 (наприклад, 10:2:10:2).

З огляду на поширеність і патогенність різних видів *Eimeria* вдала ослаблена кокцидіальна вакцина повинна містити найменшу кількість ліній *Eimeria*, достатніх для викликання імунної відповіді чи індукції імунологічної або захисної відповіді, яка не є патогенною для реципієнта вакцини. Представлені співвідношення відносяться до комбінації ооцист із чотирьох специфічних рано дозріваючих ліній *Eimeria*, а саме: *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*, які приводять до ефективної і непатогенної вакцини. Додавання інших ліній *Eimeria*, таких як *E.brunetti*, *E.necatrix* і *E.praesox* може бути несприятливим з точки зору ефективності, перехресної інфекції чи патогенності вакцини. Оскільки *E.brunetti*, *E.necatrix* і *E.praesox* не є необхідними для ефективності кокцидіозної вакцини, виявленої тут, було б доцільно виключити ці лінії з вакцини представленого винаходу.

Відзначимо, що в цьому описі і, зокрема, у формулі винаходу такі терміни як «містить», «є» і подібні можуть мати значення, приписане законом про патенти США, тобто вони можуть означати «включає», «включений», «включаючий» і подібне, і терміни, такі як «є по суті» і «складається власне кажучи» мають значення, запропоноване ім законом про патенти США, тобто вони дозволяють не докладно повідомляти елементи, але виключати елементи, які знайдені в рівні техніки чи які впливають на основну чи нову характеристику винаходу. Ці та інші втілення розкриті і/або є очевидними завдяки наступному докладному опису.

Даний винахід, зокрема, засновано на ослабленій кокцидіальній вакцині, яка ефективна щодо вірулентного виклику, має знижену перехресну інфекційність з *Clostridium* spp. і має більш високу ефективність для птахів, що визначено за швидкістю перетравлювання їжі в порівнянні з іншими кокцидіальними вакцинами.

Винахід відноситься до суміші споруваних ооцист із рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*. Спорувані ооцисти були ізольовані з насінної культури, зібраної з одного чи більше курчат, засіяних культурою рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*, тобто одне чи більше курча були засіяні однією з рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*, що дало 4 групи курчат, кожна з яких була засіяна різними лініями *Eimeria*.

Переважаючою лінією *Eimeria* є рано дозріваючою лінією. Рано дозріваючі лінії походять з поля ліній і не є патогенними, якщо вводяться в правильній дозі. У кращому втіленні лінія *Eimeria* є рано дозріваючою лінією відповідних мікроорганізмів, як описано в статті (Avian Pathology, 17: 305-314, 1988), озаглавленій "Eimeria of American Chicken: Characteristics of Six Attenuated Strains Produced by Selection for Precocious Development", P.L. Long and Joyce K. Johnson, опис як посилання включено в цей опис. Коротко, мікроорганізми ослаблені селекцією на ранньому передознаковому періоді, тобто, коли ооцисти вперше були виявлені у фе-

каліях. Такі методи добре відомі кожному фахівцю і є рутинними експериментами.

Вихідні культури лінії *Eimeria* для насінних культур включають, але не обмежуються наступним. Вважають, що батьківська *Eimeria acervulina*, отримана з лабораторії T.K. Jeffers at Hess and Clark Laboratories у 1969р., була ізолювана доктором M.M. Farr at USDA, Beltsville, MD і походила з єдиного ооциста. Культура *Eimeria maxima* походить від схрещеної суміші 10 очищених ізолятів, отриманих із Джорджії, Делавера, Мериленда, Вірджинії і Техаса. Батьківська культура *Eimeria mitis* була виділена в Gainesville, Джорджія у липні 1978р. і була очищена шляхом ізоляції єдиної ооцисти. Батьківська культура *Eimeria tenella* була отримана з культури, що підтримується у Пенсільванії (Pennsylvania State University) доктором Patten, дещо раніше 1960-х і була придбана Університетом Джорджії в 1982р. Інші рано дозріваючі лінії *Eimeria* включають LSI00, рано дозріваючу *E. acervulina*, ізолят 809-13, і LS, рано дозріваючу лінію *E. mitis*, отримані з Merk Research Laboratories, які були отримані від доктора Peter Long. Альтернативно, ослаблені рано дозріваючі лінії *Eimeria*, які зберігалися у вигляді спороцист у European Collection of Animal Cell Cultures «ECACC» як патентний депозит (див. наприклад, патент США №5 055 2 92, розкриття якого включено в цей як посилання), є корисним набором культур для генерації насінних культур *Eimeria*, описаних тут. Специфічно, депозити *E. acervulina* (депозит №ECACC 86072203), *E. maxima* (депозит №ECACC 86112011 і 86112012), *E. mitis* (депозит №ECACC 86072206) і *E. tenella* (депозит №ECACC 86072201), як описано в патенті США №5 055 292, є корисними вихідними культурами для насінних культур даного винаходу.

Бажано мікроорганізми ослаблені їхньою селекцією для передчасного розвитку, як описано раніше. Іншим вигідним втіленням є те, що культури не містять патогенів. Вихідні культури, описані вище, переважно підтримувалися на рідкій чи газоподібній фазі рідкого азоту. Такий метод відомий фахівцям.

Краще, якщо вік курчат становить від двох до восьми тижнів. Споруювані ооцисти були успішно пасирувані, без обмеження пасажів, у курчатах доти, доки число ооцист не стало достатнім для використання їх як насінних для продукції. Переважно культури повинні бути витримані довше, ніж 12 місяців, для того щоб підтримати життєздатність/інфекційність.

У кращому втіленні необхідні умови підтримувалися для кожного виду *Eimeria*. Переважно достатній об'єм споруюваних ооцист (для посіву) змішувався з їжею або, альтернативно, вводився орально для забезпечення кожного курчати мінімальною дозою. У кращому втіленні для виробництва насінної культури на кожне курча припадало близько 5000-15000 ооцист.

Споруювані ооцисти з насінної культури були ізолювані з фекалій птахів переважно центрифугуванням. У кращому втіленні це було зроблено в такий спосіб. Краплини фекалій гомогенізували в приблизно 10% (вага/об'єм) воді. Великі частки

видаляли, пропускаючи гомогенат крізь сітку. Тверді частки були відділені або центрифугуванням, або фільтруванням, або витримуванням при 5+3°C до 24 годин. Якщо тверді частки були відділені витримуванням при 5+3°C, вони надалі концентрувалися центрифугуванням. Супернатант відкидали, і тверді частки ресуспендували в насиченому водному розчині NaCl (80% вага/об'єм). Отриманий розчин центрифугували. Ооцисти були зібрані (вилучені) зверху рідини і ресуспендовані у воді. Необов'язково рідина, що залишилася була розведена до 20-40% NaCl водою і центрифугувана. Осад потім ресуспендували в насиченому розчині NaCl і рецентрифугували доти, доки знаходили додаткові ооцисти. Ооцисти були промиті не більше, ніж два рази. Ооцисти були відмиті від солі повторними циклами ресуспендування/центрифугування, слідом за якими проводили ресуспендування в 0,5% розчині гіпохлориту натрію протягом 10-15хв. Потім ооцисти були відмиті від гіпохлориту натрію повторюваними (3X) стадіями центрифугування і ресуспендування. Останнє ресуспендування проведено в 2,5% водному розчині біхромату калію (K_2CrO_7). Потім ооцисти були перенесені в посуд для споруюлції. Споруюлцію полегшували барботажем суспензії повітрям у період, який не перевищував 72 години при 27+3°C. Після споруюлції ооцисти були витримані при 27+3°C до виробництва кінцевого продукту.

В іншому втіленні ооцисти, які повинні бути використані відповідно до даного методу вакцинації, можуть бути отримані кожним з декількох методів, відомих фахівцям. Такі методи включають описані Ryley et al., Parasitology 73:311-326, 1976, P.L. Long et al., Folia Veterinaria Latina V#3, 201-217, 1976 і патент США №6 627 205, опис якого повністю включено в дану заявку як посилання. Відповідно до одного методу комерційні курчата-бройлери у віці приблизно 2 тижні були інфіковані певними видами *Eimeria* оральним введенням придатної дози споруюваних ооцист. За цим слідувала добре відома процедура збору й очищення ооцист з інфікованих птахів. Для більшості видів *Eimeria* фекалії збираються через 5-7 днів після інфікування, змішуються і фільтруються для видалення осаду, потім центрифугуються зі швидкістю, достатньою для осадження фекального матеріалу, що залишається. Осад ресуспендується в насиченому сольовому розчині, у якому ооцисти флотують, і велика частина забруднюючого сміття може бути вилучена центрифугуванням. Суспензія ооцист повторно відмивається для видалення солей і ресуспендується в розчині біхромату калію (2,5% вага/об'єм). Суспензія ооцист інкубується при 29°C і перемішуванні (наприклад, 140 оборотах за хв.) протягом приблизно 72 годин для індукування споруюлції ооцист. Альтернативно, ооцисти можуть бути оброблені гіпохлоритом калію і потім споруювані. Кількість споруюваних ооцист/мл визначається прямим підрахунком з використанням гемоцитометра чи предметного скла Макмастера, і культура зберігається в холодильнику до використання.

Для приготування спороцист біхромат калію відмивається від суспензії ооцист, описаної вище,

повторним відмиванням ооцист, яке включає збирання ооцист центрифугуванням і ресуспендуванням у деіонізованій чи дистильованій воді. Коли біхромат був відмитий, що оцінювалося за відсутністю жовто-жовтогогарячого забарвлення, суспензія ооцист змішується з рівним об'ємом гіпохлориту натрію (відбілювання) і інкубується при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. Відбілювач потім видаляється повторними відмиваннями, і ооцисти ресуспендуються у фізіологічному розчині чи деіонізованій воді. Ооцисти можуть бути зруйновані для звільнення спороцист шляхом змішування ооцист зі скляними бусинами діаметром 1-4мм і струшування вручну, міксером вортекс або в інкубаторі-шейкері, чи з використанням ручного гомогенізатора. Незруйновані ооцисти і стінки ооцист можуть бути відділені від звільнених спороцист диференціальним центрифугуванням у 50% розчині перколлу (PERCOLL), колоїдної суспензії покритих полівінілпіролідом кремнієвих часток (що їх продає Pharmacia Biotech) чи 1 М сахарозою, як описано в Dulski et al., Avian Diseases, 32:235-239, 1988. У даному методі вакцинації спороцисти можуть бути використані або змішаними, або відділеними від незруйнованих ооцист і стінок ооцист. Переважно порція спороцист відокремлюється від ооцист і стінок ооцист.

У кращому втіленні технічні вимоги для прийнятного збору посівної культури є наступними. По-перше, було визначене співвідношення споруюваних ооцист до загальної кількості ооцист. Прийнятним розглядався тільки збір, у якому кількість споруюваних ооцист дорівнювало чи перевищувало 40% споруючій. По-друге, розмір, форма і зовнішній вигляд кожного збору повинен бути характерним для виду, що планується продукувати. Наприклад, параметри, розглянуті для характеристики видів *Eimeria*, включають (але не обмежуються) технології, засновані на ДНК, визначення плавучої щільності ДНК, зміна активності ферментів, специфічність відносно хазяїна і сайту, імунологічну специфічність, патогенність, передознаковий період, час споруючій (див, наприклад, Long & Joyner, J Protozool. 1984 Nov; 31(4):535-41 and Shirley, Acta Vet Hung. 1997; 45 (3): 331-47, розкриття якого повністю включено в даний опис як посилання).

Ізольовані споруювані ооцисти посівної культури, описані тут, комбінуються для створення суміші споруюваних ооцист із рано дозрівачих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*. В основному, суміш складається приблизно з 10-1000 ооцист *E.acervulina*, близько 10-1000 ооцист *E.maxima*, близько 10-1000 ооцист *E.mitis* і близько 10-1000 ооцист *E.tenella*. Переважно кількість споруюваних ооцист різного виду в суміші складає близько 125-500 ооцист *E.acervulina*, близько 25-100 ооцист *E.maxima*, близько 125-500 ооцист *E.mitis* і близько 25-500 ооцист *E.tenella*. В одному втіленні найменша доза складає близько 125 ооцист *E.acervulina*, близько 25 *E.maxima*, близько 125 ооцист *E.mitis* і близько 25 ооцист *E.tenella*. В іншому втіленні середня доза складає близько 250 ооцист *E.acervulina*, близько 50 ооцист *E.maxima*, близько 250 ооцист *E.mitis* і близько 50 ооцист

E.tenella. У ще одному втіленні найвища доза складає близько 500 ооцист *E.acervulina*, близько 100 ооцист *E.maxima*, близько 500 ооцист *E.mitis* і близько 100 ооцист *E.tenella*.

Винахід також стосується конкретних співвідношень споруюваних ооцист, ізольованих з рано дозрівачих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*, де співвідношення *E.acervulina* : *E.maxima* : *E.mitis* : *E.tenella* складає від близько 10:1 до 2:10:2 до 10 (тобто на кожні 10 спороцист *E.acervulina* припадає близько 1-2 спороцист *E.maxima*, близько 10 спороцист *E.mitis* і близько 2-10 спороцист *E.tenella*). Краще співвідношення *E.acervulina*:*E.Maxima*:*E.mitis*:*E.tenella* складає приблизно 5:1:5:1 (тобто, 10:2:10:2).

Переважно в суміші знаходиться близько 500 ооцист *E.acervulina*, близько 50-100 ооцист *E.maxima*, близько 500 ооцист *E.mitis* і близько 100-500 ооцист *E.tenella*. У кращому втіленні суміш складається з близько 500 ооцист *E.acervulina*, близько 100 ооцист *E.maxima*, близько 500 ооцист *E.mitis* і близько 100 ооцист *E.tenella*.

Переважно ооцисти суспендуються в консервуючому розчині: 0,01М буферний розчин, який містить гентаміцин. В іншому втіленні ооцисти суспендовані в кожному з різних консервантів або органічних кислот, таких як (але не обмежуючись цим переліком) оцтова кислота, лимонна кислота, біхромат калію чи пропіонова кислота. Наприклад (але без обмежень), власне кажучи, стерильний 0,01М фосфатний буферний розчин, який містить не більше, ніж 30мг/мл гентаміцину, використовується для одержання 2мл на пляшку з 2000 доз, 5мл на пляшку з 5000 доз і 10мл на пляшку для 10000 доз. Переважно ооцисти зберігаються в стерильних пляшечках з боросилікатного скла. Наприклад (але не як обмеження), ооцистами асептично заповнюють пляшечки для вакцини з використанням напівавтоматичного диспенсера, механічно чи вручну вставляються пробки, зверху поміщають алюмінієві прошарки і запечатують.

В іншому втіленні ооцисти суспендуються в стерильній дистильованій воді, яка містить суспендуючий агент, наприклад, полісахаридний суспендуючий агент, такий як клей, тобто ксантановий клей чи акацієвий клей. Підійде целюлоза, тобто карбоксиметилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза чи мікрокристалічна целюлоза, карагенан, альгінат натрію, чи пектин крохмаль; поліпептидний суспендуючий агент, такий як желатин, синтетичний полімерний суспендуючий агент, такий як поліакрилова кислота; чи силікат магнію й алюмінію (див. наприклад, патент США №5 055 292, розкриття якого повністю включено в дану заявку як посилання).

Даний винахід забезпечує також верифікацію споруюваних ооцист, характерних для рано дозрівачих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis*:*E.tenella*. Переважно всі ооцисти ослаблені, оскільки вони є рано дозрівачими. В іншому прийнятному втіленні розмір, форма і зовнішній вигляд кожного збору ооцист повинні бути характерні для виду, що планується виробляти. І ще в одному прийнятному втіленні суміш споруюваних ооцист

тестується на чистоту, зовнішні патогени і/чи викликану ними смерть чи серйозні ураження піддослідних тварин, наприклад, курчат. Характеристики різних видів *Eimeria* повністю описані Long P.L. and Reid W.M. (1982: A Guide for the Diagnosis of Coccidiosis in Chickens; University of Georgia Research Report 404) і Joyner L.P. (1978: Identification and Diagnosis, Avian Coccidiosis, Poultry-Science Symposium N13, British Poultry Science Ltd), розкриття яких повністю включено в дану заявку як посилення.

Даний винахід також стосується тестування ефективності суміші споруюваних ооцист із рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*. Переважно це тестування проводиться введенням тварині ударних доз приблизно від 100000 до 500000 ооцист *E.acervulina* і приблизно від 10000 до 100000 ооцист *E.maxima*, приблизно від 100000 до 50000 ооцист *E.mitis* чи приблизно від 10000 до 100000 ооцист *E.tenella*. У ще кращому втіленні ці ударні дози становлять приблизно 200000 ооцист *E.acervulina*, приблизно від 20000 до 50000 ооцист *E.maxima*, приблизно 200000 ооцист *E.mitis* чи приблизно від 20000 до 50000 ооцист *E.tenella*.

Винахід також відноситься до тестування ефективності суміші споруюваних ооцист із рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella* для птахів. Ефективність перетравлювання їжі визначається як кількість фунтів корму, необхідного для виробництва фунта м'яса. Загальний результат складає 1,9-2,0. Одна точка в переварюванні корму на загальному жаргоні складає 0,1, що рівне приблизно 0,5% (половині відсотка). Якщо використовувати метричну систему, переварювання їжі дорівнює відношенню - кг корму на кг м'яса і пропорційне вищевказаному.

Даний винахід відноситься до імунізації курчат, переважно курчат-бройлерів. Однак метод приготування вакцини, описаний тут, може бути екстрапольований на інших тварин, інфікованих *Eimeria*, зокрема, таких птахів як (але не обмежуючись цим переліком) курей, качок, гусей, цесарок, павичів, фазанів, голубів, перепелів чи індичок, або, у менш прийнятному втіленні, кроликів.

Винахід охоплює імуногенну чи вакцинну препарат, який містить суміш споруюваних ооцист, ізольований з рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*. Ізольовані споруювані ооцисти змішані для виробництва композиції споруюваних ооцист із рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*. Звичайно суміш складається приблизно з 10-1000 ооцист *E.acervulina*, приблизно 10-100 ооцист *E.maxima*, приблизно 10-1000 ооцист *E.mitis* і приблизно 10-1000 ооцист *E.tenella*. Переважно діапазон кількостей споруюваних ооцист у суміші складає від близько 125 до 500 ооцист *E.acervulina*, близько 25-100 ооцист *E.maxima*, близько 125-500 ооцист *E.mitis* і близько 25-250 ооцист *E.tenella*. В одному втіленні мінімальна доза складає близько 125 ооцист *E.acervulina*, близько 25 ооцист *E.maxima*, близько 125 ооцист *E.mitis* і близько 25 ооцист *E.tenella*. В іншому втіленні середня доза складає близько 250 ооцист *E.acervulina*, близько 50 оо-

цист *E.maxima*, близько 250 ооцист *E.mitis* і близько 50 ооцист *E.tenella*. В іншому втіленні більша доза складає близько 500 ооцист *E.acervulina*, близько 100 ооцист *E.maxima*, близько 500 ооцист *E.mitis* і близько 100 ооцист *E.tenella*.

Переважаюча композиція містить близько 500 ооцист *E.acervulina*, близько 50-100 ооцист *E.maxima*, близько 500 ооцист *E.mitis* і близько 100-500 ооцист *E.tenella*. У більш доцільному втіленні композиція містить близько 500 ооцист *E.acervulina*, 100 ооцист *E.maxima*, 500 ооцист *E.mitis* і 100 ооцист *E.tenella*.

Композиція також відноситься до конкретних співвідношень споруюваних ооцист, ізольованих з рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis* і *E.tenella*, де співвідношення *E.acervulina*:*E.maxima*:*E.mitis*:*E.tenella* складає від близько 10:1 до 2:10:2 до 10 (тобто 10 споруюцих *E.acervulina* до приблизно 1-2 споруюцих *E.maxima* до приблизно 10 споруюцих *E.mitis* і до приблизно 2-10 споруюцих *E.tenella*). Переважаюче співвідношення *E.acervulina*:*E.maxima*:*E.mitis*:*E.tenella* складає 5:1:5:1 (тобто 10:2:10:2).

Таким чином, термін «імуногенна композиція» означає будь-яку композицію, здатну, будучи введеною тваринам, наприклад, птахам, викликати захисну імунну відповідь проти паразита чи антигену або імуногенного епітопа. Термін «вакцина» означає тут будь-яку композицію, здатну після одноразового введення тварині, наприклад, птаху, індукувати захисну імунну відповідь проти вірусу чи ефективно захищати тварину проти інфікування паразитом.

Імуногенні препарати чи вакцини відповідно до винаходу можуть також включати патоген чи імуноген, антиген чи епітоп патогена, або, принаймні, один імуноген, антиген або епітоп іншого патогена, паразита чи вірусу, тобто кокцідіальна вакцина є комбінованою з іншими пташиними вакцинами. Такий імуноген, антиген чи епітоп може бути в тому числі і бактеріальним, паразитарним чи вірусним, або інактивованою, чи ослабленою формою патогена, паразита чи вірусу. Винахід також охоплює набори для приготування цих комбінованих препаратів, а також методи приготування цих комбінованих препаратів і використання компонентів комбінованих препаратів для приготування комбінованих препаратів. Відповідно, винахід забезпечує набір для приготування комбінацій імуногенних компонентів чи компонентів вакцини за винаходом, наприклад, такий набір, що складається з (а) організму, патогена чи вірусу, чи антигену, чи епітопа (переважно патогена, згаданого вище) і (б) організму, патогена, чи вірусу, чи імуногена, чи антигену епітопа (переважно цього вірусу чи імуногена, антигену, чи епітопа, але інші патогени, як згадані тут, також розглядаються), що відрізняються (а) роздільними контейнерами, необов'язково в тому ж упакунні чи необов'язково з інструкціями для змішування і/чи введення.

Імуногенні препарати і/чи вакцини відповідно до винаходу можуть включати культуру чи препарат *Eimeria* (наприклад, інактивовані чи ослаблені *Eimeria* чи імуноген, чи антиген цього епітопа) і, принаймні, імуноген, антиген чи епітоп іншого па-

тогена птахів (включаючи без обмежень патоген, у інактивованій чи ослабленій формі). У пташині мультівалентні імуногенні композиції і мультівалентні вакцини включаються додаткові патоген(и) птахів, такі як: додаткові антиген(и) птахів чи імуноген(и), чи епітоп(и) цього і/чи експресованими мультівалентними імуногенними композиціями і мультівалентними вакцинами є віруси, хвороби чи патогени хвороби вірусу Марека (MDV) (тобто серотипами 1 і 2, переважно 1), вірусу хвороби Ньюкастла (NDV), інфекційного вірусу бронхіту (IBV), інфекційного вірусу анемії чи вірусу анемії курчат (PMDV2 до PMDV7), інфекційного вірусу ларинготрахеїту (ILT), інфекційного вірусу хвороби бурси (IMBDV), вірусу енцефаломієліту чи вірусу пташиного енцефаломієліту (AEV) чи вірусу пташиного лейкозу (ALV), геморагічного вірусу індичок (HEV), вірусу пневмовірозу (TRTV), вірусу пташиної чуми (грип птахів), вірусу гідроперикардиту птахів, пташині реовіруси, кокцидіози, синдром руйнування яйця (EDS76), вірусу чуми птахів, іктуліозного гепатиту (аденовірус), лімфопроліферативної хвороби індичок, ретикулоендотеліозу курчат, ретикулоендотеліозу індичок, ентероротовіруси і вірус рінотрахеїту індичок, *Clostridium* spp., *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Haemophilus avium*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella multocida* та їх суміші. Для MDV імуногеном є переважно gB і/чи gD, наприклад, gB і gD; для NDV імуногеном переважно є HN і/чи F, наприклад, HN і F; для IBV імуногеном переважно є VP2; для TRTV імуногеном переважно є S (більш вигідним S1) і/чи M, і/чи N, наприклад, S (чи S1) і M і/чи N; для CAV імуногеном переважно є VP1 і/чи VP2; для ILTV імуноген переважно gB і/чи gD для AEV імуногеном переважно є env і/чи gag/pro, наприклад, env і gag/pro; для HEV імуногеном переважно є 100K білок і/чи гексон; для TRTV імуногеном переважно є F і/чи G і для пташиної чуми імуногеном переважно є HA і/чи N, і/чи NP, наприклад, HA і N і/чи NP. Таким чином, винахід також включає методи виготовлення цих композицій, також як і їхні набори (кити).

Імуногенна композиція чи вакцина відповідно до винаходу також містить такий додатковий імуногенний компонент (додатковий імуноген, антиген чи епітоп), що має перевагу, оскільки він індукує імунну відповідь чи захист проти декількох інфекцій чи хвороб або містить агент, що є причиною цього. Цей додатковий імуногенний компонент може бути ослабленим чи інактивованим мікроорганізмом, рекомбінантним констрактом чи субодинами (наприклад, білками, глікопротеїнами, поліпептидами чи епітопами). Процедури визначення епітопа, такі як виробництво бібліотеки пептидів, що перекриваються, (Hemmer et al., Immunology Today, 1998, 19(4), 163-168), Pepscan (Geysen H.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1984, 81(13), 3998-4002; Geysen H.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1984, 81(13), 3998-4002; Geysen H.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1985, 82(1), 178-182; Van der Zee R et al., Eur. J. Immunol, 1989, 19(1), 43-47; Geysen H.M., Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health, 1990, 21(4), 523-533; Multipin Peptide Synthesis Kits de Chiron) і алгоритми (De Groot A et

al., Nature Biotechnology, 1999, 17, 533-561) можуть бути використані в практиці винаходу для визначення епітопів імуногенів, антигенів, поліпептидів, глікопротеїнів і подібного без зайвих експериментів. За допомогою цієї інформації можна сконструювати молекули нуклеїнової кислоти, які кодують такий епітоп, використовуючи ці знання і навички, можна сконструювати вектори і конструкти, наприклад, рекомбінантні віруси або вектори чи плазмиди, які експресують імуногени, епітопи чи антигени; і усе без зайвих експериментів.

Фармакологічно чи ветеринарно прийнятні переносники чи носії або ексципієнти добре відомі фахівцям, наприклад, 0,9% розчин NaCl чи фосфатний буфер. Наприклад, фармакологічно чи ветеринарно прийнятні переносники чи носії або ексципієнти можуть бути будь-яким препаратом чи комбінацією препаратів, які полегшують введення вектора (чи білка, експресованого вектором за винаходом *in vitro*); переважно чи переносники чи носії ексципієнти можуть полегшувати трансфекцію і/чи поліпшувати консервацію вектора (чи білка). Дози й об'єм доз обговорюються в базових описах методів імунізації і вакцинації, а також можуть бути визначені фахівцем у даній області з цього прочитаного розкриття, разом зі знанням предмета без додаткових експериментів.

Імуногенні композиції і вакцини відповідно до винаходу можуть включати чи містити, власне кажучи, один або більше ад'ювантів. Ад'ювантами, які підходять для використання в практиці даного винаходу, є (1) полімери акрилової і метакрилової кислоти, малеїновий ангідрид і полімери алкенілових полімерів, (2) імуностимулючі послідовності (ISS), такі як олігодезоксирибонуклеотидні послідовності, які мають один чи більше неметильованих одиниць CpG (Klinman et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1996, 93, 2879-2883; WO98/16247), (3) емульсія олії у воді, така як емульсія SPT, описана на стор.147 книги «Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach», опублікованої M. Powell, N. Newman, Plenum Press 1995, і емульсія MF59, описана на стор.183 тієї ж роботи, (4) ліпіди з позитивно зарядженими угрупованнями (катионні ліпіди), такі як четвертинні солі амонію, (5) цитокіни, (6) гідроксид і фосфат алюмінію чи (7) інші ад'юванти, обговорювані в будь-яких цитованих документах і включених як посилання в дану заявку, чи (8) будь-які їх комбінації і суміші.

Емульсія олії у воді (3), що особливо сприятлива для вірусних векторів, може мати як основу: легку рідку парафінову олію (європейського фармакопейного типу), ізопреноїдну олію, таку як сквалан, сквален, олія, що утворюється при олігомеризації алкенів, наприклад, ізобутен або децен, ефіри кислот чи спиртів, які мають нерозгалужені алкільні угруповання, такі як рослинні олії, етилолеат, пропіленгліколь, ди(каприлат/капрат), гліцерин три(каприлат/капрат) і пропіленгліколідолеат, або ефіри розгалужених жирних спиртів чи кислот, особливо ефіри ізостеринової кислоти.

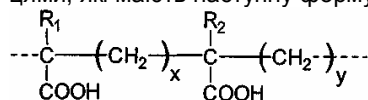
Для утворення емульсії олія використовується в комбінації з емульгаторами. Емульгаторами можуть бути неіонні сурфактанти, такі як ефіри сорбітану, маніду (наприклад, олеат ангідроманітол),

гліцерину, чи полігліцерину пропіленгліколя й олеїнової, ізостеринової, рицинололеїнової чи гідрокистеаринової кислот, які оптично цексиліровані, чи співполімерні блоки поліоксипропілен-поліоксиетилен, такі як Плюнорік (Plunoric), наприклад, L121.

Серед ад'ювантів-полімерів перевага віддається полімерам перехреснозшитих акрилової і метакрилової кислоти, особливо зшитих поліалкенильними ефірами цукрів або поліспиртів. Ці препарати відомі під назвою карбомер (Pharmecorpora, vol.8, №2, червень 1996). Фахівець може також звернутися до патенту США №2 909 462, який забезпечує такий акриловий полімер, поперечно зшитий за допомогою полігідроксильної сполуки, яка має, принаймні, три гідроксильних групи, переважно не більше восьми таких груп, атоми водню, принаймні, трьох таких груп заміщені ненасиченими аліфатичними радикалами, що мають, принаймні, два атоми вуглецю. Переважно це радикали, які містять від 2 до 4 атомів вуглецю, наприклад, вініли, аліли й інші етилен-подібні ненасичені групи. Ненасичені радикали можуть також містити інші замісники, такі як метил. Продукти, що продають під назвою карбопол (BF Goodrich, Ohio, USA), особливо прийнятні. Вони поперечно зшиті алілсахарозою чи алілпентаеритриолом. Серед них можна послатися на карбопол 974P, 934P і 971P.

Кращими сополімерами, похідних алкеніл-малеїнового альдегіду, є ЕМА (Monsanto), які є нерозгалуженими чи поперечно зшитими сополімерами етилену і малеїнового альдегіду, і вони поперечно зшиті, приміром, дивініловим ефіром. Можна також зробити посилання на J. Fields et al., Nature 186: 778-780, червень 4, 1960.

Полімери акрилової і метакрилової кислоти й ЕМА утворюються переважно основними одиницями, які мають наступну формулу:



у якій:

R_1 і R_2 , можуть бути однаковими або різними, і є H чи CH_3 ,

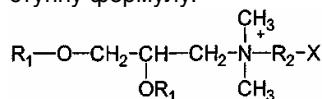
- $x=0$ або 1, переважно $x=1$;

- $y=1$ або 2, причому - $x+y=2$.

Для ЕМВ $x=0$ і $y=2$ і для карбомера $x=y=1$.

Ці полімери розчинні у воді і фізіологічних солевих розчинах (20г/л NaCl), і рН може бути доведений до 7,3-7,4, наприклад, їдким натром (NaOH), для одержання розчину ад'юванта, у який може бути включений(і) експресійний(і) вектор(и). Концентрація полімеру в кінцевій композиції вакцини може змінюватися в межах 0,01-1,5%, переважно від 0,05 до 1% (об'єм/вага) і переважно від 0,1 до 0,4% (об'єм/вага).

Катіонні ліпіди (4), які містять сіль четвертинного амонію, які є переважно, але не виключно, прийнятними для плазмід, і переважно мають наступну формулу:



у який R_1 , є насиченим чи ненасиченим нерозгалуженим аліфатичним радикалом, що має 12-18 атомів вуглецю, R_2 є іншим аліфатичним радикалом, що містить 2-3 атома вуглецю, і X є аміно чи гідроксильною групою.

Серед цих катіонних ліпідів, кращими є DMRIE (N-(гідроксietил)-N,N-диметил-2,3-біс(тетрадецилокси)-1-пропан амонію; WO96/34109), переважно асоційований з нейтральним ліпідом, переважно DOPE (діолеїлфосфатидилетаноламін; Behr J.P., 1994, Bioconjugate Chemistry, 5, 382-389) з утворенням DMRIE-DOPE.

Переважно суміш формується імпровізовано і переважно синхронно з введенням препарату чи незабаром після введення препарату: наприклад, суміш плазмід-ад'ювант формується незадовго до чи перед введенням, переважно так, щоб дати досить часу до введення, щоб суміш утворила комплекс, наприклад, за 10 чи 60 хвилин до введення, приблизно 30 хвилин до введення.

Коли є присутнім DOPE, молярне співвідношення DMRIE:DOPE складає переважно приблизно від 95:5 до приблизно 5:95, краще, близько 1:1.

DMRIE чи DMRIE:DOPE ад'ювант:плазмида молярне співвідношення може бути між близько 50:1 і близько 1:10, таке як приблизно 10:1 і близько 1:5, краще - 1:1 і близько 1:2.

Цитокін чи цитокіни (5) можуть бути в білковій формі в імуногенній композиції чи вакцині або можуть спільно експресуватися в хазяїні з імуногеном чи імуногенами або його епітопом(ами). Перевага віддається спільній експресії цитокіну чи цитокінів тим же вектором, що експресує імуноген чи імуногени або його епітоп(и), чи окремому вектору.

Винахід включає приготування комбінацій таких композицій, наприклад, шляхом змішування активних компонентів, переважно разом і з ад'ювантом, переносником, цитокіном, і/чи розчинником.

Цитокіни, які можуть бути використані в даному винаході, включають, але не обмежуються колоніє-стимулюючим фактором гранулоцитів (G-CSF), колоніє-стимулюючим фактором гранулоцитів/макрофагів (GM-CSF), інтерфероном α (INF α), інтерфероном β (INF β), інтерфероном γ (INF γ), інтерлейкіном-1 α (IL-1 α), інтерлейкіном-1 β (IL-1 β), інтерлейкіном-2 (IL-2), інтерлейкіном-3 (IL-3), інтерлейкіном-4 (IL-4), інтерлейкіном-5 (IL-5), інтерлейкіном-6 (IL-6), інтерлейкіном-7 (IL-7), інтерлейкіном-8 (IL-8), інтерлейкіном-9 (IL-9), інтерлейкіном-10 (IL-10), інтерлейкіном-11 (IL-11), інтерлейкіном-12 (IL-12), фактором некрозу пухлин α (TNF α), фактором некрозу пухлин β (TNF β), трансформуючим ростовим фактором β (TGF β). Було зрозуміло, що цитокіни можуть бути введені спільно і/чи послідовно з імуногенною композицією чи з композицією вакцини даного винаходу. Так, наприклад, в окремому випадку вакцина даного винаходу може також містити молекулу екзогенної нуклеїнової кислоти, що експресує *in vivo* придатний цитокін, наприклад, цитокін, підібраний для того хазяїна, що був вакцинований чи в якого була виявлена імунологічна відповідь (наприклад, пташиний цитокін для препаратів, уведених птахам).

Винахід також забезпечує імунну відповідь або індукцію імунної чи імунологічної чи захисної відповіді, що включає в себе введення ефективних кількостей імуногенної чи вакцинної композиції, яка містить суміш споруваних ооцист, ізольованих з рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis*, *E.tenella* для чи виявлення індукції відповіді у тварин. Тут переважно тварини є птахи, такі як (але не обмежуючись наступним списком) кури, качки, гуси, цесарки, павичі, фазани, голуби, перепели й індички. У більшості прийнятних утілень птахами є кури, переважно курчатобройлери. Спосіб викликання імунної відповіді чи індукції імунологічної відповіді може також включати введення ад'юванта, цитокіну або того й іншого.

Ефективна кількість для викликання імунної відповіді або індукції імунологічної чи захисної відповіді складає приблизно 10-1000 ооцист *E.acervulina*, приблизно 10-100 ооцист *E.maxima*, приблизно 10-1000 ооцист *E.mitis* і приблизно 10-1000 ооцист *E.tenella*. Переважно ефективна кількість для викликання імунної відповіді або індукції імунологічної чи захисної відповіді складає приблизно 500 ооцист *E.acervulina*, близько 50-100 ооцист *E.maxima*, близько 500 ооцист *E.mitis* і близько 100-500 ооцист *E.tenella*. Більш доцільна ефективна кількість складає близько 500 ооцист *E.acervulina*, близько 100 ооцист *E.maxima*, приблизно 500 ооцист *E.mitis*, і приблизно 100 ооцист *E.tenella*. В іншому втіленні ефективна кількість, достатня для протистояння ударній дозі, що складає приблизно 100000-500000 ооцист *E.acervulina*, близько 10000-100000 *E.maxima*, близько 100000-500000 *E.mitis* і близько 10000-100000 *E.tenella* для тварини. Переважно ударна доза складає приблизно 200000 ооцист *E.acervulina*, близько 20000-50000 ооцист *E.maxima*, близько 20000 ооцист *E.mitis* і близько 20000-50000 ооцист *E.tenella*.

Ефективна кількість для викликання імунної відповіді чи індукції імунологічної або захисної відповіді також стосується конкретних співвідношень споруваних ооцист, ізольованих з рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis*, *E.tenella*, де співвідношення *E.acervulina*:*E.Maxima*:*E.Mitis*:*E.tenella* складає приблизно від 10:1 до 2:10:1 до 10 (наприклад, на кожні 10 спорцист *E.acervulina* приходить близько 1-2 спорцист *E.maxima*, близько 10 спорцист *E.mitis* і близько 2-10 спорцист *E.tenella*). Переважно співвідношення *E.acervulina*:*E.Maxima*:*E.Mitis*:*E.tenella* складає приблизно 5:1:5:1 (тобто 10:2:10:2).

Іншим аспектом даного винаходу є спосіб імунізації чи спосіб вакцинації з використанням імуногенних композицій чи композицій вакцин відповідно до винаходу.

Спосіб включає, принаймні, одне введення тварині ефективної кількості імуногенної композиції чи вакцини відповідно до винаходу. Тварина може бути як самцем, так і самкою. Введення може бути зроблено головним чином шляхом внутрішньом'язової (IM), внутрішньошкірної (ID) чи підшкірної (SC) ін'єкції чи шляхом інтраназального чи орального введення, де оральне введення вклю-

чає, але не обмежується введенням до корму або питної води, гелі чи спреї. Імуногенна композиція чи вакцина відповідно до винаходу може бути введена шприцом чи безтолковим апаратом (подібно, наприклад, Pigjet чи Biojector (Bioject, Oregon, USA)). Найбільш вигідним є оральне введення.

Відповідно до винаходу композиції можуть бути також введені ссавцям, наприклад, мишам чи лабораторним тваринам, наприклад, для виробництва поліклональних антитіл чи для виробництва гібридом, необхідних для приготування моноклональних антитіл.

Даний винахід забезпечує імунізацію тварин, переважно птахів. Спосіб введення кокцидіозних вакцин описаний у патентах США №4 438 097, 4 639 372, 4 808 404, 5 055 292, 5 068 104, 5 387 414, 5 602033, 5 614 195, 5 635 181, 5 637487, 5 674 484, 5 677 438, 5 709 862, 5 780 289, 5 780 289, 5 795 741, 5 814 320, 5 843 722, 5 846 527, 5 885 568, 5 932 225, 6 001 363 і 6 100 241, розкриття яких включено повністю у заявку як посилання. Спосіб включає введення тварині ефективної імунізуючої дози вакцини даного винаходу. Вакцина може бути введена кожним з методів, відомим фахівцю, наприклад, внутрішньом'язово, підшкірно, внутрішньочеревно, внутрішньовенно, інтраназально, орально, внутрішньошкірно, інтрабурсально *in ovo* чи окулярно. Методи введення відомі фахівцям, Наприклад, патенти США №5 693 622, 5 589 466, 5 580 859 і 5 566 064, що як посилання повністю включені в дану заявку. Птахам вакцина може бути введена також *in ovo*, як описано в патентах США №4 458 630 і 6 627 205, розкриття яких повністю включено в дану заявку як посилання.

Переважно, птахам вводяться вакцини у футлярі для спреїв, тобто у футлярі (ящику), у який поміщуються птахи і піддаються впливу пару вакцини чи впливу спрею. В інших кращих втіленнях імуногенні композиції чи вакцини вводяться орально. Альтернативно, імуногенні композиції чи вакцини можуть бути введені до питної води чи в корм.

Винахід охоплює імуногенну композицію, що складається із суміші споруваних ооцист із рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis*, *E.tenella*. Спорувани ооцисти з рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis*, *E.tenella* ізолюються з насінної культури, описаної тут. В основному, доза споруваних ооцист у складі - це приблизно від 10 до 1000 ооцист *E.acervulina*, приблизно від 10 до 100 ооцист *E.maxima*, приблизно від 10 до 1000 ооцист *E.mitis* і приблизно від 10 до 1000 ооцист *E.tenella*. Переважно доза споруваних ооцист у композиції складає приблизно 125-500 ооцист *E.acervulina*, приблизно 25-100 ооцист *E.maxima*, приблизно 125-500 ооцист *E.mitis* і приблизно 25-500 ооцист *E.Tenella*. В одному втіленні найменша доза складає приблизно від 125 ооцист *E.acervulina*, приблизно 25 ооцист *E.maxima*, приблизно від 125 ооцист *E.mitis* і приблизно 25 ооцист *E.tenella*. В іншому втіленні середня доза складає приблизно 250 ооцист *E.acervulina*, приблизно 50 ооцист *E.maxima*, приблизно 250 ооцист *E.mitis* і приблизно 50 ооцист *E.tenella*. І ще в одному втіленні ви-

сока доза складає приблизно 500 ооцист *E.acervulina*, приблизно 100 ооцист *E.maxima*, приблизно 500 ооцист *E.mitis*, і приблизно 100 ооцист *E.tenella*.

Переважаюча доза імуногенної композиції чи вакцини складає приблизно 500 ооцист *E.acervulina*, приблизно 50-100 ооцист *E.maxima*, приблизно 500 ооцист *E.mitis* і приблизно 100-500 ооцист *E.tenella*. У більш кращому втіленні доза складає приблизно 500 ооцист *E.acervulina*, приблизно 100 ооцист *E.maxima*, приблизно 500 ооцист *E.mitis* і приблизно 100 ооцист *E.tenella*.

Винахід також стосується конкретних співвідношень споруваних ооцист із рано дозріваючих ліній *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis*, *E.tenella*, де співвідношення

E.acervulina:*E.maxima*:*E.mitis*:*E.tenella* складає приблизно від 10:1 до 2:10:2 до 10 (тобто на кожні 10 спороцист *E.acervulina* припадає приблизно 1-2 спороцисти *E.maxima*, близько 10 спороцист *E.mitis*, приблизно від 2 до 10 спороцист *E.tenella*). Переважаюче співвідношення *E.acervulina*:*E.maxima*:*E.mitis*:*E.tenella* складає приблизно 5:1:5:1 (тобто 10:2:10:2).

Переважаючі ооцисти суспендовані в консерванті, який складається з 0,01 М фосфатно-сольового буферного розчину, що містить гентаміцин. В іншому втіленні ооцисти були суспендовані в кожному з різних консервантів і органічних кислот, таких як (але не обмежуючись цим переліком) оцтова кислота, лимонна кислота, біхромат калію чи пропіонова кислота. Наприклад, але не обмежуючись цим, власне кажучи, стерильний 0,01М фосфатний буфер, який містить не більше, ніж 30мкг/мл гентаміцину, використовувався для одержання 2мл на пляшку для 2000 доз, 5мл на пляшку для 5000 доз і 10мл на пляшку, що містить 10000 доз. Переважаючі ооцисти зберігалися в стерильних пляшках з боросилікатного скла. Наприклад, але не обмежуючись цим, ооцисти асептично поміщали в пляшку для вакцини з напівавтоматичним чи автоматичним диспенсером, чи механічно вручну вставлялися пробки, накладалися алюмінієві прокладки, і пляшки запечатувалися.

Вакцина продається як така, що має багато доз - 2000 доз на пляшечку, 5000 доз на пляшечку, 10000 доз на пляшечку чи 20000 доз на пляшечку. Термін придатності продукту не повинен перевищувати 13 місяців від дати ініціації тесту на ефективність (potency data initiation).

Тварини, переважно птахи, можуть бути вакциновані в будь-якому придатному віці, і звичайно до першої вакцинації їх вік становить один-три дні. Переважаючі вакцинують один раз. У випадку, коли використовуються дві дози вакцини, оптимально, якщо перша вводиться тварині у віці 3 дні - тиждень і згодом після 1-10 тижнів у залежності від типу вакцинованої тварини.

Застосування, дози і шляхи введення для кожного виду тварин у кращому втіленні є наступними. Імуногенна композиція чи вакцина даного винаходу була використана для вакцинації здорових курчат у віці один день чи старше з метою запобігання захворювання, обумовленого кокцидіозом.

Бажано, щоб дозування було у вигляді однієї дози на курча водного спрею з великих краплин по 20мл на 100 курчат.

Тепер винахід буде описано шляхом наведених наступних (але не обмежуючих) прикладів.

Приклади

Приклад 1: Продукція-кокцидій

Композиція продукту. Використовуваними мікроорганізмами є *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis*, *E.tenella*. Походження вихідних культур мікроорганізмів наступне. Батьківська культура *E.acervulina* була отримана від K. Jeffers at Hess and Clarck Laboratories у 1969р. і, як думають, була ізольована доктором M.Farr у USD A, Betsville, MD, вона походила від однієї ооцисти. Культура *E.maxima* походила зі схрещеної між собою суміші 10 очищених ізолятів, отриманих із Джорджії, Делавера, Мериленду, Вірджинії і Техаса. Батьківська форма культури *E.mitis* була виділена в Gainesville, Джорджія в липні 1978р. і була очищена шляхом ізоляції єдиної ооцисти. Батьківська культура *E.tenella* була отримана з культури, підтримуваної в Пенсільванії (Pennsylvania State University) доктором Patten з 1960-х рр. і була куплена університетом Джорджії (University of Georgia) у 1982р.

Кожна використана лінія *Eimeria* була рано дозріваючою лінією відповідного мікроорганізму, як описано в статті в Avian Pathology, 17: 305-314, 1988р., озаглавленій «*Eimeria* of American Chickens: Characteristics of Six Attenuated Strains Produced by Selection for Precocious Development», p.L. Long and Joyce K. Johnson, розкриття якої включено повністю у даний опис як посилання. Мікроорганізми були ослаблені за рахунок селекції на передчасний розвиток відповідно до цього методу.

Культури. Кожна лінія *Eimeria*, використана в продукті, була ідентифікована завдяки унікальному зовнішньому вигляду, формі і розмірам мікроскопічно, а інфікована зона шлунково-кишкового тракту чи сліпої кишки, як описано в роботі Longp.L. and W.M. Reid, A guide for diagnosis of coccidiosis in chickens. Re. Report 404 (Report 355 revised) Athens, GA: College of Agriculture Experiment Station, Univ. of Georgia; 1982, розкриття якої повністю включено в даний опис як посилання.

Мікроорганізми були ослаблені завдяки їх селекції на передчасний розвиток, як це описано вище. Кожна культура була без патогенів, що показано тестуванням з використанням процедур, описаних у 9CFR113.37. Вихідні культури, описані вище, зберігалися в рідкій чи газовій фазі рідкого азоту.

Для одержання насінної культури були використані курчата у віці 2-8 тижнів. Спосіб введення був per os (тобто, орально). Усі посіви були здійснені споруваними ооцистами і проводилася на курчатах SPF у віці 2-8 тижні. Призначені умови підтримувалися для кожної лінії *Eimeria*. Достатній об'єм споруваних ооцист (посів) був змішаний з кормом без антикокцидіальних агентів чи був введений орально для забезпечення кожного курчати мінімальною дозою, зазначеною в таблиці 1. Спорувані ооцисти були успішно пасирувані, без

обмеження в пасажах, у 2-8 тижневих курчатах SPF доти, доки кількість ооцист не стала достатньою для використання їх як посів для виробництва. Культури не могли підтримуватися довше, ніж 12 місяців, для того щоб зберігалася життєздатність/інфекційність.

Таблиця 1

Мінімальна доза споруваних ооцист (посів)

вид	Ооцисти/курча
<i>E.acervulina</i>	100-15000
<i>E.maxima</i>	100-15000
<i>E.mitis</i>	100-15000
<i>E.tenella</i>	100-15000

Фекальні краплі збирали протягом дня з третього по восьмий день після посіву. Випадковим чином обраних курчат забивали і спостерігали характеристики інфекції для кожного виду, за винятком *E.mitis*. Не проводили збору, якщо не було яких-небудь зовнішніх ознак захворювання.

Вихідні культури для контролю зберігалися в рідкому азоті. Продукуючі культури зберігалися при 5+3°C і пасирувалися на SPF курчатах 2-8 тижневого віку.

Препарати суспензій для чи посіву інокуляції були присутніми в серійних пасажах посівних культур на курчатах SPF у віці 2-8 тижнів доти, доки не напрацьовувалося досить ооцист для виробництва.

Достатній об'єм споруваних ооцист був змішаний з кормом, у якому були відсутні антикоксидальні агенти, і введений для забезпечення кожного курчати мінімальною дозою, перерахованою в таблиці 1. Фекальні краплі були зібрані як один розчин із третього по восьмий день після інокуляції. Обраних випадковим чином курчат забивали і досліджували характеристики інфекції для кожного виду, за винятком *E.mitis*. Не проводили збору, якщо не було яких-небудь зовнішніх ознак захворювання. Мікроорганізми були ослаблені шляхом селекції на передчасне дозрівання, як описано вище.

Збір. До узяття мікроорганізмів з метою їх виробництва курчата утримувалися в кімнаті, призначеній для виробництва індивідуальних видів. Курчата утримувалися на дієті без антикоксидальних агентів і мали вільний доступ до води. Фекальні краплі збиралися щодня з третього по восьмий день після інокуляції і були витримані при 5+3°C до вживання.

Техніка збору мікроорганізмів з метою виробництва була наступною. Фекальні краплі гомогенізували приблизно в 10% (вага/об'єм) воді. Великі частки були вилучені шляхом пропущення гомогената крізь сітку. Тверді частки були відділені або центрифугуванням, або пропущенням крізь сітку, або витриманням при 5+3°C протягом 24 годин. Якщо тверді частки були вилучені витриманням при 5+3°C, вони потім були сконцентровані центрифугуванням. Супернатант був відкинутий, а частки були ресуспендовані в насиченому водному розчині NaCl (80%, вага/об'єм). Отриманий розчин було центрифуговано. Ооцисти були зібрані

(вилучені з поверхні рідини) і ресуспендовані у воді. Оптимально, рідина, яка залишається була розведена до 20-40% NaCl з водою і центрифугована. Осад було потім ресуспендовано у насиченому розчині NaCl і рецентрифуговано і так доти, доки виявлялися додаткові ооцисти. Ооцисти були відмиті від солі шляхом повторних циклів ресуспендування-центрифугування з наступним ресуспендуванням у 0,5% розчині гіпохлориту натрію протягом 10-15 хвилин. Потім ооцисти були відмиті від гіпохлориту натрію повторюваними (3X) стадіями центрифугування і ресуспендування. Останнє ресуспендування було проведено в 2,5% водному розчині біхромату калію (K_2CrO_7). Потім ооцисти були перенесені в судину для спорудження. Спорудження полегшувалося шляхом пропущення крізь суспензію повітря протягом періоду, який не перевищував 72 години, при 27±3°C. Після спорудження ооцисти тримали при температурі 5±3°C доти, доки не був зроблений кінцевий продукт.

У кращому втіленні специфікації для прийнятого збору були наступними. По-перше, було визначено співвідношення споруваних ооцист і загальної кількості ооцист. По-друге, розмір, форма і зовнішній вигляд кожного збору ооцист повинні бути характерні для виду, який мають намір продукувати.

Матеріал, що відкидається і не використовується у виробництві, був ліквідований способом, узгодженим з 9CRF 114.15.

Приготування продукту. Серії і суб-серії кінцевого продукту були зроблені з використанням основної маси зібраної рідини. Всі ооцисти були ослаблені, що означає - вони були рано дозріваючими, як це описано вище. Ооцисти були суспендовані в консерванті, який містить 0,01M фосфатно-сольового буфера, який містить не більше 30,0мкг гентаміцину. Продукт був стандартизований, даючи, принаймні, кінцеву кількість споруваних ооцист кожного виду, як показано в таблиці 2.

Таблиця 2

Стандартизована доза споруваних ооцист

Види	Ооцисти на дозу
<i>E.acervulina</i>	500
<i>E.maxima</i>	50
<i>E.mitis</i>	500
<i>E.tenella</i>	500

Серія була приготовлена в такий спосіб. Сумарна суспензія кожного з чотирьох видів *Eimeria* була вилучена зі зберігання при 5+3°C, і їй дозволили нагрітися до температури навколишнього середовища при перемішуванні. Достатній об'єм кожного виду збудника був вилучений асептично, і вони були змішані таким чином, щоб забезпечити одержання не меншої кількості ооцист на дозу, ніж зазначено в таблиці 2, як було визначено розрахунками, заснованими на підрахунку мікроорганізмів у кожній порції суспензії, яка додавалася. Якщо було необхідно, складені лоти кожного виду *Eimeria* були скомбіновані для того, щоб забезпе-

чити необхідну кількість спорюльованих ооцист. Для одержання 2мл пляшечки на 2000 доз, 5мл пляшечки на 5000 доз і 10мл пляшечки на 10000 доз було використано, власне кажучи, стерильний 0,01 М фосфатно-сольовий буфер, який містить не більш 30мкг/мл гентаміцину. Серія зберігалася при постійному перемішуванні.

Таблиця 3

Приклад серійного
об'єму (заснованого на 10000000
сумарній дозі продукту, що вміщує 10000 доз)

Вид	Об'єм
E.acervulina	500мл @ $1,0 \times 10^7$ ооцист/мл
E.maxima	300мл @ $1,67 \times 10^6$ ооцист/мл
E.mitis	750мл @ $6,7 \times 10^6$ ооцист/мл
E.tenella	1050мл @ $2,4 \times 10^6$ ооцист/мл
0,01M PBS/гентаміцин	17400мл
Загальний об'єм	20000мл

У середньому серія, яка містить 10000 доз, мала об'єм 20-40л. Об'єм, внесений у пляшку, становив 1,0мл і вміщував 1000 доз. Пляшка з вакциною була стерильною, з боросилікатного скла.

Метод і техніка заповнення і запечаткування контейнерів були наступними. Вакцина була асептичним шляхом перенесена в пляшечки для вакцини напівавтоматичним чи автоматичним диспенсером. Механічно або вручну були вставлені пробки. Зверху були поміщені алюмінієві покритишки, і пляшки були запечатані.

Кожна доза містила кількість спорюльованих ооцист не менше, ніж зазначено в таблиці 2, за розрахунками сумарного вмісту. Кожній кількості матеріалу, розлитий запечатаний в одній процедурі, було присвоєно серійний номер.

Тестування. Кожна серія була перевірена на чистоту з використанням методу, описаного в CFR 113.27(e). Середній рахунок у будь-якому інкубаційному середовищі не повинен перевищувати 1 колонії на дозу. Якщо в початковому тесті середній рахунок при будь-якій інкубації перевищує одну колонію на дозу, проводиться один повторний тест

на вибір з використанням 20 невідкритих кінцевих контейнерів. Якщо середній рахунок у будь-яких інкубаційних умовах кінцевого теста перевищує одну колонію на дозу, серія вважається незадовільною.

Було показано, що Salmonella ефективно убивається гіпохлоритом натрію і біхроматом калію, таким чином, додаткові тести не проводилися.

Кожна серія була тестована на зовнішні патогени відповідно до 9CFR 113.37.

Для тестування безпеки вакцини кожного, принаймні, з 25 одностенних курчат, позбавленого патогенів, було вакциновано шляхом вакцинації спреєм з 10 дозами вакцини. Курчат контролювали щодня протягом 21 доби. Курчата, що померли в цей період, були перевірені, і була визначена причина смерті. Якщо, принаймні, 20 курчат не пережили період спостереження, тест був непереколивим. Якщо будь-яке захворювання чи смерть виникли через вакцину, серія була незадовільною. Невеликі ушкодження кишечника, характерні для вакцини, розглядалися як нормальні і не впливали на визначення цінності тесту. Якщо менше 20 курчат виживали за період спостереження і не було зафіксовано смертей чи серйозних ушкоджень, викликаних вакциною, тест на вибір повторювався один раз. Якщо тест не повторювався, серія визнавалася незадовільною.

Перша серія кінцевого продукту, зробленого в кожній новій партії продукції, була перевірена на ефективність. Продукт був тестовано на бройлерах чи SPF курчатах у віці 1-14 днів. Наступні серії, отримані з продукції, були оцінені на ефективність з використанням пре-редактованого рахунку, зазначеного вище, і виявлення ооцист у інокульованих птахів. Використовувалося не більше 70 курчат. Не більше ніж 35 були вакциновані per os з однією дозою вакцини. Через 26-30 днів після початкової вакцинації всі курчата були індивідуально ідентифіковані, і їхня вага була зареєстрована. Не більше ніж 10 вакцинованих і 10 контрольних з кожної групи, перерахованих вище, зазнали впливу ударної дози, введеної per os, з 1мл кожної дози, з зазначених в таблиці 4.

Таблиця 4

Ударні дози

	Види	Ударна доза
Ударна доза, група 1	E.acervulina	Від 100000 до 500000 ооцист
	E.maxima	Від 10000 до 100000 ооцист
Ударна доза, група 2	E.mitis	Від 100000 до 500000 ооцист
Ударна доза, група 3	E.tenella	Від 10000 до 100000 ооцист

Ударну дозу було обрано на основі патогенності, у якій обраний рівень давав мінімальний рахунок, принаймні, два рази.

Через шість днів після введення ударної дози вакциновані і контрольні тварини з кожної групи в таблиці 4 були забиті, зважені, і кишечник і сліпа

кишка були перевірені на ушкодження й оцінені в балах. Бали були дані відповідно до кокцидіальної бальної системи Johnson and Reid, як це описано в роботі Experimental Pathology, Vol.28, p.30-36, 1970, розкриття якої включено в даний опис повністю як посилання. Це показано в таблиці 5.

Таблиця 5

Оцінка ушкоджень у балах

Оцінка	Ушкодження
0	Відсутні
+1	Помірні ушкодження
+2	Середні
+3	Серйозні
+4	Дуже серйозні ушкодження або смерть

Постпрепаративна стадія. Вакцина продається як така, що містить багато доз, в пляшечках по 2000, 5000, 10000 чи 20000 доз. Накопичення, зберігання і представлення репрезентативних зразків було проведено у відповідності до 9CFR 113.3. Термін зберігання продукту не перевищував 13 місяців з дати проведення тесту на ефективність і підтверджувався відповідно до 9CFR 113.3.

Застосування, дозування і шлях введення для кожного виду тварин були наступними. Цей продукт був використаний для вакцинації здорових курчат у віці 1 день з метою запобігання захворюванню, обумовленому кокцидіозом. Дозування становило одну дозу на курча за допомогою крупнокраплинного водного спрею, 20мл на 100 курчат.

Приклад 2. Ефективність експериментальної вакцини, що містить ослаблені лінії кокцидій птахів у порівнянні з комерційною живою кокцидіальною

вакциною і саліноміцином, як антикоцидальним агентом для комерційних птахів.

Метою цього приклада було визначення ефективності ослабленої вакцини ооцист *Eimeria* у порівнянні зі схваленою USDA живою вакциною з ооцист (Coccivac-B) для захисту курчат бройлерного типу від ударної дози вірулентних видів *Eimeria* і порівняння використання ослабленої вакцини з традиційним антикоцидальним агентом саліноміцином.

Мішені-зміни були наступними. Первинною мішенню була оцінка уражень кишечника в балах. Прийнятим критерієм було мінімальне після ударної дози кокцидіальне ушкодження кишечника в балах у порівнянні з не вакцинованими контрольними птахами, які зазнали впливу ударної дози. Другою змінною були (1) збільшення ваги і швидкості перетравлювання корму протягом 7-тижневої фази і (2) смертність. Прийнятий критерій включав рівний або більший приріст ваги і перетравлювання корму у вакцинованих птахів у порівнянні з контрольними, вакцинованими Coccivac B, або такими, яких лікували антикоцидальним агентом, і низьку смертність у вакцинованих птахів у порівнянні з ревакцинованими контрольними птахами, вакцинованими Coccivac птахами, і таких птахів, яких лікували антикоцидальним агентом.

Матеріали. Вакцини описані в таблиці 6.

Таблиця 6

Вакцини

	Експериментальна вакцина	Вакцина Шерінг-Плау
Наукова назва	<i>E. acervulina</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. mitis</i>	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. mivati</i>
Виробник	Отримана з ослаблених ліній Лонга	Шерінг-Плау
Приготування	Ооцисти були приготовлені шляхом оральної інокуляції сприйнятливих курчат, отримання ооцист з фекалій, споруляція, підрахунок і розведення до придатної для інокуляції дози	Власна інформація
Термін придатності	Приблизно один рік	Приблизно один рік
Умови зберігання	4°-10°C-зберігання в 1,5% розчині біхромату калію приблизно 9 місяців	4°-10°C - зберігання в 1,5% розчині біхромату калію приблизно 9 місяців
Доза	Полівалентна інокуляція з їх вакциною, де їх визначається як <i>E. tenella</i> 100 ооцист/птаха, <i>E. acervulina</i> 100 ооцист/птаха, <i>E. mitis</i> 500 ооцист/птаха, <i>E. maxima</i> 100 ооцист/птаха	Власна інформація
Спосіб введення	Spra-Vac для орального введення	Оральне введення

Таблиця 7

Вірулентні/ударні організми

Наукова назва	<i>E. acervulina</i> , <i>E. mitis</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. maxima</i>
Джерело	Набір ізолятів чи вірулентних ліній
Приготування	Дивися таблицю 6
Умови зберігання	Дивися таблицю 6
Доза	Полівалентна оральна інокуляція сприйнятливих курчат від 20000 до 50000 ооцист <i>E. tenella</i> і <i>E. maxima</i> і 200000 ооцист <i>E. acervulina</i> і <i>E. mitis</i>
Спосіб	Оральний

Таблиця 8

Тварини

Види	Gallus domesticus (курча)
Лінія/порода	Комерційні птахи
Стать	Самці і самки
Вік	Один день
Кількість	Приблизно 400
Утримання	Курчата були поміщені на ферму відразу після вакцинації

З тваринами поводитись однаково, особливу увагу звертаючи на їх гарне самопочуття. Тварини утримувалися відповідно до усіх необхідних вимог.

Дизайн експерименту. Дизайн експерименту був наступним.

Таблиця 9

Експериментальні групи

Група	Вік	Птахи/повтор	Повтор/група	Усього птахів	Спосіб введення	Inoculum	Обробка
1	1 день	650	2	1300	Спрей*	Експериментальна вакцина	Один раз
2	1 день	650	2	1300	Спрей*	Coccivac-B	Один раз
3	1 день	650	2	1300	N/A	Саліноміцин	60 г/тонну в корми кожен день до 42 дня (зупинка на 28 день, коли птахів готували до ударної дози)
4	1 день	TBD	1	TBD	N/A	Невакциновані	N/A

* 20мл на 100 курчат.

Тимчасова шкала була наступною. У день 0 птахи були зважені в загоні. Птахи групи 1 і 2 були вакциновані, як описано в таблиці 9, з 1300 птахами на режим вакцини, розділені на 2 загони, кожний з яких складав половину ферми. Птахи групи 3 стартували на саліноміцині, 60г/тонну, розділені, як описано на групу 1 і 2. Загони були стандартного розміру. На дротяних сітках було збережене додаткове маркування, що це не вакциновані курчата.

На 21 день корм був замінений з початкового на корм для вирощування для всіх птахів. Саліноміцин продовжували давати групі 3.

На 28 день птахи, яким повинна бути введена ударна доза, були поміщені в дротяні клітки. Саліноміцин перестали давати птахам групи 3, яким повинна бути введена ударна доза. Усі птахи і корм були зважені. Зразки свіжих фекалій були зібрані на ґрунті кожної групи у великих площах, 20 зразків на загін. Ооцити були охарактеризовані за видами.

На 29 день птахи в клітках були піддані дії ударної дози з використанням кількості ооцист, зазначеної у таблиці 7.

На 35 день птахи, піддані дії ударної дози, були забиті, ушкодження були оцінені в балах, і приріст ваги був визначений.

На 42 день усі групи були переведені на нелікарський остаточний корм і були зважені.

На 49 день усі птахи і корм були зважені, і експеримент був закінчений.

Експериментальні процедури

Вакцинація/Медикація. Три способи обробки птахів, ідентифікованих як групи 1-3 у таблиці 9,

було поміщено у половині приміщень, три загони на приміщення, 650 птахів на загін, у цілому 1300 птахів на обробку. Птахи в групах з 1 по 3 були вакциновані, як описано в таблиці (9). Додаткова група (4) утримувалася окремо в чистих клітках, як не вакцинований необроблений контроль тільки для використання в тесті з ударною дозою.

Групам 1, 2 і 4 давали корм без ліків. Групі 3 давали саліноміцин (60г/тону), починаючи з першого дня по 42 день. Птахам групи 3, які повинні були піддаватися дії ударної дози, давали корм без ліків після переміщення в клітки, де була обробка ударною дозою. Стартовий корм давали до 21 дня, корм для вирощування до 42 дня і кінцевий - до 49 дня.

Спостереження. Птахи були зважені в загоні на 0 і 28 день і на 6 і 49 день. Мертвих птахів збирали двічі на день і була виконана некроскопія для визначення причини смерті. Зразки фекалій, зібрані на 28 день, були тестовані на життєздатні ооцити і ідентифіковані за видами.

Ударна доза. На 28 день з 3 з 10 птахів з кожного загону (всього 60 на обробку) були зважені і переміщені в батарею кліток для обробки ударною дозою з польовими лініями Eimeria (відповідні видам, використовуваним у вакцині). Усім птахам у клітках давали корм без медикаментів. На 29 день птахи груп 1-4 були оброблені ударною дозою і забиті на 35 день. Ушкодження, оцінені в балах, і вага були зареєстровані.

Тварини були відібрані в кожну групу випадковим чином, з боксів до вакцинації їх підбирали також у випадковому порядку. Підтримувалися істот-

ні заходи безпеки для запобігання перехресного зараження між групами.

Супутня медикація і менеджмент несприятливих подій. Птахи, вакциновані Coccivac, ставали хворими на 14 день експерименту. Діагноз був - некротичний ентерит. Агент, який спричинив хворобу, був ідентифікований як *Clostridium sordelli*. Усім птахам в експерименті був уведений пеніцилін G для зменшення зараження і його ефектів між загонами і для елімінації розходжень в обробці серед груп, що могли змінити результати кокцидіозу.

Аналіз даних

Критерії для вимірювань. Первинними змінними для фази «загін з настилом» були жива вага на 28 і 49 дні і переварювання корму на 49 день. Для фази обробки ударною дозою, первинними змінними були приріст ваги за шість днів після введення дози й ушкодження, оцінені в балах, верхнього, середнього і заднього відділів кишечника також на шостий день після ударної дози.

Статистичний аналіз. Весь статистичний аналіз був проведений з використанням SA, Cary, NC (версія 8.2). Статистична значимість була заснована на дво-хвостових тестах нуль гіпотези, яка була перевірена в цьому дослідженні, результуюче значення p - 0,05 або менше.

Оцінка ушкоджень кишечника. Інциденти і важкість (бальність) кокцидіальних ушкоджень кишечника після ударної дози були проаналізовані з використанням логіт-моделі з факторами обробленої групи і блоком і/чи моделлю аналізу виживання з факторами обробленої групи і блоком (залежно від природи даних).

Смертність. Якщо смертність відносилася до вірулентних ліній *Eimeria* при ударній дозі, був проведений ANOVA (тобто аналіз розбіжностей) з факторами оброблених груп і блоком, якщо існу-

вали значні розходження між значеннями загальної смертності (незалежно від дня, коли це мало місце) для кожної обробленої групи.

Приріст ваги і перетравлювання

Фаза «загін з настилом». У межах оброблених груп був проведений спарений t-тест (блок і ціла група, без розгляду ефекту блоку) для визначення, чи існують значні розходження в середній живій вазі всередині кожної групи. Спарені порівняння включали вагу на 0 день проти 28 дня (перед ударною дозою) і 28 день проти 49 дня (після ударної дози).

Спарені t-тести (блоком і як ціла група без значного ефекту блоку) були проведені для визначення, є чи значні розходження в середній вазі перетравлювання їжі всередині кожної обробленої групи. Спарені порівняння включали дні 28 проти 49 дня ваги переварювання корму (ефект вирішального корму без медикаментів).

Між обробленими групами повторні виміри ANOVA з факторами оброблених груп, удень, блоком і взаємодією група/день були використані для визначення, чи існують значні розходження в середній живій вазі між групами, і вага була зареєстрована в усі дні.

Фаза ударної дози. Усередині оброблених груп були проведені спарені t-тести (блоком і цілою групою, без значного ефекту блоку) для визначення, чи є значні розходження в середній живій вазі в межах кожної групи. Спарені порівняння включали вагу на 28 день проти 35 дня (6 днів після ударної дози). Аналізи показників середньої живої ваги між обробленими групами після ударної дози були проведені з використанням результатів аналізу між обробленими групами для фази підлоги з настилом з фокусуванням на порівнянні на 28 день і 35 день.

Результати

Таблиця 10

Сумарні дані 28 дня

Обробка	Середня жива вага	% смертності (NE)*	% усієї смертності	Переварювання корму
Експериментальна вакцина	1,41	0,23	2,69	1,429
Coccivac	1,39	11,77	15,69	1,453
Саліноміцин	1,45	0,46	3,76	1,383

Таблиця 11

Сумарні дані 28 дня

Обробка	Середня жива вага самців	Середня жива вага самок	Середня загальна жива вага	Перетворення їжі	% смертності NE	% смертності загальний
Експериментальна вакцина	3,21	2,62	2,90	1,84	0,23	4,69
Coccivac	3,11	2,55	2,82	1,92	11,76	17
Саліноміцин	3,17	2,63	2,90	1,86	0,53	5,38

Таблиця 12

Результати введення ударної дози

Обробка	Початкова вага	Кінцева вага	6-денний приріст ваги	Ушкодження верхнього відділу	Ушкодження середнього відділу	Ушкодження нижнього відділу	TLS ¹	ATLS ²	% смертність від кокцидіозу
Негативний контроль	1425,55 аб	1849,72 а	424,17 а	0,00 в	0,00 г	0,00 г	0,00 г	0,00 г	0
Контроль ударної дози	1396,95 б	1538,75 б	141,80 в	2,48 а	3,43 а	2,38 б	8,30 а	2,77 а	6,67
Екс. вакцина	1459,60 аб	1777,53 а	317,93 б	0,78 б	1,30 в	2,17 б	5,25 б	1,42 б	0
Coccivac	1469,68	1851,53 а	381,85 а	0,85 б	0,93 в	0,55 в	2,33 в	0,78 в	0
Саліноміцин	1435,47 аб	1488,97 б	53,50 г	2,50 а	2,90 б	3,25 а	8,65 а	2,88 а	0

60 птахів були оброблені ударною дозою. * Значення статистичних розходжень по групах, а, б, в, г є поділом середніх за Дунканом (тест Дункана є статистичним нос тестом для поділу середніх значень).

1 є загальним балом ушкоджень.

2 є середнім загальним балом ушкоджень.

Обговорення. При використанні ударної дози *E.maxima*, *E.acervulina*, *E.mitts* не було виявлено значних розходжень у балах ушкоджень між експериментальною вакциною і вакциною Coccivac. Coccivac мав більш низькі бали ушкоджень для *E.tenella* у порівнянні з експериментальними лініями.

Важливо відзначити, що птахи, вакциновані Coccivac, ставали інфікованими *Clostridium sordellii*. Клостридіальна хвороба була пов'язана з інфекцією кокцидіозом. Незважаючи на те, що інфекція не поширюється на інші обробки, вакциновані Coccivac птахи були більш уразливими, демонструючи 11,77% смертність.

Висновок. Було показано, що експериментальні лінії *Eimeria* є ефективними проти вірулентних форм. Птахи, вакциновані експериментальною лінією, мали кращі показники, що визначено за швидкістю перетравлювання їжі, коли порівнювати з птахами, обробленими Coccivac і саліноміцином на 49 день, що демонструє економічну перевагу для виробника птахів.

Маючи в деталях цей опис кращого втілення даного винаходу, зрозуміло, що винахід не обмежений певним набором деталей у приведеному описі, оскільки багато видимих їх варіацій можливі без втрати духу і рамок даного винаходу.