



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 34 490 T2 2007.03.01**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 990 001 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 34 490.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NZ98/00070**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 929 914.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/054226**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **03.12.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.04.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **10.05.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.03.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 16/04 (2006.01)**

**A61K 39/40 (2006.01)**

**A61K 39/42 (2006.01)**

**A61K 35/20 (2006.01)**

**A23J 1/20 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**31495997 29.05.1997 NZ**

(73) Patentinhaber:

**Agresearch Ltd., Hamilton, NZ**

(74) Vertreter:

**Kuhnen & Wacker Patent- und  
Rechtsanwaltsbüro, 85354 Freising**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**HODGKINSON, Joy, Alison, Hamilton, NZ;  
HODGKINSON, Charles, Steven, Hamilton, NZ**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON IMMUNOGLOBULIN A IN MILCH**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## TECHNISCHER BEREICH

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin A in Säugetieren, Verfahren zur Herstellung von Milch, die Immunglobulin A enthält, und die Nutzungsmöglichkeiten für das/die erzeugte Immunglobulin A und Milch.

## HINTERGRUND

**[0002]** Immunglobulin A (IgA) ist ein gut dokumentiertes Immunglobulin, das in fast allen Körperflüssigkeiten vorkommt. Man geht davon aus, dass es eine wesentliche Rolle beim Schützen des Wirtes vor einer Infektion durch pathogene Organismen spielt, die über die Schleimhautoberflächen der Atemwege, des Magen-Darm-Kanals und des Urogenitaltraktes eindringen. IgA ist an der Beseitigung pathogener bakterieller, viraler und parasitischer Organismen und einer Vielfalt aufgenommener oder inhalierter Antigene von den Schleimhautoberflächen durch Neutralisieren von Toxinen und viralen Partikeln, Inhibieren der Adhärenz bakterieller Pathogene und Verhindern der Besiedelung und Penetration von Schleimhautoberflächen durch pathogene Mikroorganismen beteiligt. Die Schlüsselrolle von Immunglobulinen, einschließlich IgA, in Milch ist daher die Erzeugung lokaler schützender Immunität im Magen-Darm-Kanal der Jungtiere während der Säugeperiode.

**[0003]** Der Nutzen von Immunglobulinen auf den Gebieten Pharmazie und Tiermedizin zur Behandlung bakterieller oder viraler Infektionen des Darms oder allgemeiner zur Behandlung von Erkrankungen und Entzündungen ist mittlerweile anerkannt. Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Techniken zur Herstellung von Immunglobulinen vorgeschlagen. Ein besonders beliebtes Verfahren ist die Induktion und Gewinnung von Immunglobulinen von Wiederkäuermilch. Dieser Ansatz hat spezielle Vorteile, da das in der Milch erzeugte Immunglobulin in einer Form vorliegt, die für den sofortigen Verbrauch geeignet ist, oder zu geeigneten Formeln oder Produkten verarbeitet werden kann. Seine Verwendung ist unbedenklich und die industrielle Infrastruktur zur Herstellung von antikörperhaltiger Milch ist bereits vorhanden.

**[0004]** Das Immunsystem von Wiederkäuern scheint sich von dem seines humanen Pendanten dahingehend zu unterscheiden, dass das in bovinen Milchdrüsensekretionen dominante Immunglobulin IgG<sub>1</sub> ist. Demzufolge liegt der Schwerpunkt der Antikörperproduktion in Milch durch aktive Immunisierung auf Immunglobulin G, obwohl das bevorzugte Immunglobulin aus den oben dargelegten Gründen theoretisch IgA wäre.

**[0005]** Es wurden einige Versuche unternommen, erhöhte Anteile von IgA in Wiederkäuermilch zu erzeugen. Es wurden Vorschläge zur Impfung durch eine einzelne Verabreichungsmethode wie parenteral, subkutan, intravenös, systemisch, oral, intraperitoneal, intramuskulär, intramammär und dergleichen unterbreitet. Im Allgemeinen führen diese Verabreichungsmethoden zur überwiegenden Produktion von IgG<sub>1</sub>. Die systemische Immunisierung erzeugte sowohl IgA als auch IgM in Milch, aber nur in geringen Konzentrationen. Die Reaktion wurde verbessert, als intramuskuläre/subkutane (IM) und intramammäre (IMM) Immunisierungsprozesse kombiniert wurden (Am. J. Vet. Res<sup>5</sup>). Es hat sich gezeigt, dass auch Kombinationen aus intraperitonealer (IP) und intramammärer (IMM) Infusion IgA und IgG<sub>1</sub> hervorbringen (Immunology<sup>7</sup>; Res. in Vet. Sci<sup>8</sup>; Res. in Vet. Sci<sup>11</sup>, The Ruminant Immune System in Health and Disease<sup>10</sup>). Es wird bemerkt, dass diese Methode zu einer begrenzten Verbesserung der IgA Produktion führt (The Ruminant Immune System in Health and Disease<sup>10</sup>). Eine Kombination aus IM und IMM Immunisierung führte zu einer Prädominanz von IgG<sub>1</sub> in der Milch (Aus. J. Dairy Technology<sup>6</sup>) sowie zu einer allgemeinen Erhöhung der Anteile von IgG<sub>2</sub>, IgA und IgM (Am. J. Vet. Res<sup>5</sup>). Außerdem wurde eine signifikante Variabilität bei den produzierten Antikörpertitern zwischen Tieren bemerkt.

**[0006]** Die vorherrschende Produktion von IgG<sub>1</sub> stimmt mit den Feststellungen überein, dass produzierte IgGs die Hauptimmunglobuline in Milchdrüsensekretionen von Wiederkäuern sind.

**[0007]** Intramammäre Immunisierungstechniken werden infolge des hohen Milchdrüseninfektionsrisikos im Allgemeinen nicht als Impfmethode unter Freilandbedingungen bevorzugt (Aus. J. Dairy Technology<sup>6</sup>). Anderen Arbeiten zufolge ist dies jedoch möglicherweise nicht der Fall (Am. J. Vet. Res<sup>1</sup>).

**[0008]** Es ist zu beachten, dass ein großer Teil der veröffentlichten Literatur bezüglich der Immunglobulinproduktion in Milchdrüsensekretionen auf die Krankheitsvorbeugung bei Tieren oder ihrem Nachwuchs gerichtet ist. Es wird sich kaum mit der Produktion von mit Immunglobulin angereicherter Milch zur Gewinnung der Immunglobuline an sich befasst.

**[0009]** Eine Ausnahme hierzu ist ein Verfahren zur Herstellung eines Proteinkonzentrats, das immunologische Faktoren milchigen Ursprungs enthält, im Schweizer Patent Nr. 1,573,995. Vor fast 20 Jahren offenbarte dieses Patent ein Verfahren zur Herstellung von Milch mit einem hohen Antikörpertiter durch intrazisternale Instillation in die Milchdrüse, parenterale Injektion (subkutan, intravenös), Injektion in das retromammäre Gangliensystem durch Skarifikation, durch orale Aufnahme oder durch eine Kombination von verschiedenen dieser Methoden. Das einzige spezifische offenbarte Immunisierungsprotokoll zur Gewinnung von Kolostrum und Übergangsmilch beinhaltete etwa 11 Immunisierungsschritte über einen Zeitraum von 8 Wochen vor dem Kalben. Dieses Protokoll beinhaltet mehrere parenterale (einschließlich intravenöse) Verabreichungsschritte, mit mehreren eingestreuten IMM Verabreichungsschritten, und setzt 2 orale Verabreichungsschritte in der Woche vor dem Kalben voraus.

**[0010]** Dieses Protokoll wird heute nicht oft angewendet. Der Immunisierungsplan ist angesichts der Anzahl der involvierten Schritte mühsam und genau genommen für die Immunglobulin-A-Produktion nicht optimiert. In der Tat ist das Patent irreführend, indem es nahe legt, dass in Muttermilch von Wiederkäuern IgAs überwiegen; eine Fehlannahme, die möglicherweise aus der Kenntnis resultiert, dass IgA in humaner Milch vorherrscht. Wie in anderen Lehren (siehe z.B. Aus. J. Dairy Technology<sup>6</sup>) ermittelt wurde, ist das überwiegend in Muttermilch produzierte Immunglobulin IgG.

**[0011]** In den Jahren dazwischen wurde außerdem gezeigt, dass eine orale Zuführung von Antigenen in kaum einer oder keiner Erhöhung der IgA-Titer in Milchdrüsensekretionen im Vergleich zu nicht inokulierten Kontrollen resultiert (Am. J. Vet. Res.<sup>1</sup>). Es wird angenommen, dass die Anwesenheit des Pansens möglicherweise das Antigen daran hindert, den Dünndarm zu erreichen. Demzufolge ist der von Hilpert geforderte orale Verabreichungsschritt heute kontraindiziert.

**[0012]** Ebenso wäre eine intravenöse Injektion aufgrund der möglichen nachteiligen Wirkungen wie ein anaphylaktischer Schock im Allgemeinen für Immunisierungszwecke nicht empfehlenswert (Cold Spring Harbour<sup>18</sup>, ILAR Journal<sup>19</sup>).

**[0013]** Es besteht derzeit Bedarf an einem Verfahren zum Induzieren und Produzieren von IgA in Milch in höheren Anteilen, als sie bisher durch bekannte Antigenverabreichungsverfahren erhalten wurden. Außerdem ist ein Verfahren erwünscht, das zusätzlich die Variabilität bei der Herstellung von IgA zwischen Tieren verringert. Ein kommerzielles Verfahren, das die Herstellung von IgA optimiert, während gleichzeitig das Immunisierungsprotokoll vereinfacht wird, ist ebenfalls erwünscht.

**[0014]** Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Induzieren und Produzieren von Immunglobulin A in Milch bereitzustellen, das zum Teil in Richtung einer Überwindung der obigen Nachteile geht oder der Allgemeinheit zumindest eine nützliche Wahl bietet.

**[0015]** Demzufolge kann allgemein gesagt werden, dass die vorliegende Erfindung aus einem nichttherapeutischen Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin A (IgA) in der Milch eines Wiederkäuers besteht, das die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Verabreichen eines Antigens an einen trächtigen Wiederkäuer über zwei beliebige Verabreichungsmethoden, ausgewählt aus intramammär (IMM), intraperitoneal (IP) und intramuskulär (IM); und
- (b) Verabreichen eines Antigens an den genannten Wiederkäuer über eine dritte Verabreichungsmethode, ausgewählt aus intramammär (IMM), intraperitoneal (IP) und intramuskulär (IM); unter der Voraussetzung, dass alle drei Verabreichungsmethoden verschieden sind; und
- (c) Gewinnen von IgA-haltiger Milch von dem Wiederkäuer.

**[0016]** Vorzugsweise folgt dem anfänglichen Verabreichungsprotokoll ein Programm mit Booster-Verabreichungen während des Zeitraums vor der Geburt.

**[0017]** In einem bevorzugten Verfahren der vorliegenden Erfindung ist das verabreichte Antigen bei jeder Verabreichungsmethode das gleiche.

**[0018]** Vorzugsweise wird das verabreichte Antigen in einem Adjuvans emulgiert. Ein besonders bevorzugtes Adjuvans ist Freundsches inkomplettes Adjuvans (FIC).

**[0019]** In einer Ausgestaltung der Erfindung kann IgA von der gewonnenen Säugetiermilch isoliert werden. Das isolierte IgA kann bei Bedarf gereinigt werden.

- [0020]** Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung IgA-haltige Säugetiermilch bereit, die mit den erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wird.
- [0021]** Gemäß noch einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung IgA bereit, das mit den erfindungsgemäßen Verfahren produziert wird.
- [0022]** Die zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugten Säugetiere sind Wiederkäuer, insbesondere Milchkühe.
- [0023]** Die vorliegende Erfindung sieht ferner die Verwendung von Immunglobulin A, das mit den erfindungsgemäßen Verfahren produziert wird, in pharmazeutischen, kosmetischen und tiermedizinischen Zusammensetzungen sowie in Lebensmittelprodukten vor, einschließlich funktioneller Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel.
- [0024]** Obschon die vorliegende Erfindung grob der obigen Definition entspricht, wird es für die fachkundige Person verständlich sein, dass die Erfindung nicht darauf begrenzt ist und dass sie auch Ausgestaltungen einschließt, für die die folgende Beschreibung Beispiele gibt. Insbesondere werden bevorzugte Aspekte der Erfindung unter Bezugnahme auf die Begleitzeichnungen beschrieben. Dabei zeigt:
- [0025]** [Fig. 1](#) eine typische Immunglobulinverdünnungskurve für eine positive Kontrollprobe im ovinen E. coli IgA Enzymimmuntest (ELISA – Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay).
- [0026]** [Fig. 2](#) die Anti-E.coli-IgA-Titer von Milch der rechten (immunisierten) Drüse für alle Gruppen am Tag 0, Tag 5, in der Woche 2 und Woche 4 nach dem Geburtsvorgang.
- [0027]** [Fig. 3](#) stellt Anti-E.coli-IgA-Reaktionen von Milch der rechten (immunisierten) Drüse und der linken (unbehandelten) Drüse am Tag 0 gegenüber.
- [0028]** [Fig. 4](#) zeigt die Anti-E.coli-IgA-Reaktionen für individuelle Schafe mit rechten (immunisierten) Drüsen am Tag 1 post-partum. Es ist der Effekt der Immunisierungsmethode dargestellt.
- [0029]** [Fig. 5](#) zeigt die Anti-E.coli-Reaktionen für individuelle Schafe mit rechten (immunisierten) Drüsen am Tag 2 post-partum.
- [0030]** [Fig. 6](#) zeigt die Anti-3K Scourguard-IgA-Antikörpertiter von Milch der rechten (immunisierten) Drüse für alle Gruppen am Tag 0 und 5.
- [0031]** [Fig. 7](#) zeigt die Anti-3K Scourguard-IgA-Antikörpertiter von Milch der rechten (immunisierten) und linken Drüse für alle Gruppen am Tag 0.
- [0032]** [Fig. 8](#) zeigt eine typische Verdünnungskurve für positive und negative Kontrollproben im ovinen TNF IgA ELISA.
- [0033]** [Fig. 9](#) zeigt individuelle Probenanalysen von Anti-TNF-IgA-Titerreaktionen in Milchproben der rechten (immunisierten) Drüse am Tag 1 post partum für jede der Immunisierungsgruppen.
- [0034]** [Fig. 10](#) zeigt die Daten für Anti-TNF-Titer von Proben der rechten (immunisierten) und linken (unbehandelten) Drüse am Tag 1 post-partum.
- [0035]** [Fig. 11](#) zeigt die Beziehung zwischen Anti-TNF-IgA und Laktationsstadium.
- [0036]** [Fig. 12](#) zeigt eine typische Verdünnungskurve für positive und negative Kontrollproben im C.albicans IgA ELISA.
- [0037]** [Fig. 13](#) zeigt den Anti-C.albicans-IgA-Antikörpertiter von Milch der rechten (IMM Immunogen in FIC) Drüse für alle Gruppen am Tag 1, 2, 7, 14 und 60.
- [0038]** [Fig. 14](#) vergleicht die Anti-C.albicans-IgA-Reaktion in der linken Drüse (wässriges IMM Immunogen) und der rechten (FIC IMM Immunogen) Drüse im Laufe der Laktationsperiode.

## AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG

**[0039]** Der hierin verwendete Begriff „Milch“ betrifft sowohl Milch als auch Kolostrum in der Form, in der sie/es von dem Säugetier produziert wird.

**[0040]** Der hierin verwendete Begriff „Antigen“ bezieht sich auf jedes Material, das eine Antigenreaktion in einem behandelten Säugetier induzieren kann.

**[0041]** Gemäß einem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Induzieren von Immunglobulin A (IgA) in einem Säugetier. In einem ersten Schritt beinhaltet das Verfahren das aktive Immunisieren eines trächtigen Säugetiers mit einem Antigen durch zwei beliebige Verabreichungsmethoden, ausgewählt aus intramammär (IMM), intraperitoneal (IP) und intramuskulär (IM). In einem zweiten Schritt wird das Säugetier wieder aktiv durch eine dritte Verabreichungsmethode immunisiert, die aus den oben genannten Methoden ausgewählt wird. Die Voraussetzung für dieses Verfahren ist, dass alle drei ausgewählten Verabreichungsmethoden unterschiedlich sind.

**[0042]** Die Anmelderinnen haben überraschenderweise festgestellt, dass durch die Anwendung von drei Verabreichungsmethoden die IgA-Antikörpertiterwerte über die erwarteten Werte erhöht werden, wenn einfach zwei bekannte Verabreichungsmethoden mit einer dritten Verabreichungsmethode kombiniert werden oder wenigstens die Variabilität bei der IgA-Antikörpertiterreaktion zwischen Tieren verringert wird.

**[0043]** Der/die Leser(in) wird verstehen, dass die Reihenfolge der Methoden und der Zeitpunkt der Verabreichung für das Verfahren zum Induzieren von Immunglobulin A nicht entscheidend sind. Ferner können die Immunisierungen mit den verschiedenen Methoden der Reihe nach, diskontinuierlich oder gleichzeitig durchgeführt werden. Ein derzeit bevorzugtes Immunisierungsprotokoll sieht die gleichzeitige IM und IP Immunisierung mit anschließender IMM Immunisierung vor. Die IM und IP Immunisierungen haben effektiv die Aufgabe, die Immunsystemantwort auszulösen. Die IMM Immunisierung ist ein lokalisierter Reiz, um die IgA-Produktion in dieser immunisierten Region zu induzieren.

**[0044]** In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung folgt dem anfänglichen Immunisierungsprotokoll eine Reihe von Antigen-Booster-Dosen über den Zeitraum vor der Geburt. Die eingeführten Antigenmengen, die Häufigkeit (Zeitintervall) und die Anzahl der Booster-Dosen kann/können stark variieren. Zum Beispiel von einer einzigen Booster-Impfung über eine einzige Verabreichungsmethode zu einem Zeitpunkt bis zu mehreren Impfungen über jeweils drei Verabreichungsmethoden zu vielen verschiedenen Zeitpunkten.

**[0045]** Booster-Impfungen erfolgen gewöhnlich in einem Abstand nach Belieben des Bedieners. Um lokale Irritationen und Kongestion zu vermeiden, wird es gewöhnlich bevorzugt, dass Booster-Shots nicht öfter als alle zwei Wochen an dieselbe Stelle verabreicht werden.

**[0046]** Ein bevorzugter Ordnungsplan setzt die gleichzeitige IM und IP Immunisierung zu zwei separaten Zeitpunkten voraus, gefolgt von einer IMM Immunisierung zu einem Zeitpunkt. Das heißt, genau genommen zwei Priming-Schritte, gefolgt von einem lokalen Challenge. Der erste Priming-Schritt findet gewöhnlich 2 bis 8 Wochen vor dem zweiten Priming-Schritt und dem Challenge-Schritt statt.

**[0047]** Diese letzteren Schritte finden vorzugsweise gleichzeitig statt. Ein praktisches Protokoll beinhaltet die Durchführung des ersten Initialreaktionsschrittes 6 bis 14, vorzugsweise 8 bis 12 und am bevorzugtesten 8 Wochen vor der Geburt und die Durchführung des zweiten Priming-/lokalen Challenge-Schrittes 2 bis 10 Wochen, vorzugsweise 4 bis 8 und am bevorzugtesten 4 Wochen vor der Geburt. Wie zuvor bemerkt, ist der Zeitpunkt jedoch nicht entscheidend.

**[0048]** Ein zweiter bevorzugter Ordnungsplan sieht die anfängliche Immunisierung 6 bis 14, vorzugsweise 8 bis 12 und am bevorzugtesten 8 Wochen vor der Geburt vor, gefolgt von 1 oder 2 Booster-Shots über die jeweiligen drei Verabreichungsmethoden zu 1 bis 3 Zeitpunkten vor der Geburt. Die letzte Immunisierung erfolgt gewöhnlich 1 bis 2 Wochen vor der Geburt.

**[0049]** Besonders bevorzugt wird ein Ordnungsplan, der einen zusätzlichen Priming- und lokalen Challenge-Schritt erfordert, so dass 8 Wochen vor der Geburt (minus 8 Wochen) eine gleichzeitige IM und IP Immunisierung erfolgt, gefolgt von gleichzeitigen IM/IP und IMM Immunisierungen bei minus 4 Wochen, einer zweiten IMM Immunisierung bei minus zwei Wochen und einer letzten gleichzeitigen IM und IP Immunisierung bei minus einer Woche.

**[0050]** Ein weiterer bevorzugter Verordnungsplan sieht die anfänglichen IM/IP Immunisierungen 12 Wochen vor der Geburt und den zweiten Priming-/lokalen Challenge-Schritt 8 Wochen vor der Geburt, eine zweite IMM Immunisierung bei minus 6 Wochen und eine letzte gleichzeitige IM/IP Immunisierung bei minus 4 Wochen vor.

**[0051]** Anhand des Obigen ist zu verstehen, dass eine große Variation beim Zeitpunkt der Immunisierungen möglich ist, die gewöhnlich 14 Wochen vor der Geburt beginnen, vorzugsweise jedoch 12 bis 8 Wochen vor der Geburt.

**[0052]** Nach der Geburt können sinkende Antikörperkonzentrationen durch periodisches Einführen von Booster-Shots des ausgewählten Antigens in das Säugetier im Laufe der Laktationsperiode gemäß entsprechenden oben angeführten Vorgeburtspartokollen erhöht werden. Im Allgemeinen sind hier zwischen 1 und 6, vorzugsweise 2 bis 4 und am bevorzugtesten 2 oder 3 gleichzeitige IM und IP Immunisierungen in der Laktationsphase nach der Geburt zusammen mit 1 IMM Immunisierung in der Involutionsphase der Laktation involviert.

**[0053]** In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung beinhaltet das erfindungsgemäße Verfahren ferner einen Vorselektionsschritt. In diesem Schritt werden einzelne Tiere getestet und im Hinblick auf ihre IgA-Produktionsfähigkeit ausgewählt.

**[0054]** Wie zuvor erwähnt, gibt es eine erhebliche Variabilität zwischen Tieren in Bezug auf die Produktion von Immunglobulinen. Dieser Vorselektionsschritt, bei dem die Tiere ausgewählt werden, die die besten IgA-Antikörpertiterreaktionen zeigen, hilft bei der Verringerung des Variabilitätsfaktors zwischen Tieren. Dieser Prozess kann ebenso für die Bildung von Gruppen von Tieren angewendet werden, die für die IgA-Produktion besonders geeignet sind.

**[0055]** Verfahren für die IM, IP und IMM Verabreichung sind in der Technik allgemein bekannt. Zur IM Immunisierung wird es gewöhnlich bevorzugt, dass mehr als eine Stelle zur Verabreichung mit diesem Verfahren verwendet wird. Bevorzugte IM Verabreichungsstellen sind die linke und die rechte Seite des brachiocephalic [sic] Muskels (d.h. zwei Stellen in einem Muskel). Zur IP Immunisierung wird derzeit die Verabreichung in die Peritonealhöhle, gewöhnlich an nur einer Stelle, bevorzugt. Wünschenswerterweise erfolgt die Verabreichung an der unteren Lendengrube (sublumbar fossa).

**[0056]** Die genauen Verabreichungsstellen für diese Methoden können natürlich gemäß bekannten Verabreichungsprotokollen variieren. Menge und Form des verabreichten Antigens können ebenfalls entsprechend dem verwendeten Antigen und dem zu immunisierenden Säugetier gemäß bekannten Impfstoffformulierungen variieren.

**[0057]** Im Allgemeinen wird das Antigen bei der IM und IP Methode mit Spritze und Kanüle und bei der IMM Methode mit einem engen chirurgischen Polyethylenschlauch, der an einer Spritze angebracht ist, oder alternativ mit einem konventionellen sterilen intramammären Applikator injiziert. Für die IMM Immunisierung wird das Antigen im Allgemeinen über den Hauptmilchgang oder den supramammären Lymphknoten verabreicht. Vorzugsweise über die Zitzenöffnung in den Zitzenkanal. Für die besten Ergebnisse wird außerdem bevorzugt, dass jede Milchdrüse bei jeder Gelegenheit immunisiert wird. Dadurch wird die in dem Säugetier hervorgerufene lokalisierte IgA Reaktion maximiert.

**[0058]** Das injizierte Antigenvolumen variiert je nach dem Säugetier und der Immunisierungsmethode. In der folgenden Tabelle 1 ist eine Übersicht über die Injektionsvolumen für Schafe und Kühe enthalten, die mit den IM, IP und IMM Methoden immunisiert werden.

Tabelle 1

**Schafe**

	<b>IM</b>	<b>IP</b>	<b>IMM</b>
Volumen	1,0 ml (pro Stelle)	1,0 ml	1,0 ml (pro Drüse)
max Volumen	5,0 ml	2,5 ml	2,0 ml (pro Drüse)

**Kühe**

	<b>IM</b>	<b>IP</b>	<b>IMM</b>
Volumen	2,0 ml (pro Stelle)	4,0 ml	2,0 ml (pro Drüse)
max Volumen	8,0 ml	10,0 ml	5,0 ml (pro Drüse)

**[0059]** Zum Immunisieren von Rindern wird das Antigen typischerweise für IM zu 2 ml pro Stelle an 2 Stellen, für IP zu 4 ml an 1 Stelle und für IMM zu 2 ml in jeweils die vier Drüsen verabreicht.

**[0060]** Im Gegensatz zur landläufigen Meinung zeigen Freilandversuche, dass es bei der intramammären Immunisierung kein signifikantes Infektionsrisiko gibt, vorausgesetzt, es werden entsprechende Vorsichtsmaßnahmen getroffen. Die Drüsen müssen zum Beispiel vor der Immunisierung sorgfältig sterilisiert werden. Geeignete Sterilisationsverfahren sind in der Technik bekannt. Hierzu können zum Beispiel Ethanol/Iodwäschen dienen. Eine weitere Vorsichtsmaßnahme ist die Gewährleistung, dass das Antigen in einer Lösung verabreicht wird, die ein Antibiotikum enthält. Zu geeigneten Antibiotika gehören Dupocillin, Ampicillin und Clavulox L.C.

**[0061]** Die zur Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren ausgewählten Säugetiere sind gewöhnlich wirtschaftlich nützliche Säugetiere wie Wiederkäuer. Beispiele für bevorzugt verwendete Wiederkäuer sind Kühe, Ziegen und Schafe.

**[0062]** Der hierin verwendete Begriff „Antigen“ bezieht sich auf jedes beliebige Material, das eine Antigenreaktion in dem behandelten Säugetier induzieren kann. Antigene können gemäß dem endgültigen Nutzen der IgA-Formulierung ausgewählt werden. Das heißt, soll die Formulierung zum Erzeugen von passiver Immunität verwendet werden, dann ist das Antigen zu verwenden, gegen das eine solche Immunität erwünscht ist. Zu Antigensubstanzen, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, gehören Bakterien, Viren, Hefen, Mycoplasmen, Proteine, Haptene, Tiergewebeextrakte, Pflanzengewebeextrakte, Spermatozoen, Pilze, Pollen, Staub, chemische Antigene und Säugetierzellen.

**[0063]** Wenn Haptene als Antigene verwendet werden sollen, dann müssen sie zuerst mit Trägersubstanzen wie Proteinen unter Anwendung chemischer Verfahren konjugiert werden, die der fachkundigen Person allgemein bekannt sind. (ILAR Journal<sup>19</sup>).

**[0064]** Zu nützlichen bakteriellen Antigenen gehören Gattungen von Escherichia, Staphylococcus, Streptococcus, Salmonella und Pneumococcus. Besonders bevorzugte bakterielle Antigene sind Escherichia coli, Clostridium difficile, Vibrio cholerae und Helicobacter pylori.

**[0065]** Zu bevorzugten Hefeantigenen gehören Gattungen von Candida.

**[0066]** Ein besonders bevorzugtes Hefeantigen ist Candida albicans.

**[0067]** Zu nützlichen viralen Antigenen gehören Rotavirus, Herpes, Geflügelpocken, Rhinopneumonitis, Coronavirus, Parvovirus und Influenza. Zu Proteinantigenen gehören Tumornekrosefaktor, Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren und Somatostatin, virale oder bakterielle Zelloberflächenproteine und konjugierte Proteinantigene. Chemische Antigene sind u.a. Pollen, Pestizide, Insektizide, Fungizide und Toxine. Komplexe Antigene, die eine Kombination aus zwei oder mehr Antigenen der identifizierten Typen beinhalten, sind ebenfalls möglich. Ein solches bevorzugtes komplexes Antigen ist 3K Scourguard (SmithKline Beecham, Royal Oak, Auckland, New Zealand). Der Impfstoff enthält pathogenes E. coli, bovinen Rotavirus und Coronavirus.

**[0068]** Zu nützlichen Mycoplasmaantigenen gehören Mycoplasma pneumoniae und Cryptosporidium parvum.

**[0069]** Gewöhnlich werden die Antigensubstanzen in flüssigem Medium zur Infusion oder Injektion gemäß bekannten Protokollen suspendiert. Es können alle beliebigen geeigneten Träger, Verdünnungsmittel, Puffer und Adjuvantien verwendet werden, die in der Technik bekannt sind. Zu geeigneten Suspensionsflüssigkeiten gehören Salzlösungen, Wasser und physiologische Puffer.

**[0070]** Die Verwendung von Adjuvantien ist ebenfalls erwünscht. Zu Adjuvantien, die zur Verwendung mit den Antigenen der Erfindung geeignet sind, gehören Freundsches komplettes Adjuvans (FCA), Freundsches inkomplettes Adjuvans (FIC), Adjuvans 65, Cholera-Toxin-B-Untereinheit, Alhydrogel; oder Bordetella pertussis, Muramyl-dipeptid, Cytokine und Saponin. Adjuvantien auf Ölbasis und insbesondere FCA und FIC werden bevorzugt.

**[0071]** Vor der Injektion werden die Antigene in geeigneten Trägern typischerweise mit einem Adjuvans auf Ölbasis (FIC wird bevorzugt) unter Verwendung eines Laborhomogenisators emulgiert. Wässriges Antigen wird typischerweise mit 3 Volumen eines Öl-Adjuvans vermischt und emulgiert, bis eine stabile Was-

ser-in-Öl-Emulsion entsteht, wie anhand von in der Technik allgemein bekannten Tests demonstriert wird.

**[0072]** Gemäß der landläufigen Meinung war die Verwendung von Adjuvanzen auf Ölbasis auch bei der direkten intramammären Immunisierung aufgrund des Risikos nachteiliger Reaktionen nicht möglich. Die Anmelderinnen der vorliegenden Erfindung haben gefunden, dass die Verabreichung mit Adjuvanzen auf Ölbasis unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen nicht nur möglich, sondern auch erwünscht ist. Durch die Verwendung von FIC kann die immunogene Reaktion, die für einige Antigene erhalten wird, vor allem bei der Verabreichung mit der IMM Methode wesentlich verstärkt werden. Es wird daher zur Zeit bevorzugt, dass Antigene für alle Immunisierungen in FIC emulgiert werden, mit Ausnahme von kleinen Polypeptiden, bei denen FCA möglicherweise für die erste IM/IP Immunisierung bevorzugt wird. FCA wird jedoch nicht für IMM verwendet.

**[0073]** Wie zuvor erwähnt, sind Größe und Konzentration der Antigendosen nicht entscheidend und in der Technik gibt es bekanntlich einen Dosisbereich, der als Antigenimmunogenitätsfenster bekannt ist, das gewöhnlich relativ breit ist.

**[0074]** Zu viel oder zu wenig Antigen kann jedoch Suppression, Toleranz- oder Immunabweichung in Richtung auf zelluläre Immunität und weg von humoraler Immunantwort induzieren. Für Proteinantigene liegen optimale Dosen typischerweise bei etwa 5 bis 25 µg/kg Lebendmasse in Wiederkäuern und für tote, lyophilisierte bakterielle oder virale Antigene sind Dosen von  $1 \times 10^8$  bis  $4 \times 10^{10}$  Organismen je ml typisch.

**[0075]** Wie ebenfalls oben erwähnt wurde, wird es bei der IMM Immunisierung bevorzugt, dass das Antigen zusätzlich in Suspension mit einem Antibiotikum formuliert wird.

**[0076]** Was die spezifische Form des Antigens betrifft, so wird es dem/der Leser(in) verständlich sein, dass sowohl Lebend- als auch Totvakzine möglich sind. Studien haben gezeigt, dass Totvakzine IgG<sub>1</sub> Antworten stimulieren, wohingegen Lebendvakzine IgG<sub>2</sub> Antworten stimulieren. Zur Produktion von IgA sind beide Alternativen möglich.

**[0077]** Das mit den jeweiligen Immunisierungsmethoden verabreichte Antigen kann gleich oder unterschiedlich sein. Demzufolge können mehrere verschiedene Antigene mit den drei verschiedenen Immunisierungsmethoden für die jeweiligen Initial- und die Booster-Immunisierungen verabreicht werden. Es wird jedoch derzeit bevorzugt, dass das gleiche Antigen oder eine Kombination von Antigenen mit den drei Methoden bei jeder Immunisierungsgelegenheit verabreicht wird.

**[0078]** Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von IgA-haltiger Säugetiermilch, wobei das Verfahren die Induktion von IgA Antikörpern gemäß dem oben detaillierten Prozess und dann das Gewinnen der IgA-haltigen Milch von dem Säugetier beinhaltet. Die Gewinnung der Milch kann mit normalen Melkverfahren erfolgen.

**[0079]** Die IgA Titerreaktionen sind im Allgemeinen am ersten Tag nach der Geburt am stärksten. Danach fallen diese Antikörperwerte auf zwischen 5 und 20 % des Ausgangswertes. Dieser folgende Wert wird gewöhnlich zwei bis drei Monate lang oder bis zur Abtrocknung oder Involution beibehalten. Die IgA-Werte können in diesem Zeitraum durch Booster-Immunisierungen wie oben erörtert erhöht werden. IgA-haltige Milch kann im Laufe dieses Zeitraums nutzbringend gewonnen werden.

**[0080]** Diese Milch ist in der direkt von dem Säugetier erhaltenen Form nützlich, kann aber bei Bedarf verarbeitet werden. Zu Beispielen für Verarbeitungsschritte gehören Wärmebehandlung, UV-Bestrahlung, Konzentration, Anreicherung mit Lebensmittelzusätzen, Trocknung zu Konzentraten, Milchpulver und dergleichen.

**[0081]** Als ein weiterer Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens kann das IgA von der Milch isoliert werden. Die Isolation kann mit Trennmethoden erfolgen, die in der Technik bekannt sind. Zum Beispiel, Isolation von Fraktionen, die reich an Immunglobulin sind, von Molke in Can. J. Vet. Res.<sup>21</sup>, EP 0320152, WO 97/27757, GB2179947, von Milch in Milchwissenschaft<sup>22</sup>, US 4,229,342, vom Kolostrum in Agric. Biol. Chem.<sup>20</sup>, Französisches Patent Nr. 2520235, Neuseeländisches Patent Nr. 239466 und US 4,582,580, und von Milch und vom Kolostrum in US 4,644,056.

**[0082]** Das isolierte IgA kann anschließend bei Bedarf gereinigt werden. Die Reinigung kann mit bekannten Techniken erfolgen, wie durch Präzipitation und Ionenaustauschchromatographie. Geeignete Techniken sind in den oben angeführten Journalen und Patenten offenbart. Sowohl das isolierte als auch das gereinigte Immunglobulin A, das in den zusätzlichen Verfahrensschritten hergestellt wird, bilden einen Bestandteil der vorlie-



genden Erfindung.

**[0083]** Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung IgA-haltige Säugetiermilch, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren produziert wird.

**[0084]** Verfahren zum Herstellen von Immunglobulinhaltigen Proteinkonzentraten im kommerziellen Maßstab sind im Schweizer Patent Nr. 1,573,995 offenbart. Kurz, das Verfahren beinhaltet das Gewinnen der Milch von hyperimmunisierten, milchtragenden Weibchen; Trennen von Rahm und Verunreinigungen, Koagulieren der geklärten und entrahmten Milch, Trennen des Caseins, Filtrieren, Ultrafiltrieren und Sterilisieren der Proteine der Molke durch Filtration, Verdampfen und Trocknen des Produkts unter Bedingungen, bei denen die Immunglobuline nicht denaturieren und die Sterilität wahren.

**[0085]** Gemäß einem weiteren Aspekt sieht die vorliegende Erfindung die Verwendung von IgA in Form von Milch, verarbeiteten Milchprodukten, Konzentraten, isoliertem IgA und gereinigtem IgA, produziert gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren, vor. IgA ist in den Bereichen pharmazeutische, tiermedizinische und kosmetische Zusammensetzungen sowie in Lebensmitteln und Nahrungsmittelergänzungen eventuell vielfältig einsetzbar. Diese Zusammensetzungen, Lebensmittel und Ergänzungsmittel können Patienten (einschließlich humaner Patienten), die diese benötigen, verabreicht werden.

**[0086]** Spezieller, die passive orale Immunisierung ist mit Milchimmunglobulinen von speziell geimpften Kühen auf dem Gebiet der Humangesundheitsfürsorge seit langem bekannt. Angesichts der bedeutenden Rolle, die IgA in der Verhütung von Darminfektionen spielt, können mit IgA-haltigen Formulierungen Patienten, die für solche Darminfektionen empfänglich sind, effektiv behandelt werden. Es sind alle Formulierungen, die IgA-Antikörper gegen enterotoxinogene, gastrische Pathogene einschließlich pathogenes E. coli, Rotavirus, Staphylococcus, Streptococcus, Aerobacter, Salmonella, Pseudomonas, Haemophilus influenza, Proteus vulgaris, Shigella dysenteriae, Diplococcus pneumoniae, Coronavirus und Corynebacterium acne enthalten, möglich.

**[0087]** Eine Anwendungsmöglichkeit sind Formulierungen, die hohe Anteile von für Säuglinge spezifischem IgA enthalten.

**[0088]** Säuglinge sind oft sehr empfänglich für Magen-Darm-Störungen. Spezielle Formulierungen, die Anti-Cryptosporidiosis-IgA zum Schutz vor einer Cryptosporidiosisinfektion bei HIV- und AIDS-Patienten enthalten, sind eine weitere Möglichkeit. Allgemeine Formulierungen zum Schützen Reisender vor Diarrhoe und allgemeinen Magenstörungen werden in Erwägung gezogen. Nützliche Formulierungen, die Antikörper gegen Helicobacter pylori zum Schutz vor Magengeschwüren enthalten, sind möglich.

**[0089]** Geeignete Formulierungen können auf der Basis von Formulierungen produziert werden, die in der Technik bekannt sind. Die Technik stellt z.B. Formulierungen zur Behandlung der folgenden Störungen bereit:

Behandlung von	Quelle
Gastroenteritis	Schweizer Patent Nr. 1,573,995
Infantile E. coli Gastroenteritis	Eur. J. Pediatr <sup>14</sup>
Darminfektionen	Advances in Exp. Med. & Biol. <sup>15</sup>
Darmerkrankungen	US 5,066,491
Campylobacter jejuni	J. Applied Bacteriology <sup>25</sup>
Shigella Flexneri	Am. J. Tropical medicine and Hygiene <sup>27</sup>
Rotavirus-Diarrhoe	Indigenous Antimicrobial Agents <sup>23</sup>
Zahnkaries	Infection and Immunity <sup>28</sup>
Cryptosporidial-Diarrhoe	Lancet <sup>24</sup> , Gastroenterology <sup>29</sup>
Cryptosporidiosis bei AIDS	Archives of Disease in Childhood <sup>30</sup>
Rotavirus-Gastroenteritis	J. Infectious Diseases <sup>16</sup>
	J. Clinical Microbiology <sup>17</sup>
H. pylori	US 5,260,057
Atmungserkrankung	US 5,066,491
Cryptosporidiosis	US 5,066,491

**[0090]** Eine umfassende Übersicht über die Verwendung boviner Immunglobuline zur Behandlung von oder

Vorbeugung gegen bestimmte Humankrankheiten, die durch *H. pylori*, *C. parvum*, *E. coli*, *S. flexneri*, *C. difficile*, *V. cholerae* und Rotavirus verursacht werden, ist in den Proceedings of the IDF seminar on Indigenous antimicrobial agents of milk<sup>23</sup> enthalten.

**[0091]** In einem allgemeineren Kontext sind pharmazeutische IgA-haltige Formulierungen erwünscht, die auf die Bedürfnisse von Jungen, Alten, medizinisch Beeinträchtigten und unheilbar Kranken maßgeschneidert sind.

**[0092]** Die erfindungsgemäßen Formulierungen finden ebenso Anwendung im tiermedizinischen Bereich. Zum Beispiel zur Herstellung von Formulierungen, die spezifische IgA-Antikörper gegen pathogene Mikrobiologie wie *E. coli*, Rotavirus, Coronavirus und andere „Scour“ verursachende Mikroben zur Vorbeugung gegen und Behandlung von gastrischen Störungen beim neugeborenen Vieh enthalten.

**[0093]** Es sind Formulierungen möglich, die spezifische IgA Antikörper gegen Mycotoxine, Phytotoxine, Aflotoxine, Herbizide, Pestizide und Fungizide enthalten, um die Absorption von diesen nach der oralen Aufnahme zu blockieren.

**[0094]** Allgemeiner, es können Formulierungen hergestellt werden, die IgA gegen unerwünschte Lebensmittelinhaltsstoffe enthalten, um deren Absorption zu blockieren.

**[0095]** Neben pharmazeutischen und tiermedizinischen Formulierungen finden gemäß der vorliegenden Erfindung produzierte IgA Antikörper im Ernährungsbereich Verwendung.

**[0096]** Dies kann von der Verwendung der Milch per se bis hin zu spezifischen produzierten Formulierungen reichen, die hohe IgA-Anteile für das Wohlbefinden enthalten, zum Beispiel für den Einsatz in Nährgetränken und Sportnahrung.

**[0097]** Es sind Formulierungen möglich, die spezifisches IgA gegen gängige Allergene wie Pollen, Staub und Milben zum Schutz vor Allergien enthalten. Hierin werden Formulierungen in Erwägung gezogen, die spezifische Antikörper gegen Mycotoxine, Phytotoxine, Aflotoxine, Pestizide, Herbizide, Umweltschadstoffe wie Dioxine, polychlorierte Biphenyle und Fungizide enthalten, um die Absorption dieser Verbindungen zu blockieren.

**[0098]** Formulierungen gegen unerwünschte Lebensmittelinhaltsstoffe wie Cholesterol zum Blockieren ihrer Absorption wären besonders nützlich. Gemäß einem weiteren Aspekt kann das spezifische IgA mit Probiotika oder Wachstumsfaktoren zur Herstellung von Formulierungen für ein Magenwohlbefinden komplexiert werden.

**[0099]** Im entsprechenden tiermedizinischen Bereich sind Formulierungen möglich, die IgA zur ernährungstechnischen Unterstützung vor allem von wirtschaftlich bedeutendem tierischen Nachwuchs wie Lämmer, Ferkel, Kälber, Fohlen und Küken enthalten. Es können auch Formulierungen nützlich sein, die aus spezifischem IgA bestehen, das gegen unerwünschte Lebensmittelinhaltsstoffe wie  $\beta$ -Caroten gerichtet ist, um ihre Absorption zu blockieren.

**[0100]** Ein weiterer Anwendungsbereich für das erfindungsgemäße IgA Produkt sind Formulierungen mit Antikörpern gegen Haut- oder Haarproteinantigene für topische Anwendungen, gegen Hautantigene, komplexiert mit UV-absorbierenden Verbindungen wie Zink für einen Langzeitschutz vor Sonnenbrand, und mit spezifischen IgA-Antikörpern, komplexiert mit Wachstumsfaktoren zur Hautreparatur.

**[0101]** Die Formulierungen können in Form von Getränken, Lotionen, Pulvern, Cremes und dergleichen gemäß in der Technik allgemein bekannten Prinzipien hergestellt werden. Die Formulierungen können oral, intravenös, intramuskulär, subkutan, rektal, topisch, parenteral oder bei Bedarf über andere Wege verabreicht werden.

**[0102]** Die Formulierungen können pharmazeutisch akzeptable Träger oder im Falle von Nahrungsergänzungsmitteln ernährungsmäßig akzeptable Träger enthalten. Zu solchen Trägern gehören wässrige Lösungen, nicht toxische Exzipienten, einschließlich Salze, Konservierungsmittel und Puffer. Die Formulierungen können Additive wie Mineralien, Vitamine, Aromastoffe, Duftstoffe und dergleichen enthalten.

**[0103]** Allgemeine Unterstützung bei der Herstellung solcher Formulierungen kann von Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> Edition. Easton: Mac Publishing Company (1980); the National Formulary XIV, 14th Edition. Washington: American Pharmaceutical Association (1975); und Goodman and Gillmans The Pharma-

cological basis for Therapeutics (7<sup>th</sup> Edition) erhalten werden.

**[0104]** Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele beschrieben.

### 1. BEISPIEL

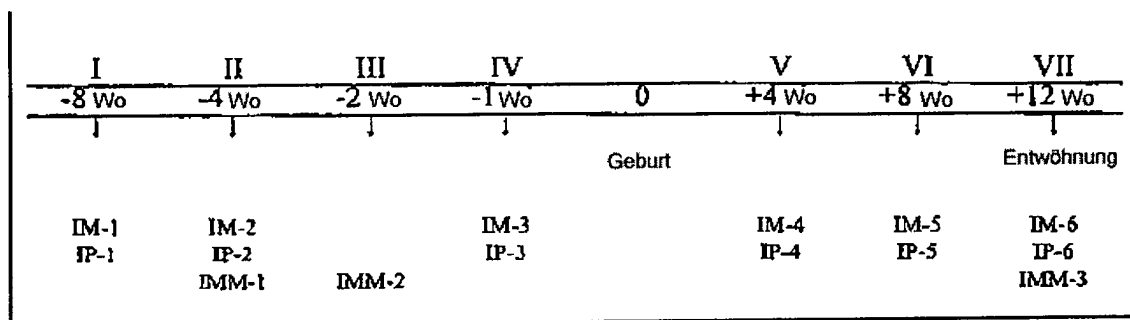
**[0105]** Es wurden 64 trächtige Mutterschafe ausgewählt, in acht Gruppen unterteilt und durch intramuskuläre (IM), intraperitoneale (IP) oder intramammäre (IMM) Methoden oder Kombinationen dieser drei Methoden immunisiert. Für die IMM Immunisierung wurde nur die rechte Drüse immunisiert, während die linke Drüse unbehandelt blieb und als Kontrolle diente.

#### Immunisierungsprotokoll

Gruppe (n = 8)	Immunisierungsmethode
1	IM
2	IP
3	IMM
4	IM/IP
5	IM/IMM
6	IP/IMM
7	IM/IP/IMM
8	KEINE (Kontrolle)

**[0106]** Die Tiere wurden gemäß dem folgenden Plan immunisiert.

#### Immunisierungsplan



#### Antigen

**[0107]** Als Antigen wurde ein handelsüblicher pathogener E. coli Impfstoff (Suvaxyn, Maternafend-4; J&H Pacific Ltd, NZ) verwendet. Dieser Impfstoff hat bekanntlich hohe Konzentrationen von K88, K99, 987P und F41 Pili Antigenen.

**[0108]** Die Details der Immunisierungsprotokolle sind wie folgt:

#### Immunisierung I

##### IM/IP

**[0109]** Stammimpfstoff wurde mit Freundschem inkomplettem Adjuvans (FIC; 1 Teil Impfstoff : 3 Teile FIC) emulgiert.

IM; 1 ml pro Stelle; 2 Stellen

IP; 1 ml pro Stelle; 1 Stelle

#### Immunisierung II

##### IM/IP

IM/IP wie bei Immunisierung I wiederholen.

## IMM

**[0110]** Stammimpfstoff wurde in steriler Salzlösung (1 Teil Impfstoff : 1 Teil Salzlösung) verdünnt. Ein Antibiotikum (Dupocillin) wurde zum IMM Immunogen in einem Verhältnis von 1 ml Antibiotikum : 30 ml Immunogen gegeben.

IMM; 1 ml je Drüse; nur rechte Drüse

## Immunisierung III

## IMM

Immunisierung II nur für IMM wiederholen.

## Immunisierung IV, V und VI

## IM/IP

Immunisierung I wiederholen.

## Immunisierung VII

## IM/IP &amp; IMM

Immunisierung II wiederholen.

## Gesundheitszustand der Tiere

**[0111]** Der allgemeine Gesundheitszustand der an dem Versuch beteiligten Mutterschafe wurde durch regelmäßige Gewichtskontrollen und tierärztliche Untersuchungen überwacht. Es wurde kein erkennbarer Unterschied hinsichtlich Gewichtszunahme/-verlust zwischen den Behandlungsgruppen beobachtet. Es wurden keine nachteiligen Immunisierungseffekte beobachtet. Zwei der 64 Mutterschafe wurden auf Mastitis behandelt, ein Mutterschaf aus Gruppe 6 (IP/IMM) und ein Mutterschaf aus Gruppe 7 (IM/IP/IMM). Insgesamt wurden keine schädlichen Wirkungen der IMM Immunisierung festgestellt.

## Proben

**[0112]** Den Mutterschafen wurde vor der Immunisierung I, II und IV vor dem Lamm Blut entnommen. Proben von Blut und Kolostrum/Milch (linke und rechte Milchdrüsen separat) wurden nach der Geburt am Tag 0 (Geburt), 1, 2, 3 und 5 und dann in der Woche 1, 2 und 3 und dann im Monat 1, 2 und 3 genommen.

**[0113]** Das Blut wurde in EDTA Vacutainern auf Eis gesammelt. Getrenntes Plasma wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zur Antikörperanalyse aufbewahrt. Kolostrum/Milchproben (20–30 ml) von der linken (unbehandelten) und rechten (immunisierten) Milchdrüse wurden auf Eis gehalten, bis sie zur Fettbeseitigung zentrifugiert wurden ( $4^{\circ}\text{C}$ ; 20 Minuten;  $2000\text{ g}_{\text{max}}$ ). Entrahmter Überstand wurde erneut zentrifugiert ( $4^{\circ}\text{C}$ ; 1 Stunde;  $40.000\text{ g}_{\text{max}}$ ), um Milchmolke/Plasma und Casein zu trennen. Der Überstand wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zur Antikörperanalyse aufbewahrt.

## Probenanalyse

**[0114]** Alle Proben und Reagenzien wurden mit 0,01 M phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7,5), die 0,05 % v/v Tween-20 (PBS-T) und 1 % w/v Rinderserumalbumin (BSA; Typ A7030, Sigma Chem. Co., USA) enthielt, verdünnt und alle Wäschen erfolgten mit einem automatisierten Plattenwäscher (ELP-35, BioTek Instruments, USA) mit PBS-T, sofern nicht anders angegeben.

**[0115]** ELISA-Platten (Maxisorp F-96 Immunoplaten, Nunc, Dänemark) wurden mit 100 µl E. coli Antigen (Suvaxyn Maternafend-4; J & H Pacific Ltd, NZ) beschichtet, 1:1000 in 0,05 M Carbonatpuffer (pH 9,6) verdünnt, über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert und dreimal gewaschen. Verbleibende aktivierte Stellen auf den Immunoplaten wurden durch 2-stündiges Inkubieren bei  $22^{\circ}\text{C}$  mit 250 µl PBS-T, der 1 % w/v BSA enthielt, blockiert. Nach zweimaligem Waschen der Platten wurden 100 µl 10fache Serienverdünnungen von Testproben (Primärantikörper; 1:100, 1:1000, 1:10.000, 1:100.000) zu Duplikat-Wells gegeben. Die Platten wurden 2 Stunden lang bei  $22^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. 100 µl eines zweiten Antikörpers, der aus spezifi-

schem Schwerketten-Kaninchen-Anti-Schaf-IgA (1:200.000; Bethyl Laboratories, USA) bestand, wurden zu den Platten gegeben. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, dann dreimal vor der Zugabe von 100 µl des Enzymkonjugats, Ziegen-Anti-Kaninchen-Ig konjugiert mit Meerrettichperoxidase (1:8000; Dako, Dänemark), gewaschen. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 22°C wurden die Platten zweimal mit PBS-T und dann zweimal mit PBS ohne Tween-20 gewaschen und mit 100 µl frisch zubereiteter Substratlösung befüllt. Die Substratlösung bestand aus 0,1 g/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Boehringer Mannheim, Deutschland) in 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 5,5), der 1,3 mmol/l Wasserstoffperoxid enthielt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 22°C wurden 50 µl einer Stopplösung, 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zugegeben und die optische Dichte (OD) wurde bei 450 nm mit einem automatisierten Plattenleser (EL311s, BioTek Instruments, USA) gemessen.

**[0116]** Bei jeder ELISA Mikroplatte wurde eine positive Qualitätskontrollprobe (geprüft bei 1:100, 1:1000, 1:10.000, 1:100.000 und 1:1.000.000) und eine negative Qualitätskontrollprobe (geprüft bei 1:1000) mit den Proben laufen gelassen. Absorbanzwerte von diesen Kontrollproben wurden in Berechnungen verwendet, um die Probenantikörpertiter zu bestimmen. Die mittlere Absorbanz zwischen der maximalen Absorbanz der positiven Kontrolle und der Absorbanz der negativen Kontrolle liefert einen 50%-Wert. Die reziproke Verdünnung von Probenantikörper entsprechend diesem 50%-Absorbanz-Wert wird als der Antikörpertiter für die Probe eingestuft.

**[0117]** [Fig. 1](#) zeigt eine typische Verdünnungskurve für die positive Kontrollprobe im E. coli IgA ELISA.

### Ergebnisse

**[0118]** Proben wurden anfänglich als Gruppenpools geprüft, um eine Übersicht über die Reaktionen der Gruppe auf verschiedene Immunisierungspläne zu erhalten.

**[0119]** [Fig. 2](#) zeigt die Anti-E.coli-IgA-Titer von Milch der rechten (immunisierten) Drüse für alle Gruppen am Tag 0, Tag 5, in Woche 2 und Woche 4. Bei allen Gruppen waren die IgA-Antikörpertiter der Milch am Tag 0 (Geburt) am höchsten, wobei die Werte im Laufe der ersten Woche fielen. Gruppe 7 (IM/IP/IMM) erbrachte die beste IgA Reaktion mit einem Milchantikörpertiter von 105.000. Es folgte Gruppe 5 (IM/IMM) mit einem Titer von 50.000 und Gruppe 6 (IP/IMM) mit einem Titer von 22.000. Die anderen Gruppen zeigten eine minimale Reaktion, einschließlich Gruppe 3 (IMM). Bis zum Tag 5 waren die IgA-Antikörpertiter in der Milch der Gruppen 5, 6 und 7 auf etwa 20 % der Tag-0-Titer zurückgegangen, bis zur Woche 4 waren die Titer jedoch mit etwa 3000 noch immer bedeutend.

**[0120]** In [Fig. 3](#) sind Anti-E.coli-IgA-Antworten der rechten (immunisierten) Drüse und der linken (unbehandelten) Drüse am Tag 0 gegenübergestellt. Bei den IgA-Antikörpertitern in der Milch gab es eine deutliche Reaktionsdifferenz zwischen Proben von der rechten (immunisierten) Drüse und der linken (unbehandelten) Drüse. Während in den rechten Milchproben der Gruppen 5, 6 und 7 hohe Titer gemessen wurden, lagen die Titer der entsprechenden linken Milchproben bestenfalls bei nur 20 % dieser Werte.

## 2. BEISPIEL

**[0121]** Es wurden einzelne Probenanalysen von Anti-E.coli-IgA-Titerreaktionen für jede der Immunisierungsgruppen des 1. Beispiels durchgeführt. Proben wurden mit dem ELISA-Assay gemäß dem Verfahren aus dem 1. Beispiel analysiert. Die Ergebnisse für Tag 0 und 1 sind jeweils in den [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) dargestellt.

### Ergebnisse

**[0122]** In allgemeiner Übereinstimmung mit den zuvor zusammengefassten Daten waren die Titer in mit der IM, IP oder IMM Methode alleine immunisierten Tieren niedrig und in mit der Kombination aus IM/MM, IP/IMM und IM/IP/IMM Methoden behandelten Tieren weit höher (Mittel ± s.e.m. Antikörpertiter; jeweils 1/32.100 ± 1/13.500; 1/29.000 ± 1/12.000; 1/30.000 ± 1/7300).

**[0123]** Es wurden keine bedeutenden Unterschiede bei den mittleren IgA Titerreaktionen beobachtet, die sich aus der Immunisierung mit den jeweiligen drei Kombinationsmethoden ergaben. Es wurde jedoch eine wesentliche Variabilität bei der Titerreaktion innerhalb der Gruppe beobachtet, und insbesondere der Standardfehler des Mittelwertes für die IM/IP/IMM Gruppe (1/7300) war weit geringer als der für die IM/IMM (1/13.500) und IP/IMM (1/12.500) Methoden berechnete.

**[0124]** Dieses Titerreaktionsmuster wurde ab Tag 2 und danach in Milchproben aufrechterhalten. Die Daten

scheinen aufzuzeigen, dass die Immunisierung durch das Drei-Stellen-IM/IP/IMM-Verfahren das Ausmaß der Reaktion nicht über das mit den IM/IMM und IP/IMM Kombinationen erhaltene erhöht, sondern dazu dient, die Variabilität bei der IgA Reaktion zwischen Tieren zu verringern.

### 3. BEISPIEL

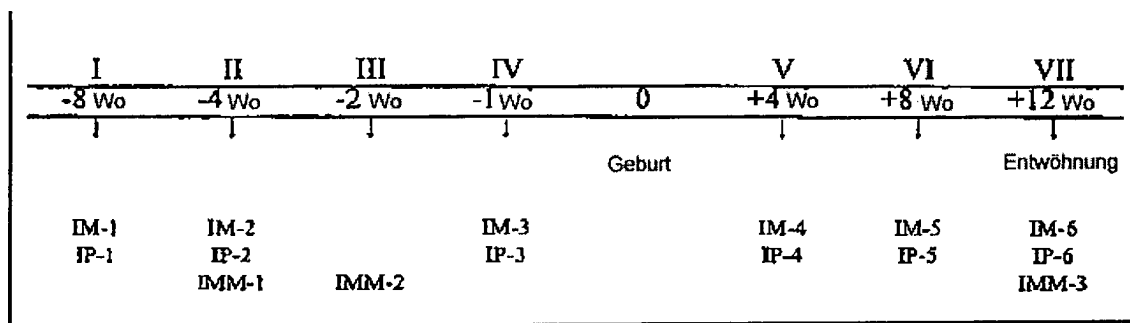
**[0125]** Es wurden 64 trächtige Mutterschafe ausgewählt, in acht Gruppen unterteilt und durch intramuskuläre (IM), intraperitoneale (IP) oder intramammäre (IMM) Methoden oder Kombinationen dieser drei Methoden immunisiert. Für die IMM-Immunisierung wurde lediglich die rechte Drüse immunisiert, während die linke Drüse unbehandelt blieb und als Kontrolle diente.

#### Immunisierungsprotokoll

Gruppe (n = 8)	Immunisierungsmethode
1	IM
2	IP
3	IMM
4	IM/IP
5	IM/IMM
6	IP/IMM
7	IM/IP/IMM
8	KEINE-Kontrolle

**[0126]** Die Tiere wurden gemäß dem folgenden Plan immunisiert.

#### Immunisierungsplan



#### Antigen

**[0127]** Als Immunogen wurde ein handelsüblicher Impfstoff, 3K Scourguard (SmithKline Beecham, Royal Oak, Auckland, Neuseeland) verwendet. Dieser Impfstoff enthält pathogenes E. coli, bovines Rotavirus und Coronavirus.

**[0128]** Die Details der Immunisierungsprotokolle sind wie folgt:

Das Immunisierungsprotokoll aus dem 1. Beispiel wurde mit 3K Scourguard wiederholt, das anstelle von Maternafend als Stammimpfstoff verwendet wurde.

#### Gesundheitszustand der Tiere

**[0129]** Der allgemeine Gesundheitszustand der in dem Versuch beteiligten Mutterschafe wurde durch regelmäßige Gewichtskontrollen und tierärztliche Untersuchungen überwacht. Wie im 1. Beispiel wurde(n) kein erkennbarer Unterschied hinsichtlich Gewichtszunahme/-verlust zwischen den Behandlungsgruppen und keine nachteiligen Immunisierungseffekte beobachtet.

#### Proben

**[0130]** Proben von Blut und Kolostrum/Milch wurden gemäß dem Protokoll des 1. Beispiels genommen.

## Probenanalyse

**[0131]** Der ELISA-Assay wurde gemäß dem Verfahren aus dem 1. Beispiel durchgeführt, mit der Ausnahme, dass 3K Scourguard (1:1000) für die Mikroplattenbeschichtung anstelle von Maternafend verwendet wurde. Blutplasma und Kolostrum/Milch wurden gepoolt, um einen ersten Hinweis auf die Antikörperreaktionen der Gruppe zu erhalten.

## Ergebnisse

**[0132]** [Fig. 6](#) zeigt die Anti-3K Scourguard-IgA-Titer von Milch der rechten (immunisierten) Drüse für alle Gruppen am Tag 0 und 5. Bei allen Gruppen waren die IgA-Antikörpertiter in der Milch am Tag 0 (Geburt) am höchsten, wobei die Werte im Laufe der ersten Woche fielen. Gruppe 7 (IM/IP/IMM) erbrachte die beste IgA Reaktion mit einem Milchantikörpertiter von 210.000. Es folgte Gruppe 5 (IM/IMM) mit einem Titer von 70.000 und Gruppe 3 mit einem Titer von 27.000. Gruppe 6 (IP/IMM) erbrachte eine Milchantikörperreaktion von 20.000. Die anderen Gruppen erbrachten eine minimale Reaktion. Bis zum Tag 5 waren die IgA-Antikörpertiter in der Milch der Gruppen 3, 5 und 7 auf etwa 10 % der Tag-0-Titer zurückgegangen.

**[0133]** [Fig. 7](#) zeigt die Anti-3K Scourguard-IgA-Titer von Milch der rechten (immunisierten) und linken (unbehandelten) Drüse für alle Gruppen am Tag 0. Die rechte Drüse erbrachte eine weit höhere Reaktion als die linke Drüse. Es gab keine bedeutende Antikörpertiterreaktion für die unbehandelte linke Drüse, mit Ausnahme der Gruppe 3.

## BEISPIEL

**[0134]** 32 trächtige Mutterschafe wurden vier Behandlungsgruppen zugeordnet und durch Kombinationen aus intramuskulären (IM), intraperitonealen (IP) und intramammären (IMM) Methoden immunisiert. Das IMM Immunogen für die Gruppe 3 lag in wässriger Lösung vor, wohingegen das IMM Immunogen für die Gruppe 4 in FIC emulgiert war. Für die IMM Immunisierungen wurde nur die rechte Drüse immunisiert, wohingegen die linke Drüse unbehandelt blieb und als Kontrolle diente.

## Immunisierungsprotokoll

Gruppe (n = 8)	Immunisierungsmethode
1	IM/IMM
2	IP/IMM
3	IM/IM/IMM
4	IM/IP/IMM (FIC)

**[0135]** Die Tiere wurden gemäß dem folgenden Plan immunisiert.

## Immunisierungsplan

I	II	III	IV	
-8 Wo	-4 Wo	-2 Wo	-1 Wo	0
				Geburt
IM-1 IP-1	IMM-1 IMM(FIC)-1 IM-2 IP-2	IMM-2 IMM(FIC)-2	IM-3 IP-3	

## Antigen

**[0136]** Als Antigen wurde ein TNF-Präparat verwendet, das im Handel von R & D Systems, 614 McKinley Place, New England, USA, erhältlich ist. Eine Stammlösung (1 mg/ml) wurde durch Rekonstituieren des gefriergetrockneten TNF in steriler Salzlösung hergestellt.

**[0137]** Die Details der Immunisierungsprotokolle sind wie folgt:

Immunisierung I

IM/IP

**[0138]** Die Antigenstammlösung wurde auf 0,16 mg/ml verdünnt und anschließend mit FIC emulgiert (1 Teil Salzlösung : 3 Teile FIC).

IM; 1 ml je Stelle; 2 Stellen

IP; 1 ml je Stelle; 1 Stelle

Immunisierung II

IM/IP

IM/IP wie bei der Immunisierung I wiederholen.

IMM

**[0139]** Für rechte Drüsen: Antigenstammlösung wurde in steriler Salzlösung auf 0,1 mg/ml verdünnt. Ein Antibiotikum (Dupocillin) wurde in einem Verhältnis von 1 ml Antibiotikum : 40 ml Immunogen zugegeben.

IMM; 1 ml je rechte Drüse

IMM (FIC)

**[0140]** Für rechte Drüsen: Antigenstammlösung wurde in steriler Salzlösung auf 0,32 mg/ml verdünnt und mit FIC emulgiert (1 Teil Salzlösung : 3 Teile FIC). Ein Antibiotikum (Dupocillin) wurde im Verhältnis von 1 ml Antibiotikum : 40 ml Immunogen zugegeben.

IMM (FIC); 1 ml je rechte Drüse

Immunisierung III

IMM/IMM (FIC)

Immunisierung II nur für IMM/IMM(FIC) wiederholen.

Immunisierung IV

IM/IP

Immunisierung I wiederholen.

Gesundheitszustand der Tiere

**[0141]** Der allgemeine Gesundheitszustand der in dem Versuch beteiligten Mutterschafe wurde durch regelmäßige Gewichtskontrollen und tierärztliche Untersuchungen überwacht. Die Tiere behielten ihr Gewicht während der Trächtigkeit und Laktation und es wurden keine Behandlungseffekte innerhalb der Gruppe beobachtet. Zwei Tiere starben an nicht im Zusammenhang stehenden Ursachen während der Trächtigkeit/des Lammens (beides Mutterschafe aus der Gruppe 1, IM/IMM). Ein Tier wurde aufgrund von Mastitis in der linken unbehandelten Drüse aus dem Versuch genommen. Es wurden keine nachteiligen Effekte auf die Immunisierung festgestellt. Anzeichen für eine Geschwürbildung an den IM und IP Immunisierungsstellen waren minimal. Es wurden keine bedeutenden Unterschiede bei der Milchdrüsenfunktion zwischen den linken und den rechten Drüsen und zwischen Drüsen beobachtet, die mit Immunogen in steriler Salzlösung oder FIC immunisiert wurden.

Proben

**[0142]** Den Mutterschafen wurde vor der Immunisierung I, II und IV vor dem Lammen Blut entnommen. Nach dem Lammen wurden Proben von Blut und Kolostrum/Milch (linke und rechte Milchdrüse separat) am Tag 1 (Geburt), 2, 3, 6, 14 und 28 und im Monat 2 und 3 genommen.

**[0143]** Die Proben wurden gemäß dem im 1. Beispiel angewendeten Verfahren genommen und behandelt.



## Probenanalyse

**[0144]** Der ELISA-Assay für TNF wurde gemäß dem im 1. Beispiel angewendeten Verfahren durchgeführt, mit der Ausnahme, dass TNF zur Plattenbeschichtung (2 mg/ml) verwendet wurde. [Fig. 8](#) zeigt eine typische Verdünnungskurve für die positiven und negativen Kontrollproben im TNF IgA ELISA. Die Inter-Assay-Präzision wurde anhand 10 wiederholter Analysen der positiven Kontrolle berechnet und der Variationskoeffizient betrug 10,2 %.

## Ergebnisse

## IgA-Reaktionen in Milch

**[0145]** Einzelne Probenanalysen der Anti-TNF-IgA-Titerreaktionen in Milchproben der rechten (immunisierten) Drüse am Tag 1 post partum sind für jede der Immunisierungsgruppen in [Fig. 9](#) dargestellt. Die Titer waren in Tieren, die durch die IM/IMM, IP/IMM oder IM/IP/IMM Methoden immunisiert wurden, wobei das Immunogen in Salzlösung verabreicht wurde, niedrig. (Mittlere  $\pm$  s.e.m Antikörpertiter: jeweils  $1/3600 \pm 1/2600$ ;  $1/3300 \pm 1/1500$ ;  $1/900 \pm 1/500$ ). Im Gegensatz dazu waren die Titer in Tieren, die mit den IM/IP/IMM Kombinationsmethoden behandelt wurden, wobei das IMM Immunogen in FIC emulgiert war, etwa 20 mal höher ( $1/61.900 \pm 1/29.600$ ). Eine wesentliche Variation wurde bei den Reaktionen der einzelnen Tiere der Gruppe 4 beobachtet, bei denen die Titer von  $1/4000$  bis  $1/250.000$  reichten.

## Antikörperreaktionen in Milch der rechten und linken Drüse

**[0146]** Bedeutende Unterschiede waren in Anti-TNF-IgA-Titer von Milch der rechten (immunisierten) und linken (unbehandelten) Drüse erkennbar, wobei der IgA-Titer der linken Drüse fast nicht nachweisbar war, was mit früheren Feststellungen für E. coli übereinstimmte. [Fig. 10](#) zeigt die Daten für die Anti-TNF-IgA-Titer von Milchproben von der linken und der rechten Drüse am Tag 1 post partum.

## Antikörperreaktion in Milch während der Laktation

**[0147]** Die Beziehung zwischen Anti-TNF-IgA und dem Laktationsstadium ist in [Fig. 11](#) dargestellt. Die Daten sind Mittel  $\pm$  s.e.m. Titer von Milch der rechten (immunisierten) Drüse von Tieren der Gruppe 4, die mit der IM/IP/IMM (FIC) Kombinationsmethode behandelt wurden. Die Anti-TNF-IgA-Titer waren in den anfänglichen Milchdrüsensekretionen post partum am höchsten und gingen bis zum Tag 6 von den Höchstwerten auf etwa 10% und bis zum Monat 1 auf etwa 5 % zurück (entspricht einem IgA Titer von  $1/3500$ ). Das Gesamtreaktionsmuster war dem aus dem E. coli Versuch ähnlich, wobei der Antikörperrückgang mit dem Beginn der vollständigen Laktation und erhöhtem Milchvolumen zusammenfiel.

## 5. BEISPIEL

**[0148]** 35 trächtige Kühe wurden in vier Gruppen unterteilt und entweder mit zwei Methoden, drei Methoden oder keiner gemäß dem folgenden Protokoll immunisiert. Immunogen wurde in Freundschem inkomplettem Adjuvans (FIC) für intramammäre (IMM) Immunisierungen der rechtsseitigen Drüsen und für intramuskuläre (IM) und intraperitoneale (IP) Immunisierungen emulgiert. Für die linken Drüsen wurde Immunogen in wässriger Lösung verwendet.

## Immunisierungsprotokoll

Gruppe	Immunisierungsmethode
1a (n = 10)	IM/IMM
1b (n = 10)	IP/IMM
1c (n = 10)	IM/IP/IMM
1d (n = 5)	KEINE

**[0149]** Die Tiere wurden gemäß dem folgenden Plan immunisiert.

## Immunisierungsplan

I	II	III	IV	
-8 Wo	-4 Wo	-2 Wo	-1 Wo	0
				Geburt
IM-1 IP-1	IMM-1 IM-2 IP-2	IMM-2	IM-3 IP-3	

## Antigen

**[0150]** Als Antigen für die Immunisierung wurde Hefe, *Candida albicans*, verwendet. Die Hefezellen wurden in Medium kultiviert, durch Zentrifugation geerntet, gewaschen, durch Hitze abgetötet und anschließend gefriergetrocknet. Eine Stammlösung von *C. albicans* (7 mg Protein je ml) wurde durch Rekonstituieren des gefriergetrockneten *C. albicans* in Phosphatpuffer hergestellt.

**[0151]** Die Details des Immunisierungsprotokolls sind wie folgt:

## Immunisierung I

## IM/IP

**[0152]** Antigenstammlösung wurde in steriler Salzlösung auf 1 mg/ml verdünnt und mit FIC emulgiert (1 Teil Salzlösung : 3 Teile FIC).

IM; 2 ml je Stelle; 2 Stellen

IP; 4 ml je Stelle; 1 Stelle

## Immunisierung II

## IM/IP

IM/IP wie für Immunisierung I wiederholen.

## IMM

**[0153]** Für rechte Drüsen: Antigenstammlösung wurde in steriler Salzlösung auf 1 mg/ml verdünnt und mit FIC emulgiert (1 Teil Salzlösung : 3 Teile FIC).

**[0154]** Für linke Drüsen: Antigenstammlösung wurde in steriler Salzlösung auf 0,25 mg/ml verdünnt.

IMM; 2 ml je Drüse; 4 Drüsen

## Immunisierung III

## IMM

Immunisierung II nur für IMM wiederholen.

## Immunisierung IV

## IM/IP

Immunisierung I wiederholen.

## Gesundheitszustand der Tiere

**[0155]** Der allgemeine Gesundheitszustand der an dem Versuch beteiligten Kühe wurde durch regelmäßige Gewichtskontrollen und tierärztliche Untersuchungen überwacht. Die Immunisierungsstellen wurden regelmäßig begutachtet, um Auswirkungen des Immunisierungsverfahrens zu beurteilen. Es wurden keine Reaktionen

von klinischem Grad an irgendeiner der immunisierten Stellen beobachtet. Darüber hinaus zeigten die gesammelten Milchvolumendaten, dass die Behandlung der Milchdrüse die Gesamtlaktationsleistung der Tiere nicht beeinflusste.

#### Proben

**[0156]** Den Kühen wurde vor der Immunisierung I, II und IV vor dem Kalben Blut entnommen. Proben von Blut und Kolostrum/Milch wurden nach der Geburt am Tag 1, 2, 3, 5, 7, 14, 28 und 60 genommen. An den Probenentnahmetagen wurden die Kühe morgens und abends viertelgemolken (d.h. Proben wurden von einzelnen Drüsen entnommen), die Milchvolumen wurden aufgezeichnet und eine Probe von 100 ml wurde behalten. Die morgens und abends genommenen Viertelgemelkproben wurden für Laboranalysen zusammengefasst.

**[0157]** Blut- und Kolostrum/Milchproben wurden gemäß dem im 1. Beispiel angewendeten Verfahren behandelt.

#### Probenanalyse

**[0158]** Der ELISA-Assay für *C. albicans* wurde gemäß dem im 1. Beispiel angewendeten Verfahren durchgeführt, mit der Ausnahme, dass *C. albicans* (5 mg/ml) zur Plattenbeschichtung verwendet wurde; der zweite Antikörper, der zur Ermittlung der Klassenspezifität verwendet wurde, war Kaninchen-Anti-Rind-IgA (1:40.000; Bethyl Laboratories, USA); enzymkonjugierter Antikörper war Ziegen-Anti-Kaninchen (1:12.000; Dako, Dänemark). Das Endpunktnachweissystem war das gleiche wie im 1. Beispiel.

**[0159]** [Fig. 12](#) zeigt eine typische Antikörpervedünnungskurve für die positive Kontrollprobe.

#### Ergebnisse

**[0160]** Bei den Gruppen 1a, 1b und 1c waren die Anti-*C. albicans*-IgA-Milchantikörpertiter am Tag 1 (Geburt) am höchsten, wobei die Werte über den Laktationszeitraum zurückgingen, wie bei den früheren Schafversuchen (Beispiele 1 bis 4) beobachtet wurde.

#### Immunisierung an zwei Stellen gegenüber Immunisierung an drei Stellen

**[0161]** [Fig. 13](#) zeigt die Anti-*C. albicans*-IgA-Antikörpertiter von Milch der rechten (IMM Immunogen in FIC) Drüse für alle Gruppen am Tag 1, 2, 7, 14 und 60. Die an drei Stellen immunisierten Tiere (Gruppe 1c; IM/IP/IMM) wiesen eine weit höhere Reaktion als die an zwei Stellen immunisierten Tiere auf (Gruppe 1a; IM/IMM und Gruppe 1b; IP/IMM). Die Mittel  $\pm$  s.e.m. Antikörpertiter waren jeweils  $11.700 \pm 3700$ ,  $2500 \pm 700$  und  $3000 \pm 900$ . Die Gruppe 1d (Kontrolle) hatte einen sehr geringen Antikörpertiter am Tag 1 (Titer von  $200 \pm 70$ ). Die höheren Titer der an drei Stellen immunisierten Tiere wurden über den Laktationszeitraum aufrechterhalten.

#### Freundsches Agens gegenüber Salzlösung für IMM-Immunisierungen

**[0162]** [Fig. 14](#) zeigt einen Vergleich zwischen dem Anti-*C. albicans*-IgA-Titer von Milch der linken (wässriges IMM Immunogen) und der rechten (FIC IMM Immunogen) Drüse bei der Gruppe 1c im Laufe des Laktationszeitraums. Drüsen, die mit in FIC emulgiertem Immunogen immunisiert wurden, erbrachten eine höhere Reaktion als Drüsen, die mit wässrigem Immunogen immunisiert wurden, wobei dieser Unterschied mit der Zeit zunahm. Am Tag 1 lag der Titer der rechten Drüse bei  $11.700 \pm 3700$  im Vergleich zum Titer der linken Drüse von  $8700 \pm 2900$ . Bis zum Tag 60 war der Titer der linken Drüse auf  $590 \pm 200$  zurückgegangen, wohingegen der Titer der rechten Drüse 4 Mal höher war ( $2300 \pm 800$ ). Diese Differenz zwischen der Reaktion der linken und rechten Drüse war auch in den an zwei Stellen immunisierten Gruppen (Gruppe 1a und 1b) offensichtlich.

**[0163]** Gemäß der vorliegenden Erfindung wird somit ein Verfahren zum Induzieren von IgA in einem Säugetier sowie die Produktion von IgA in Säugetiermilch auf einem Niveau bereitgestellt, das über dem liegt, das bisher erreicht wurde oder möglicherweise zu erwarten war, wenn eine dritte Verabreichungsmethode für ein Antigen mit zwei bekannten Verabreichungsmethodenprotokollen kombiniert wird. Alternativ stellt die vorliegende Erfindung wenigstens ein Verfahren bereit, mit dem die Variabilität der IgA-Antikörpertiterreaktion zwischen Tieren reduziert werden kann. Es ist zu verstehen, dass diese Ergebnisse einen Vorteil darstellen, wenn IgA-haltige Produkte zur Verwendung in pharmazeutischen, tiermedizinischen und kosmetischen Formulierungen sowie in Nahrungs- und Nahrungsergänzungsmitteln erwünscht sind.

1. Immune Response of Pregnant cows to Bovine Rotavirus Immunisation, Saif L. J. et al; American Journal of Veterinary Research (1984), 45: 1, 49–58.
2. Comparative Effect of Selected Adjuvants on the Response in the Bovine Mammary Gland to Staphylococcal and Streptococcal antigens, Opdebeeck, J. P. and Norcross, N. L; Veterinary Immunopathology (1984), 6: 341–351.
3. Novel Vaccination Strategies for the Control of Mucosal Infection, Husband, A. J; Vaccine (1993), 11: 2, 107–112.
4. Immunological Effector Mechanisms in Ruminants, D.L. Watson, I. G. Colditz, H. S. Gill; in Vaccines in Agriculture (1994), S. 21–36, Hrsg. Wood et al, CSIRO, Australia.
5. Responses of Antibody Titers to Intramammary Immunization with Escherichia coli J5 Bacterin; J. S. Hogan, K. L. Smith, P. Schoenberger, S. Romig and L. Thompson; J Dairy Sci. (1997) 80: 2398–2402.
6. Immune Mechanisms of the Ruminant Mammary Gland, R. F. Sheldrake; Australian Journal of Dairy Technology (1987), 42:1-2, 30–32.
7. The Effect of Intraperitoneal and Intramammary immunization of sheep on the numbers of antibody-containing cells in the mammary gland, and antibody titres in blood serum and mammary secretions; R. F. Sheldrake, A. J. Husband, D. L. Watson, A. W. Cripps; Immunology (1985), 56: 605–614.
8. Specific antibody-containing cells in the mammary gland of non-lactating sheep after Intraperitoneal and intramammary immunisation; R. F. Sheldrake, A. J. Husband, D. L. Watson, Research in Veterinary Science (1985), 38: 312–316.
9. Vaccination against enteric Rota and Coronaviruses in cattle and pigs: enhancement of lactogenic immunity, C. F. Crouch; Vaccine (1985), 3: 284–291.
10. The mucosal immune system with particular reference to ruminant animals, A. K. Lascelles, K. J. Beh, T. K. Mukkur, D. L. Watson; in The Ruminant Immune System in Health and Disease (1986), S. 429–457, Hrsg. Morrison, Cambridge University Press, UK.
11. Origin of antibody-containing cells in the ovine mammary gland following Intraperitoneal and intramammary immunisation, R. F. Sheldrake, A. J. Husband, D. L. Watson; Research in Veterinary Science (1988), 45, 156–159.
12. IgA immune responses in the respiratory tract of pigs; R. F. Sheldrake; Research in Veterinary Science, (1990), 49, 98–103.
13. The Development of Vaccines to Protect Mucosal Surfaces; A. J. Husband, M. L. Dunkley, V. L. Clifton, in Health and Production for the 21st Century (1993), S. 82–88, Hrsg. Beh, CSIRO, Australia.
14. Treatment of Infantile E. coli Gastroenteritis with Specific Bovine anti-E.coli Milk Immunoglobulins; C. Miettens, H. Keinhorst, H. Hilpert, H. Gerber, H. Amster, J.J. Pahud; Eur. J. Pediatr. (1979), 132: 239–252.
15. Bovine Milk Antibodies in the Treatment of Enteric Infections and their ability to eliminate virulence factors from pathogenic E. coli; J. J. Pahud, H. Hilpert, K. Schwarz, H. Amster, M. Smiley; in Advances in Exp. Med & Biol.: The Ruminant Immune System (1981), S. 591–600, Hrsg. Butler, Plenum Press, NY.
16. Use of Bovine Milk Concentrate Containing Antibody to Rotavirus to treat Rotavirus Gastroenteritis in Infants; H. Hilpert, H. Brussow, C. Miettens, J. Sidoti, L. Lerner, H. Werchau; Journal of Infectious Diseases (1987), 156: 1, 158–166.
17. Bovine Milk Immunoglobulins for Passive Immunity to Infantile Rotavirus Gastroenteritis; H. Brussow, H. Hilpert, I. Walther, J. Sidoti, C. Miettens, P. Bachmann; Journal of Clinical Microbiology (1987), 25: 6, 982–986.
18. Antibodies: A Laboratory Manual (1988), S. 110–114; Hrsg. Harlan Cold Spring Water Laboratory, NY.
19. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures, Hanly et al; ILAR Journal (1995), 37:3, 93–118.
20. Purification of Secretory IgA from Bovine Colostrum, Kanamaru et al; Agric. Biol. Chem (1982), 46:16, 1531–1537.
21. A Method for Preparation of IgA from Bovine Mammary Secretions, Nielson, K; Can. J. Vet. Res (1986); 50: 227–231.
22. Ultrafiltration and Gel Filtration methods for separation of Immunoglobulins with secretory component from bovine milk, Kanamaru et al; Milchwissenschaft (1993), 48: 5, 247–251.
23. Antibodies from Milk for the prevention and Treatment of Diarrheal disease, Ruiz, L.P; in Indigenous Antimicrobial Agents of Milk – Recent Developments (1994), S. 108–121, International Dairy Federation, Brüssel, Belgien.
24. Chronic Cryptosporidial Diarrhoea and Hyperimmune Cow Colostrum, Tzipori, Robertson, Cooper, White; Lancet (1987), II: 8554, 344–345.
25. Production of Hyperimmune Bovine Colostrum against Campylobacter Jejuni; Husu, Syvaioja, Aho-la-Luttila, Kalsta, Sivela, Kosunen; Journal of Applied Bacteriology (1993), 74:5, 564–559.
26. Production and Preparation of Hyperimmune Bovine Colostrum for passive Immunotherapy of Cryptosporidiosis; Fayer, Tilley, Upton, Guidry, Thayer, Hildreth, Thomson; Journal of Protozoology (1991), 38: 6,

38S–39S

27. Efficacy of Bovine Milk Immunoglobulin Concentrate in Preventing Illness after Shigella Flexneri Challenge; Tacket, Binion, Bostwick, Losonsky, Roy, Edelman; American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, (1992) 47:3, 276–283.
28. Protection of Gnotobiotic rats against dental caries by passive immunization with Bovine Milk Antibodies to Streptococcus mutans; Michalek, Gregory, Harmon, Katz, Richardson, Hilton, Filler, McGhee; Infection and Immunity (1987), 55: 10, 2341–2347.
29. Cessation of Cryptosporidium-associated Diarrhea in an acquired Immunodeficiency Syndrome Patient after Treatment with Hyperimmune Bovine Colostrum; Ungar, Ward, Fayer, Quinn; Gastroenterology New York (1990), 90: 2, 486–489.
30. Bovine Colostrum Immunoglobulin Concentrate for Cryptosporidiosis in AIDS; Heaton; in Archives of Disease in Childhood (1994), 70: 4, 356–357.

### Patentansprüche

1. Nichttherapeutisches Verfahren zur Herstellung von Immunglobulin A (IgA) in der Milch eines Wiederkäuers, das die folgenden Schritte umfasst:  
(a) Verabreichen eines Antigens an einen trächtigen Wiederkäuer über zwei beliebige Verabreichungsmethoden, ausgewählt aus intramammär (IMM), intraperitoneal (IP) und intramuskulär (IM);  
(b) Verabreichen eines Antigens an den genannten Wiederkäuer über eine dritte Verabreichungsmethode, ausgewählt aus intramammär (IMM), intraperitoneal (IP) und intramuskulär (IM);  
unter der Voraussetzung, dass alle drei Verabreichungsmethoden verschieden sind; und  
(c) Gewinnen von IgA-haltiger Milch von dem Wiederkäuer.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei in Schritt (a) die beiden ausgewählten Verabreichungsmethoden IP und IM sind und in Schritt (b) die dritte Verabreichungsmethode IMM ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die beiden Verabreichungsmethoden aus Schritt (a) der Reihe nach, diskontinuierlich oder gleichzeitig erfolgen.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die beiden Verabreichungsmethoden aus Schritt (a) gleichzeitig erfolgen.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Schritte (a) und (b) der Reihe nach, diskontinuierlich oder gleichzeitig durchgeführt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Schritte (a) und (b) vor dem Geburtsvorgang einmal oder zweimal wiederholt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei Schritt (a) vor dem Geburtsvorgang zweimal wiederholt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei jeder Schritt (a) in Abständen von 2 bis 8 Wochen durchgeführt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei jeder Schritt (a) in Abständen von 2 bis 9 Wochen durchgeführt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, wobei Schritt (a) 6 bis 14 Wochen vor dem Geburtsvorgang, der erste Wiederholungsschritt (a) 2 bis 10 Wochen vor dem Geburtsvorgang und der letzte Schritt (a) 1 bis 4 Wochen vor dem Geburtsvorgang durchgeführt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei Schritt (a) 8 bis 12 Wochen vor dem Geburtsvorgang, der erste Wiederholungsschritt (a) 4 bis 8 Wochen vor dem Geburtsvorgang und der letzte Schritt (a) 1 bis 4 Wochen vor dem Geburtsvorgang durchgeführt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei Schritt (a) 8 Wochen vor dem Geburtsvorgang, der erste Wiederholungsschritt (a) 9 Wochen vor dem Geburtsvorgang und der letzte Schritt (a) 1 Woche vor dem Geburtsvorgang durchgeführt wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12, wobei Schritt (b) vor dem Geburtsvorgang einmal wiederholt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12, wobei die Schritte (b) in Abständen von 1 bis 6 Wochen durchgeführt werden.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 13, wobei die Schritte (b) in Abständen von 2 Wochen durchgeführt werden.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 oder 14, wobei Schritt (b) 3 bis 12 Wochen vor dem Geburtsvorgang und der Wiederholungsschritt (b) 1 bis 10 Wochen vor dem Geburtsvorgang durchgeführt wird.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei Schritt (b) 4 bis 8 Wochen vor dem Geburtsvorgang und der Wiederholungsschritt (b) 2 bis 4 Wochen vor dem Geburtsvorgang durchgeführt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei Schritt (b) 4 Wochen vor dem Geburtsvorgang und der Wiederholungsschritt (b) 2 Wochen vor dem Geburtsvorgang durchgeführt wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei das Antigen wenigstens ein Mitglied der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Viren, Mycoplasmen, Proteinen, Haptenen, Tiergewebeextrakten, Pflanzen-gewebeextrakten, Spermatozoen, Pilzen, Pollen, Staub und einem Komplex von Antigenen umfasst.
20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das Antigen ein bakterielles Antigen ist.
21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das bakterielle Antigen ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Escherichia, Staphylococcus, Streptococcus, Salmonella, Pneumococcus, Helicobacter, Cryptosporidiosis, Campylobacter und Shigella.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, wobei das bakterielle Antigen E. coli ist.
23. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das Antigen ein Hefeantigen ist.
24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei das Hefeantigen Candida albicans ist.
25. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das Antigen ein Proteinantigen ist.
26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das Proteinantigen Tumornekrosefaktor ist.
27. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das Antigen ein Komplex von Antigenen ist, wobei der Komplex ein Gemisch aus E. coli, Rotavirus und Coronavirus ist.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27, wobei das Antigen als eine Suspension formuliert wird.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 28, wobei das Antigen zusammen mit einem akzeptablen Träger, Verdünnungsmittel, Puffer und/oder Adjuvans verabreicht wird.
30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei das Antigen zusammen mit einem Adjuvans verabreicht wird.
31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei das Adjuvans ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: komplettem Freundschem Adjuvans (FCA), inkomplettem Freundschem Adjuvans (FIC), Adjuvans 65, Cholera-Toxin-B-Untereinheit, Alhydrogel, Bordetella pertussis, Muramyl-dipeptid, Cytokinen und Saponin.
32. Verfahren nach Anspruch 30, wobei das Adjuvans ein Adjuvans auf Ölbasis ist, das ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Freundschem komplettem Adjuvans (FCA), Freundschem inkomplettem Adjuvans (FIC).
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 32, wobei das Antigen zusammen mit einem Antibiotikum verabreicht wird.
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 33, wobei das in jedem Verabreichungsverfahren und an den jeweiligen Orten verabreichte Antigen unterschiedlich ist.
35. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 33, wobei das in jedem Verabreichungsverfahren und an den

jeweiligen Orten verabreichte Antigen gleich ist.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 35, wobei der Wiederkäuer ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Kühen, Ziegen, Schafen.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 36, wobei der Wiederkäuer eine Milchkuh ist.

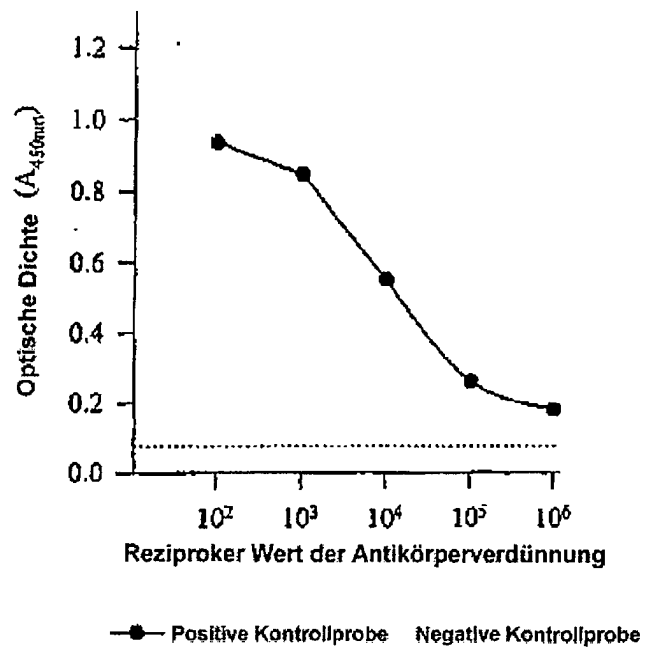
38. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Verfahren ferner einen Schritt zum Extrahieren von IgA aus der IgA-haltigen Milch umfasst.

39. Verfahren nach Anspruch 38, das ferner einen Schritt zur Reinigung des extrahierten IgA umfasst.

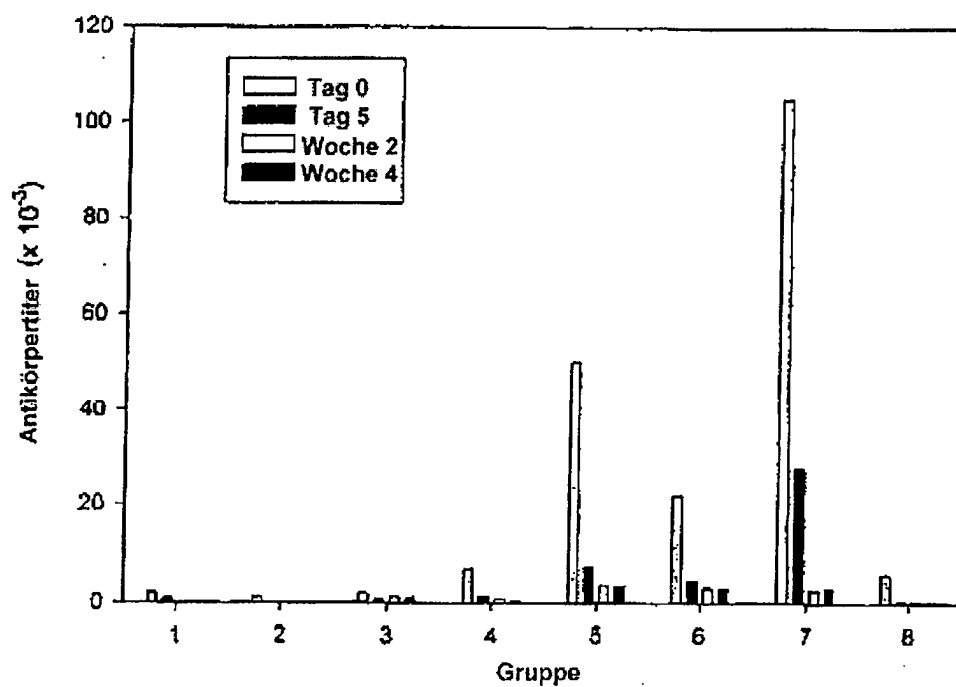
Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

Figur 1



Figur 2





Figur 3

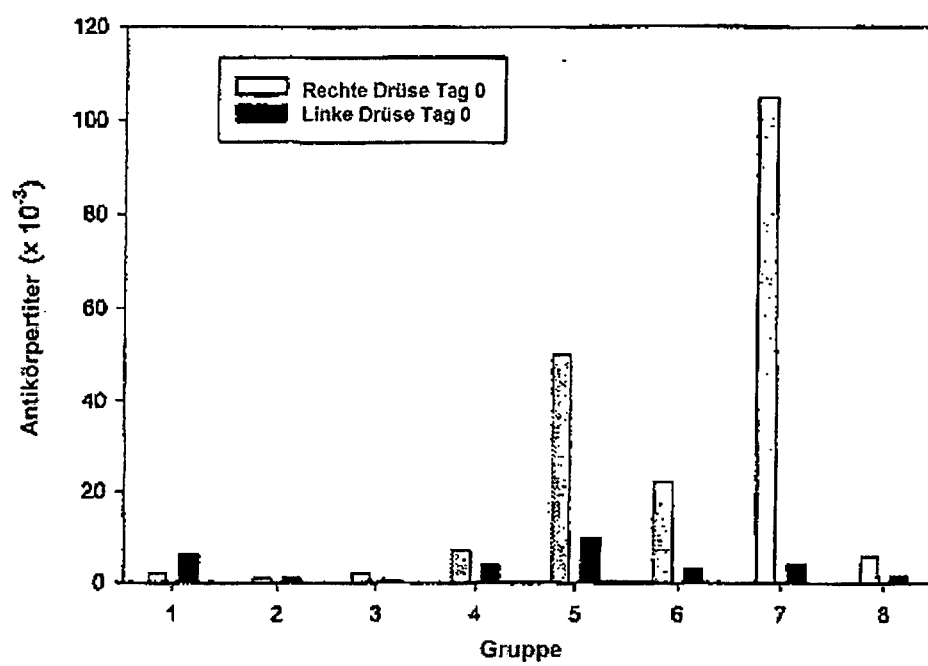


Figure 4

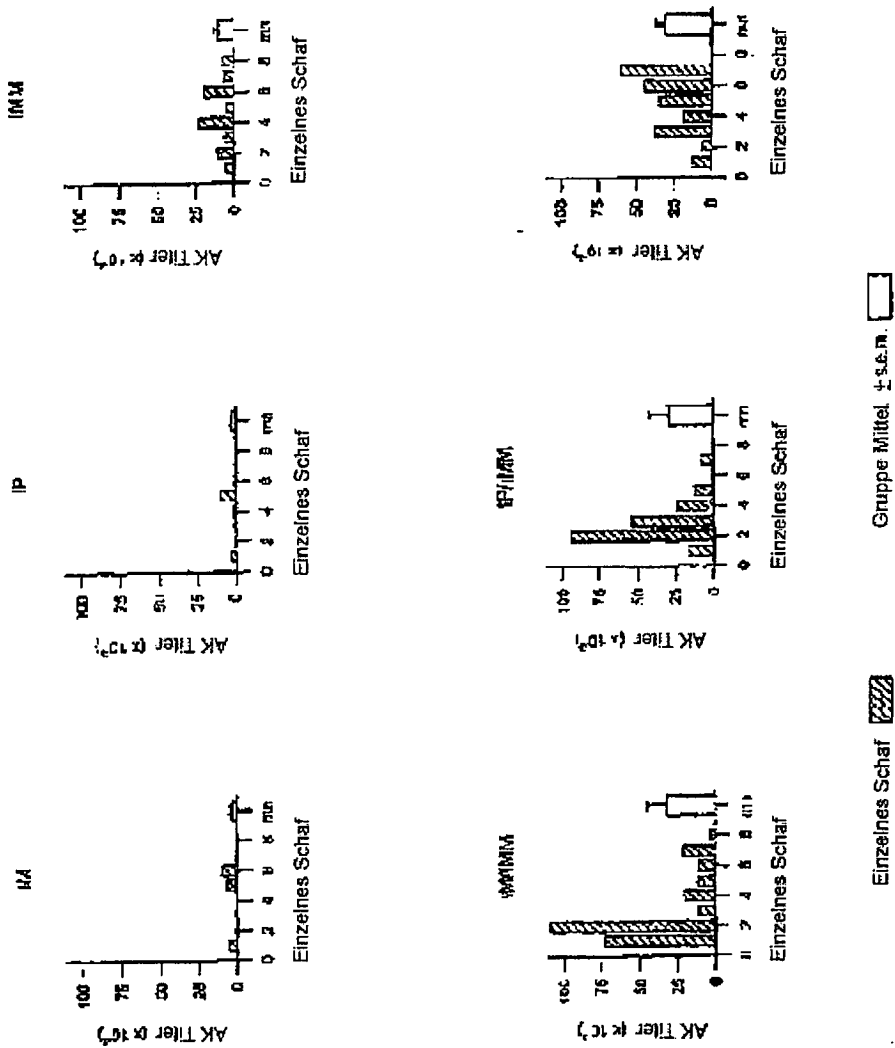
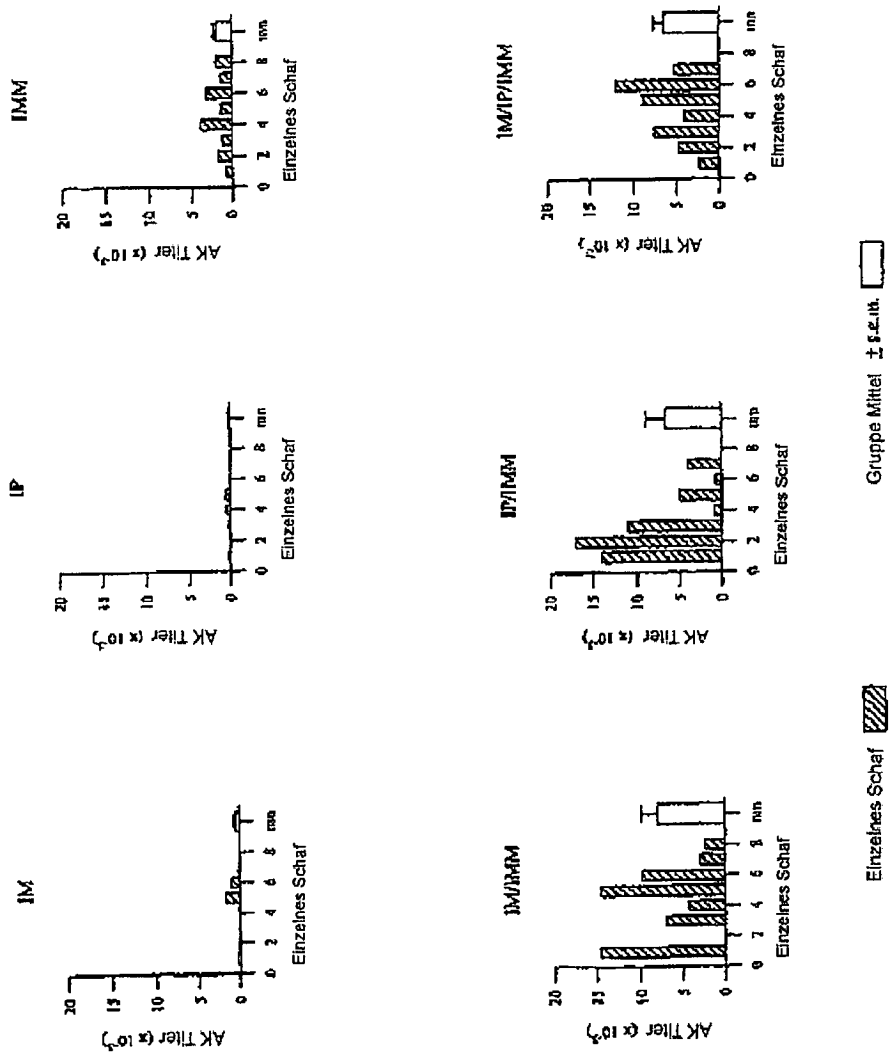
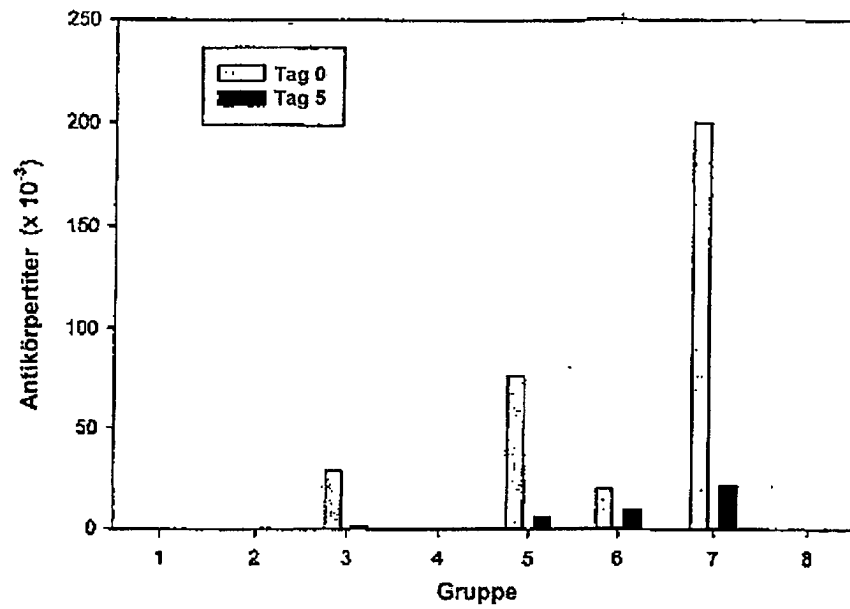


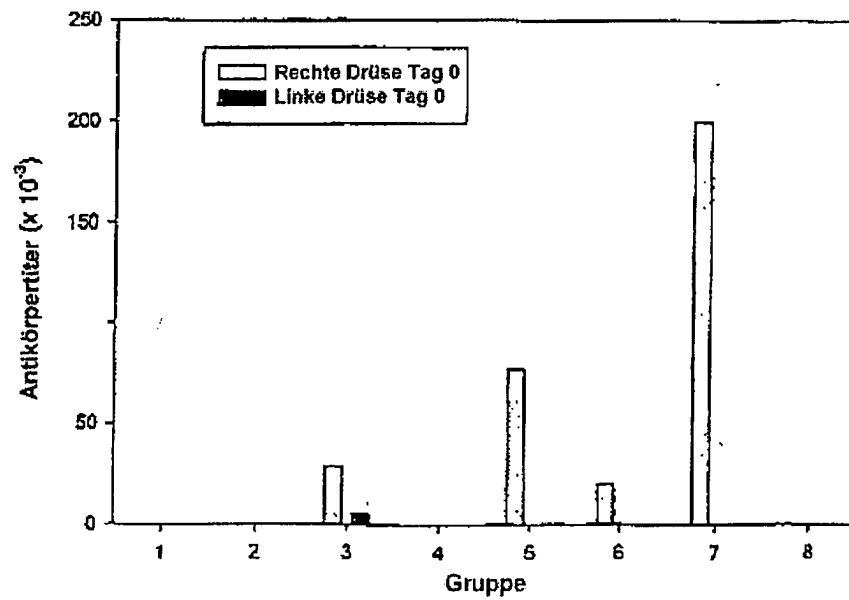
Figure 5



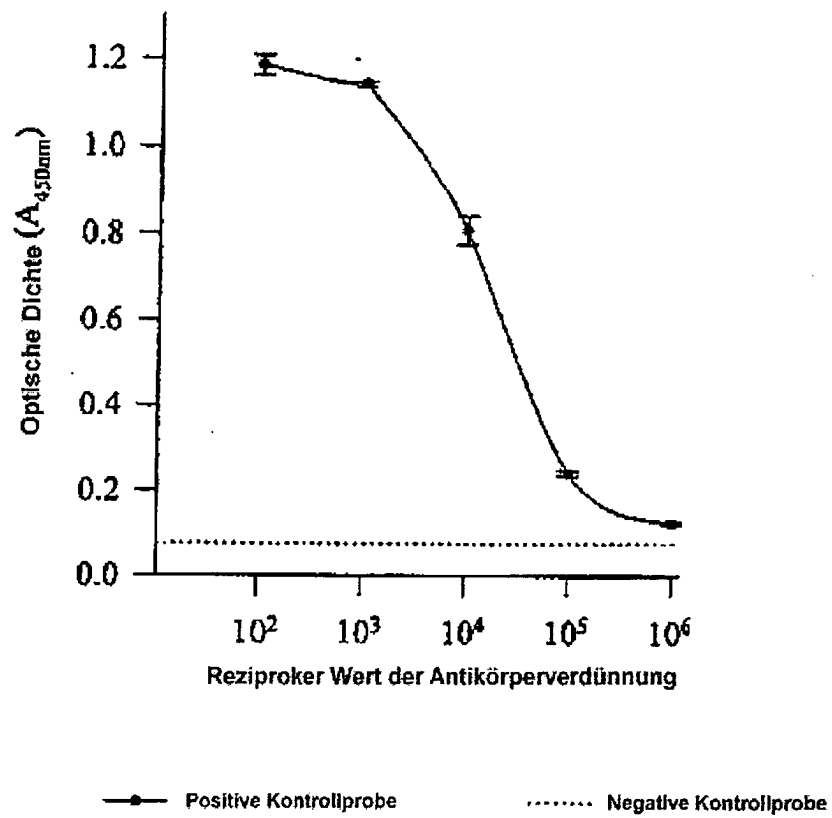
Figur 6



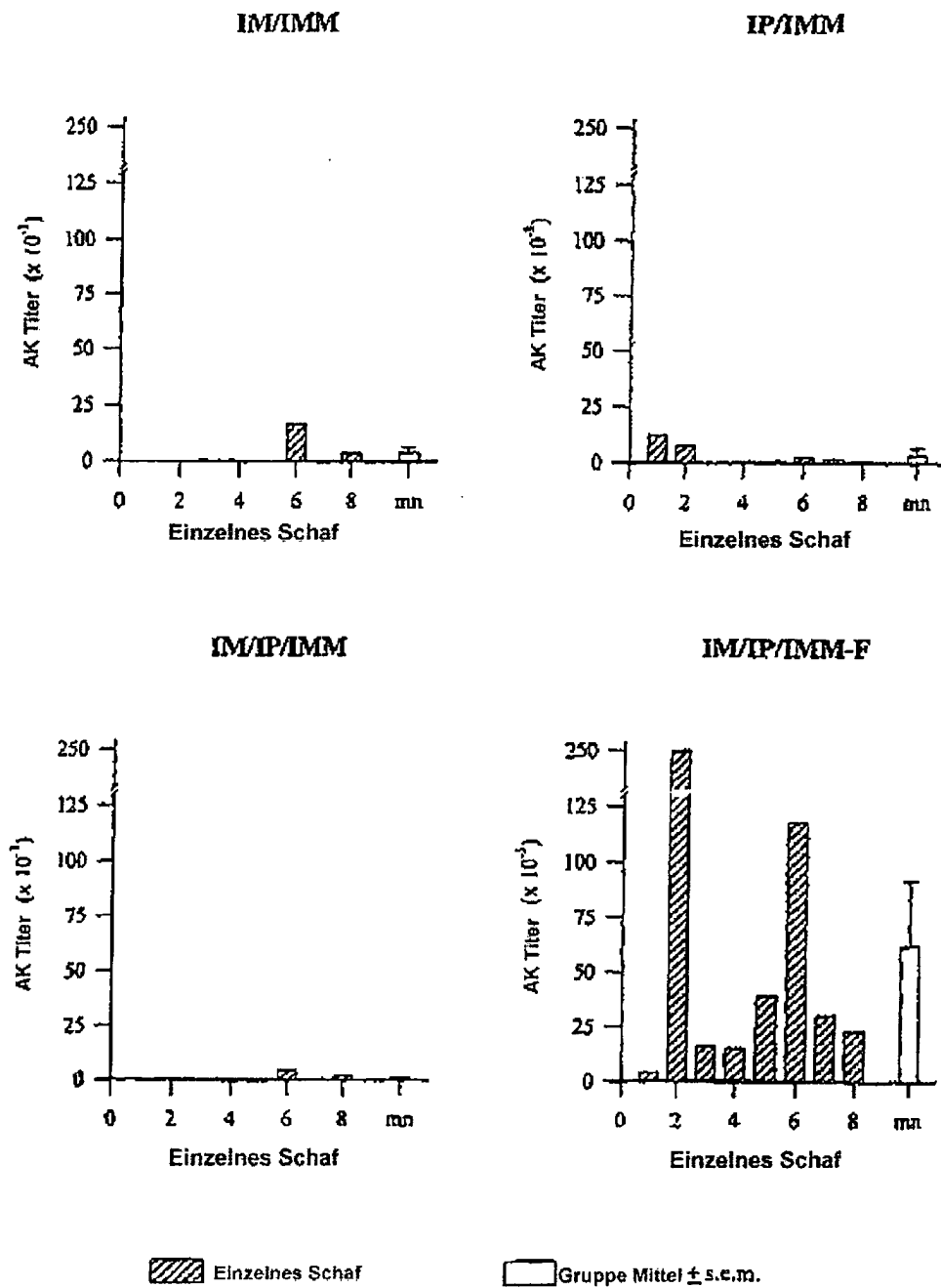
Figur 7



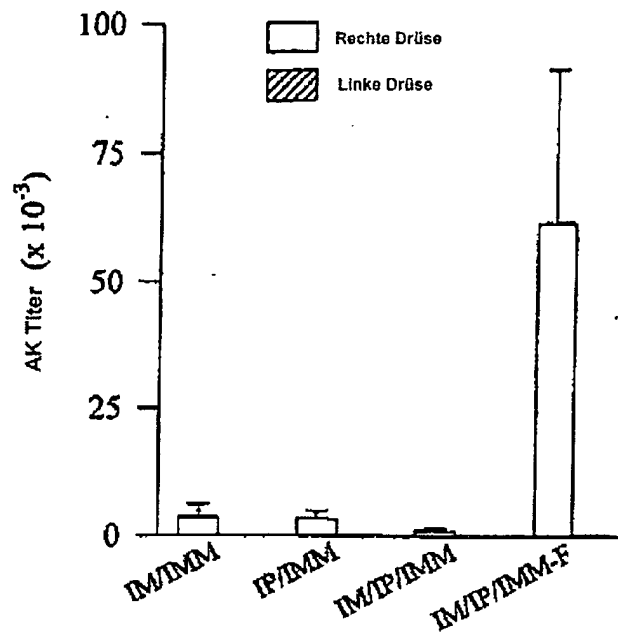
Figur 8



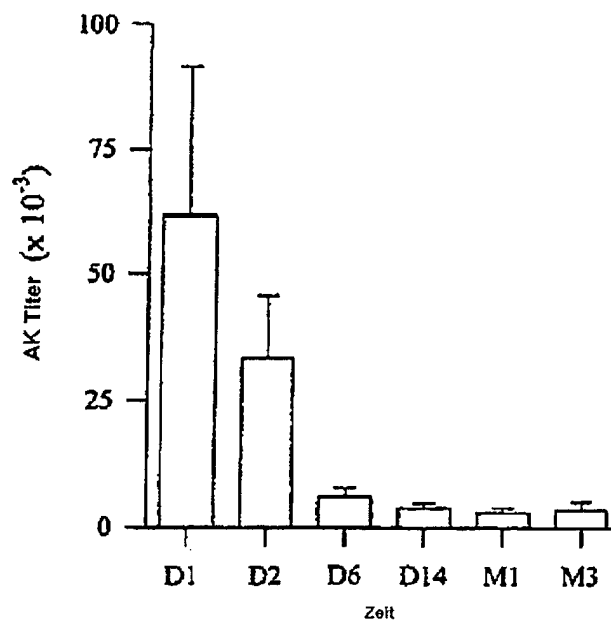
Figur 9



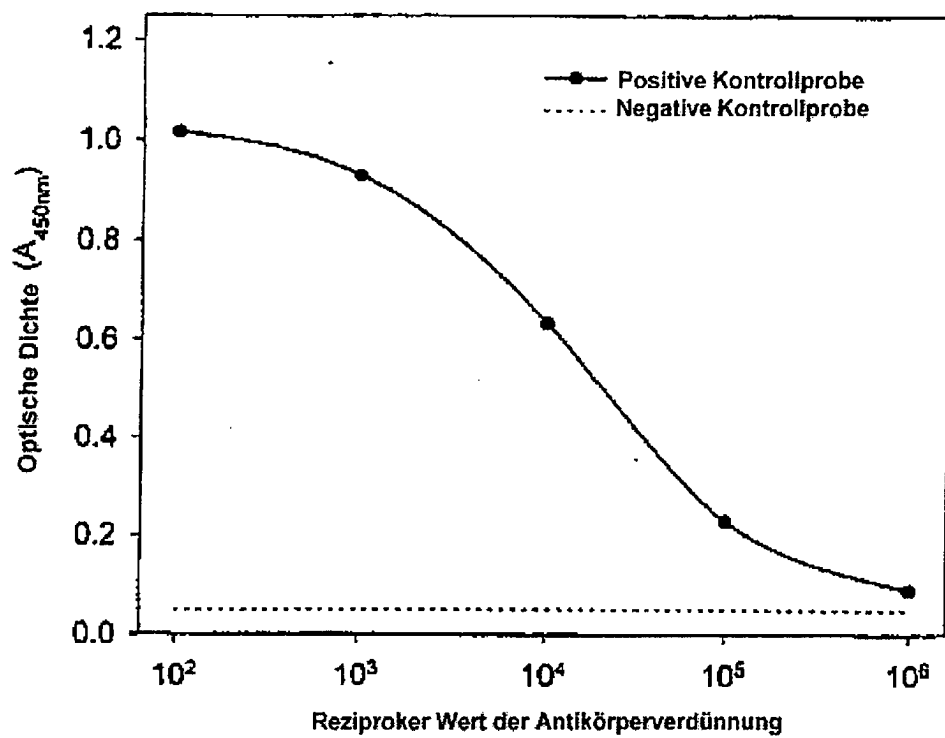
Figur 10



Figur 11

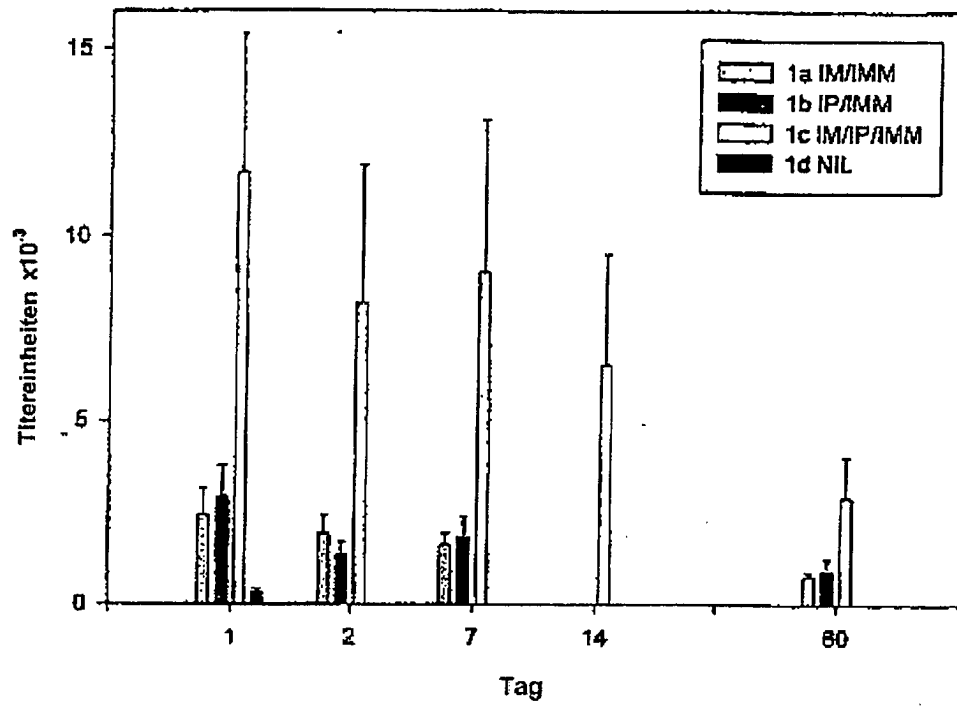


Figur 12





Figur 13



Figur 14

