

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 16/02, A61K 39/42, 39/40, A61P 31/12, 31/04</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/52055</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. September 2000 (08.09.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00547</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Februar 2000 (21.02.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 10 159.0 26. Februar 1999 (26.02.99) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: KOBILKE, Hartmut [DE/DE]; Lehniner Strasse 4, D-14797 Damsdorf (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HEITSCH, Wolfgang; Göhlsdorfer Strasse 25g, D-14778 Jeserig (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: BY, CZ, DE, HU, JP, PL, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: SPECIFIC EGG YOLK ANTIBODIES IgY, THE OBTAINMENT AND USE THEREOF</p> <p>(54) Bezeichnung: SPEZIFISCHE IgY-EIDOTTERANTIKÖRPER, IHRE GEWINNUNG UND IHRE VERWENDUNG</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to specific egg yolk antibodies IgY and the obtainment and use thereof for immunotherapy in animal breeding and animal production. Pullets are immunised and repeatedly boosted over the entire laying period of twelve to thirteen months. The obtained IgY antibodies in the form of whole egg powder, egg yolk powder or lyophilisates are given to the animal stock via ready feed or drinking water. The IgY antibodies can be used as the basis in monospecific ELISA kits for associated diagnostics and titer quality control as well as for titer development.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft spezifische IgY-Eidotterantikörper, ihre Gewinnung und ihre Verwendung zur Immuntherapie in der Tierzucht und Tierproduktion. Mit Hilfe eines neuen Immunisierungsschemas werden Junghennen über die gesamte Legeperiode von 12 bis 13 Monaten immunisiert und wiederholt geboostert und die gewonnenen IgY-Antikörper in Form von Volleipulver, Eidotterpulver oder Lyophilisate über Fertigfutter oder über Tränkwasser an Tierbestände gegeben. Die IgY-Antikörper sind als Ausgangsbasis in monospezifischen ELISA-Kits für die Begleitdiagnostik und die Titer-Qualitätskontrolle sowie für die Titerentwicklung geeignet.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbajdschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Spezifische IgY-Eidotterantikörper, ihre Gewinnung und ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft spezifische IgY-Eidotterantikörper, ihre Gewinnung und ihre Verwendung zur Immuntherapie in der Tierzucht und Tierproduktion. Sie werden in Form von Volleipulver, Eidotterpulver oder Lyophilisat über Fertigfutter oder über Tränkwasser an Tierbestände gegeben. Die IgY-Antikörper sind als Ausgangsbasis in monospezifischen ELISA-Kits für die Begleitdiagnostik und die Titer-Qualitätskontrolle sowie für die Titerentwicklung geeignet.

10 Ausgangspunkt der vorliegenden Erfindung ist die Tatsache, daß vom Huhn (*Gallus gallus*) aktiv erworbene Immunitäten zum Schutz ihrer Nachkommen als spezifische polyklonale IgY-Antikörper über das Eidotter übertragen werden (KLEMPERER, F., 1893 [1]) und diese eine echte Alternative für eine gezielte passive Immuntherapie bzw. Immundiagnostik darstellen, die die Tötung bzw. Manipulation von Laborsäugern ersetzen und unnötig machen (u.a. KOBILKE, 1994 [2a]; KOBILKE et al, 1994 [2b]; SCHADE et al, 1993 [4], [5]; IBURG et al, 1994 [7]; OLTMER, 1998 [8]).

Immunglobulinhaltige Eidotter mit spezifischem IgY werden durch gezielte Immunisierungen unter Verwendung von Adjuvantien hergestellt. Diese immunglobulinhaltigen Eidotter mit spezifischen IgY (ERHARD et al, 1993 [9]) ersetzen fehlende Impfstoffe und Immunsereen. Das Huhn sichert dabei insgesamt eine hohe Ausbeute an solchen spezifischen, thermostabilen und säurefesten IgY-Eidotterantikörpern, die der Immunglobulin-Klasse IgG zuzuordnen sind (KOBILKE 1994 [2], KOBILKE et al. 1994 [2b], LÖSCH 1996 [10]).

25 Aus der DE 195 04 755 A1 sind aviäre, vitelline, gegen HIV-Antigene gerichtete Antikörper sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung bei HIV-positiven Patienten zur Erzeugung hoher Antikörper-Serumtiter bekannt.

Bekannt ist auch aus der EP 0 225 254 B1 die Verwendung eines speziellen Antikörpers, der aus dem Ei des Huhnes, welches gegen ein pathogenes Antigen immunisiert worden ist, gewonnen wurde und in pharmazeutischer Zusammensetzung gegen von einem darmgiftbildenden *E.coli* hervorgerufene infektiöse Darmkrankheit bei neonatalen Säugern eingesetzt wird.

Ferner ist aus der EP 0 503 293 A1 die Gewinnung von IgY-Antikörpern sowie ihre pharmazeutische Anwendung als Eidotterpulver und insbesondere die Eidotterreinigung und -entfettung bekannt.

Der aus den genannten Patentschriften ersichtliche Stand der Entwicklung ist in seiner Verwendung eingeschränkt auf neonatale Säuger oder den Menschen, gegen pathogene
5 E.coli-Stämme und Rotavirus bzw. das HIV-1-p24-core-Antigen. Es werden allgemein die Gewinnung von IgY-Eidotterantikörpern und deren Aufbereitung für eine allgemeine Therapie bzw. die Aufbereitung/Reinigung dieser Dotter als pharmazeutische Komposition dargelegt. Aus den EP 0 225 254 B1 und 0 503 293 A1 sind keine
10 Immunisierungsschemata und verwendete Adjuvantien erkennbar.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, spezifische IgY-Antikörper permanent und in derart ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen, daß mit ihrer Hilfe eine spezifische passive Immuntherapie vorgenommen und der über Jahre akkumulierte Infektionsdruck in vorhandenen Tierbeständen spürbar reduziert werden kann.

15 Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß spezifische Eidotterantikörper vom Huhn - die gesamte Legeperiode ausnutzend - durch Immunisierung nach einem neuen Impfschema mit geflügelpathogenen Viren und Bakterienkulturen - Parvovirus, Adenovirustypen, Reovirustypen bzw. E.coli-Stämmen und Pasteurella multocida ssp. - gewonnen werden.

20 Zur Lösung der Aufgabe liegt der Erfindung auf Basis jahrelanger Praxis und Erfahrungen die Tatsache zugrunde, daß Bakterien und Viren - insbesondere solche, die stark den Magen-Darm-Kanal angreifen und sich dort hauptsächlich in den Zellen vermehren - zu den Hauptursachen verlustreicher Infektionskrankheiten und Leistungsminderungen beim Nutzgeflügel, insbesondere beim Wassergeflügel und beim Legehuhn, gehören. Trotz
25 teilweiser Immunprophylaxe mittels Impfstoffen werden die Nutzgeflügelbestände nicht genügend und durchgängig gegen solche Infektionen geschützt.

Ferner wird vorgeschlagen, globulinhaltiges Trockenvolleipulver und/oder Eidotterpulver oder deren Lyophilisat mittels neuer Einsatzmöglichkeiten und -strategien oral mit dem Futter und/oder dem Tränkwasser und/oder mit Futtermittelergänzungstoffen und/oder als
30 Naturheilmittel zu verabreichen.

Die Eigenschaften von polyklonalen Eidotterantikörpern und, bei oraler Gabe, ihr günstiger Angriffsort im Darmkanal garantieren einen nachhaltigen Erfolg beim Einsatz als Trockenvollei- oder Eidotterpulver im Fertigfutter für Nutzgeflügel oder als Lyophilisat via Tränke über den gefährdeten Zeitraum.

5 Bisher sind solcherart praxisrelevanter und den Forderungen der Tierschützer entgegenkommender Immuntherapien bei Geflügel, insbesondere bei Wassergeflügel und Legehuhn, nicht bekannt. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß darin und in der unkomplizierten und kostengünstigen Verabreichung via Fertigfuttermischungen oder Tränkwasser ein wesentlicher Fortschritt erreicht wird und durch dieses Vorgehen als
10 Immuntherapie beträchtliche Tierverluste und Wachstumsminderungen in der Aufzuchtphase sowie Legeleistungs- und Befruchtungsminderungen bei den erwachsenen Zuchtieren, Wachstumsdepressionen in der Mastphase sowie Schlachtwertminderungen verhindert und der Infektionsdruck in den Produktionsanlagen beträchtlich gemindert werden oder eine Feldvirusverdrängung erreichbar ist.

15 Gemäß der Erfindung werden die IgY-Antikörper durch ein neues Immunisierungsschema für Geflügel gewonnen, das die Erreichung permanent hoher Antikörper und damit maximaler Antikörperausbeuten für eine rationelle und ökonomisch vertretbare Therapie ermöglicht. Das Immunisierungsschema erstreckt sich auf die gesamte Legeperiode von 12 bis 13 Monaten. Zur Durchführung desselben werden 7 bis 14 Tage vor der
20 Basisimmunisierung 14 bis 15 Wochen alte Junghennen der Legerichtung aufgestellt.

Die Einsatzstrategie und Anwendung bei der Bekämpfung erwähnter verlustreicher Geflügelinfektionen mit oft seuchenhaftem Verlauf und das Einpassen dieser oralen Therapie bei Geflügel, insbesondere bei Wassergeflügel und Legehühnern, in die objektiv
25 gegebenen Lücken der Immunprophylaxe ermöglicht die zuvor genannte Lösung der Aufgabenstellung.

Aus dem Immunisierungsschema zur Entstehung derartiger spezifischer IgY-Antikörper via Eidotter, die das Geflügel zum Schutze seiner Nachkommen gegen Infektionen erzeugt, werden durch gezielte Impfung spezifische Antikörper-haltige Eier mit höchstmöglichem spezifischen IgY-Gehalt während der gesamten Legeperiode erzeugt.

Die gelegten Eier werden kühl gelagert aufbewahrt und regelmäßig - nicht älter als vier Wochen - eingeschlagen und als Volleihomogenisat bzw. als Eidotterhomogenisat zu Vollei- oder Eidotterpulver oder zu Gefrietrockengut (Lyophilisat) unter keimarmen Bedingungen verarbeitet.

- 5 Das Vollei- oder Eidotterhomogenisat wird ohne weitere Zusätze nativ verarbeitet und konfektioniert und in der Nutzgeflügelfütterung oder resuspendiert via Tränke eingesetzt. Dieses Endprodukt wird gewonnen aus der Vollei- und/oder der Eidotterrohmasse als Pulver über Sprühtürme oder als Lyophilisat.

- 10 Im Bereich der Erfindung liegt es, den von IgY- Eidotterantikörpern zur spezifischen, passiven Immuntherapie und für den Aufbau von diagnostischen KITS (z.B. ELISA) vorgesehenen Anwendungen auch gegen andere Erreger sowie für andere Tierspezies und für den Menschen zu erweitern.

- 15 Allen bisherigen Patentbeschreibungen haftet der Nachteil an, daß ihnen die diagnostischen Untersuchungsmethoden/-verfahren zur begleitenden Kontrolle
- des Ausgangs- bzw. Herdenstatus
 - der Wirksamkeitskontrolldiagnostik für diese spezifischen angewendeten Antikörper in Produktionsherden
 - der seuchendiagnostischen Verfolgsuntersuchungen sowie
 - 20 - der quantitativen Antikörperbestimmung
- fehlen.

- 25 Deshalb verfolgt diese Schutzrechtsanmeldung das Ziel, begleitend zur Immunisierung der Probanden bzw. Antikörperspender sowie des Immunstatus bei den Herden der Anwenderbetriebe die adäquate Untersuchungsmethodik mittels neuer ELISA-Kits mitzukreieren. Dadurch lassen sich bisher gängige, aber aufwendige und teure Untersuchungsmethoden (z.B. SNT / Serum-Neutralisations-Test) ablösen.

- 30 Die Merkmale der Erfindung gehen außer aus den Ansprüchen auch aus der Beschreibung hervor, wobei die einzelnen Merkmale jeweils für sich allein oder zu mehreren in Form von Kombinationen vorteilhafte schutzfähige Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird. Die Kombination besteht aus bekannten (Immunisierungen, Boosterungen) und neuen Elementen (Immunisierungsschema, Art der Verabreichung), die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil

und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, daß nunmehr nicht nur der über Jahre akkumulierte Infektionsdruck in Tierbeständen reduziert, sondern überraschenderweise auch eine Feldvirusverdrängung erreicht werden kann.

Die erfindungsgemäßen IgY-Antikörper werden dadurch erhalten, daß immunisierte SPF-
5 oder Vorzugs-Junghennen der Legerichtung subkutan oder intramuskulär immunisiert werden und die Antigen-Dosis 100 µg (0,1 ml) bis 1.000 µg (1 ml) in 0,5 bis 1,0 ml Suspension (steril) beträgt, verteilt auf 3 bis 4 Injektionsdepots.

Die Erfindung soll nachstehend an mehreren Ausführungsbeispielen erläutert werden:

10

Beispiel 1:

Durch hochimmunogene lebende oder abgetötete (inaktivierte) reine mono- oder polyvalente homologe oder heterologe Antigene (gegen verlustreiche erregerbedingte
15 Infektionen des Wassergeflügels und der Legehennen) immunisierte SPF- bzw. Vorzugs-Junghennen der Legerichtung (Legehybriden mit definiertem Status) und durch wiederholte Boosterung bei legenden Hennen werden nach einem nachfolgend beschriebenen, neuen Impfschema permanent zu gewinnende spezifische IgY-Antikörper enthaltene Eidotter mit einem Gehalt an hochspezifischen, polyklonalen, vitellinen Antikörpern zwischen
20 20 - 100 mg spezifisches IgY pro Eidotter erzeugt.

Langzeitimmunisierungsschema für die optimale IgY-Gewinnung:

Um permanent einen maximalen Antikörperspiegel im Eidotter zu erzeugen, erstreckt sich das erfindungsgemäße Immunisierungsschema auf die gesamte Legeperiode von 12 bis 13
25 Monaten. Es werden 7 bis 14 Tage vor der Basisimmunisierung 14 bis 15 Wochen alte Junghennen der Legerichtung aufgestellt und nach folgendem Schema immunisiert:

- Tag 0: Basisimmunisierung = 1. Immunisierung sbk. oder i.m. mit Antigen und
komplettem Freundes Adjuvans (FCA) oder anderen alternativen Adjuvantien
(aA)
- Tag 28: 1. Boosterung = 2. Immunisierung mit Antigen und inkomplettem
30 Freundes Adjuvans (IFA) oder aA
- Tag 38 - 42: Beginn des erreichten Antikörperpikis = Ernte/Gewinnung und
Aufbereitungsbeginn der Eidotter

- Tag 56: 2. Boosterung = 3. Immunisierung mit Antigen und IFA oder aA
Tag 140: 3. Boosterung = 4. Immunisierung mit Antigen und IFA oder aA
Tag 252: 4. Boosterung (Auffrischungsimpfung) = 5. Immunisierung mit Antigen und IFA oder aA
- 5 [alle Immunisierungen ab Tag 28 subkutan (sbk.)]
Tag 510 - 500: Endnutzung der immunisierten Legehennen am Nutzungsende nach 17 bis 18 Lebensmonaten, d. h. im 12. bis 13. Legemonat.
Antigendosis: je nach Reinheitsgrad und Zustand (Lyophilisat oder Kultursuspension) zwischen 100 µg (0,1 ml) und 1000 µg (1 ml) in 0,5 - 1,0 ml Suspension (steril).
- 10 Adjuvans: zwischen 0,1 - 0,5 ml je Dosis gut durchmischt in sterilen Spritzen und Kanülen als Freund's Adjuvans; komplett und inkomplett.
Je nach antigenem Molekulargewicht (< 15000 > 30000) ist eine Bindung des Antigens an Trägereiweiße (bovines Serumglobulin oder humanes Serumalbumin) erforderlich.
- 15 **Beispiel 2:**
Aus dem dargelegten Immunisierungsschema nach Beispiel 1 und dem allgemeinen Immunisierungsprinzip zur Entstehung solcher spezifischen IgY-Antikörper via Eidotter, die das Geflügel zum Schutze seiner Nachkommen gegen Infektionen erzeugt, werden durch gezielte Impfung beispielsweise an Legehennen ab 15. Lebenswoche nach
- 20 erfindungsgemäßem Langzeitimmunisierungsschema und unter Zuhilfenahme von Freund's Adjuvans diese spezifischen, antikörperhaltigen Eier mit höchstmöglichem spezifischen IgY-Gehalt während der gesamten Legeperiode erzeugt.
Die gelegten Eier werden kühl gelagert aufbewahrt und regelmäßig - nicht älter als vier Wochen - eingeschlagen und als Volleihomogenisat bzw. als Eidotterhomogenisat mit 1:1
- 25 physiol. Kochsalz- oder PbS-Pufferlösung im pH-Bereich um 6,0 bis 7,5 zu Vollei- oder Eidotterpulver oder zu Gefriertrockengut (Lyophilisat) unter keimarmen Bedingungen verarbeitet.

Das Vollei- oder Eidotterhomogenisat wird ohne weitere Zusätze verarbeitet und konfektioniert und in der Nutzgeflügelfütterung oder resuspendiert via Tränke eingesetzt. Dieses Endprodukt wird gewonnen aus der Ei- und/oder der Eidotterrohmasse

- 5 a) als Pulver über Sprühtürme nach vorgegebenen Temperatur-Zeit-Parametern zwischen 68° und 95° C durch Erhitzung mit mindestens 95% Trockensubstanz = maximal 5% Restfeuchte,
- b) als Lyophilisat (Gefriertrockengut) über Gefriertrocknungsanlagen, resuspendierbar, mit max. 3,5% Restfeuchte.

10

Beispiel 3:

Die neuen, nach Beispiel 2 erzeugten Produkte sind reich an spezifischem IgY und zu Eidotter- oder Volleipulver und/oder Lyophilisat aufbereitet und besitzen eine spezifische, immuntherapeutische Wirkung. Sie werden oral zu 1% bis 5% ins Fertigfutter oder zu 2% 15 bis 5% resuspendiert ins Tränkwasser eingemischt und zwischen 1 und 6 (8) Wochen lang - ggf. wiederholt - verabreicht.

Der Einsatz via Futterbeimischung und/oder als Futterzusatzstoff erfolgt beispielsweise beim Nutzgeflügel bei indizierter Gefährdung mono- oder polyvalent spezifisch in der Aufzucht- und Mastphase und/bzw. während der Legeperiode bzw. in der 20 Reproduktionsphase des Nutzgeflügels sowie in der Legeruhe der bei Zuchttieren gegen die Virose (Parvo-, Adeno- und/oder Reovirose) beim Wassergeflügel und/bzw. enterotoxische E.coli-Stämme und Pasteurella multocida ssp.-Infektionen bei Legehennen unter Beachtung der Diagnostik, des Infektionsdrucks, der volkswirtschaftlichen und epizootiologischen Verlustrelevanz sowie der Beachtung der Streßprophylaxe und des 25 Tierschutzes.

Literatur:

- [1] KLEMPERER, F.: Über natürliche Immunität und ihre Verwertung für die Immunisierungstherapie. Arch. exptl. Pathol. Pharmathol. 31 (1893) 356 - 382
- [2a] KOBILKE, H.: Argumentation und Vorteile zur Durchführung der
5 Forschungsprojekte zu Tierversuchs-Ersatzmethoden und der Gewinnung polyklonaler Antikörper vom SPF-Huhn für die Diagnostik und Therapie in Medizin, Veterinärmedizin und Biowissenschaften. Vorlage für das BMG, das MELF und MWFK in Potsdam und Tagungsteilnehmer der GV SOLAS 9/94 München sowie der BIOTEC/MEDICA 11/94 in Düsseldorf (4 und 8/1994) - Fachargumentation
- 10 [2b] KOBILKE, H., GIPPNER-STEPPERT, C. und SCHEUBER, H.-P.: Das SPF-Huhn - eine Alternative zur Gewinnung hochspezifischer mono- und polyklonaler IgY-Antikörper aus dem Eidotter für die Immunodiagnostik und -therapie in Medizin und Veterinärmedizin. XXXII. Wiss. Tag. d. GV SOLAS, München, 12.-15.09.1994, abstracts und Poster, Tagungsbericht S. 85
- 15 [3] SCHADE, R. und HLINAK, A.: Die Extraktion spezifischer Antikörper aus dem Dotter von Hühnereiern - eine attraktive und unblutige Alternative zur Gewinnung spezifischer Antikörper in Säugern. Mh. Vet. Med. 48(1993), 91-98
- [4] SCHADE, R. und HLINAK, A.: Egg yolk antibodies. state of the art and future prospects Altex, Supplement-Band 13 (1996), 5-9
- 20 [5] IBURG, M und OLTMER, S.: Neue Strategien zur Verhinderung von Jungtierdurchfällen Lohmann-Information Sept. - Dez. 94, 5-13
- [6] OLTMER, S.: Neues zu Ei-Immunglobulinen für junge Säuger. Lohmann-Information 2/98, April - Juni 1998, 23-28
- [7] ERHARD, M. und LÖSCH, U: Einsatz von Dotterantikörpern gegen
25 Durchfallerkrankungen in: Vorträgen der Wiss. Tagung vom 20./21.10.1993 zu "Aktuelle Themen der Tierernährung und Veredlungswirtschaft" Lohmann - LTE GmbH, Cuxhaven
- [8] LÖSCH, U.: Wie kommen die Antikörper ins Hühnerei? Altex, Supplement-Band 13 (1996), 15-17.

Patentansprüche

1. Spezifische IgY-Eidotterantikörper, **dadurch gekennzeichnet**, daß von nach einem Immunisierungsschema, das auf hochimmunogenen lebenden oder abgetöteten reinen mono- oder polyvalenten homologen oder heterologen Antigenen beruht, immunisierten Hennen permanent Eidotter mit einem hohen Gehalt an hochspezifischen polyklonalen vitellinen Antikörpern erhalten werden, wobei Junghennen über die gesamte Legeperiode von 12 bis 13 Monaten immunisiert und wiederholt geboostert werden.
5
2. Gewinnung von spezifischen IgY-Eidotterantikörpern, wie im Anspruch 1 beschrieben, nach Basisimmunisierung von Hennen, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Erzeugung eines permanent maximalen Antikörperspiegels im Eidotter Junghennen gemäß nachfolgendem Immunisierungsschema über die gesamte Legeperiode von 12 bis 13 Monaten immunisiert werden: Basisimmunisierung = 1. Immunisierung 1. Boosterung = 2. Immunisierung - Beginn des erreichten Antikörperpiks - 2. Boosterung = 3. Immunisierung, 3. Boosterung = 4. Immunisierung, 4. Boosterung (Auffrischungsimpfung) = 5. Immunisierung und Nutzung der immunisierten Legehennen bis zum 17. oder 18. Lebensmonat.
10
15
20
3. IgY-Antikörper nach den Ansprüchen 1 und 2, erhältlich in Eiern von Hennen der Legerichtung, deren erste Immunisierung am Tag 0 subkutan mit Antigenen und komplettem Freund's Adjuvans (FCA), die zweite Immunisierung zwischen dem 25. und 30. Tag, vorzugsweise am 28. Tag mit Antigen und inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) oder aA (anderes alternatives Adjuvans) erfolgt, in der Zeit zwischen dem 35. und 45. Tag der Beginn des erreichten Antikörperpiks liegt und in dieser Zeit die Gewinnung und Aufbereitung von Eidotter beginnt, die dritte Immunisierung zwischen dem 51. und 61. Tag, vorzugsweise am 56. Tag mit Antigen und IFA oder aA, die vierte Immunisierung zwischen dem 130. und 150. Tag, vorzugsweise am 140. Tag mit Antigen und IFA oder aA, die fünfte Immunisierung zwischen dem 240. und 265. Tag, vorzugsweise am 252. Tag mit Antigen und IFA oder aA und die Endnutzung zwischen dem 490. und 500. Tag erfolgt.
25
30

4. Gewinnung von IgY-Antikörper nach Anspruch 2, dadurch erhältlich, daß immunisierte SPF- oder Vorzugs-Junghennen der Legerichtung subkutan oder intramuskulär immunisiert werden und die Antigen-Dosis 100 µg (0,1 ml) bis 1.000 µg (1 ml) in 0,5 bis 1,0 ml Suspension (steril) beträgt, verteilt auf 3 bis 4 Injektionsdepots.
5
5. IgY-Antikörper nach den Ansprüchen 1 bis 4, enthalten in Volleihomogenisat und Volleipulver, die unter keimarmen Bedingungen hergestellt werden.
6. IgY-Antikörper nach den Ansprüchen 1 bis 4, enthalten in Eidotterhomogenisat und Eidotterpulver, die unter keimarmen Bedingungen hergestellt werden.
10
7. IgY-Antikörper nach den Ansprüchen 1 bis 4, enthalten in Volleihomogenisat und Eidotterhomogenisat als Lyophilisate, die unter keimarmen Bedingungen hergestellt werden.
15
8. IgY-Antikörper nach den Ansprüchen 1 bis 4, enthalten in Volleipulver oder Eidotterpulver oder Lyophilisat als Bestandteil von Tierfutter und/oder Tiertränke zur Verringerung des Infektionsdrucks in und Verdrängung des Feldvirus aus den Tierbeständen.
20
9. IgY-Antikörper nach den Ansprüchen 1 bis 4 und 8, enthalten in Fertigfutter oder Tränkwasser für Nutzgeflügel, das insbesondere gegen Virose - Parvo-, Adeno- und/oder Reovirose - und gegen enterotoxische E.coli-Stämme und Pasteurella multocida ssp.-Infektionen anfällig ist.
25
10. IgY-Antikörper nach den Ansprüchen 1 bis 4, als Ausgangsbasis enthalten in monospezifischen ELISA-Kits für die Begleitdiagnostik, die Titer- und Qualitätskontrolle sowie die Titerentwicklung.

11. Verwendung von spezifischen IgY-Eidotterantikörpern nach den Ansprüchen 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die reich an spezifischem IgY und eine spezifische immuntherapeutische Wirkung aufweisenden Volleipulver und Eidotterpulver und Lyophilisate über Fertigfutter oder über Tränkwasser an Nutzgeflügel gegeben werden, das insbesondere gegen Virose - Parvo-, Adeno- und/oder Reovirose - und gegen enterotoxische E.coli-Stämme und Pasteurella multocida ssp.-Infektionen anfällig ist.
- 5
12. Verwendung von spezifischen IgY-Eidotterantikörpern nach den Ansprüchen 1 bis 10 als Ausgangsbasis in monospezifischen ELISA-Kits für die Begleitdiagnostik und die Titer-Qualitätskontrolle sowie die Titerentwicklung.
- 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/00547

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/02 A61K39/42 A61K39/40 A61P31/12 A61P31/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 33915 A (OVOIMMUN) 18 September 1997 (1997-09-18) cited in the application claims 1-11; example 1 ---	1-12
X	EP 0 503 293 A (TAIYO KAGAKU) 16 September 1992 (1992-09-16) cited in the application page 6, line 54 -page 7, line 5; claims 1-12 ---	1-12
A	US 5 080 895 A (TOKORO) 14 January 1992 (1992-01-14) column 5, line 47 -column 6, line 7; claims 1-7 --- -/--	1-12

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 June 2000

Date of mailing of the international search report

04/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/00547

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 14209 A (OVIMMUN) 9 April 1998 (1998-04-09) claims 1,34-36,39 ----	1-12
A	WIEDEMANN V ET AL: "Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious diseases" J VET MED (1991) 38 283-91, XP002109371 abstract -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE 00/00547

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9733915 A	18-09-1997	EP 0826005 A	04-03-1998
EP 0503293 A	16-09-1992	JP 6128298 A	10-05-1994
		CA 2061134 A	17-08-1992
		DE 69228016 D	11-02-1999
US 5080895 A	14-01-1992	AU 600240 B	09-08-1990
		AU 6564886 A	28-05-1987
		CA 1306946 A	01-09-1992
		CH 225254 H	15-09-1998
		DE 3689717 D	21-04-1994
		DE 3689717 T	20-10-1994
		EP 0225254 A	10-06-1987
		ES 2052496 T	16-07-1994
		MX 171572 B	08-11-1993
		JP 2034005 C	19-03-1996
		JP 7053669 B	07-06-1995
		JP 62215534 A	22-09-1987
WO 9814209 A	09-04-1998	AU 4741997 A	24-04-1998
		EP 0930891 A	28-07-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

l. nationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00547

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K16/02 A61K39/42 A61K39/40 A61P31/12 A61P31/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 33915 A (OVOIMMUN) 18. September 1997 (1997-09-18) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-11; Beispiel 1 ---	1-12
X	EP 0 503 293 A (TAIYO KAGAKU) 16. September 1992 (1992-09-16) in der Anmeldung erwähnt Seite 6, Zeile 54 -Seite 7, Zeile 5; Ansprüche 1-12 ---	1-12
A	US 5 080 895 A (TOKORO) 14. Januar 1992 (1992-01-14) Spalte 5, Zeile 47 -Spalte 6, Zeile 7; Ansprüche 1-7 --- -/--	1-12

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Juni 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Le Flao, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00547

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 98 14209 A (OVIMMUN) 9. April 1998 (1998-04-09) Ansprüche 1,34-36,39 ---	1-12
A	WIEDEMANN V ET AL: "Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious diseases" J VET MED (1991) 38 283-91, XP002109371 Zusammenfassung -----	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00547

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9733915 A	18-09-1997	EP 0826005 A	04-03-1998
EP 0503293 A	16-09-1992	JP 6128298 A	10-05-1994
		CA 2061134 A	17-08-1992
		DE 69228016 D	11-02-1999
US 5080895 A	14-01-1992	AU 600240 B	09-08-1990
		AU 6564886 A	28-05-1987
		CA 1306946 A	01-09-1992
		CH 225254 H	15-09-1998
		DE 3689717 D	21-04-1994
		DE 3689717 T	20-10-1994
		EP 0225254 A	10-06-1987
		ES 2052496 T	16-07-1994
		MX 171572 B	08-11-1993
		JP 2034005 C	19-03-1996
		JP 7053669 B	07-06-1995
		JP 62215534 A	22-09-1987
WO 9814209 A	09-04-1998	AU 4741997 A	24-04-1998
		EP 0930891 A	28-07-1999