

Даний винахід стосується композиції, яка включає ферменти, та способів використання ферментів як протинфекційних агентів у контексті лікування або зниження ризику інфекцій травного тракту.

У своєму звіті [World Population Estimates and Projections "Оцінки та прогнози щодо населення світу" за 1998 рік] Відділ народонаселення Департаменту ООН з економічних та соціальних справ прогнозував, що населення світу досягне 6 мільярдів у 1999 році. У звіті також зазначалося, що для збільшення населення з 5 до 6 мільярдів знадобилося лише 12 років, порівняно з 123 роками для збільшення з одного до двох мільярдів. До середини XXI століття населення за прогнозами становитиме від 7,3 до 10,7 мільярдів. Помітне збільшення населення в останнє десятиріччя частково зумовлюється суттєвими досягненнями у виробництві продовольства в результаті застосування технологій та практики інтенсивного виробництва продовольства. Для подальшого росту необхідно буде дотримуватися темпів збільшення ефективності у виробництві продовольства.

Один з підходів, який дозволяє підвищити ефективність виробництва м'яса тварин, включає широке застосування антимікробних хімічних продуктів та антибіотиків у раціоні тварин. На великих фермах, в умовах переповнених приміщень, поширення інфекції є дуже швидким. Таким чином, поширення хвороби контролюють шляхом профілактичного та терапевтичного застосування цих речовин. Наприклад, для контролю над кокцидіозними інфекціями загальною практикою є включення до раціону тварин хімічних продуктів (наприклад, саліноміцину, монензину, роксарзону (3-нітро), галхінолу, карбадоксу та олахіндоксу), а також антимікробних антибіотиків (наприклад, бацитрацину, віргінаміцину, тилозину, тетрацикліну, хлортетрацикліну, пеніциліну, олеандомицину, новобіоцину, лінкоміцину, бамберміцинів, апраміцину, спіраміцину, еритроміцину, неоміцину та інших). Така практика широко застосовується завдяки тому, що вона сприяє росту і поліпшує перетравлювання корму.

Вироблення комплексної резистентності до антибіотиків серед патогенів людини, таких як *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae* та *Mycobacterium tuberculosis*, дало підстави для побоювань, що ця резистентність до антибіотиків, яка виробилася у мікробах, пов'язаних зі свійськими тваринами, може мігрувати до патогенів людини через перехідні фактори резистентності до ліків. Існує свідчення того, що тварини, яким вводили антибіотики, є джерелом бактерій з перехідними факторами резистентності [Див. Hooge, Feedstuffs 71(20):59,1999]. Хоча антибіотики, які застосовують для тварин і для людей, як правило, є різними, між ними існують спільні особливості у механізмах, які можуть призводити до перехресної резистентності. В одному випадку прийнятим для боротьби з інфекціями *E. coli* (колібациллезом) у деяких тварин вважають застосування фторхінолонів, а також застосовують їх для лікування людей. Див. Hooge, supra. Нещодавно FDA/CVM запропонувало скасувати ухвалення щодо застосування фторхінолон-енрофлоксацину для птиці через вироблення резистентної до фторхінолону кампілобацили та перенесення її на людину. [Див. Murhead, S. Feedstuffs 72(45): 1-4,2000].

Стурбованість серед виробників м'яса також викликає можливість зниження продуктивності та відновлення хвороб рослин у разі заборони застосування антибіотиків та антимікробних засобів у кормах. У 1986 році, наприклад, Швеція заборонила застосування кормових антибіотиків, і захворюваність тварин зросла. Це супроводжувалося збільшенням застосування терапевтичних антибіотиків, що призвело до загального збільшення застосування антибіотиків, а також підвищення вартості виробництва. [Див. Smith, Feedstuffs 71 (13); 1, 1999]. У грудні 1998 року Рада міністрів ЄС вирішила призупинити застосування шести антимікробних засобів, які формально були ухвалені для відпускання без рецепта як активатори росту для введення з кормом [Official Journal of the European Communities 29.12.98, Постанова Ради №2821/98 стосовно Директиви 70/524]. Два додатки на основі хіноксаліну також були заборонені у серпні 1999 через стурбованість утворенням залишків у м'ясі. Результатом цих дій стала активізація поширення хвороб, які формально вважалися подоланими, серед яких: некротичний ентерит у бройлерів; ентерит, спричинений *Clostridium perfringens* у молочних поросят; дизентерія та спiroхетозна діарея свиней; спричинена *E.coli* діарея. [Див. Miller, United States Animal Health Association, 1999 Proceedings "Antibiotic Usages in Food Animal Production and Resistance-European Perspective"].

Щороку вмирає 30000 людей через внутрішньолікарняне зараження резистентними патогенами, але значно менше смертей викликають харчові патогени. У жодному випадку смерть від харчових патогенів не була пов'язана з резистентністю до антибіотиків (див. Smith, supra). Таким чином, залишається нез'ясованим, чи загострює застосування антибіотиків у м'ясній промисловості проблему резистентних до ліків патогенів при внутрішньолікарняних зараженнях людей. Стурбованість також викликає брак нових антибіотиків для лікування заражень резистентними патогенами. [Див. Henry, C.M., Chemical and Engineering News, March 6, 2000, стор.41-58]. Це може означати, що при виробленні значної резистентності патогенів до антибіотиків не завжди є нові антибіотики для лікування від інфекцій. Очевидно, труднощі, пов'язані з розробкою антибіотиків, розмір ринку та регулятивні проблеми спричинили ситуацію, коли більшість фармацевтичних компаній перестають зосереджувати наукові дослідження на розробці антибіотиків, особливо для застосування на тваринах. Запропоновані нові правила щодо реєстрації ліків для застосування на тваринах є настільки складними, що розробки поступово припиняються. Див. Smith, supra. Щоправда, існують дрібні компанії, які займаються розробкою нових антибіотиків (Henry, supra).

У деяких тваринних популяціях інфекція вже є пандемічною. Наприклад, кокцидіоз у птахів є хворобою, з якою можна боротися, але неможливо реально тримати під контролем. Інфікуються фактично всі зграї, і антикоксидіозні хімікати, як правило, додають до раціону для стримування шкоди та обмеження розвитку резистентних штамів. Кокцидіоз забирає у птахівників \$350 мільйонів щорічно за рахунок збитків та витрат на медикаментозне лікування антибіотиками, такими як саліноміцин. [Див. Suszkiw, USDA Agricultural Research Service News, October 28, 1997]. Згідно з оцінками, у Сполучених Штатах до 1999 року має витратитися близько \$114 мільйонів щорічно на зниження захворюваності на кокцидіоз. [Див. Frost & Sullivan, U.S. Pharmaceutical Products for Food Animals, Report 5245-54,1995].

Очевидно, що існує потреба в нових і більш ефективних способах контролю над інфекціями у травному тракті тварин, які вирощуються інтенсивними методами. В основі цієї потреби лежить вимога досягнення

більшої ефективності виробництва, яке має встигати за швидким ростом населення світу. Поліпшення контролю над кишковими інфекціями гарантує прискорення росту та збільшення ефективності годування. Існує також потреба в альтернативі застосування антибіотиків у тваринництві для розв'язання проблеми можливої резистентності до антибіотиків, яка виробляється у патогенів людини.

Немає ніякого ризику сприяння розвитку резистентних патогенних мікроорганізмів, які являють проблему для здоров'я людини при застосуванні в лікуванні на основі ферментів, які діють не так, як усі антибіотики. Оскільки ферменти є білками, то не існує ризику вмісту небезпечного хімічного залишку у м'ясних продуктах, як це трапляється у разі деяких антибіотиків та антикоксидіозних хімічних продуктів. [Див. American Feed Control Officials Inc., Official Publication, 1999, "Drugs and Feed Additives, Section 30.0 Enzymes," стор. 206-217, ISBN 1-878341-10-3].

Таким чином, мета даного винаходу полягає у забезпеченні ферментного лікування для зменшення впливу інфекцій травного тракту.

Ще однією метою даного винаходу є забезпечення механізму зменшення впливу інфекцій травного тракту шляхом втручання у зв'язування патогенів з клітинами травного тракту.

Ще однією метою даного винаходу є забезпечення способу збільшення вагових показників та перетворення корму для тварин, заражених патогенами, які викликають інфекції або некротичний ентерит.

Ще однією метою даного винаходу є забезпечення придатної для перорального введення дозованої форми, ефективною для поліпшення стану об'єкта, який є зараженим або якому загрожує зараження мікробним патогеном.

Для досягнення цих та інших цілей згідно з одним аспектом даного винаходу також було передбачено композицію, яка включає (i) фермент, який розщеплює зв'язок, що веде до вивільнення білка або вуглеводу клітинної поверхні, причому фермент не є ендо-1,4- $\beta$ -D-мананазою, та (ii) фізіологічно прийнятний носій для ферменту, причому композиція передбачається у формі, придатній для перорального введення, і не містить іншого протиінфекційного агента, крім ферменту. В одному варіанті втілення даний фермент розщеплює зв'язок, що веде до вивільнення білка клітинної поверхні.

В оптимальному варіанті втілення фермент, включений до композиції, є сфінгомеліназою або фосфоліпазою, особливо, фосфоліпазою типу C або типу D. В іншому оптимальному варіанті втілення фермент вибирають із групи, яка складається з естераз, цереброзидаз та карбогідраз, які розщеплюють зв'язок, що веде до вивільнення білка або вуглеводу клітинної поверхні. В іншому варіанті втілення фермент одержують із штаму *Bacillus cereus*, в оптимальному варіанті - ATCC 7004 або ATCC 6464. В альтернативному варіанті фермент одержують шляхом експресії рекомбінантної ДНК, яка кодує фермент у *Bacillus megaterium*. В іншому варіанті втілення фермент міститься в оболонці желатинової капсули і є присутнім у композиції в кількості 200МО/кг-4000МО/кг корму.

Згідно з іншим аспектом даного винаходу, пропонується композиція, яка має вищезгадані компоненти (i) та (ii), у якій фізіологічно прийнятним носієм є кормовий продукт, до якого включено фермент. Таким чином, композиція може бути кормом для тварин, що не містить іншого протиінфекційного агента, крім ферменту. Композиція корму для тварин згідно з даним винаходом також включає зерновий матеріал, такий як кукурудза, сорго, пшениця, ячмінь або овес, джерело білка, таке як боби або горох, і вітаміни, амінокислоти та мінерали.

Згідно з іще одним з аспектів, даний винахід забезпечує композицію, як було описано вище, у твердій або рідкій дозованій формі.

Крім того, забезпечується спосіб лікування або зниження ризику інфекцій травного тракту, який включає пероральне введення суб'єктові, який є зараженим або перебуває під ризиком зараження, ефективною кількістю ферменту, який розщеплює зв'язок, що веде до вивільнення білка або вуглеводу клітинної поверхні, причому фермент не є ендо-1,4- $\beta$ -D-мананазою. Крім того, спосіб не включає введення іншого протиінфекційного агента, крім самого ферменту. Інфекція може бути викликана найпростішими, такими, як *Eimeria* та *Cryptosporidium*, бактеріальними, такими як *Clostridium*, грибовими або дріжджовим патогеном.

Пропонується також композиція, яка включає (i) фермент, який розщеплює зв'язок, що веде до вивільнення білка або вуглеводу клітинної поверхні, і (ii) фізіологічно прийнятний носій для ферменту, причому композиція передбачається у формі, придатній для перорального введення і не містить іншого протиінфекційного агента, крім ферменту.

Забезпечується також спосіб лікування або зниження ризику інфекцій травного тракту, який включає пероральне введення суб'єктові, який є зараженим або перебуває під ризиком зараження, ефективною кількістю ферменту, який розщеплює зв'язок, що веде до вивільнення білка або вуглеводу клітинної поверхні, причому цей спосіб не включає введення з ферментом ефективною проти мікробів кількістю іншого протиінфекційного агента.

Інші цілі, особливості та переваги даного винаходу стануть зрозумілими з нижчеподаного детального опису. Детальний опис та наукові приклади, хоча вони і вказують на оптимальні варіанти втілення, лише ілюструють винахід, оскільки різні зміни та модифікації, які відповідають сутності та обсягові винаходу, стануть зрозумілими спеціалістові з цього детального опису. Крім того, на прикладах показано лише принцип винаходу, і вони не можуть пояснити застосування цього винаходу для всіх конкретних інфекцій, при яких він може бути корисним на думку спеціаліста.

На Фігурі 1 показано антикриптоспоридіну активність рекомбінантного ферменту PI-PLC, який виробляється штамом *Bacillus megaterium*.

Було виявлено, що ферменти певного класу, який характеризується здатністю до розщеплення зв'язку, що веде до вивільнення білка або вуглеводу клітинної поверхні, виявляють після перорального введення значну антибіотичну активність, яка є ефективною, наприклад, при лікуванні інфекцій травного тракту. До ферментів такого класу належать, крім інших, сфінгомелінази та фосфоліпази типів C та D, а також ферменти з подібною специфічністю розщеплення. Таким чином, прикладами цього класу є ферменти, які розщеплюють і вивільнюють глікопротеїни або вуглеводи, які зчеплюються з мембраною через зв'язок із фосфатидилінозитом. Отже, фермент фосфатидилінозит, специфічний до фосфоліпази C (E.C. 3.1.4.10),

відомий також під скороченою назвою PI-PLC або як 1-фосфатидилінозит-фосфодіестераза, належить до цього класу. Ще одним прикладом є глікозилфосфатидилінозит-специфічна фосфоліпаза D або GPI-PLD. [Low and Prasad, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 980-984, 1988].

Було описано ферменти GPI-PLD та PI-PLC з еукаріотних джерел. [Див. Low, "Degradation of glycosylphosphatidylinositol anchors by specific phospholipases", Chapter 2, стор.35-63, Molecular and Cell Biology of Membrane Proteins: Glycolipid Anchors of Cell-surface Proteins, A.J. Turner (ed.), Ellis Horwood, New York, 1990; Low and Prasad, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:980-984, 1988; Essen et al., Nature 380:595-602, 1996; та Essen et al., Biochemistry 36:2753-2762, 1997]. Було описано PI-PLC з прокаріотних джерел, включаючи позаклітинне вироблення бактеріями. Серед відомих бактеріальних джерел PI-PLC - *Bacillus cereus* [Stein and Logan, J. Bacteriol. 85:369-381, 1963; Stein and Logan, J. Bacteriol. 90: 69-81, 1965; Ikezawa et al., Biochimica et Biophysica Acta 450:154-164, 1976; Griffith et al., Methods in Enzymology 197:493-502, 1991; Volwerk et al., J. Cell. Biochem. 39:315-325, 1989; та Kuppe et al., J. Bacteriol. 171:6077-6083, 1989], *Bacillus thuringiensis* [Ikezawa and Taguchi, Methods in Enzymology 71:731-741, 1981; японський патентний документ JP 55034039], *Staphylococcus aureus* [Low and Finean, Biochem. J. 162:235-240, 1977] та *Clostridium novyi* [Taguchi and Ikezawa, Arch. Biochem. Biophys. 186:196-201, 1978].

Удосконалені способи аналізу для ферменту PI-PLC було розроблено на основі флуоресцентного субстрату. [Див. Hendrickson et al., Biochemistry 31:12169-12172, 1992; Hendrickson, Anal. Biochem. 219:1-8, 1994; Hendrickson et al., Bioorg. Med. Chem. Letters. 1:619-622, 1991].

Не посилаючись конкретно на жодну теорію, автори даного винаходу наголошують на тому, що фермент PI-PLC має здатність до розщеплення фосфатидилінозитгліколіпідного зчеплення білків клітинної поверхні та інших глікозилфосфатидилінозитів. [Див. Low, supra; Low and Saltiel, Science 239: 268-275, 1988]. Наприклад, різновиди поверхневих глікопротеїнів та інші поверхневі білки та вуглеводи кількох найпростіших паразитів зчеплюються глікозилфосфатидилінозитними ліпідами (GPI зчепленнями) і є чутливими до гідролізу та вивільнення PI-PLC. Види, які можуть служити прикладами, належать до родів *Schistosoma*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* та *Leishmania* (Low, supra), а також *Eimeria*, *Babesia*, *Theileria*, *Giardia*, *Leptomonas* та *Entamoeba*. [Див. McConville and Ferguson, Biochemical J. 294: 305-324, 1993; Pearce and Sher, J. Immunol. 142:979-984, 1989; Sauma et al, Mol. Med. Biochem. Parasitol. 46:73-80, 1991; Hawn and Strand, Mol. Med. Biochem. Parasitol. 59:73-82, 1993].

Цей механізм зчеплення з компонентами поверхні клітин є універсальним для еукаріотних клітин, від дріжджів до клітин ссавців. Присутність GPI зчеплень у *Giardia lamblia*, який вважають дуже примітивним еукаріотом, вказує на те, що цей тип зчеплення розвивається в еукаріотах на ранній стадії. Підтверджує цю думку виявлення в архебактерії нового фосфогліцероліпіду GlcNal-6-міо-інозит-Р-діалкілгліцерину [Nishihara et al., J. Biol. Chem. 267:12432-12435, 1992], який є основою для розвитку більш складних еукаріотних структур GPI зчеплення. У найпростіших, система GPI зчеплення використовується більшою мірою, ніж у вищих еукаріотів, і є підстави вважати, що зчеплені GPI структури є важливими для життєздатності паразитів у хазяїв - комах та ссавців (McConville and Ferguson, supra). Наприклад, часте скидання різних поверхневих глікопротеїнів може служити механізмом уникнення впливу імунної системи.

Найпростіше *Eimeria tenella* містить зчеплені фосфатидилінозитом структури, подібні до глікопротеїну/гліколіпіду *Trypanosoma brucei*. Їх вважають важливими для мембранного приєднання та наступного інфікування [Див. Gurnett et al., Mol. Med. Biochem. Parasitol. 41:177-186, 1990]. Структури *Eimeria* розщеплюються трипаносомною ліпазою та PI-PLC *Bacillus thuringiensis* (Gurnett, supra). Обробка паразитів PI-PLC *in vivo*, якщо її можливо здійснити, очевидно, може допомогти імунній системі хазяїна і завадити приєднанню та інфікуванню патогенами, які проникають у травний тракт. Види *Eimeria* є поширеною проблемою для птахівництва, яка вимагає великих витрат. Поширеним найпростішим паразитом є *Cryptosporidium parvum*, який викликає гостру діарею у людей та багатьох тварин. Передбачається, що білок спорівиків, GP15/45/60, є зв'язаним GPI білком на основі послідовності ДНК, і моноклональні антитіла, які реагують із цим білком спорівиків, інгібують інфекцію [Strong, W.B., et al., Infection and Immunity 68: 4117-4134, 2000; Cevallos, A.M., et al., Infection and Immunity 68: 4108-4116, 2000]. Таким чином, *C. parvum* є ще одним патогеном, на який може діяти PI-PLC.

Прокаріотні бактерії не містять поверхневих глікопротеїнів та вуглеводів, зчеплених фосфатидилінозитом (McConville and Ferguson, supra), але PI-PLC все ж може зменшувати бактеріальні інфекції, заважаючи процесові приєднання. Патогенна *E. coli* та багато інших добре відомих патогенних бактерій *Enterobacteriaceae* експресують бактеріальний адгезин FimH, 29 kD манозозв'язувальний лектин, присутній на віддаленому кінці бахромів. [Abraham et al., Nature 336: 682-684, 1988]. Було виявлено, що цей адгезин зв'язується з CD48 мастоцитів, GPI-зчепленою молекулою. [Див. Malaviya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8110-8115, 1999]. *In vitro* гідроліз за допомогою PI-PLC зменшував зв'язування мутантного GPI-зчепленого дифтеротоксину (з *Corynebacterium diphtheria*) рецептора з NIH3T3-клітинами мишей та щурів. [Див. Lanzrein et al, EMBO J. 15:725-734, 1996]. Крім того, альфа-токсин *Clostridium septicum* та аеролізін *Aeromonas hydrophila* обидва приєднуються до поверхні клітин за допомогою С-кінцевого GPI-зчеплення і можуть бути видалені з поверхні клітин під дією PI-PLC. [Див. Gordon et al., J. Biol Chem. 274:27274-27280, 1999].

Механізм PI-PLC для зменшення впливу бактеріальної інфекції пов'язаний з відокремленням місця зв'язування CD48 від мастоцитів хазяїв. Зв'язування FimH з мастоцитами також започатковує запальну реакцію. Таким чином, згідно з даним винаходом, усунення місця зв'язування також має усувати запалення, яке може стати надмірним і шкідливим для самого стану кишечника, оскільки запальна реакція викликає вивільнення фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (Malaviya, supra). Отже, через цей механізм зменшення запалення та секреції фактора некрозу пухлин, яка лежить у його основі, фосфоліпазне лікування, згідно з даним винаходом, має послаблювати симптоми, які характеризують такі стани, як синдром подразненого кишечника, коліт та хвороба Крона. [Див. van Deventer, S.J., Ann. Rheum. Dis. 58(1):1114-1120 (November 1999)].

Даний винахід також може бути ефективним проти вірусних інфекцій завдяки розриванню зв'язків між вірусними частинками та клітинами, які вірус може інфікувати *in vivo*. З огляду на виявлення авторами даного

винаходу ефективності описаного перорального введення, цікавим є те, що попередня обробка вірусу грипу фосфоліпазою C, яка викликає вивільнення приблизно 50% фосфоліпиду вірусу, в результаті забезпечує значне зниження інфективності ембріонів курчат. [Див. Mizutani et al., Nature 204:781-782, 1964]. І навпаки, попередня обробка культивованих фібробластів ембріонів курчат фосфоліпазою C, виділених із *Clostridium perfringens*, помітно інгібує наступне інфікування клітин вірусом Semliki Forest. [Див. Friedman and Fasten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59:1371-1378, 1968]. Хоча спеціалісти не вбачають у цих явищах ніякого терапевтичного значення, якщо поглянути в минуле, то можна побачити, що вони відповідають одному механізмові, який лежить в основі даного винаходу, а саме - розщепленню поверхневого ліганду патогену та/або спорідненого з ним рецептора клітинної мембрани, перешкоджаючи взаємодії, необхідній для інфекції.

Ще одним шляхом ефективного застосування даного винаходу для запобігання вірусній інфекції є руйнування зв'язування вірусного GPI-зчеплених білків зі сприйнятливими клітинами. Прикладом вірусного GPI-зчепленого білка, який є чутливим до PI-PLC гідролізу, є вірус денге NS1 (неструктурний білок 1). [Див. Jacobs et al., FASEB J.14:1603-1610, 2000]. Існує кілька прикладів GPI-зчеплених білків клітин-хазяїв, які є місцями зв'язування для вірусів. До цих прикладів належать еховірус людини 6, 7, 12 та 21 і ентеровірус 70, які зв'язуються з GPI-зчепленим CD55 (фактор розпаду, DAF). [Див. Clarkson et al., J. Virology 69: 5497-5501, 1995; Bergelson, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 91: 6245-6248, 1994; та Karnauchow, et al., J. Virology 70: 5143-5152, 1996]. Інфікування парвовірусом собак (CPV) може бути блоковане *in vitro* шляхом попередньої обробки клітин котятих PI-PLC. [Див. Barbis and Parrish, Brazilian J. Med. Biol. Res. 27: 401-407, 1994].

Деякі рецептори клітинної поверхні, які нібито відіграють важливу роль у викликанні інфекцій, приєднують до мембран із застосуванням механізмів, відмінних від GPI-зчеплення. До них належать такі структури, як естери холестерину [Rostand and Esko, J. Biol. Chem. 268:24053-24059, 1993], нефосфорильовані глікофінголіпіди [Karlsson, Ann Rev, Biochem 58: 309-350, 1989] та інші фосфоліпіди, такі як фосфатидилетаноламін та фосфатидилсерин. [Див. Sylvester, Infect. Immun. 64:4060-4066, 1996].

Отже, з вищевказаних причин обробка таких структур відповідними естеразами, цереброзидазами, карбогідразами та фосфоліпазами, які діють для відчеплення цих структур від поверхонь клітин, після перорального введення згідно з даним винаходом має сприятливий вплив на лікування від інфекцій травного тракту.

Завдяки універсальному характерові фосфатидилінозит-зв'язаних поверхневих білків та вуглеводів в еукаріотах, терапевтична методологія даного винаходу, пов'язана з введенням ферменту, при гострих захворюваннях або профілактично, для розщеплення зчеплювального зв'язку для таких білків та/або вуглеводів клітинної поверхні, знаходить широке застосування у подоланні викликаних найпростішими, бактеріями, грибами та вірусами інфекцій травного тракту. З цієї точки зору головним аспектом даного винаходу є демонстрація того, що фермент, який не лише є активним у розщеплювальних компонентах поверхні клітин, може вводиться перорально як протиінфекційний агент і бути ефективним *in vivo*. Слід зважити, що хоча типовий придатний фермент, PI-PLC, є доступним з 1960-х років, цей підхід раніше ще не пропонувався.

Ще одним аспектом даного винаходу є використання ферменту, як було описано вище, як ефективного протиінфекційного агента у кормі для тварин з метою лікування або зниження ризику інфекцій травного тракту у тварин, які вживають корм. Відомими є корми, які містять ендо-1,4- $\beta$ -D-мананазу, і в деяких повідомленнях припущалася протигрибкова активність мананази. [Див. WO 00/21381 (PCT/EP99/07835) та Kudo et al., Experientia 48:227-281, 1992]. У цих випадках мананазу комбінували з визнаним антибіотиком, хоча в цілому обговорювалася перспектива використання ферменту в кормах, які не містять антибіотиків. [Adams, Feed Mix (Special 2000), стор.16-18].

Таким чином, в одному з аспектів даний винахід стосується композицій, включаючи кормові композиції, які містять фермент, що характеризується вищезгаданою розщеплювальною активністю і не є мананазою або, точніше, ендо-1,4- $\beta$ -D-мананазою, і відрізняється, наприклад, від мананоспрямованого ферменту іншою специфічністю розщеплення, як описано в [Enzyme nomenclature 1992 (Academic Press) (див. статті 3.2.1.77, 3.2.1.78, 3.2.1.101, 3.2.1.106, 3.2.1.130 та 3.2.1.137)]. Крім того, даний винахід розглядає композицію, яка містить такий фермент, включаючи мананазу, але не містить ніяких інших протиінфекційних агентів.

Таким чином, згідно з даним винаходом, позаклітинна ферментна композиція, одержана з *Bacillus cereus* і стандартизована щодо вмісту PI-PLC, може бути використана для досягнення дуже значного приросту ваги та перетворення корму у присутності інфекції. Цей результат є несподіваним, оскільки *B. cereus* є умовним патогеном, який зазвичай викликає гастроентерит, який переноситься з кормом, та ендотальміт *B. cereus*.

Раніше проведені дослідження показали, що зроблена кролячя ін'єкція позаклітинного ферменту *B. anthracis* або *B. cereus* викликає фосфасемію і навіть смерть. Наприклад, [див. Stein and Logan, J. Bacteriol, 85:369-381, 1963]. Отже, несподіваним є те, що позаклітинний фермент із патогена, який викликає гастроентерит, згідно з даним винаходом має цілющий вплив по відношенню до хвороби, викликаной бактеріальною інфекцією.

*Bacillus cereus* перетворює різноманітні діючі у позаклітинній мембрані ферменти та цитолітичні токсини, включаючи PI-PLC та Cereolysin AB, які складаються з фосфоліпази C та сфінгомелінази. [Див. Gilmore, J. Bacteriol. 171:744-753, 1989]. У вищезгаданий ферментній композиції позаклітинну специфічну до фосфатидилінозиту фосфоліпазу C [E.C. 3.1.4.10], вироблену *B. cereus*, вважають активним інгредієнтом. Ферментне лікування згідно з даним винаходом є ефективним протикокцидіозним і антибіотичним засобом. Отже, воно являє собою ефективний і реально здійснений з комерційної точки зору підхід до лікування інфекцій травного тракту, особливо за умов заборони нині застосовуваних речовин.

Якщо вони не є вкритими, ферменти здатні на необоротну інактивацію шлунковими рідинами. У [патенті США №4079125] описано поліпшені композиції кишкової дії, які містять вкритий фермент, для приймання ссавцями з дефіцитом ферментів. Несподівано було виявлено, що додавання PI-PLC до раціону тварин без покриття в результаті забезпечує ефективне лікування патогенних інфекцій.

Ферментні композиції згідно з винаходом в оптимальному варіанті створюють як висушені, тверді або рідкі

композиції для перорального введення. Такі композиції, як правило, включають стабілізатори, такі як буфер, вуглевод та/або гліколь. Висушені, стійкі при зберіганні композиції ферментів, згідно з даним винаходом, придатні для включення до таблеток або капсул, одержують, наприклад, шляхом ліофілізації, розпилювального сушіння в сушарці з псевдозрідженим шаром з інертним або вуглеводним носієм, або шляхом застосування технологій випарювання у поєднанні зі склотвірними стабілізаторами. [Див. Franks et al, Biopharm. 4:38-55, 1991]. Інший підхід пов'язаний з осадженням солей, наприклад, сульфату амонію або розчинника, так як за допомогою ацетону для утворення порошку, з наступним висушуванням та змішуванням з носієм.

Деякі вуглеводи, зокрема, моносахариди, дисахариди та нижчі олігосахариди, є важливими склотвірними вуглеводами. Прикладами вуглеводів для застосування як носіїв є, крім інших, ксиліоза, фруктоза, глюкоза, сорбіт та мальтотріоза, як описано Франком (Franks, supra). В основі вибору вуглеводного носія лежить сумісність із ферментом, схильність до слабкого поглинання вологи та сприятлива крива склування. Стабілізатор грегалоza є особливо придатним для створення стійкого до температури біологічного середовища. [Див. патент США №4 891 319; Roser, Biopharm. 4 (8):47-53, 1991; Colaco et al., Bio/Technology 10:1007-1011, 1992; Aldridge, Genetic Engineering News, March 15, 1995, стор.10-11].

Ферменти для даного винаходу приготують у рідкій формі, наприклад, як сиропи з сорбітом або гліцерином для зниження активності води та стабілізації білка. Такі розчини перед фармацевтичним застосуванням, як правило, стерилізують фільтруванням.

Як зазначалося раніше, даний винахід в одному з аспектів стосується забезпечення ферменту як компонента корму або кормового продукту. Корми складаються, головним чином, із зернового матеріалу, джерела білка, вітамінів, амінокислот та мінералів. Зерновий матеріал зазвичай включає кукурудзу, сорго, пшеницю, ячмінь або овес. Джерелом білків можуть бути, наприклад, боби або горох. Прикладами мінералів, амінокислот та вітамінів є  $V_{12}$ , вітамін А, пантотенова кислота, ніацин, рибофлавін, К, DL-метіонін, L-лізин, холінхлорид, фолієва кислота, дикальційфосфат, сульфатат магнію, сульфат калію, карбонат кальцію, хлорид натрію, селеніт натрію, оксид марганцю, йодат кальцію, оксид міді, оксид цинку та D-активовані тваринні стерини.

Для застосування в кормах рідку ферментну композицію приготують із сольовим розчином (наприклад, NaCl, 15-18% (маса/маса)) або сиропом для зниження активності води та запобігання розвитку мікробів у концентрованому продукті. Прикладами інших випробуваних хімічних консервантів для кормів є бензоат натрію, пропілпарабен, сорбат натрію або калію та аскорбілпальмітат, які також застосовують для запобігання можливому псуванню через розвиток мікробів у продукті. [Див. Association of American Feed Control Officials, Inc., Official Publication 2000, Частина 18, "Chemical Preservatives", стор.215-217, ISBN 1-878341-11-1]. Ці консерванти можуть бути застосовані в кормах шляхом гранулювання з розведенням у великій кількості з застосуванням технології автоматичного розпилення. [Див. Fodge et al, Feedstuff's, September 29, 1997]. Такі рідкі композиції можуть містити стабілізуючі вуглеводи, такі як сорбіт або гліцерин, якщо вони є сумісними. Для підвищення ефективності можуть бути включені матеріали, які є необхідними компонентами кормів, такі як інші ферменти або вітаміни, нестійкі при нагріванні.

У випадках, коли корм застосовують у формі негранульованого місива (тобто без термообробки), ферменти для даного винаходу пропонуються у вигляді сухого концентрату для додавання у змішувач кормової суміші. Такі сухі ферментні концентрати одержують, спочатку концентруючи рідку ферментну композицію з використанням а 10 Kd NMWC або іншого підходящого ультрафільтра для досягнення високого відсоткового вмісту ферменту, а потім змішуючи з дуже сухим носієм, таким як кукурудзяна крупа, соєва крупа, або навіть з інертним матеріалом чи нерозчинною сіллю, прийнятною для використання в кормах. [Див. Official Publication, American Feed Control Officials, supra, Part 582, "Substances generally regarded as safe in animal feeds".

Існує багато способів утворення ферментів для функціонування у травному тракті, достатньо стійких при низьких температурах, щоб витримувати процес гранулювання у кормодобарках, зберігаючи достатню активність. Загальновідомо, що модифікація структури білка, насамперед, через зміну кодувальної послідовності ДНК або, у другу чергу, через хімічну модифікацію, може надавати ферментам більшої стійкості проти інактивації. Ілюстрацією цього є застосування хімічного зшивання кристалів ферменту. [Див. Collins et al, Organic Process Research and Development 2(6):400-406, 1998]. Інший спосіб підвищення стійкості ферменту для даного винаходу пов'язаний зі зміною амінокислот шляхом мутагенезу гена, який кодує потрібний фермент, або одержання генів чи частин генів для перестановок. [Див. Cramer et al., Nature 391:288-291, 1998; Arnold, Nature Biotechnol. 16:617-618, (1998); Zhao et al., Nature Biotechnol. 16:258-235, 1998; Zhao and Arnold, Protein Eng. 12:47-53, 1999]. Можливо також здійснити мутацію та відбір на "спрямовану еволюцію" ферментів з потрібними властивостями. Наприклад, [див. Giver et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 95:12809-12813, 1998; Liao et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 83:576-580, 1986; Cherry et al., Nature Biotechnol. 17:379-384, 1999].

Деякі модифікації білків, включаючи глікозилювання, PEG-ілування та сукцинілування, також можуть підвищувати стійкість і змінювати оптимальні показники pH - характеристики, які можуть бути оптимізовані для ферменту, який має використовуватися згідно з даним винаходом. Таким чином, можуть бути застосовані відомі протоколи для одержання модифікованого ферменту для випробування згідно з прикладами, з метою перевірки придатності для способів згідно з винаходом.

Ефективний спосіб вироблення PI-PLC було виявлено при клонуванні гена *B. cereus* у *B. megaterium*. Експресійна система [Rygus and Hillen, Appl. Microbiol. Bacteriol. 35:594-599, 1991] використовує елементи з регулону ксиліози *Bacillus megaterium* [Rygus et al., Arch. Microbiol. 155:535-542, 1991] і постачалася на ринок від BIOIOI Corp. (Vista, California). Створювалося злиття між лідерною кодувальною послідовністю PI-PLC гена та першими трьома амінокислотами гена *B. megaterium* *xylA* у плазміді, стабілізованій резистентністю до тетрацикліну і регульованій чутливим до ксиліози репресором. Штами цього типу з посиленою експресією забезпечують реальний засіб виробництва PI-PLC у промислових кількостях для включення до раціону тварин згідно з даним винаходом.

Деякі ізоляти *Bacillus cereus* виробляють антибіотики, такі як тунікаміцин. [Див. Kamogashira et al., Agric. Biol. Chem. 52:859-861, 1988]. Ще один ізолят *Bacillus cereus* (ATCC 53522) описано у [патентах США №№4 877 738 та 5 049 379] як агент біоконтролю для запобігання загибелі рослин від мільдю та гнилі коренів рослин. Вважають, що цей вплив є результатом дії двох антибіотиків, які отримали назви "цвітерміцин," лінійний амінополіол, 396 Дальтон, та "антибіотик В", аміноглікозид. У прикладах, детально описаних нижче, можливість залучення цих двох антибіотиків усувалася через виключення можливих антибіотиків з низькою молекулярною масою з ферментної композиції.

Зокрема, за допомогою мембрани з виключенням молекулярної маси 10 Kd концентрували безклітинний ферментативний бульйон. Для подальшої обробки використовували концентрат, який містить білок, більший за 10 Kd. Антибіотики малої молекулярної маси, такі як описані Гандельсманом (Handelsman, supra), проходять крізь цей фільтр. Крім того, застосовували осадження сульфату амонію, щоб осадити білки великої молекулярної маси, залишивши матеріали низької молекулярної маси у розчині. Після повторного розчинення осаду сульфату амонію одержаний в результаті ферментний розчин діалізували на буфері, піддаючи додатковій обробці з видаленням антибіотиків з низькою молекулярною масою. І нарешті, білок осаджували вдруге, знову з сульфатом амонію, для перенесення будь-якої решти сполук з низькою молекулярною масою до розчину.

Комбіноване застосування цих чотирьох видів обробки майже виключає можливість зумовлення антибіотичного впливу, який спостерігають, антибіотиком з низькою молекулярною масою, який виробляється ATCC 6464 або ATCC 7004. Ферментативний бульйон також піддавали випробуванню випробувальним штамом *E. coli* на присутність антибіотика, але ніякої антибіотичної активності не було виявлено.

Даний винахід далі описується з посиланням на нижчеподані пояснювальні приклади.

Приклад 1. Одержання заморожених вихідних культур *Bacillus cereus* ATCC 6464 та ATCC 7004

Склянки з ліофілізованими клітинами з ATCC відкривали й інокулювали у висівне середовище, яке складалося з Amberferm 4015 (Red Star), 10г/л, Amberex 695 (Red Star), 5г/л, та хлориду натрію, 5г/л, pH7,0, і вирощували при 30°C. Первісну культуру наносили штрихуванням на агарові планшети з LB-бульйоном, отриману в результаті єдину колонію знову інокулювали у 20мл висівного середовища у 250мл колбі з перегородкою (Bellco) і вирощували зі збовтуванням при 30°C. Коли густина культури досягала OD<sub>600</sub> з показником 1,5, додавали стерильний гліцерин до приблизно 10% (об'єм/об'єм), і склянки, які містили 1,8мл культури, заморожували при -80°C.

Приклад 2. Вирощування ізолятів ATCC 6464 та ATCC 7004 *Bacillus cereus* для одержання специфічної до фосфатидилінозиту фосфоліпази C

У два ферментатори Biostat C, по 30 літрів кожен, подавали середовище такого складу у водопровідній воді: живильний бульйон №2 (Oxoid), 25г/л, триптон (Difco), 10г/л, екстракт дріжджів (Difco), 10г/л, та протиспінувач Mazu DPIOP Modi 1 (BASF), 0,1мл на літр. Первісний об'єм порції становив 9,5л, і бульйон стерилізували при 121°C протягом 40 хвилин. Первісний рівень pH доводили до 7,0 газоподібним аміаком після стерилізації.

Висівні культури приготували у 500мл такого самого середовища у 4-літрових колбах для збовтування з перегородками з приєднанням через силіконову трубку аспіратором (Bellco) зі з'єднувачем для інокуляції. Колби стерилізували в автоклаві при 121°C протягом 50 хвилин до інокуляції 1,8мл замороженої вихідної культури, одержаної з партії ATCC (Приклад 1). Культури з колби для висівання вирощували при 30°C протягом 5,5 години зі збовтуванням при 200об/хв в інкубаторі з регульованим середовищем (NBS модель G-25). Перед інокуляцією культура ATCC 7004 мала показник OD<sub>600</sub> 1,53 і pH6,58. Культура ATCC 6464 мала OD<sub>600</sub> 1,28 і pH6,79.

500мл висівних культур інокулювали у the 30-літрові ферментатори і обробляли за таких умов: температура 30°C, змішування 600об/хв, повітряний потік 10 літрів на хвилину, і тиск 0,5бар. OD<sub>600</sub> первісної культури становив 0,81. Через шість годин ферментацію припиняли з кінцевим показником OD<sub>600</sub> 22,1 (ATCC 7004) і 24,2 (ATCC 6464). Ферментація проходила без регулювання pH, і кінцевий показник pH становив 8,17 (ATCC 7004) і 8,13 (ATCC 6464). Бульйон забирали з ферментатора і охолоджували до 8°C перед подальшою обробкою.

Ферментатори запускали вдруге, застосовуючи фактично ту ж саму процедуру з обома ізолятами ATCC *Bacillus cereus*. У цьому разі висівні культури використовували шість годин при OD<sub>600</sub> 2,86 (ATCC 7004) і 1,98 (ATCC 6464), та pH6,69 (ATCC 7004) і 6,65 (ATCC 6464). Основна ферментація тривала протягом 6,5 годин з кінцевим OD<sub>600</sub> 35,9 (ATCC 7004) і 33,6 (ATCC 6464). Кінцевий рівень pH становив 8,38 (ATCC 7004) і 8,47 (ATCC 6464) на час охолодження.

Приклад 3. Видалення клітин шляхом фільтрації та концентрація ферменту PI-PLC

Видаляли і промивали клітини з кожного з чотирьох ферментаторів, описаних у Прикладі 2, застосовуючи два послідовно з'єднані 3мм фільтри A/G Technology (UFP-500-K-6A) з порожніх волокон 500000 з виключенням молекулярної маси (500 Kd NMWC). Охолоджений бульйон перекачували крізь фільтри перистальтичним насосом при швидкості 2 літри на хвилину з рециркуляцією знову до резервуара для утримання. Розчинену речовину, яка містила фермент, збирали до резервуара, охолодженого на льоді. Первісний об'єм бульйону, що містив клітини, приблизно 9 літрів, концентрували до приблизно 2 літрів, і в цей момент розпочинали розчинення в 10мМ Tris-HCl, pH8,5. Після того, як було зібрано приблизно 14 літрів розчиненої речовини, промивання клітин припиняли.

500 Kd розчиненої речовини (приблизно 14 літрів з кожного ферментатора) концентрували, застосовуючи два послідовно з'єднані 0,5мм фільтри A/G Technology (UFP-10-C-4XTCA) з порожніх волокон 10000 з виключенням молекулярної маси (10 Kd). Застосовували такий самий спосіб перекачування з рециркуляцією концентрату, за винятком того, що розчинену речовину зливали. Кінцевий концентрат в об'ємі приблизно 500мл з кожного ферментатора зберігали для наступного етапу обробки.

Приклад 4. Подальше очищення та концентрація ферменту PI-PLC

10 Kd ультрафільтрований концентрат (Приклад 3), одержаний після кожної ферментації *Bacillus cereus*,

доводили до 80% насичення сульфатом амонію і перемішували на льоді протягом 60 хвилин. Розчин центрифугували протягом 15 хвилин при 6000об/хв у роторі Sorvall GSA. Спливаючий шар видаляли, а осад розчиняли у мінімальному об'ємі 10мМ Tris-HCl, 0,2мМ EDTA (pH7,5), а потім діалізували у холоді на тому самому буфері.

Рівень білка у кожному концентраті вимірювали, застосовуючи аналіз зв'язування з барвником (BioRad), а рівень PI-PLC вимірювали [Hendrickson et al, Bioorg. Med. Chem. Letters 1:619-622,1991], застосовуючи спосіб виявлення на основі HPLC та флуоресцентний субстрат (Molecular Probes, Inc., P-3764,1-піренбутил міо-інозит-1-фосфат, літієва сіль). Нижче у Таблиці 1 показано зведені дані та прогнозовану приблизну чистоту і загальну кількість чистого ферменту, одержаного для кожної з чотирьох композицій. Ферментні композиції зберігали замороженими при -20°C до подальшої обробки.

Таблиця 1

Зведені дані про аналіз необроблених ферментних композицій PI-PLC

Фермент. композ.	Номер ATCC штаму	Білок, мг/л	Питома активн. U/мг <sup>1</sup>	Заг. кільк. Білка у композ., мг	Розрах. чистота, %	Заг. кільк. чистого PI-PLC, мг
1	7004	1,86	1,75	325	2,92	9,49
2	6464	1,44	0,52	345	0,867	2,99
3	7004	1,35	4,42	208	7,36	15,3
4	6464	2,06	1,72	256	1,95	5,00

<sup>1</sup>U = одиниця = 1 мікромоль/хвилину

<sup>2</sup> На основі припущення, що 100% чистий білок має питому активність 60U/мг (Hendrickson, supra).

Приклад 5. Об'єднання і концентрація ферментних композицій до застосування в раціоні тварин

Ферментні композиції 1, 2, 3 та 4 об'єднували в загальному об'ємі 675мл. Поволі додавали сульфат амонію (492г) і розчин перемішували на льоді кілька хвилин. Розчин центрифугували для збирання осаду. Гранульовану фракцію розчиняли у мінімальній кількості 20мМ фосфатного буфера (pH7,0).

В результаті було одержано 70,9мл розчину з густиною 1,057г/см<sup>3</sup>. Концентрація білка становила приблизно 25,5мг/мл. Активність PI-PLC становила приблизно 1,13U/мг при розрахованій чистоті PI-PLC 1,88%. Увесь розчин заморожували при -20°C, давали відтанути і застосовували для рівномірної обробки 200 фунтів корму для курчат.

Приклад 6. Клонування та експресія PI-PLC гена *Bacillus cereus* у *Bacillus megaterium*

Секвенували ген, який кодує специфічну до фосфатиділінозиту фосфоліпазу С (PI-PLC). [Див. Kuppe et al, J. Bacteriol. 171:6077-6083, 1989]. Застосовуючи технологію полімеразної ланцюгової реакції (PCR), PI-PLC ген клонували з хромосомної ДНК *Bacillus cereus* (ATCC 6464). Застосовували вектор експресії, pMEGA (BIO 101, Vista, CA), для *Bacillus megaterium*. Було синтезовано два праймери PCR, а саме, 5'-GACTAGTAATAAGAAGTTAATTTTG-3' (праймер 1) та 5'-CGGGATCC ATATTGTTGGTTATTGG-3' (праймер 2), з ділянкою SpeI у праймері-1 та ділянкою BamHI у праймері-2.

Посилений PCR PI-PLC ген лігували у SpeI-BamHI ділянку pMEGA і одержували плазмиду pCG682. PI-PLC білок зливали з першими трьома амінокислотами хуІА генного продукту в ділянці SpeI у векторі експресії. Експресія PI-PLC гена відбувалася при регулюванні хуІА промотора. Ферментацію у колбі зі збовтуванням застосовували для визначення вироблення специфічної до фосфатиділінозиту фосфоліпази С у *Bacillus megaterium*. LB-бульйон з 10мг/мл тетрацикліну (20мМ) інокулювали з 0,2мл висівної культури і інкубували у струшуванні при 37°C і 250об/хв. При OD<sub>600</sub> приблизно 0,5 додавали 5г/л D-(+)-ксилози для утворення хуІА промотора. Через три години спливаючий шар збирали шляхом центрифугування. Активність специфічної до фосфатиділінозиту фосфоліпази С вимірювали способом флуоресцентного субстрату [Hendrickson, et al., Biochemistry 31: 12169-12172,1992; Hendrickson, Anal. Biochem. 219: 1-8, 1994], використовуючи 1-піренбутил-міо-інозит-1 -фосфатний субстрат (Molecular Probes, Eugene, OR) і застосовуючи виявлення шляхом HPLC.

Таблиця 2

Вимірювання експресії PI-PLC

Випробуваний матеріал	Додавання ксилози	Питома активність (U/мг білка)
Частинки лізату клітин		
<i>B. megaterium</i> /pCG682	-	0
<i>B. megaterium</i> /pCG682	+	0,436
<i>B. megaterium</i> /pCG682	-	0
<i>B. megaterium</i> /pCG682	+	0,365

Частинки ферментативного бульйону		
6. megaterium/pCG682	-	0
B. megaterium/pCG682	+	4,087
B. megatehum/pCG682	-	0
B. megaterium/pCG682	+	4,56

Ці дані показують, що більша частина PI-PLC є позаклітинною, і що експресія відбувається лише після додавання D (+) ксилози (Таблиця 2). За розрахунками, цей рекомбінантний штам має щонайменше у 15 разів вищу продуктивність (мг/л/ОД), ніж середній штам дикого типу, який вирощували у Прикладі 2.

Приклад 7. Ферментація *B. megaterium* для вироблення PI-PLC

*B. megaterium*/pCG682 описаний у Прикладі 6, використовували для вироблення PI-PLC шляхом ферментації. Середовище (PM) для етапів висівання та ферментації містило 20г/л Amberferm 4015 (Universal Flavors Bionutrients, Indianapolis, IN), 10г/л екстракту дріжджів Amberex 695 (Universal Flavors Bionutrients, Indianapolis, IN), 10г/л NZ Case Plus (Quest International, Hoffman Estates, IL), 2,0г/л  $K_2HPO_4$ , 0,1г/л  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  і спочатку 2,0г/л глюкози та 12,5мг/л тетрацикліну. Рівень pH доводили до 7,5.

Етап висівання (500мл у 2,8-літровій колбі з перегородкою) започатковували шляхом інокуляції з замороженої висівної склянки і збівування при 250об/хв і 30°C. Висівні склянки підготовляли шляхом додавання окремої колонії, яку вирощували на планшеті з LB-агаром, до 20мл PM у 250мл колбі для збівування. Після вирощування до приблизно 1,0 OD<sub>600</sub> при 30°C додавали 5мл 50% стерильного гліцерину, змішували і розчин розподіляли по 2мл пластмасових стерильних склянках і заморожували при -60°C.

500мл висівні колби використовували після вирощування до приблизно 1,2-1,8 OD<sub>600</sub> nm після 9 годин збівування. Дві колби використовували для висівання у 60-літровий ферментатор, заповнений 50л того ж самого стерилізованого парою середовища. Тетрациклін стерилізували фільтруванням (0,2-мікронний фільтр) як 1% розчин у 40% етанолі і додавали після стерилізації та охолодження до 30°C. У ферментатори також додавали 0,1мл/л протиспінювача Mazu DF10PMOD11 (BASF, Gurnee, IL) у первісному об'ємі, який додавали у разі потреби для стримування піни під час ферментації. Робочі умови для етапу висівання у першому ферментаторі були такими: тиск від 0,5 до 2,5psig; температура 30°C±0,5°C; струшування при 200-450об/хв; барботування повітрям 25-50 SLPM; розчинений кисень >25%. Показник pH контролювали на рівні від 6,9 до 8,1, застосовуючи 21,25%  $H_3PO_4$  або 5N NaOH. Коли показник OD<sub>600</sub> досягав 8-10, вміст використовували для висівання у 600-літровий ферментатор, що містив 425л такого самого середовища.

Робочі умови 600-літрового ферментатора для продукування були такими: тиск від 0,5 до 2,5 psig; температура 30°C±0,5°C; струшування при 100-300об/хв; барботування повітрям 250-500 SLPM; розчинений кисень >25%. Показник pH контролювали на рівні від 6,9 до 8,1, використовуючи 21,25%  $H_3PO_4$  або 5N NaOH. Коли через 5 годин при OD<sub>600</sub> приблизно 17 вичерпувалася початкова глюкоза, розпочинали подачу ксилози (яку було попередньо стерилізовано автоклавуванням при 121°C протягом 20 хвилин і яка складалася з 10кг D-(+)-ксилози та 10 літрів води). D-ксилозу отримували від Varsal Instruments, New Jersey. Подачу розпочинали при 25мл/хв і здійснювали на цій швидкості 1,5 години, а потім посилювали до 43мл/хв. Другу швидкість підтримували доти, доки не витрачалися всі 22,5 літра ксилози. Рівень розчиненого кисню підтримували, ступінчасто посилюючи барботування повітрям на 50 SLPM до 500 SLPM. По досягненні повітряного потоку 500 SLPM збільшували кількість обертів на хвилину. Ферментацію припиняли через 20 годин. За 17 годин накопичувалося 7440U/л (одиниці визначено у Прикладі 4).

Ферментативний бульйон збирали, застосовуючи Pall Filtron CIO Skid та чотири модулі CellFlo Microgon (мембранні пори 0,2мкм, волокна діаметром 1мм, 3,3м<sup>2</sup>). Розчинену речовину, пропущену крізь 0,2мкм мембрану, концентрували, застосовуючи LT100 Pall Filtron Skid з ультрафільтраційною мембраною від AG/Technologies, розмір 85 10K. Об'єм кінцевого концентрату становив 10 літрів, і його заморожували при -20°C.

Приклад 8. Ферментативний бульйон *Bacillus cereus* не мав антибіотичної активності

Ферментацію з *Bacillus cereus* (ATCC 7004) здійснювали згідно зі способом, описаним у Прикладі 2, за винятком того, що первісний об'єм збільшували до 20 літрів. Випробування на присутність антибіотика здійснювали з *B. coli* MGI 655 як тестовим штамом з кінцевим ферментативним бульйоном або частково очищеним PI-PLC, приготуванням згідно зі способом, описаним у Прикладах 3-5. Випробування здійснювали шляхом аналізу на циліндрах. [Див. Brantner, Pharmazie 52 (1):34-40, 1997]. Чистої зони, яка свідчила б про антибіотичну активність, навколо циліндрів, що містили зразки ферменту, не спостерігали.

Приклад 9 Випробування PI-PLC шляхом флуоресцентного аналізу мікротитрувальних планшетів

Було розроблено удосконалене біохімічне випробування для PI-PLC способом Хендріксона (Hendrickson et al. (supra)), застосованим у Прикладі 4. Субстрат 4-метилумбелліферил-міо-інозит-1-фосфату, N-метилморфолінову сіль отримували від Biosynth (Naperville, Illinois). Реакції спостерігали у зчитувальному пристрої для флуоресцентного аналізу мікротитрувальних планшетів Flourescan II від MTX Lab Systems (Vienna, Virginia). Для аналізу ферментативного бульйону або ферментних концентратів у чорних пластмасових мікротитрувальних планшетах приготували 200мкл реакційної суміші, яка складалася з 10мМ Tris-Cl, 0,16% деоксихолату, 0,8мМ 4-метилумбелліферил-міо-інозит-1-фосфату, N-метилморфолінової солі та розведеного ферменту, pH8,0. Розведення ферменту в разі потреби здійснювали у 0,1% розчині BSA у воді. Реакцію проводили при 37°C протягом 30 хвилин зі зчитуванням з 2-хвилинними інтервалами для спостереження вивільнення метилумбелліферону з субстрату зі збудженням при 350nm та емісією при 450nm.

Для розрахунку одиниць (мікромолів на хвилину), утворених на кількість доданого ферментного розчину, застосовували кореляцію одиниць флуоресценції з мікромольми метилумбелліферону. Реакція при pH8,0 являє собою компроміс між рівнем pH, оптимальним для ферменту, та рівнем pH для максимальної флуоресценції метилумбелліферону (pH10). Крім того, при pH9,0 і вище швидкість неферментного



вивільнення метилумбелліферону стає значною. За цих умов аналізу питома активність (ОД/мг) є приблизно у 39,3 рази вищою, ніж при застосуванні способу Hendrickson et al, (supra). Для ефективності випробувань в експериментах з раціоном тварин одиниці, виміряні з застосуванням цього аналізу, перетворювали на еквівалентні одиниці Хендріксона для можливості порівняння з першими випробуваннями до застосування цього аналізу.

Приклад 10. Аналіз PI-PLC, який додавали в ефективних дозах до раціону тварин

Для вимірювання ферменту після додавання до раціону тварин було розроблено аналіз PI-PLC на основі більш чутливого варіанта 4-метилумбелліферил міо-інозит-1-фосфату, N-метил-морфолінової солі (Приклад 9), який передбачає один рівень pH для аналізу та інший рівень pH для вимірювання флуоресценції. Фермент видобували з кормового матеріалу для випробувань шляхом зважування 4г корму та додавання його до 20мл 10мМ Tris-Cl (pH7,5) з 0,1% деоксихолату для одержання 20г/л. Цю суспензію струшували у струшувачі NBS G-25 (New Brunswick Scientific) протягом 1 години при кімнатній температурі і 250об/хв. Суспензію центрифугували при 13000об/хв у мікроцентрифузі IEC Micromax з 1,5мл пробірками для мікроцентрифугування. Відповідне розведення екстрактів здійснювали у 0,1% BSA (альбумін сироватки великої рогатої худоби). Зразки, видобуті з корму при 10ОД/lb, не розводили.

Перший етап реакції. Пробірки готували таким чином. Включали пробірки зі стандартним 1:100 або 1:200 розведенням 0,12Од/мл PI-PLC (одиницю визначено як у Прикладі 4) та чисті пробірки. Зразки реакційної суміші мали бути накриті плівкою для захисту субстрату від світла.

20мкл Tris-Hcl, 0,10 М, pH6,0

40мкл деоксихолату (0,8%)

40мкл PI-PLC-субстрату (4мМ)

100мкл ферменту

200мкл/пробірку Total React при 25°C

У два моменти часу (30хв та 60хв) забирали 0,10мл кожної реакційної суміші. Аліквоти нагрівали при 65°C протягом 15 хвилин для зупинення ферментної реакції і охолоджували на льоді. І нарешті, зразки центрифугували при 12000об/хв у мікроцентрифузі протягом 5 хвилин.

Флуорометричні показники. 120мА 0,10М Tris-буфера (pH8,0). Tris-буфер додавали у мікротитрувальну лунку в чорному пластмасовому планшеті, після чого перед зчитуванням, описаним у Прикладі 7, додавали 80мкл реакційної суміші. Віднімали фоновий контрольний рівень. Розраховували швидкість вироблення одиниць флуоресценції за хвилину. Одиниці флуоресценції перетворювали на мікомолі продукту реакції і розраховували кількість одиниць ферменту, видобутого на первісний фунт корму.

Приклад 11. Випробування корму для курчат шляхом піддання дії патогену

I. Годування курчат-бройлерів. Випробування I

Здійснювали перше випробування з годуванням, починаючи з самців курчат-бройлерів одноденного віку. У формі місива приготувляли типовий однорідний раціон "початкового корму" для курчат, який за характеристиками відповідав або перевищував вимоги для продуктів живлення для птахівництва Національної ради з досліджень (nutrient requirements for poultry (9<sup>th</sup>ed., 1994)). Курчат розсаджували у клітки (площею 12×24 дюйми) по чотирьох дослідних групах, причому кожна група розподілялася на чотири однакові підгрупи, які склалися з шести птахів на одну клітку (Таблиця 3). Воду та корм давали без обмежень протягом усього 21-денного періоду випробування. Курчат по клітках і клітки по групах розподіляли шляхом рандомізації по групах. Усі клітки, годівниці та напувалки перед початком випробування піддавали дезінфекції. Освітлення лампами розжарювання було безперервним (24 години на добу). Масу тіла визначали на перший та 21-й день. Споживання їжі вимірювали на 21-день.

На 5-й день кожного з курчат пероральним шляхом інфікували 200000 ооцист Eimeria acervulina. На 7-й день усіх птахів додатково інфікували 500000 Clostridium perfringens через споживання ними води. Негативні контрольні групи (Т1) лікуванню від інфекції не піддавали. Позитивним контрольним групам (Т2) з кормом давали антикоксидіозні та антибіотичні засоби. Це були засіб антикоксидіозного лікування Sacox (60г/тонну саліноміцину) та антибіотик BMD-50 (50г/тонну). Для підданих лікуванню груп, Т3 та Т4, застосовували оброблений ферментом PI-PLC дикого типу корм (приблизно 0,34г PI-PLC на чистій основі), починаючи з п'ятого дня під час перорального введення Eimeria acervulina. Увесь корм приготувляли однією однорідною партією, а потім розділяли для додавання антибіотика (Дослідна група Т2) та ферменту (Дослідні групи Т3 та Т4). Результати аналізу маси птахів представлено в Таблиці 4, а розрахунки годування/додавання у вазі представлено в Таблиці 5.

Таблиця 3

Експериментальна обробка корму для курчат-бройлерів. Випробування 1

Дослідна група №	Назва випробування	Випробуваний матеріал	Підгрупи	Курчат на підгрупі
T1	Негативний контроль	Немає	4	6
T2	Позитивний контроль	Антикоксидіозне та саліноміцинове лікування	4	6
T3	PI-PLC дикого типу	0,34г ферменту на тонну (чиста основа)	4	6
T4	PI-PLC дикого типу	0,34г ферменту на тонну	4	6

		(чиста основа)		
--	--	----------------	--	--

Таблиця 4

Середня маса тіла (г) через 21 день

Підгрупа	Лікування			
	T1	T2	T3	T4
1	323,00	341,67	377,83	366,67
2	326,67	321,33	383,83	361,17
3	299,33	337,33	378,83	361,33
4	211,67	254,00	374,33	403,40
Середн.	290,17	313,58	378,71	373,14
STAT	b	b	a	a
S.D.	46,52	35,22	3,40	17,61
C.V.	16,03	11,23	0,90	4,72

Таблиця 5

Середнє Перетворення корму (0-21 днів) з поправкою на масу загиблих птахів

Підгрупа	Лікування			
	T1	T2	T3	T4
1	1,486	1,569	1,407	1,445
2	1,562	1,532	1,423	1,421
3	1,524	1,562	1,432	1,406
4	1,760	1,462	1,438	1,404
Середн.	1,583	1,531	1,425	1,419
STAT	b	b	a	a
S.D.	0,11	0,04	0,01	0,02
C.V.	6,68	2,78	0,82	1,17

В обох представлених вище таблицях, середні значення в ряду без літер мають значні розбіжності ( $P < 0,05$ ), за тестом Дункана.

## II. Годування курчат-бройлерів. Випробування II

Здійснювали друге випробування з годуванням, починаючи з самців курчат-бройлерів одноденного віку. У формі місива, для забезпечення однорідності, приготували базовий раціон, який за характеристиками відповідав або перевищував вимоги для продуктів живлення для птахівництва Національної ради з досліджень (nutrient requirements for poultry (9<sup>th</sup> ed., 1994)). Дослідження здійснювали шляхом випадкової вибірки у клітках для перевірки впливу PI-PLC з природного джерела, *Bacillus cereus* (PI-PLC дикої типу), або рекомбінантного *Bacillus megaterium*, на характеристики бройлерів, вирощених до 21-денного віку. Природне джерело також містить інші позаклітинні ферменти, але PI-PLC, одержаний з *Bacillus megaterium*, є високоочищеним, і його піддавали подальшому очищенню шляхом ультрафільтрації з застосуванням 30 Kd мембрани NMWC. Птахів інфікували на 8 день життя кокцидіозом птахів (200000 ооцист *E. acervulina* на кожного з птахів з водою для пиття), а та 10-й день життя - *Clostridium perfringens* (100000 на кожного з птахів з водою для пиття). Кожна з дев'яти груп (Таблиця 6) мала 10 підгруп або кліток. Кожна клітка вміщувала 6 вакцинованих (Newcastle-Bronchitis, Mareks) самців бройлерів Cobb×Cobb, з площею по 0,40 квадратних футів на кожного птаха. Померлих птахів, якщо такі були, після 8-го дня не забирали. Корм давали у формі місива без обмежень протягом усього періоду випробувань (з 0 по 21-й день).

Однаковий необроблений базовий раціон у формі місива, який не містив антибіотиків, давали всім птахам з 0 по 7-й день. Після цього з 8 по 21 день давали дев'ять оброблених раціонів у формі місива. Базовий корм являв собою типовий початковий корм для бройлерів, який містив 22% необробленого білка, з ME (вмістом засвоюваної енергії) 1400ккал/lb.

Таблиця 6

Експериментальна обробка корму для курчат-бройлерів. Випробування II

Обробка	Предмет вивпробування	Інфікування <sup>1</sup>
T1	Немає	+
T2	Бацитрацин метилен дисаліцилат (BMD, 50г/т) та Саліноміцин (Sасох, 60г/т)	+

T3	Рекомбінантний PI-PLC (30Д/Іb), вироблений <i>Bacillus megaterium</i>	+
T4	Рекомбінантний PI-PLC (100Д/Іb), вироблений <i>Bacillus megaterium</i>	+
T5	Рекомбінантний PI-PLC (300Д/Іb), вироблений <i>Bacillus megaterium</i>	+
T6	Рекомбінантний PI-PLC (900Д/Іb), вироблений <i>Bacillus megaterium</i>	+
T7	PI-PLC (100Д/Іb) та інші позаклітинні ферменти з <i>Bacillus cereus</i>	+
T8	Немає	Немає
T9	Рекомбінантний PI-PLC (900Д/Іb), вироблений <i>Bacillus megaterium</i>	Немає

<sup>1</sup> 200 000 ооцист *E. acervulina* давали кожному з птахів з водою для пиття на 7-й день, а у віці 1 днів - 100000 бактерій *Clostridium perfringens* на кожного з птахів з водою для пиття.

**Таблиця 7. Годування курчат-бройлерів, Випробування II**

Обробка	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Інфекція	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Лікування	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Тип PI-PLC			Рек. <sup>1</sup>	Рек. <sup>1</sup>	Рек. <sup>1</sup>	Рек. <sup>1</sup>	Д. т. <sup>2</sup>		Рек. <sup>1</sup>
Задан. ОД/Іb	-	-	3	10	30	90	10	-	90
Середн. вимір. ОД/Іb	0,36	0,32	0,32 <sup>3</sup>	0,71	1,74	5,96	2,46	0,12	5,94
Додавання у вазі з 8 по 21 день	309,72	333,83	323,24	324,78	320,64	328,29	298,98	326,12	338,8
	cd	ab	bc	ab	bc	ab	D	Ab	a
Перетворення корму, 8-21 день (виправлено)	1,859	1,642	1,702	1,732	1,699	1,739	1,876	1,651	1,650
	c	a	ab	b	ab	b	C	A	a
Сер. показник кишкового ураження	1,447	0,833	1,120	1,133	0,842	0,808	1,267	0,983	0,847
	d	A	bc	bc	a	a	Cd	ab	a

<sup>1</sup>Рекомбінантний PI-PLC, вироблений *Bacillus megaterium*.

<sup>2</sup> PI-PLC дикого типу з *Bacillus cereus*.

<sup>3</sup>Рівень додавання PI-PLC в цьому експерименті був надто низьким для ефективного видобування й вимірювання і являв собою фоновий рівень

У першому випробуванні, коли бактеріальну інфекцію вводили з водою для пиття (Приклад 11-I), за всіма критеріями PI-PLC дикого типу, вироблений *Bacillus cereus*, діяв так само або краще, ніж саліноміцин + BMD (Таблиці 4-5). У більш пізньому випробуванні, показаному вище з рекомбінантним PI-PLC (Приклад 11-11, Таблиця 7), PI-PLC, який додавали у різних концентраціях, виявляв залежну від дози дію на зниження кишкового ураження та Перетворення корму (T3-T6) і збільшення додавання у вазі. Крім того, піддання дії рекомбінантного PI-PLC при 900Д/Іb, за відсутності саліноміцину + BMD, знижувало показник кишкового ураження і мало позитивний вплив на перетворення корму та приріст ваги. PI-PLC дикого типу з *Bacillus cereus* не був таким ефективним, як його рекомбінантний відповідник у тій самій концентрації (10U/Іb) в цьому випробуванні.

III. Випробування III корму для курчат-бройлерів з ферментами. PI-PLC та ендо-1,4-β-D-мананазою

Дослідження здійснювали у випадково вибраних клітках Petersime для випробування впливу PI-PLC та ендо-1,4-β-D-мананази [Патент США 5 429 828] на характеристики самців бройлерів, вирощених до 21-денного віку. Птахів інфікували на 8 день життя кокцидами птахів (75000 ооцист *E. acervulina* та 1250 ооцист *E.*

тахіма для кожного з птахів пероральним шляхом) і на 11, 12 та 13-й дні життя - *Clostridium perfringens* (щоденне пероральне введення 1мл свіжого культурального бульйону, який мав  $10^8$ cfu/мл). Кожна дослідна група (Таблиця 8) складалася з 8 однакових підгруп або кліток, і кожна клітка вміщувала 14 Mareks-вакцинованих самців бройлерів Cobb×Cobb (кількість яких знижували до 10 на 14-й день, коли 4 птахів з кожної клітки забирали і знімали показники ураження), де на кожного птаха відводили по 0,36кв. фута площі. Померлих птахів забирали з кліток, коли їх виявляли, і новими не замінювали. Корм давали у формі місива без обмежень протягом усього періоду випробування (з 0 по 21 день).

Раціон давали у формі місива з 0-21-денного віку. Базовим кормом був типовий початковий корм для бройлерів, який містив 22% необробленого білка, з ME 1400ккал/lb.

**Таблиця 8. Експерименти з обробкою корму для курчат-бройлерів,**

**Випробування III**

Обробка	Лікування <sup>1</sup>	Інфікування <sup>3</sup>	PI-PLC	Мананаз <sup>2</sup>
1	+	-	-	-
2	+	-	-	100 МОД/Т
3	-	+	-	-
4	-	+	-	100 МОД/Т
5	-	+	PI-PLC дикого типу (10 ОД/lb), вироблений <i>Bacillus cereus</i>	-
6	-	+	Рекомбінантний PI-PLC (30 ОД/lb), вироблений <i>Bacillus megaterium</i>	-
7	-	+	Рекомбінантний PI-PLC (10 ОД/lb), вироблений <i>Bacillus megaterium</i>	100 МОД/Т
8	-	+	Рекомбінантний PI-PLC (30 ОД/lb), вироблений <i>Bacillus megaterium</i>	100 МОД/Т
9	+	+	-	-
10	+	+	Рекомбінантний PI-PLC (30 ОД/lb), вироблений <i>Bacillus megaterium</i>	-

<sup>1</sup>Раціон містив бацитрацин метилен дисаліцилат (BMD 50г/т) та саліноміцин (Sacoх, 60г/т)

<sup>2</sup>100 МОД/Т дорівнює  $100 \times 10^6$  одиниць активності на тонну корму

<sup>3</sup>Птахів інфікували на 8-й день життя 75000 ооцист *E. acervulina* та 1250 ооцист *E. maxima* на кожного птаха пероральним шляхом і на 11, 12 та 13-й дні життя - *Clostridium perfringens* шляхом щоденного перорального введення свіжого культурального бульйону, який містив  $10^8$ cfu/мл.

Перетворення корму коректували, враховуючи різницю середньої маси птахів для порівняння способів лікування. Інфекція погіршувала AF/G (скоректоване за масою перетворення корму) приблизно на 23% (0,147 AF/G одиниць). Використання саліноміцину та BMD повністю відновлювало AF/G до нормального рівня, але ці дві хімічні речовини були не кращі за комбінацію β-мананазу та PI-PLC при зниженні викликаних інфекцією кишкових уражень. Один мільйон (100МОД) одиниць β-мананазу на тонну, окремо або у комбінації з PI-PLC, частково долав шкідливі наслідки інфекції, про що свідчить 65-70% поліпшення щодо зниження AF/G, яке спостерігали у інфікованих контрольних птахів (див. T3 і T1). β-маназ<sup>2</sup> знижувала показник кишкового ураження, викликаного *E. acervulina*, більше, ніж викликаного *E. maxima*. У інфікованих птахів, яких лікували PI-PLC у складі корму, досягали часткового відновлення AF/G, але подолати вдавалося лише 33-41% погіршення. Однак в обох класах PI-PLC знижувався показник кишкового ураження, викликаний обома видами *Eimeria*. У разі *E. maxima* зменшення ураження було статистично значущим. Результати показано у Таблиці 9.

**Таблиця 9. Випробування ІІІ корму для курчат-бройлерів з PI-PLC та ендо-1,4-β-D-мананазою, який давали курчатам, інфікованим *E. acervulina*, *E. maxima* та *C. Perfringens***

	Обробка				Спожив. корму		Перетвор. корму		Додавання у вазі		Жива маса	Показн. ураження		Маса AF/G <sup>3</sup> пор. з Гр. 1
	I <sup>1</sup>	M <sup>2</sup>	β-мананаза	PI-PLC	0-21 день	8-21 день	0-21 день	8-21 день	0-21 день	8-21 день	21-й день	E. acer.	E. max.	
1	Ні	Так	Ні	Ні	11,178 <sup>ab</sup>	8,866 <sup>a</sup>	1,433 <sup>bc</sup>	1,446 <sup>d</sup>	0,659 <sup>a</sup>	0,540 <sup>a</sup>	0,701 <sup>a</sup>	0,00 <sup>c</sup>	0,00 <sup>c</sup>	1,433
2	Ні	Так	100 МОД/т	Ні	11,230 <sup>a</sup>	8,841 <sup>a</sup>	1,402 <sup>c</sup>	1,424 <sup>d</sup>	0,678 <sup>a</sup>	0,548 <sup>a</sup>	0,720 <sup>a</sup>	0,00 <sup>c</sup>	0,00 <sup>c</sup>	1,416
3	Так	Ні	Ні	Ні	10,497 <sup>bcd</sup>	8,155 <sup>bc</sup>	1,669 <sup>a</sup>	1,704 <sup>a</sup>	0,538 <sup>d</sup>	0,429 <sup>c</sup>	0,579 <sup>d</sup>	1,38 <sup>a</sup>	1,56 <sup>a</sup>	1,579
4	Так	Ні	100 МОД/т	Ні	10,787 <sup>abc</sup>	8,435 <sup>abc</sup>	1,501 <sup>cd</sup>	1,536 <sup>c</sup>	0,611 <sup>bc</sup>	0,490 <sup>b</sup>	0,652 <sup>bc</sup>	1,16 <sup>ab</sup>	1,44 <sup>ab</sup>	1,465
5	Так	Ні	Ні	1X рек. 10 ОД/лб	10,456 <sup>cd</sup>	8,228 <sup>abc</sup>	1,560 <sup>bc</sup>	1,591 <sup>b</sup>	0,594 <sup>c</sup>	0,477 <sup>b</sup>	0,635 <sup>c</sup>	1,34 <sup>a</sup>	1,19 <sup>bc</sup>	1,512
6	Так	Ні	Ні	3X рек. 30 ОД/лб	10,266 <sup>d</sup>	7,982 <sup>c</sup>	1,572 <sup>b</sup>	1,621 <sup>ab</sup>	0,579 <sup>c</sup>	0,483 <sup>b</sup>	0,638 <sup>c</sup>	1,16 <sup>ab</sup>	1,13 <sup>cd</sup>	1,526
7	Так	Ні	100 МОД/т	1X рек. 10 ОД/лб	10,533 <sup>abc</sup>	8,227 <sup>abc</sup>	1,514 <sup>bc</sup>	1,536 <sup>c</sup>	0,598 <sup>c</sup>	0,482 <sup>b</sup>	0,639 <sup>c</sup>	1,09 <sup>b</sup>	1,25 <sup>bc</sup>	1,469
8	Так	Ні	100 МОД/т	3X рек. 30 ОД/лб	10,496 <sup>bcd</sup>	8,156 <sup>bc</sup>	1,516 <sup>bc</sup>	1,562 <sup>bc</sup>	0,601 <sup>c</sup>	0,478 <sup>b</sup>	0,643 <sup>c</sup>	1,25 <sup>ab</sup>	1,38 <sup>abc</sup>	1,474
9	Так	Так	Ні	Ні	11,060 <sup>abc</sup>	8,658 <sup>ab</sup>	1,423 <sup>c</sup>	1,447 <sup>d</sup>	0,650 <sup>a</sup>	0,522 <sup>a</sup>	0,692 <sup>a</sup>	1,03 <sup>b</sup>	0,88 <sup>d</sup>	1,416
10	Так	Так	Ні	3X рек. 30 ОД/лб	10,666 <sup>abc</sup>	8,359 <sup>abc</sup>	1,430 <sup>c</sup>	1,444 <sup>d</sup>	0,647 <sup>ab</sup>	0,526 <sup>a</sup>	0,688 <sup>ab</sup>	1,03 <sup>b</sup>	1,13 <sup>cd</sup>	1,420

<sup>1</sup>I = Інфікування <sup>2</sup>M = Лікування (саліноміцин (60г/т) та BMD (50г/т)).

<sup>3</sup>AF/G = скоректоване за масою перетворення корму (Обробка 1 lbs<sub>21 день</sub> - Обробка X lbs<sub>21 день2</sub>)/3) + (спожитий корм/додавання у вазі (0-21 дні))  
Hemicell МОД - мільйон одиниць ChemGen

#### IV. Годування курчат-бройлерів. Випробування IV

Дослідження здійснювали у випадково вибраних клітках Petersime для випробування впливу PI-PLC, мананази [Патент США 5 429 828] та грибкового ферменту мананази на характеристики самців бройлерів, вирощених до 21-денного віку. Птахів інфікували на 8-й день життя кокцидами (75000 ооцист *E. acervulina* і 1250 ооцист *E. maxima* для кожного з птахів пероральним шляхом, і на 11, 12 та 13-й дні життя - *Clostridium perfringens* (щоденне пероральне введення свіжого культурального бульйону, який має 10<sup>8</sup>cfu/мл) Кожна група розподілялася на 8 однакових підгруп або кліток Кожна клітка спочатку вміщувала 14 Mareks-вакцинованих самців бройлерів Cobb×Cobb (їх кількість зменшувалася до 10 на 14-й день, коли 4 птахів забирали для зняття показників ураження), причому на кожного птаха відводили по 0,36кв. дюйма площі. Померлих птахів новими не замінювали. Корм та воду давали без обмежень протягом усього періоду випробування (з 0 по 21 день). Раціон давали у формі місива з 0-21-денного віку. Базовим кормом для груп обробки 1-16 був типовий початковий корм для бройлерів з кукурудзи/сої, який містив 22% необробленого білка і мав ME 1400ккал/lb.

Результати, зведені нижче у Таблиці 10, показують відновлювану перевагу додавання PI-PLC або мананази до кормів для курчат-бройлерів, інфікованих двома видами кокцид птахів та *Clostridium perfringens*, що забезпечувало поліпшення щодо приросту ваги та перетворення корму. Важливим є те, що це дослідження показує, що PI-PLG або мананаза, у комбінації з саліноміцином, але без антибіотика BMD (Випробування 6 та 5), відновлює характеристики по суті до рівня неінфікованих піддослідних птахів (№№1 та 2). Це свідчить про антибактеріальну функцію У цьому разі PI-PLC/саліноміцин діяли дещо краще за мананазу і навіть краще за прийняте нині в США додавання комбінації BMD та саліноміцину для інфікованих зграй (Випробування 4).

Таблиця 10. Годування курчат-бройлерів, Випробування IV

Випр.	f	E <sup>2</sup>	M <sup>3</sup>	Пок. ураження		Перетвор. Корму		Додавання у вагі		Жива маса	
				Е. асег. Е. тах		0-21 день	8-21 день	0-21 день	8-21 день		21 день
				Верхи.	Середн.						
1	-	-	-	0,00	0,00	1,652	1,694	0,527	0,427	0,565	
2	-	-	B/S	0,00	0,00	1,612	1,696	0,546	0,437	0,583	
3	+	-	-	2,44	2,31	1,613	1,509	0,394	0,296	0,432	
10	+	-	B	2,25	1,94	1,707	1,770	0,453	0,352	0,490	
7	+	-	S	1,00	1,09	1,709	1,719	0,458	0,368	0,496	
4	+	-	B/S	0,59	1,63	1,585	1,671	0,509	0,397	0,547	
16	+	-	PI-PLC	2,25	1,50	1,701	1,776	0,451	0,347	0,486	
9	+	-	PI-PLC B	2,03	1,34	1,760	1,844	0,445	0,342	0,482	
6	+	-	PI-PLC S	1,06	1,28	1,564	1,613	0,526	0,419	0,564	
12	+	Ман	-	1,84	1,34	1,803	1,849	0,433	0,338	0,483	
13	+	Ман 5х	-	2,13	2,00	1,740	1,813	0,437	0,339	0,471	
8	+	Ман	B	2,09	1,34	1,707	1,772	0,448	0,348	0,486	
5	+	Ман	S	0,67	1,09	1,652	1,688	0,500	0,397	0,538	
11	+	Ман	B/S	0,78	1,16	1,622	1,666	0,502	0,390	0,540	

<sup>1</sup> I = Інфекція: інфікували на 8-й день життя 175 000 ооцист *E. acervulina* та 1250 ооцист *E. maxima* кожного з птахів пероральним шляхом, і на 11, 12 та 13-й дні життя — *Clostridium perfringens* пероральним шляхом з 1 мл свіжого культурального бульйону, який мав  $10^8$  cfu/мл.

<sup>2</sup> E = Ферменти: PI-PLC - рекомбінантний PI-PLC, вироблений *B. megaterium*, який додавали у кількості 30 ОД/л, одиниці визначали за Прикладом 4.

Ман. = *B. lentus* ендо-1,4-β-D-мананаза (Патент США 5 429 828), яку додавали у кількості 121 МОД/т (мільйонів одиниць ChemGel на тонну), або 5х 506 МОД/т.

<sup>3</sup> M = Лікування (B = BMD, 50г/т); S = Саліноміцин (60 г/т).

Приклад 12 Визначення впливу ферментів на життєздатність та клітинну інвазію споривиків *Eimeria acervulina* та *Eimeria tenella* in vitro

Споровики *Eimeria acervulina* або *Eimeria tenella* та культивовані клітини нирок новонародженого хом'яка (ВНК) підготовляли способами, опублікованими у роботі [Augustine, Avian and Poultry Biology Reviews 11:113-122, 2000]. Для попередньої обробки культури клітин вкривали розведеними ферментами, як описано у Таблиці 11, і перевіряли на морфологічні зміни з 5 по 45 хвилини після вкривання. Через 45 хвилин культури моношару двічі промивали, потім інокулювали необробленими споривиками *E. acervulina* або *E. tenella*. Для застосування під час інфекції споривики суспендували у відповідно розведеному ферменті та безпосередньо після цього інокулювали в культури клітин. Після 45 хвилин інкубації культури фіксували, забарвлювали і визначали ступінь інвазії.

Спостереження здійснювали, відшукуючи зміни у загальній морфології споривиків або клітин через обробку ферментом. На рівні ферменту, який використовували в цих експериментах, ніяких морфологічних змін помічено не було. Інвазію споривиків на культивовані клітини після двох способів ферментної обробки, а також без ферментної обробки, вимірювали через гістологічне забарвлення та мікроскопію. Див. Augustine, supra.

Дані у Таблиці 11 показують значне зниження інвазії споривиків, як при *E. acervulina*, так і при *E. tenella*. І відносно забруднений ферментний препарат PI-PLC з позаклітинного бульйону *B. cereus*, і високоочищений рекомбінантний PI-PLC, вироблений у рекомбінантному бульйоні *B. megaterium*, в результаті забезпечували статистично значуще зниження інвазії у більшості експериментів. Навіть у дозі, яка приблизно дорівнювала дозі препарату PI-PLC дикого типу *B. cereus*, рекомбінантний препарат PI-PLC зберігав активність. Таким чином, попередня обробка клітини ферментом та вимивання ферменту були такими самими ефективними, як і паралельне додавання ферменту під час інфікування. Однак досвід видобування ферменту з корму показує, що два етапи промивання можуть не видалити весь фермент.

Ферментний препарат з ендо-1,4-β-D-мананазою також викликав статистично значуще зниження інвазії в двох експериментах, коли клітини перед інфікуванням піддавали попередній обробці ферментом. Ці позитивні результати включали один експеримент для кожного типу патогенів. Отже, мананаза, так само, як і препарат PI-PLC *B. cereus*, знижувала інвазію споривиків in vitro.

Таблиця 11. *In vitro* інвазія клітин ВНК споровиками *Eimeria acervulina* або*Eimeria tenella* з ферментною обробкою і без неї.

Ферменти та концентрація	Обробка клітин ферментом з наступним промиванням		Застосування ферменту під час інфікування	
	Випроб. 1	Випроб. 2	Випроб. 1	Випроб. 2
Споровики <i>E. acervulina</i>				
Контроль	22 ± 1 <sup>a</sup>	33 ± 4 <sup>a</sup>	50 ± 4 <sup>a</sup>	35 ± 7 <sup>a</sup>
PI-PLC з <i>B. cereus</i> <sup>1</sup> 0,0403 Од/мл	15 ± 1 <sup>b</sup>	26 ± 1 <sup>ab</sup>	33 ± 3 <sup>b</sup>	25 ± 2 <sup>ab</sup>
PI-PLC з рекомб. <i>B. megaterium</i> <sup>2</sup> 0,261 Од/мл	14 ± 1 <sup>b</sup>	22 ± 1 <sup>b</sup>	16 ± 2 <sup>c</sup>	18 ± 1 <sup>bc</sup>
PI-PLC з рекомб. <i>B. megaterium</i> <sup>2</sup> 0,0261 Од/мл	18 ± 1 <sup>ab</sup>	26 ± 1 <sup>ab</sup>	36 ± 3 <sup>b</sup>	9 ± 2 <sup>c</sup>
Ендо-1,4-β-D-мананаз <sup>3</sup> 5100 Од/мл	16 ± 1 <sup>b</sup>	29 ± 2 <sup>ab</sup>	н.в. <sup>4</sup>	н.в.
Споровики <i>E. tenella</i>				
Контроль	44 ± 2 <sup>a</sup>	26 ± 4 <sup>a</sup>	63 ± 5 <sup>a</sup>	42 ± 4 <sup>a</sup>
PI-PLC з <i>B. cereus</i> <sup>1</sup> 0,0403 Од/мл	38 ± 2 <sup>b</sup>	21 ± 2 <sup>a</sup>	52 ± 13 <sup>ab</sup>	37 ± 2 <sup>ab</sup>
PI-PLC з рекомб. <i>B. megaterium</i> <sup>2</sup> 0,261 Од/мл	30 ± 1 <sup>c</sup>	15 ± 0 <sup>a</sup>	28 ± 2 <sup>b</sup>	39 ± 4 <sup>ab</sup>
PI-PLC з рекомб. <i>B. megaterium</i> <sup>2</sup> 0,0261 Од/мл	н.в.	17 ± 1 <sup>a</sup>	18 ± 1 <sup>c</sup>	29 ± 1 <sup>b</sup>
Ендо-1,4-β-D-мананаз <sup>3</sup> 5100 Од/мл	35 ± 1 <sup>b</sup>	19 ± 5 <sup>a</sup>	46 ± 6 <sup>ab</sup>	н.в.

Показники інвазії вказано як середні значення ± стандартна похибка середнього значення, вимірюваного на 1-3 накривних скельцях / відхилення (клітини ВНК вирощували на накривних скельцях, вставлених у чашки з культурою). Середні значення у дослідних групах з різними верхніми індексами мають значні розбіжності ( $P < 0,05$ ).

<sup>1</sup> Позаклітинний фермент з *B. cereus* діалізували у фосфатно-буферному розсолі, одиниці стандартизовані за Прикладом 4.

<sup>2</sup> Позаклітинний фермент з рекомбінантного *B. megaterium* діалізували у фосфатно-буферному розсолі, одиниці стандартизовані за Прикладом 4.

<sup>3</sup> Манназу одержували з *Bacillus lentus*, як описано у Патенті США 5 429 828, і діалізували у фосфатно-буферний розчин, одиниці є такими, як визначено аналізом зниження цукру ChemGel Corp.

<sup>4</sup> н.в. - не визначали

### Приклад 13 *In vitro* оцінка PI-PLC після інфікування *Cryptosporidium*

Фермент PI-PLC оцінювали на антикриптоспородійну активність та токсичність у концентраціях 0,001-30 Од/мл з застосуванням клітин нирок 4-денних цуценят Madin-Darby (MDCK). Одиниці ферменту визначали способом за Прикладом 4, але вимірювали за Прикладом 9. Препарат застосованого ферменту одержували з рекомбінантного *Bacillus megaterium*. Обробку розпочинали через 3 години після інфікування і здійснювали протягом 48 годин.

Хемілюмінесцентний імунологічний аналіз. Перед інфікуванням ооцисти промивали і ресуспендували в основі DMEM з 0,75% таурохолату натрію і інкубували протягом 10хв при 37°C [You et al., FEMS Microbiol. Letters 136:251-256, 1996; You et al., J. Antimicrobial. Chemother. 41:293-296, 1998]. Експистаційну суміш розводили ультракультуральним середовищем, відразу розподіляли по планшетах, які містили клітини MDCK при 100% злитті, і тримали в ультракультуральному середовищі протягом 4 днів. Інокулят інкубували з клітинами протягом 3год. перед промиванням PBS і замінювали свіжим ультракультуральним середовищем з випробуванням ферментом або без нього. Планшети інкубували при 37°C в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> протягом 48год. Культури промивали PBS і фіксували Bouin-розчином.

Зафіксовані планшети промивали TBST-буфером (20mM Tris-HCl (pH7,5), 150mM NaCl, 0,05% Tween-20) і блокували 1% BSA-TBST (TBST-буфер, що містить 1% альбуміну сироватки великої рогатої худоби) протягом 30хв при 25°C з легким збовтуванням. У планшети додавали сироватку кроля проти *Cryptosporidium parvum* (розведення 1:200) і інкубували протягом 1год. Після промивання TBST зразки послідовно інкубували з міченим біотином IgG кози проти кроля та міченим пероксидазою хрому стрептавідином (робоче розведення 1:1000, KPL Inc., Gaithersburg, MD). Як субстрат застосовували Enhanced Luminol (4-йодофенол та пероксид водню, Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, WI). З планшетів зчитували показники за допомогою люмінометра ML3000 (Dynatech Lab., Chantilly, VA) і визначали відносні одиниці світла (RLU). Середні значення RLU розраховували на 4 однакових лунках, і всі експерименти повторювали принаймні двічі.

Аналіз токсичності. Фермент випробували, застосовуючи аналіз редукції тетразолу [CellTiter 96; Promega Corp., Madison, WI, USA]. Тобто кожну з нижчевказаних концентрацій ферменту вводили у 96-лункові планшети, які містили злиті моношари MDCK-клітин. Кожне розведення оцінювали у трьох примірниках. Фермент інкубували на моношарах при 37°C і 5% CO<sub>2</sub>. Через 48 годин планшети залишали на 1год і зчитували у зчитувальному пристрої ELISA для планшетів при 490nm. Результати записували і піддавали аналізу. Відсоток токсичності розраховували шляхом віднімання середнього OD контрольного середовища без ферменту від середнього OD з ферментом, а потім ділення на OD середовища та множення на 100. Показники цитотоксичності оцінювали, як показано у нижчеподаній таблиці.

Токсичність, %	Оцінка
0-5%	0
6-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Значну токсичність спостерігали при концентрації ферменту 30 Од/мл або вищій. Не спостерігали значної токсичності для цього ферменту в діапазоні 0,1-10 Од/мл (Таблиця 12). Таким чином, для визначення активності ферменту та специфічності ферменту у цьому діапазоні концентрації (1,0 Од/мл або нижче) здійснювали серію експериментів. У першому експерименті MDCK-клітини інфікували експистованими споровиками. Після 3-годинного інкубаційного періоду моношар клітин промивали і протягом 48 годин додавали фермент у різних

концентраціях. Як показано у Таблиці 13, фермент виявляв антикриптоспородійну активність у діапазоні 0,01-10д/мл *in vitro*. Приблизно 50% інгібування досягали при концентрації 0,10д/мл (Фігура 1).

Таблиця 12. Токсичність рекомбінантного PI-PLC у *B. megaterium* для моношару культур MDCK-клітин

Концентрація	% токсичності (95% CL)	Оцінка токсичності
10 ОД/ мл	83	4
3	57	3
1	13	1
0,3	11	1
0,1	10	1

Таблиця 13. Активність рекомбінантного ферменту PI-PLC з інфікованими *S. parvum* культурами MDCK-клітин

Обробка	Од/мл	Відсоток інгібування	Середня кількість <i>Cryptosporidium</i> на лунку мікротитрувального планшета	95% CL
пост-інфікування, год	1	77,36	285,28	0,01
	0,3	77,26	286,5	0,04
	0,1	52,74	595,63	0,18
	0,03	27,62	912,15	0,22
	0,01	7,33	1167,78	0,09
інфікован.	-	0	1260,18	0,09
неінфікован.	-	100	0	0,02

Другу серію експериментів здійснювали для оцінки специфічності ферменту. Споровики обробляли ферментом у різних концентраціях протягом 45хв і швидко промивали. Обробленим споровикам після цього давали інфікувати необроблені клітини-хазяї та залишали для розвитку і відтворення протягом 48 годин. В іншому окремому експерименті клітини-хазяї інкубували ферментом у різних концентраціях, промивали і інфікували необробленими споровиками. Як показано нижче (Таблиця 14), обробка будь-якого зі споровиків або клітин-хазяїв ферментом в результаті дає часткове інгібування. Залежного від дози інгібування у цьому діапазоні концентрацій не спостерігали. Це може бути зумовлено коротким періодом інкубації ферменту з клітинами-хазяями або клітинами-паразитами (45хв), або частковим чи неповним розщепленням рецепторів-хазяїв/паразитів. Крім того, інші рецептори-хазяї/паразити, можливо, беруть участь в інфікуванні і відповідають за ріст, який спостерігали у клітинах-хазяях.

неінфіковані		100	0	0'05
інфіковані		0	1580'18	0'08
	0'01	26'84	243'82	0'10
	0'03	26'23	255'88	0'15
	0'1	23'85	422'88	0'18
	0'3	20'01	853'54	0'58
інфіковані клітини-хазяї	1	88'18	383'84	0'15
	0'01	26'88	245'12	0'04
	0'03	26'13	251'88	0'03
	0'1	21'40	238'80	0'03
	0'3	82'84	433'04	0'08
інфіковані споровики	1	81'31	415'40	0'05
обробка	0'01	інфіковані відсоток	інфіковані кількість мікротитрувального планшета	95% CL

вплив на інфекційність *S. parvum*

таблиця 14. Вплив інфекційності обробки споровиків або MDCK-клітин на

#### Приклад 14 In vivo оцінка PI-PLC після інфікування *Cryptosporidium*

Фермент оцінювали на антикриптоспородійну ефективність на мишах SCID з імунodefіцитом. Тобто, інокуляти ооцист приготувляли шляхом промивання очищених ооцист (зберігали <6 місяців) 0,1% BSA, PBS (pH7,2) для видалення дихромату калію. Мишей SCID (віком 4-5 тижнів) інфікували 10<sup>6</sup> ооцист (штам IOWA) і піддавали вказаним нижче процедурам. Збирали зразки фекалій мишей, очищали через переривчасту цукрозу і оцінювали на паразитне навантаження шляхом проточної цитометрії, як описано вище. [Див. Arrowwood et al., J. Parasitol. 81:404-409, 1995].

грудка	без обмороження	без обмороження	без обмороження
інфекція	з ооцист	з ооцист	з ооцист
100 (мільярд)	80 ОД/мл	30 ОД/мл	500
спорова	Б-Б-Б-Б	Б-Б-Б-Б	Б-Б-Б-Б
100 (мільярд)	10	10	10
кількість мишей	10	10	10
100 (мільярд)	A	B	C

таблиця 12. Річний цикливання для лабораторних експериментів

Гранульовану їжу для мишей вкривали 30 або 900Д/лб PI-PLC у PBS або PBS. Усіх мишей годували без



обмежень. Миші отримували їжу відразу після інфікування Зразки фекалій збирали і показники маси знімали двічі на тиждень. Кількість спожитої їжі вимірювали щодня. Мишей присипляли шляхом ін'єкції кожній 0,2см<sup>3</sup> 100мг/мл кетаміну, 100мг/мл ксилазину та 0,9% NaCl).

Середню кількість спожитої їжі за день на одну мишу та середню масу мишей показано у Таблиці 16. За тритижневий період статистично значущої різниці у споживанні їжі або у масі не спостерігали

Таблиця 16. Споживання їжі та приріст ваги мишей.

	Групи	Їжа (г), спожита за день	Маса (г)
День 3		Середн	Середн
	A (90U/лб)	7,56	16,67
	B(30U/лб)	6,13	17,055
	C(PBS контроль)	5,46	16,88
День 7		Середн	Середн
	A	8,31	16,95
	B	8,51	16,91
	C	7,27	16,89
День 10		Середн	Середн
	A	8,55	17,29
	B	7,93	17,08
	C	7,1,1	16,97
День 14		Середн	Середн
	A	7,78	17,43
	B	8,06	17,62
	C	7,55	17,38
День 17		Середн	Середн
	A	8,52	17,64
	B	8,53	17,84
	C	7,79	17,59
День 21		Середн	Середн
	A	7,89	18,25
	B	8,22	18,62
	C	8,51	18,14
День 24		Середн	Середн
	A	9,79	18,2
	B	8,3	18,63
	C	8,22	18,33

Ефективність через 3 тижні після інфікування. Зразки фекалій збирали через 3, 4 та 4,5 тижні після інфекції, і у мишей SCID у групах, що піддавали лікуванню, та контрольних групах вимірювали показники *Cryptosporidium* у 100 мікролітрах зразків, як показано у Таблиці 17. Як видно, у мишей, яким вводили фермент, виявлялося зниження паразитного навантаження. Паразитне навантаження спостерігали (34-54%) у групах, що піддавали лікуванню. Деякі з цих показників зниження були статистично значущими при оцінці з застосуванням статистичного аналізу ANOVA (показано нижче і позначено символом). Фермент демонструє свій потенціал як антикриптоспоридійний терапевтичний агент. Більш високі дози ферменту або краще доставляння ферменту до місця інфекції можуть збільшити його ефективність і можуть бути застосовані в подальших експериментах.

Таблиця 17. Ефективність PI-PLC *in vivo* для зниження інфекцій

*Cryptosporidium*

Група	Доза ферм. (U/лб)	Паразитне навантаження (ооцисти/100мл) SD) День 21	Відсоток нівбування	Параз. навантаж. (ооцисти/100мл) SD) День 28	Відсоток нівбування	Параз. навантаж. (ооцисти/100мл) SD) День 31	Відсоток нівбування
PI-PLC	90	22,7(11,4)	44,0	26,3(14)*	48,9	87,5(52,9)	34,0
PI-PLC	30	16,2(4,7)	52,0	23,4(11)*	54,6	74,3(89,7)*	40,0
PBS (контр.)	-	33,5 (162)	-	50,4 (29)	-	132,1(89,3)	-

\* Показники P були значущими при 0,05 або менше

+ Показник P був 0,08 або менше.

Приклад 15 Перевірка ферменту у кормах, використовуваних у випробуваннях з вирощуванням

Аналіз PI-PLC, виділених із кормів, використовуваних у вищезгаданих випробуваннях на тваринах, здійснювали, як описано у Прикладі 10. Результати зведено у Таблицях 18-19.

Таблиця 18. Дослідження *Cryptosporidium* у їжі для мишей

Обробка	Контроль	30 ОД/лб	90 ОД/лб
Задан. ОД/лб	0	30	90
тип PI-PLC	-	Рекомбінантний із <i>B. megaterium</i>	Рекомбінантний із <i>B. megaterium</i>
PI-PLC, серія №	-	45-46 SF	45-46 SF
Аналіз. ОД/лб виділено	0	22,8	66,1
% від заданого виділення	-	76,0	73,4

Ефективність виділення з їжі була різною і значною мірою залежала від типу їжі. Виділення з їжі для мишей виявило ефективність від 73,4 до 76 відсотків (Таблиця 18). У три різні партії корму для курчат, виготовлені у трьох різних місцях, обережно вводили 45 або 180 ОД/лб рекомбінантного PI-PLC, потім відразу виділяли і піддавали аналізу за процедурою Прикладу 9, оскільки рівень навантаження тримається в межах способу безперервного аналізу за Прикладом 9 (Таблиця 19).

Таблиця 19 Випробування ефективності видобування з різних джерел корму для курчат та кукурудзяної крупи

	Джерело корму для курчат							
	Джерело 1		Джерело 2		Джерело 3		Кукурудзяна крупа	
Рівень навантаження ОД/лб	180	45	180	45	180	45	180	45
ОД/лб виділено	128	9,3	53,2	3,66	82,7	8,46	134,4	33
% доданих одиниць виділено	71,1	20,7	29,6	8,1	45,9	18,8	74,7	73,3

Можна побачити, що ефективність виділення з кукурудзяної крупи є такою ж самою, як і при виділенні з їжі для мишей. Однак виділення з деяких зразків корму для курчат у цьому експерименті та в інших було незначним.

У випробуванні, показаному в Таблиці 20, відсоток ферменту, який видобувається, становив приблизно 30-45% від теоретичного PI-PLC, тоді як  $\beta$ -мананаза легко видобувалася, та її вихід становив приблизно 100%. Найкращий рівень видобування, який спостерігали для цього корму у вищезазначених випробуваннях, становив приблизно 45%. Таким чином, результати аналізу для видобутих ОД/лб для випробуваних кормів з Таблиці 20, не виходять за межі очікуваних.

Таблиця 20. Перевірка ферментного навантаження при годуванні курчат-бройлерів, Випробування III

Група №	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Інфекція	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Лікування	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Задано ОД/лб	0	0	0	0	10	30	10	30	0	30
Тип PI-PLC	-	-	-	-	ДТ	Рек.	Рек.	Рек.	-	Рек.
Аналіз ОД/лб PI-PLC										
Середн. ОД/лб	0,94	0,76	0,79	0,7	3,08	11,48	4,56	10,18		9,49
% від заданого	-	-	-	-	30,75	38,27	45,57	33,93		31,64
Задан. МОД/т										
Геміцел. мананаза	-	3-	-	3-	-	-	3-	3-	-	-
Аналіз МОД/т Мананази										
МОД/т	-	124,9	-	135,5	-	-	153,5	172,0	-	-
% від заданого	-	124,9	-	135,5	-	-	153,5	172,0	-	-

Хоча для пояснення винаходу було показано деякі типові варіанти втілення та деталі, спеціалістові стане зрозуміло, що допускаються різні зміни та модифікації без відхилення від обсягу винаходу.

Fig. 1

Антикриптоспоридійна активність рекомбінантного PI-PLC, виробленого  
*Bacillus megiterum*

