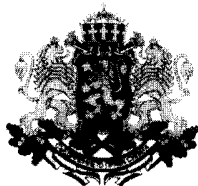


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 99888A

(51) A61K 39/00



ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

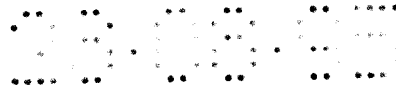
<p>(21) Заявителски № 99888 (22) Заявено на 28.08.1995 (24) Начало на действие на патента от:</p> <p style="text-align: center;"><b>Приоритетни данни</b></p> <p>(31) 9303681 (32) 24.02.1993 (33) GB</p> <p>(41) Публикувана заявка в бюлетин № 4   30.04.1996 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници:</p> <p>(62) Разделена заявка от рег. №</p>	<p>(71) Заявител(и): MALLINCKRODT VETERINARY, INC. , , MUNDELEIN, IL, MUNDELEIN, IL ( US ) ; (72) Изобретател(и): ROLPH , TIMOTHY P . , WHEATLEY, OXFORD ( US ) ; ANDREWS , STUART J. , UXBRIDGE, MIDDLES ( US ) ; (74) Представител по индустриална собственост: Валентина Великова Нешева , 1408 София , ул. "Димитър Манов" 20</p> <p>(86) № на PCT заявка: PCT/ GB94/0 / 0354 , 23.02.1994 (87) № и дата на PCT публикация: 94/190 / 10 , 01.09.1994</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**(54) ПРИЛОЖЕНИЕТО НА АНТИХЕЛМИНТНИ ВАКСИНИ ПРИ ЛЕЧЕНИЕ НА ПАРАЗИТНО ЗАБОЛЯВАНЕ, СВЪРЗАНО СЪС ЗАГУБА НА ЕСТЕСТВЕНИЯ ИМУНИТЕТ**

(57) Изобретението се отнася до използването на хелминтен скрит антиген или антигенни фрагменти, прекурсори и функционално еквивалентни производни или техни варианти с имуногенна активност срещу един или повече хелминтни паразити в производството на ваксина. Ваксината се прилага предварително на животни поне един път и/или през период на загуба или намаляване на естествения имунитет към гастро-интестинални хелминтни паразити. Изобретението се прилага, по-специално при лечението на околородилното увеличаване на хелминтния нематод *Haemonchus* при овце и на остертагиаза тип II.

30 претенции, 2 фигури

BG 99888A



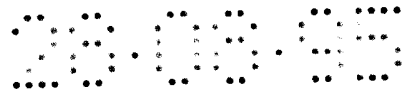
## ПРИЛОЖЕНИЕТО НА АНТИХЕЛМИНТНИ ВАКСИНИ ПРИ

ЛЕЧЕНИЕ НА ПАРАЗИТНО ЗАБОЛЯВАНЕ, СВЪРЗАНО СЪС ЗАГУБА

НА ЕСТЕСТВЕНИЯ ИМУНИТЕТ

Област на техника на изобретението

Представяното изобретение се отнася за приложението на хелминтни антигени при приготвянето на ваксини за третиране на заболяване, причинявано от хелминтни паразити, особено при домашните животни, и особено при използването на такива антигени при лечението на паразитно заболяване, свързано със супресия/изменение на естествения имунитет, напр. така нареченото перипартуриентно (околородово) увеличаване или остертагиза тип II.



### Характеристика на предшествващото състояние на техниката

Хелминтните паразити причиняват голям брой заболявания и инвазии при домашните животни, а също и при другите животни, които довеждат до загуба на животинска продукция и дори до смъртта на тези животни, имат голямо икономическо значение. При случаите при хората, хелминтните инфекции могат да доведат до значително намаляване и смърт. При домашните животни особено внимание трябва да се отдели на HAEMONCHUS, хранещ се с кръв нематод, който инфектира сиршето на преживните животни, причинявайки анемия и загуба на тегло, и който ако не се лекува многократно причинява смърт, и на OSTERTAGIA (TELADORSAGIA) – нематод, който не се храни с кръв, причиняващ същите проблеми по отношение на смъртността и заболяемостта на домашните животни, особено при говедата и овцете.

Други хелминти с голямо икономическо значение включват TRICHOSTRONGYLUS, COOPERIA, CHABERTIA, OESOPHASTOMUM, NEMATODIRUS, DICTYOCAULUS и различни метили (например FASCIOLA).

### Техническа същност на изобретението

Естественият имунитет по отношение на хелминти като HAEMONCHUS, може да се развие в стада, продължително пребиваващи на пасбище, но контрола на хелминтната инфекция традиционно е бил осъществяван, посредством употребата на антихелминтни препарати, заедно с третиране на пасището. Прилагането на антихелминтна ваксина би имало явни предимства пред другите лекарствени препарати, които изискват продължително прилагане и срещу които може да се



-3-

развие резистентност, и усилията в последните години са били насочени към имунологичните методи за лечение.

Над-обещаващи резултати понастоящем са били получени с протеини, екстракирани от червото на HAEMONCHUS, като имат потенциала на защитни антигени, не само срещу HAEMONCHUS, но и също срещу други хелминти. Особено, протеиновия дублет H110D, открит върху луминалната повърхност на червото на H. CONTORTUS, е показал качествата си да дава защитен имунитет срещу хемонхоза в обиде (виж например W088/00835).

Така нареченото перипартюриентно увеличаване също наричано и постпартюриентно увеличаване, представлява особен проблем. Този феномен се отнася за увеличаването на броя на хелминтните (общо нематоди) яйца, типично тези от различните видове, включително H. CONTORTUS, които са наблюдавани в екскрементите на животни по време последните стадии от бременността и особено около времето на раждане и ранните фази на лактацията, и въпреки че не е напълно установено, се счита, че се дължи на временно отслабване на имунитета, свързано с промените в циркулиращите нива на хормона пролактин, който се среща в животните по време на бременността, или намаляване на имуноглобулин, секретирани в млечната повърхност на червото, дължащо се на преминаване на имуноглобулин в плазмата към епитела на млечната жлеза, последвано от неговата секреция в млякото. Редуцирането на имунитета на гостоприемника завършва с увеличаване на производството на яйца от развитието на наскоро погълнати от гостоприемника лаври, или от активиране/възобновяване на развитието на блокирани лаври до възрастни форми, или и двата, което води до високи нива на яйца (и последващо



получаване на инфекцирани лабри) бързо пасбишето тъкмо по бременето на поябата на следващото поколение животни, и следователно нов податлив гостоприемник, се ражда и осигурява преживяването и разпространението на хелминтните видове. Така цикъла на инфекцията продължава.

За да се осигури, че податливите животни са адекватно защитени и за да се предотврати регулярно избухване на гладна инвазия, и следователно е желателно да се прекъсне този цикъл на инфекция на околородовия стадий. Както бе споменато по-горе, естественият имунитет пропада през критичния период и така единственият способ за контролиране на перипартурният растеж е бил прилагането на антихелминтни лекарства, преди чифтосване. Обаче, по време на бременността, животните обикновено продължават да приемат заразени лабри и състоянието на паразитиеръм може да бъде бързо възстановено. Но съществува реална необходимост за усъвършенствуван метод за контролиране на околородовото увеличаване и редуциране на последващия инцидент с хелминтна инфекция на податливи млади животни в постродовия период. Освен това, загуба на естествен имунитет към гастроинтестинални нематоди в животни, които не са бременни възникват от сезонни промени в диетата, лагериране и пазитно въздействие също могат да доведат до заболяване, често с фатален край, например остертагиза тип II при говедата.

#### Подробно описание на изобретението

Ние сме установили с изненада, че особения режим на ваксиниране, с използването на скрити антигени, получени от хелминти, при условията описани оттук нататък, е



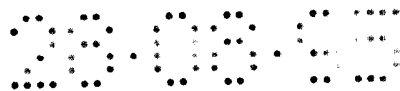
—5—

успешен при редуцирането на продукцията на хелминтни яйца в животните, страдащи от загуба на естествен имунитет, и особено в инфектирани бременни животни и следобратно в предотвратяване на околородното увеличаване и прекъсване на цикъла на инфекция.

От една страна, изобретението съответно осигурява приложение на хелминтен скрит антиген, или антигенни фрагменти, прекурсори и функционално-еквивалентни производни или варианти от това, имащи имуногенна активност срещу един или повече хелминтни паразити, в производството на състав на ваксина за прилагане на животно, предварително поне един път и/или през период на загуба или намаляване на естествения имунитет към гастроинтестинални хелминтни паразити, за да се стимулира защитния имунитет срещу споменатите хелминтни паразити през периода на компрометиран природен имунитет.

Нещо повече, изобретението предлага прилагане на хелминтен скрит антиген, или антигенни фрагменти, прекурсори и функционално-еквивалентни производни или техни варианти имащи имуногенна активност срещу един или повече хелминтни паразити, в производството на състав на ваксина за прилагане на женско животно, предварително поне един път през период на чифтосване и/или до започването на третото тримесечие на бременността, през която да стимулира защитен имунитет срещу споменатите хелминтни паразити през перипартурният период, и особено да предпази или редуцира перипартурното увеличаване.

Алтернативно погледнато, изобретението може да бъде погледнато, като предлагащо метод за стимулиране на имуноен отговор срещу хелминтни паразити у животно през



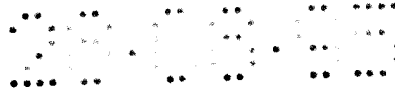
-6-

период на компрометиран естествен имунитет, споменатия метод включва прилагане на бече упоменато жиботно, поне един път преди и/или през периода на загуба или застрашване от загуба на естествения имунитет към гастро-интестинални хелминтни паразити на ваксина, включваща един или повече хелминтни скрити антигени или антигенни фрагменти, прекурсори и функционално-еквивалентни производни или варианти от това, имащи имуногенна активност срещу един или повече хелминтни паразити.

Отличителна черта на изобретението е, че предлага метод за стимулиране на имуен отговор срещу хелминтни паразити у женски жиботни през перипартурцентния период, и особено за предотвратяване или редуциране на перипартурцентния растеж, споменатия метод включва прилагане на бече споменатото жиботно, поне един път през периода преди раждосване и/или до започването на третото тримесечие на бременността, на ваксинаен състав, включващ един или повече хелминтни скрити антигени или антигенни фрагменти, прекурсори и функционално-еквивалентни производни или варианти от това, имащи имуногенна активност срещу един или повече хелминтни паразити.

Така, както так е прилаган, терминът "компрометиран естествен имунитет" включва загуба или намаляване на естествения имунитет, което води до неефективна или до неадекватна защита.

Така, според изобретението, ваксината е приложена през период, когато имунната система на жиботното остава компетентна и служи за осигуряване на адекватен отговор на антигена. В случай на перипартурцентна имунизация, за предпочитане, ваксината може да бъде



— 2 —

положена поне един път през периода преди чифтосване и/или до започването на второто тримесечие на бременността. Както по-нататък ще бъде посочено в детайли, най-общо е за предпочитане да се повтори имунизацията един или повече пъти през време на бременността, в съответствие с ветеринарната мерцинска практика.

Намаляване на естествения имунитет към гастро-интестиналните нематоди може да бъде манифестирано посредством:

1. бързобновена зрялост на блокираните ларви;
2. увеличаване на броя на погълнатите зрели ларви;
3. редуцирано изхвърляне на съществуващите възрастни глисти;
4. увеличаване плодовитостта на съществуващите възрастни популации.

Всичките четири от тези фактори са смятани, че допринасят за перипартюцентно увеличаване. Цотолкоба, доколкото други условия, свързани с загуба или намаляване на естествения имунитет са засегнати, например остертагиза тип II, ефектът на бързобновена зрялост се счита за особено важен.

Усвен това, хипобиотично или имунологично блокирани на ларви, това са ларви подложени на сезонно блокиране на развитието, което е типично за някои видове нематоди, боди до зрялост през пролетта около времето на раждане на гостоприемника и така пролетния растеж може също да допринася за перипартюцентния растеж. Естествения имунитет към хелминти, такива като HAEMONCHUS, действа главно на ранния L4 ларвен стадий, който е стадият при който

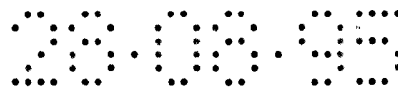


-8-

се случва блокирането в този род. Понякога лабрите успешно са възобновили развитието си и не могат повече да бъдат контролирани посредством естествения имунитет на гостоприемника. Напротив, скритите антигени са ефективни при стимулиране на защитен имунитет срещу най-късните лабри и установените зрели стадии фази, които са осветили механизма на клетъчния имунитет на гостоприемника.

Ефектът от предлаганото изобретение, състои се в стимулирането на защитен имуен отговор през периоди, когато естествения имунитет към хелминти е компрометиран, например обикновено през период на понижен имуен отговор към паразити на гостоприемника като бременността, което се изразява в предотвратяване или редуциране на перипартурентно увеличаване, е изненадващ и непредсказуем; По-ранните изследвания са показали, че ваксинирането на овци и говеда с помощта на антигени демонстрирано посредством имуоскрибнинг за да подпомогне естествения имуен отговор, не е ефективно. Следователно, в случая на околородова имунизация това не се очаквало, че чрез поставянето на първична имунизация на животните преди или скоро след изготвянето, факултативно последвано от втора имунизация през периода на бременността ще се успее в увеличаването на имуен отговор, способен да предотврати перипартурентно увеличаване. Подобно, не се е очаквало, че други условия, свързани с загуба или намаляване на природния имунитет, такива като остертагиваа тип II, могат също да бъдат контролирани посредством имунизация през периода на компрометиран естествен имунитет.

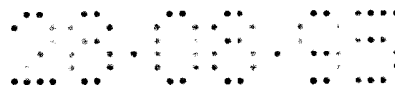
Докато па желаем да го обсъждаме теоретично, смята се че ефектът се състои главно в предотвратяването на



съзряването до зрели форми на на хипоблиотичните или имунологично блокирани лаври и посредством това регулиране на нивото на установената инфекция. Намаление на броя на яйца, получени от възрастни паразити може също да играе значителна роля. Това може да бъде от особена важност за хелминти като *OSTERTADIA*, където съзряването на блокирани лаври в бременни животни, или последващите сезонни климатични промени в мъжките и женските говеда често водят до болест с фатален изход, например остертагиза тип II.

Допълнителен важен фактор при перипартурентния ефект може да бъде премиването през коластрата в бозвешото младо животно на майчински защитни антитела, индуцирани посредством имунизация с скритите антигени, които могат също да бъдат от значителна важност при намаляване на случаите на инфекция, например чрез *HAEMONCHUS* в младите животни, последвано от приемане на лаври, произлезли от яйца в резултат на околородното увеличаване. Това е в пълен контраст с естествения имунитет, който не е пренесен от майката на потомството.

Терминът "скрит антиген" е прилаган в изобретението за тези антигени, известни също и като "cryptic", "прикрити" или "латентни" антигени, които по време на обичайния ход на инфекционния процес не близват в контакт с имунната система на гостоприемника, и които следователно не са реконисцирани чрез серум на животни, които имат придобит естествен имунитет към въпросния паразит. Такива антигени, така най-общо получени от тези вътрешни части на хелминта, през периода на инфекцията не са близвали в контакт с имунната система на гостоприемника. Така например, установено е, че червата на хелминта е богат



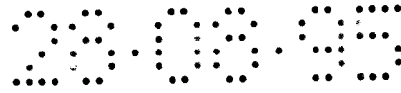
источник на скрити антигени.

Прекурсор на въпросния антиген може да бъде голям белтък, който е получен, например чрез протеолизиса на даден антиген сам по себе си. Такива прекурсори могат да вземат формата на зиногени (профермент), т.е. инактивни прекурсори на ензими, активирани посредством протеолитично разцепване, например, аналог на системата пепсин/пепсиноген или добре известните зиногени обхващени в каскадата на системата на кръвосъсирване.

Откакто скрити антигени упражняват техните ефекти, посредством излъчване на продукцията в кръвния поток на гостоприемника от имунните ефекторни молекули, такива като антитела или комплемент, които са бвети от паразита, когато се хранят с кръвта на гостоприемника, понятието скрити антигени бе отначало използвано ограничено само при хранещи се с кръв паразити. Ние показваме обаче, че скрити антигени могат да бъдат прилагани като база за ваксина за хелминтни паразити, които не се хранят с кръв.

Терминът "имуногенна активност" както е използван в изобретението, дефинира тези антигени и техните фрагменти, прекурсори, производни и варианти, способни да генерират в гостоприемника защитен имунен отговор, т.е. отговор чрез гостоприемника, който води до производство на имунни ефекторни молекули, антитела и/и клетки, които стерилизират или редуцират плодовитостта, побреждат, инхибират или убиват паразита и посредством това намаляват броя отделените от паразита яйца и "защизават" гостоприемника от клинични или субклинични болести и загуби на продуктивността.

Такъв защитен имунен отговор към скрити

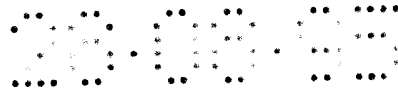


-11-

антигени може - над - обикновено да бъде манифестиран посредством получаването на антитела, които са способни да потискат метаболичната функция на паразита, водеше до спиране на растежа, липса на производство на яйца и/или смърт. Тази продукция на защитни, главно IgG, антитела, които присъствуват в серума на гостоприемника, е един важен фактор изискващ типа на имунен отговор, извлечан посредством скрити антигени от така наблюдавания с естествен имунитет; където скритите антигени са в основата на имунния ефекторен механизъм с първично хуморален тип т.е. основан на антитела, естествения имунитет към паразитите се явява като първично клетъчно-медиран, т.е. еозинофили и мастни клетки, които са взети в действие за освободят бещества, които подреждат паразита, хуморалната част на имунния отговор е по-малко важна.

Тези различия в индуцирания от скрити антигени имунитет се смятат за важни съдействащи фактори за приноса на скритите антигени за контролирането на хелминтните заболявания през периода на компрометиран естествен имунитет, т.е. перипартюриентно увеличаване и остертагиза тип II при лобедата.

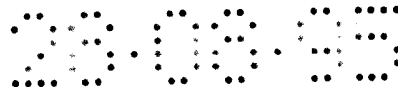
Както бе споменато по-горе, в обхвата на изобретението са включени функционално-еквивалентни фрагменти, производни и варианти на хелминтни скрити антигени. Терминът "функционален еквивалент" е използван за да дефинира протеини, включително гликопротеини, свързани или произлезли от природни протеини, където аминокиселинната секвенция е била модифицирана посредством единично или множествено аминокиселинно заместване, добавяне и/или делеция и също секвенции, където аминокиселините са били по



химичен способ модифицирани, включително посредством деглицосилация или глицосилация, но които въпреки това запазват защитна антигенна (имуногенна) активност, напo. са в състояние да повишават защитните антитела на гостоприемника и/или функционалния имунитет срещу хелминти. Такива функционално-еквивалентни барианти могат да срещнат като естествени биологични барианти или могат да бъдат получени с помощта на известни технологии. Например, функционално-еквивалентни рекомбинантни протеини могат да бъдат приготвени чрез използването на известните технологии чрез насочена към участък мутагенеза, или случайна мутагенеза, или ензимно разграждане и/или лигиране на нуклеинови киселини.

Както бе споменато по-горе, при околородова имунизация, ваксинната композиция, на основата на скрити антигени се прилага на женски животни поне един път през периода преди чифтосването и/или до началото на третото тримесечие на бременността, по-ва предпочитане до началото на второто тримесечие на бременността. Наб-общо, обаче, ваксината се прилага по-често от един път, например с първата инжекция преди чифтосването и една или повече реваксинации през периода до началото на третото тримесечие, но за предпочитане до началото на второто тримесечие на бременността.

Подходящо е, ваксината да бъде поставена най-напред през периода между 20 и 60 дни преди, или по-ва предпочитане 10 дни след чифтосване, например през 45-те дни до чифтосването или още по-добре през периода между 40-ия и 5-ия, особено между 40-ия и 10-ия дни преди чифтосването. Докато прилагането на първата ваксинна инжекция наскоро

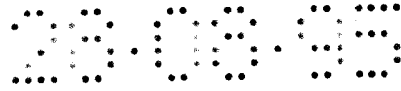


преди чифтосването е за предпочитане, различните ветеринарни специалисти или различните ферми могат обаче да твърдят, че имунизацията през други периоди, например 6 месеца преди чифтосването, или дори скоро след раждането на младото животно, може да бъде по приемлива.

Прилагането на реимунизация може да бъде по всяко време след чифтосването до началото на третото тримесечие на бременността. Например, реимунизация може да бъде направена едн или няколко пъти в периода до ранното второ тримесечие до ранното трето тримесечие на бременността.

Както бе дискутирано по-горе, ваксинация със същия имуноген може да намери място повече от един път през бремене на съответния период и могат да бъдат подходящи различни комбинации за различни животни или ваксини. Алтернативно, обаче прилагането на контролирано-изпускаща система доставяща антигени, ще индуцира дълго продължаващ имунен отговор в сравнение с единичната ваксинация (O' Naqan, et al., 1991. Immunology, 73: 239-242). Ако първата инжекция е направена повече от 6 месеца преди чифтосването, следващата инжекция бързо в 6-те месеца преди чифтосването, най-общо ще се изискват. Инжектирането на годишната реваксинация може да задоволява в някои случаи, например през зимния период, когато риска от инфектиране е нисък. Като пример за подходящ режим за имунизация, поставянето на ваксина, основана на H110D двукратно на 40-ия и 10-ия дни преди и около 90 дни след чифтосването е намерено за ефективно при имунизиранието на овце срещу HAEMONCHUS.

Въпреки че, имунизация на животни единствено през късната бременност е намерена за неефективна, там



където не се използва прилагането на контролирано-изпускателна система, една или повече реимунизации с ваксината ще бъдат за предпочитане, да бъдат направени през време на бременността до началото на третото тримесечие, например при овцете около 50 - 100 дни, например между 45-ия - 90-ия дни през време на бременността.

Животни, за които може да бъде извлечена полза от представяното изобретение, могат да бъдат всички домашни или други животни, но домашни любимци, специално кучета, котки и домашни животни, особено преживни животни са за предпочитане. Особено внимание ще бъде отделено на овце, говеда, елени и кози.

Броя на хелминтните видове е свързан с перипартюриентния растеж и така, те са подходящи обекти за прилагане на ваксинния състав. Тук се включват най-известни видове като HAEMONCHUS, OSTERTAGIA, TRICHOSTRONGYLUS, CHABERTIA, CHABERTIA, OESOPHASTOMUM, HYOSTRONGYLUS, NEMATODIRUS, TOXOCARA и COOPERIA. Скрити антигени могат да бъдат получени от редица такива хелминти.

Предпочитани са тези антигени, така наречените антигени с "широк спектър", които са способни да стимулират защитните имунни отговори на гостоприемника срещу, в допълнение към хелминтите от които те са били изолирани, редица други хелминтни паразити.

Най-подходящо, скритите антигени, използвани според изобретението могат да бъдат интегрални мембранни протеини, изолирани от червата на хелминта, включвайки за пример ензими, структурни протеини или други функционални протеини, изисквани за съхранение и/или разбитие на хелминтните яични протеини, включени в хранителния механизъм



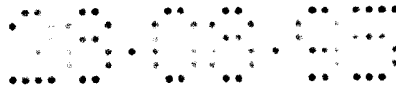
-15-

на хелминта. Такива протеини могат да бъдат например ензимни протеази или екзо- и ендопептидази, включени в разградения хранителен протеин до свободна аминокиселина.

Подходящи скрити антигени включват H110D, споменат по-горе, приготвянето на рекомбинантни форми, от които е описано във WO93/23542. Упоменат е също и направен от протеинов комплекс H45, описан във WO90/11086 и на антигените, описани във WO/94/02169. В последния случай, такива антигени включват интегрални мембрани протеини, имащи нативна локализация в червата на паразита и характеризирани чрез способността за съвръзване с пепстатин и с пшеничен зародишен лектин и фъстъчен лектин и други лектини, имащи специфичност за бета-свързан N-ацетилазлактозамин. Такива антигени могат да бъдат протеолитични ензими, специално ензими, имащи аспартилова протеаза и/или неутрална ендопептидазна активност. Особено внимание може да бъде обърнато на антигените H-gal-6P и O-gal-6P, които са описани в детайли в WO94/02169.

Антигените и техните фрагменти, прекурсори и функционално-еквивалентни варианти и деривати могат да бъдат нативни антигени, изолирани директно от хелминти, или могат да бъдат получени чрез рекомбинантна ДНК технология, използвайки стандартни технологии, такива като описаните например от Sambrook et al., 1989 (Molecular Cloning, a Laboratory manual 2nd Edition, Cold Spring Harbour Press), или чрез химически синтез, такъв като добре известната синтетична процедура на Merrifield (твърда фаза).

Ваксинната композиция, приложена на животното може да бъде поливалентна, съдържайки редица от антигенни компоненти, например, които са активни срещу редица



-16-

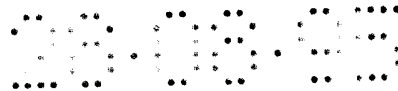
величинни бидобе.

Ваксинна композиция може да бъде получена според изобретението чрез методи, добре известни областта на производството на ваксини. Традиционни ваксинни рецептури могат да включват един или повече антигени или антигена, според изобретението съвместно, където е подходящо, с един или повече съвместни адювант, например алуминиев хидроксид, поташ стигли, сапонин или производни от това, муранилоб дипептид, минерални или растителни масла, NAGD, Novavomes или нейонни блокери съполимери, DEAE декстран или контролирани системи, даващи антиген като биоразградими микрочастици, в присъствието на един или повече фармацевтично приемливи носители или разтворители. Подходящи носители включват течна среда, като солици разтвор, подходящ за използване като бехикул за да бъде пептидите или полипептидите в организна на животното или пациента. Могат да се включат и допълнителни компоненти като консерванти.

Алтернативна ваксинна структура може да включва вирус или клетка гостоприемник, например микроорганизъм, който може да бъде жив, убит или отслабен, или инсертирана бърза молекула на аминокиселина (напр. ДНК молекула) за стимулираща на имунен отговор насочен срещу полипептиди, кодирани чрез инсертирана молекула на аминокиселина.

Прилагането на ваксинната композиция може да намери своето място при всеки от конвенционалните пътища за въвеждане, напр. орален или парантерален, посредством интранаскулно, подкожно или вътрекожно инжектиране. Инжектирането на общо е за предпочитане.

Изобретението по-нататък ще бъде дискутирано в



-17-

по-големи детайли с особена реверенция за предотвратяване перипартурientния растеж на HAEMONCHUS в овце, използвайки скрития антиген H110D. Докато нелимитираното обобщение на изобретението дефиниране по-горе не бъде разбрано, ще се установи, че използването на антигени от HAEMONCHUS за предпазване на перипартурientния растеж при отделянето на яйца на HAEMONCHUS в овце, представлява предпочитан аспект на изобретението. В следващите примери, фигурите представят:

Фигура 1 показва средния брой на фекалните яйца (хиляда яйца за грам) през побечето бремене у ваксинирани и неваксинирани бременни и небременни овце с въвеждани инфектирани лаври на HAEMONCHUS на 110-ия ден на бременността.

Група Д (17 бременни овце, ваксинирани с H110D и кластридиалната ваксина COVEXIN 8)

Група Е (18 бременни овце, ваксинирани с H110D)

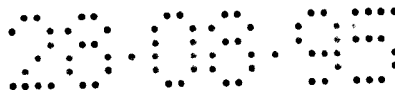
Група Ф (5 не бременни овце, ваксинирани с H110D и COVEXIN 8)

Група Г (3 небременни овце, ваксинирани с H110D)

Група Ц (17 бременни овце, ваксинирани с феритин като контролна група)

Стрелката индицира бременето на въвеждане; и

Фигура 2 показва защитата на агнетата срещу H. CONTORTUS, с въвеждане на 5-та седмица от раждането чрез коластриен пренос на антитела към H110D (брой на фекални



-18-

яйца (хиляда яйца за грам)) за време (дни след средната дата на обатненето) o – агнетата от ваксинирани обие o – агнетата от обие от контролната група.

#### П Р И М Е Р 1

С този пример се цели:

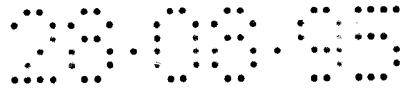
(i) Да се оцени ефикасността на H110D ваксина при контролирането на отделянето на глистни яйца, асоциирано с инфекция с H. CONTORTUS в обие през перипартюцентния период.

(ii) Да се наблюдава имунологичния отговор с антитела и в бременните и в небременните обие за да се оцени въздействието на бременността върху имуногенността на антигенът H110D.

(iii) Да се оцени ефектът събместното приложение на кластрициалната ваксина COVEXIN B на ефикасността на H110D ваксина. Събместимостта на съществуващите бактериални ензими с нови паразитни ваксини е необходимо условие за тяхната адаптация в практиката.

#### Въведение

Това изследване оценява ефикасността на H110D ваксина при контролирането на отделянето на глистни яйца от двугодишни обие (гимери) ваксинирани двукратно преди зачеването и поддържани през бременността и въвеждане на инфектирани ларви на H. CONTORTUS през последното



тримесечие на бременността. Тези тинери са сравнени с  
подходящи по възраст ваксинирани небременни контролни групи.

Р А Э П И С А Н И Е (Главни дати)

ДАТА	ДЕН НО	ДЕЯНОСТ
Еанен септември	- 50	Обце, дозирани с лебанисол (NILVERM GOLD) са изведени на пасбище.
	- 40	Производно определена група и първа ваксинация.
	- 10	Втора ваксинация
	- 8	Обни се окарбат за приблизително три седмици.
	0	(Средна дата на зачеване)
	20	Всички обце са дозирани с ибермектин (ORAMEC DRENCH) и прибрани от пасбището.
	90	Трета ваксинация.
	110	Всички обце приенат са, 10000 инфектирани с H. CONTORTUS лаври След две седмици фекалните проби започват
март/април	147	Обагненето започва.
юли/август	267	Отбиване на агнетата.

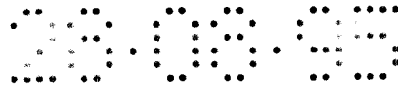
Методи и експериментални способи

60 обце, дозирани с лебанисол (NILVERM GOLD) за



-20-

да отстрани всеки установен глист, бяха пренесени в заграденото място до кошарите в началото на м. септември 1991 г. Послеоба минимален период от 7 дни за аклиматизиране и общите бяха разпределени в три групи А, Б и Ц, които включваха респективно 35, 8 и 17 пинери. Последните в групите А и Б бяха ваксинирани с H110D (денят е -40-ти), докато тези в група Ц бяха ваксинирани с феритин, като контролна група. Тридесет дни по-късно (денят е -10) общите получиха втората си ваксинация и веднага след това бяха разделени в следващите групи: - общите в група А бяха разделени, формирайки две нови групи - Д и Е, докато по подобен начин група Б формира групите Ф и Г. Общи се бкарват през последната седмица на м. октомври при тези жаботни от групи Ц, Д и Е за да се определи за група средна дата за оплождане, колкото е възможно по-близка до денят 0 и планираната дата за обагнене през последната седмица на м. март или първата седмица на м. април. Общите в групи Ф и Г не бяха пуснати при обните, така че да се действа като при ваксинираните небременни контроли. След приблизителни шест седмици обните бяха изселвани от заграденото място с общите и общите бяха оставени да пасат заедно като едно стадо. На 80-ия ден всички пинери бяха обвирани с ивермектин (IVERMECTIN DRENCH) за да бъдат отстранени всички зрели глисти и бладжирани лаврите и подслонени. Третата ваксинация беше с H110D бе поставена на всички общи в групите Д, Ф, Е и Г на 90-ия ден (тоба е 90 дни бременност  $\pm$  дни). Общите в групи Д и Ф също получиха инжекции с COVEXIN B по това време. На 110-ия ден от бременността  $\pm$  10 дни, на всички жаботни бяха бвбедени са. 10000 H. CONTORTUS инфектирани лаври. Броя на нематодите бе проследяван чрез изследване на фекалиите.



Отсъствието на възможно подтискане на имунния отговор към скрития антиген H110D през бременността беше потвърдено чрез проследяване на нивата на антителата.

Обобщение

ГРУПА	ВАКСИНАЦИЯ	БРЕМЕНИИ/не-БРЕМЕНИИ
Група А	Ваксинирани двукратно преди оплождането (H110D)	Бременни
Група Д	H110D + COVEXIN B на 90-ия ден бременност	"
Група Е	H110D на 90-ия ден бременност	"
Група В	Ваксинирани (H110D)	не-Бременни
Група Ф	H110D + COVEXIN B на 90-ия ден бременност	"
Група Г	H110D	"
Група Ц	Ваксинирани (феритин)	Бременни

) = Време, подходящо за ваксинация на групи Д и Е

ИЗПОЛЗВАНИ МАТЕРИАЛИ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТА

Ваксина на H. CONTORTUS (H110D) беше приложена и подготвена от Institute of Animal Physiology and Genetics Research, Babraham, Cambridge. Спомагателната система за първата ваксинация беше Freund's complete adjuvant/aluminium hydroxide (FCA/Al(OH)<sub>3</sub>) и Freund's incomplete adjuvant/aluminium hydroxide (FIA/Al(OH)<sub>3</sub>) за втората и третата ваксинации.

Конска контролна ваксина с феритин беше



-12-

приложена и приготвена от Institute of Animal Physiology and Genetics Research, Wabraham, Cambridge. Спонагательната система беше като по-горе.

#### ВЪВЕЖДАНЕ НА ПАРАЗИТ

##### Видове/Щам

Щам на *H. CONTORTUS* (щам H/CR), който е резистентен на бензенидазол беше използван в изследването. Щамът беше получен като ларви трети стадий от Central Veterinary Laboratory, Weybridge. Резистентността към бензенидазол беше потвърдена чрез анализ с инкубирани яйца и контролен тест (Cawthorne RJG and Cheong FH 1984, Veterinary Record 114: 562).

##### Лабрена култура

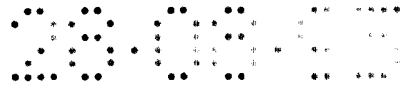
Достатъчен брой от ларви трети стадий бяха получени посредством пасаж през неконтаминирано с глести агне. Фекалии, съдържащи яйца бяха събрани и отгледани до инфективен стадий. Инфектирани ларви бяха възстановени и пречиштени с помощта на апарата на Ваегманн.

##### Дози със инфектиращо действие

Материал за инокулиране с са. 10000 инфектиращи ларви беше приготвен с помощта на стандартна разреждаща технология. Ларвите бяха въведени през устата чрез чисти пластмасови туби.

##### Процедура за въвеждане

За да се осъществи контролирано въвеждане в



-23-

последното тримесечие на бременността всички овце бяха третирани с ибермецитин (ORAMEC DRENCH) за отделяне акумулирани обременени глисти и подслонени в кошара беднага на 80 ден. На всички овце, бяха бърбедени на 110-ия ден от бременността са. 10000 инфективни ларви на *H. CONTORTUS*, които бяха използвани за наподобяване, в контролния начин за развитието на перипартицентен растеж.

#### ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОЦЕДУРИ

---

##### Контрол на системната грешка

---

Всички овце бяха разпределени по групи на основана на критериите телесно тегло към определеното време.

##### Процедура на ваксинация

---

Обиете в групи А и Б бяха ваксинирани с интранаскулна инжекция в задното бедро (1 ml във всяко бедро, общо 2 ml) с 150 µg от антигена на *H. CONTORTUS* (H110D) на -40-ия ден и повторно в предните бедра (1 ml във всяко бедро, общо 2 ml) на -10-ия ден. На 90-ия ден, след формирането на групите Д, Е, Ф и Г, всички овце в тези четири групи получиха трета реваксинация чрез интранаскулна инжекция в задните бедра (процедурата е същата като при първата имунизация). Респективно, обиете в групи Д и Г бяха инжектирани подкожно в областта на шията (както е според Р А З П И С А Н И Е Т О (с кластридиална ваксина COVEXIN В. Обиете в група Ц останаха като контролна група и получиха инжекции с конски феритин (по същия начин и обем както при ваксината H110D) на -40-ия ден, на -10-ия ден и COVEXIN В подкожно на 90-ия.

## ОЦЕНКА НА ЗАЩИТНИТЕ КАЧЕСТВА

### Брой на фекални яйца

Бяха взети фекални проби от всички овце (от ректума) на седмични интервали, започвайки приблизително шест седмици преди облагненето до приключването на експеримента. Броя на фекалните яйца беше установяван посредством модифициран вариант на метода на McMaster, с точност до 10 яйца на грам (еро) фекалии. Фекалните проби бяха култивирани на всеки две седмици за 7 дни при 27 градуса по Целзий за идентифициране на ларви и потвърждаване на чистотата на бърбеждането.

### Реагиране с производство на антитела, в резултат на ваксинация с CopAN11

Бяха взети кръвни проби от югуларната вена на всички овце в обикновени кръвни контейнери на обседмични интервали след първата ваксинация. Кръвни проби бяха взети на деня на първата ваксинация за референция на серума. Титрата на антителата бяха установени посредством метода ELISA.

## РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от изследването са показани на Фигура 1. Тя ясно показва, че неваксинираните бременни овце (група II) продуцират високи титра на нематодни яйца около бременето на облагнене следващо изкуствено бърбеждане. Всички ваксинирани овце обаче, дават значително редуциран брой на яйца в техните фекалии. Защитните качества не бяха намалени у оцетите, които получиха също и кластридиална ваксина.

ТАБЛИЦА 1 показва резултатите от анализите с метода ELISA за определяне на нивата на антитела у животните, участвували в изследването. Може да се види, че всички ваксинирани овце демонстрират по-високи нива на антитела, в сравнение с тези от контролните групи, които не са ваксинирани. Нивата на антитела у ваксинираните бременни овце бяха подобни на тези на небременните ваксинирани овце, потвърждавайки отсъствието на супресия на реакцията с производство на антитела срещу скритите антигени. Съвместното прилагане и на кластридиалната ваксина COVEXIN B не повлиява върху нивата на антителата.

ТАБЛИЦА 1

Анализ на серумни проби, разредени 1:1000 срещу  
H110D, чрез метода ELISA

Животно No	Група	90 дни бременност	100 дни бременност	Животно No	Група	90 дни бременност	100 дни бременност
223	Ц	0.459	0.419	180	Е	1.714	2.132
226	"	0.267	0.287	191	"	1.905	2.420
231	"	0.203	0.148	193	"	1.856	2.290
234	"	0.096	0.178	199	"	2.123	2.309
235	"	0.112	0.234	209	"	1.965	1.998
236	"	0.098	0.294	212	"	1.093	2.104
237	"	0.150	0.108	214	"	1.654	2.520
238	"	0.741	0.552	224	"	1.956	2.708
175	"	0.119	0.108	227	"	1.486	2.314
195	"	0.229	0.175	228	"	1.278	2.236
202	"	0.495	0.267	233	"	1.202	2.218
204	"	0.368	0.247	239	"	1.155	2.251



Животно	Група	90 дни	100 дни	Животно	Група	90 дни	100 дни
№		бременност	бременност	№		бременност	бременност
207		0.118	0.153	240		1.673	2.531
210	"	0.339	0.308	241	"	1.391	2.548
215		0.190	0.117	245		1.921	2.484
				248	"	1.268	2.505
217	"	НИ	НИ	253	"	1.750	2.408
216	"	НИ	НИ	298	"	1.911	2.222
	СРЕДНО	0.271	0.247		СРЕДНО	1.606	2.344
222	Д	0.880	2.165	198	Ф	2.062	2.105
230	Д	1.289	2.288	203	Ф	1.792	НИ
244	Д	2.126	2.523	243	Ф	1.373	2.446
247	Д	1.871	2.553	246	Ф	1.865	2.326
249	Д	1.910	2.505	264	Ф	1.436	2.418
250	Д	1.894	НИ		СРЕДНО	1.706	2.239
255	Д	1.710	2.459				
190	Д	1.918	2.283				
194	Д	1.837	2.311				
196	Д	1.556	2.241				
197	Д	1.658	1.875	189	Г	1.565	2.285
200	Д	1.864	2.137	205	Г	1.271	1.761
208	Д	2.066	2.199	272	Г	1.637	2.484
211	Д	1.869	2.066		СРЕДНО	1.409	2.217
213	Д	1.418	2.443				
274	Д	1.612	2.239				
300	Д	1.301	2.214				
	СРЕДНО	1.692	2.291				

ГРУПА Д = ВРЕМЕНИ (Н110Д + СОВЕХ1Н В)



- ГРУПА Е = ВРЕМЕННИ (само Н110D)
- ГРУПА Ф = НЕВРЕМЕННИ (Н110D + COVEXIN B)
- ГРУПА Г = НЕВРЕМЕННИ (само Н110D)
- ГРУПА Ц = ВРЕМЕННИ (контролни, с феритин)
- НИ = НЕ ИЗСЛЕДВАНИ

П Р И М Е Р 1

Пренасяне чрез коластрата на нециран от Н110D имунитет

Обосновка на опита

За да се установи, че защитните качества могат да бъдат удостоени при малки агнета, са, на 5 седмици, кърмещи от овце, които са имунизирани с Н110D, отнасящи се за агнета на неимунизирани овце. Защитните свойства бяха определени като намаляване на отделянето на яйца с фекалии и родени глисти, след приемане на пилъла.

Съдържание на опита

Съдържанието на опита е обобщено:

ТАБЛИЦА 2

ГРУПА	БРОЙ НА АГНЕТА, ПОЛУЧИЛИ П.	ПРИЕМАНА НА 5 СЕДМИЧНА ВЪЗРАСТ (L ЛАРВИ) 3
АГНЕТА ОТ ОВЦЕ, ВАКСИНИРАНИ ПРЕЗ ВРЕМЕННОСТТА С Н110D	6	3000

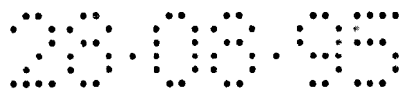
ТАБЛИЦА 2 (продължение)

ГРУПА	БРОЙ НА АГНЕТА, ПОЛУЧИЛИ П.	ПРИЕМАНА НА 5 СЕДМИЧНА ВЪЗРАСТ (L ЛАРВИ) 3
АГНЕТА ОТ ОВЦЕ, НЕВАКСИНИРАНИ ПРЕЗ ВРЕМЕННОСТТА L H110D	6	3000

Всички подробности за имунизирването на бременни овце с H110D са описани в ПРИМЕР 1. Десет агнета, родени от имунизирани с H110D овце, заедно с десет от контролните овце, бяха селектирани на базата на случайността на възраст 2-3 седмици. Антисерум от тях беше скриниран посредством метода ELISA за определяне на нивата на анти-H110D антитела. Шест агнета с най-високите нива на антитела бяха подбрани от група овце, имунизирани с H110D. Шест контролни агнета бяха подбрани да подхождат по възраст. Тези две групи от агнета получиха 3000 L<sup>3</sup> ларви от H. CONTORTUS (H/CR шам) на 4 - 5-та седмица. Броят на фекалните яйца беше установяван от 8 - 11 седмица и родените глисти изброявани на 11 седмица след аутопсия.

#### Резултати

Преминването на антитела чрез коластрата беше потвърдено чрез техните високи нива в шестте агнета от



-29-

общете, имунизирани с H110D (виж ТАБЛИЦА 3). Напротив, не  
бяха открити анти-H110D антитела в агнетата от контролните  
обще.

ТАБЛИЦА 3

Възраст на агнета (в седмици)	2/3	3/4	7/8	8/9	10/11
	Средна оптична плътност при 405 nm дебелина на филма				
Агнета от обще, имунизирани с H110D	1.5	1.6	0.9	0.9	0.9
Агнета от обще, от контролната група	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

н.о. = няма открити

Разреждането на серума беше 1/1000.

Общият брой на фекални яйца на възраст от 8 до  
11 седмици бе 50% по-нисък ( $P < 0.05$ ) у агнета от имунизирани  
обще, в сравнение при контролната група (Виж Фигура 2), в  
съответствие с по-малкото зрели женски гисти (виж по-долу).  
Средния брой на родените гисти, 5 седмици след приема, бе:

ТАВЛИЦА 4

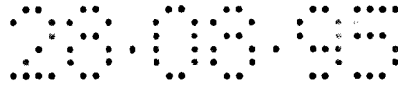
ГРУПА	БРОЯ НА РОДЕНИ ГЛИСТИ	% НА ЗАЩИТА	СРЕДНО СЪОТНОШЕНИЕ МЪЖКИ/ЖЕНСКИ
АГНЕТА ОТ ОБЦЕ ВАКСИНИРАНИ С H110D	625	30.0	0.35
АГНЕТА ОТ КОНТРОЛНИТЕ ОБЦЕ	892		1.15

Намалването при родените глисти беше незначително ( $P < 0.05$ ). Обаче, имаше добре маркирано намаление на съотношението мъжки/женски организми ( $P < 0.05$ ), характеристичния ефект от имунизацията с H110D е по-изябен при зрялите агнета.

Обобщение

Агнета, родени и отглеждани от овце, които са били имунизирани с H110.D имат значителни нива на антитела срещу H110D, които са получени в резултат на преминаването им от майчиния организъм през коластрата.

Тези антитела имат защитни качества срещу отделянето на яйца с фекациите и срещу раждане на глисти, в резултат на прием на пилули на възраст от 5 седмици.



ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ:

1. Приложение на хелминтен скрит антиген, или антигенни фрагменти, прекурсори и функционално-еквивалентни производни или баранти от това, имащи имуногенна активност срещу един или повече хелминтни паразити, в производството на състав на ваксина за приложение на жаботно, поне един път предбарително и/или през перипартурцентния (околородилния) период, чрез което да се стимулира защитен имунитет срещу споменатите хелминтни паразити през околородилния период.

2. Приложение, съгласно претенция 1, в производството на състав на ваксина за приложение на женско жаботно поне еднократно през периода преди чифтосването и/или до началото на третото тримесечие на бременността, чрез което да се стимулира защитен имунитет срещу споменатите хелминтни паразити през околородилния период.

3. Приложение, съгласно претенция 2, за предотвратяване или намаляване на околородилното увеличаване.

4. Приложение, съгласно претенция 2 или претенция 3, в което споменатия ваксинаен състав е приложен на женското жаботно поне еднократно преди чифтосване и поне един път през време на бременността, до началото на третото тримесечие на бременността.

5. Приложение, съгласно претенция 4, в което споменатия ваксинаен състав е приложен на женското жаботно поне еднократно преди чифтосване и поне един път през време



на бременността, до началото на второто тримесечие на бременността.

6. Приложение, съгласно претенция 1, за борба с остертагиза тип II.

7. Приложение, съгласно претенции от 1 до 6, в което споменатия хелинтен еквит антиген е неразделна част от чребен мембранен протеин.

8. Приложение, съгласно претенция 7, в което споменатия хелинтен антиген е ензим или транспортен протеин.

9. Приложение, съгласно претенция 8, в което споменатия хелинтен антиген е протеаза или еквит или ендопептидаза.

10. Приложение, съгласно претенция 9, в което споменатия хелинтен антиген е селектиран от антигени H110D, H45, H-gal-6P и Q-gal-6P, или антигенен фрагмент от това или прекурсор вместо това.

11. Приложение, съгласно претенции от 1 до 10, в което споменатото животно е преживно животно.

12. Приложение, съгласно претенции от 1 до 10, в което споменатото животно е селектирано от овце, говеда, елени, кози или кучета.

13. Приложение, съгласно претенции от 1 до 12, чрез което се стимулира защитен имунитет срещу хелинти, селектирани от HAEMONCHUS, OSTERTAGIA, TRICHOSTRONGYLUS, CHABERTIA, OESOPHASTOMUM, HYOSTRONGYLUS, NEMATODIRUS,

TOXOCARA и COOPERIA.

14. Приложение, съгласно претенции от 1 до 13, в което споменатия ваксинаен състав е под формата на контролирано-изпускателно съдържанието си препарат.

15. Приложение, съгласно претенции от 1 до 5, и претенции от 7 до 14, на антигенът H110D или на антигенен фрагмент от това за производство на състав на ваксина за лечение на оксалорозалното увеличение на продукцията на яйца от HAEMONCHUS във фекалии на овце.

16. Метод за стимулиране на защитен имунен отговор срещу хелминтни паразити в животни през период на компрометиран естествен имунитет, като споменатия метод обхваща прилагането му на споменатите животни, поне еднократно преди и/или през период на загуба или намаляване на естествения имунитет по отношение на гастро-интестинални хелминтни паразити, ваксинаен състав включващ един или повече хелминтни скрити антигени или антигенни фрагменти, прекурсори и функционално-еквивалентни производни или варианти от това, имащи имуногенна активност срещу един или повече хелминтни паразити.

17. Метод, съгласно претенция 16, в което споменатия състав на ваксина е приложен на женско животно поне еднократно през периода преди чистосъеме и/или до началото на третото тримесечие на бременността, чрез което да стимулира защитен имунен отговор през бременността на оксалорозалния период.

18. Метод, съгласно претенция 17, за



предотвръщане или намаляване на околородилното нарастване.

19. Метод, съгласно претенция 17 и претенция 18, в който споменатия състав на ваксината е положен на женското животно поне еднократно до чифтосването и поне един път през бремене на бременността, до началото на третото тримесечие на бременността.

20. Метод, съгласно претенция 19, в който споменатия състав на ваксината е положен на женското животно поне еднократно до чифтосването и поне един път през бремене на бременността, до началото на второто тримесечие на бременността.

21. Метод, съгласно претенция 16, за борба с остертагива тип II.

22. Метод, съгласно претенции от 16 до 21, в който споменатия желатинен скрит антиген е неразделна част от чревен мембранен протеин.

23. Метод, съгласно претенции от 16 до 22, в който споменатия желатинен антиген е ензим или транспортиращ протеин.

24. Метод, съгласно претенции от 16 до 23, в който споменатия желатинен антиген е протеаза или екзо- или ендопептидаза.

25. Метод, съгласно претенции от 16 до 24, в който споменатия желатинен антиген е селектиран от антигени H1100, H45, H- $\alpha$ 1-SP и O- $\alpha$ 1-SP, или антигенен фрагмент от това или прекурсор вместо това.



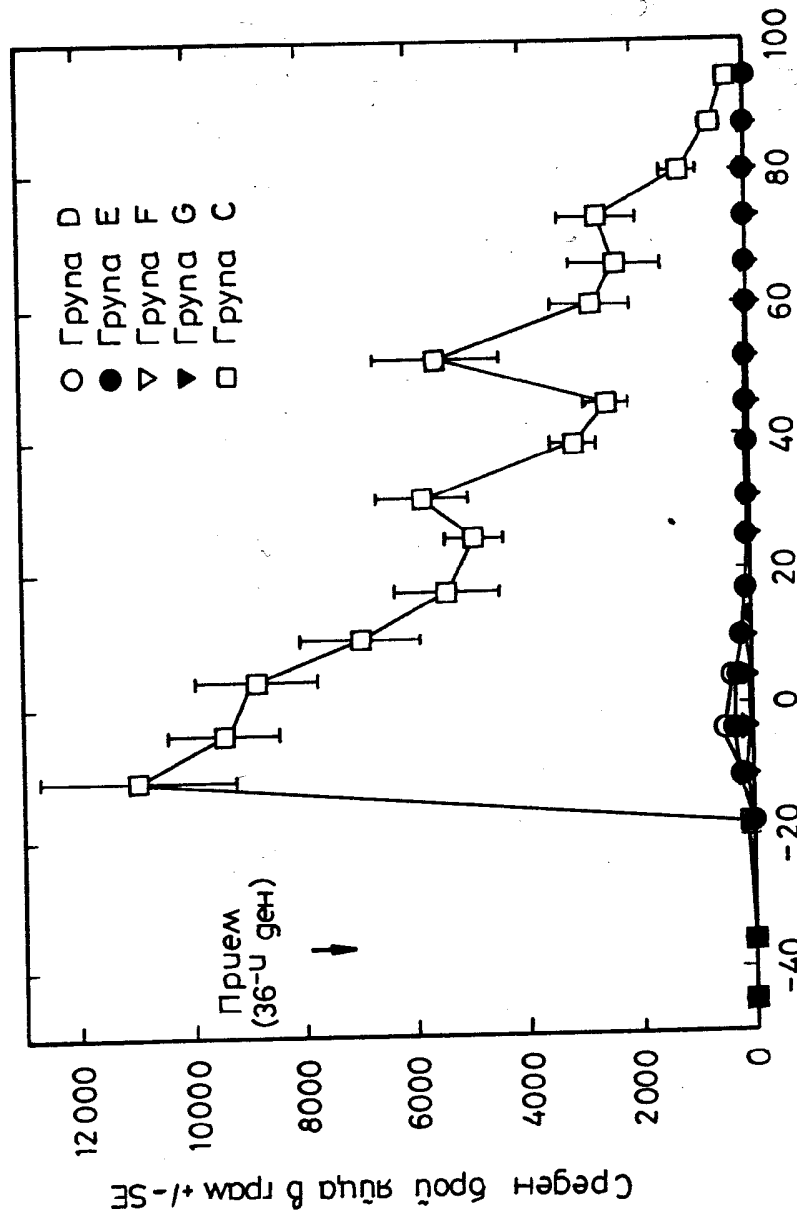
26. Метод, съгласно претенции от 16 до 25, в който споменатия ваксинаен състав е приложен на прецизно животно.

27. Метод, съгласно претенции от 16 до 25, в който споменатия ваксинаен състав е приложен на животно, селектирано от овце, говеда, елени, кози или кучета.

28. Метод, съгласно претенции от 17 до 27, в който се стимулира защитен имунитет срещу хелминти, селектирани от HAEMONCHUS, OSTERTAGIA, TRICHOSTRONGYLUS, CHABERTIA, OESOPHAOSTOMUM, HYOSTRONGYLUS, NEMATODIRUS, TOXOCARA и COOPERIA.

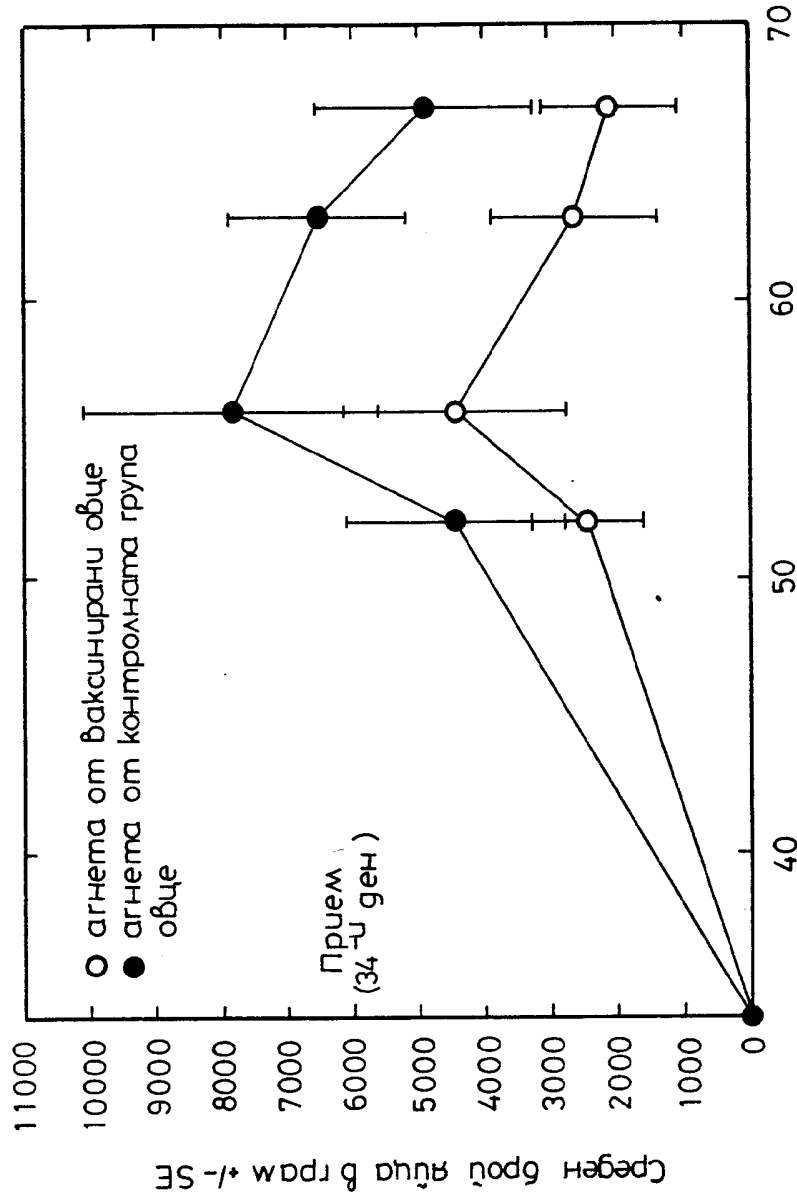
29. Метод, съгласно претенции от 16 до 28, в който споменатия ваксинаен състав е приложен под формата на контролирано-целулкаш съдържанието си препарат.

30. Метод, съгласно и претенции от 16 до 20 и претенции от 22 до 29, в който ваксинаен състав включващ антигенът H110D или антигенен фрагмент от това, е приложен на овце (женските животно) на около 40-те до 10-те дни преди чифтосване, чрез което да лекува околородилното нарастване на продукцията на фекални яйца от HAEMONCHUS.



Дни, отнесену към средните дати за обогняне

Фиг. 1



Дни след средните дати за обагняне

Фиг. 2