

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11.12.2001**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.12.2000**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/256637**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 4/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/US2001/047865**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/049666**

(21) Číslo dokumentu:

2003-1721

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. :
A 61 K 39/02
A 61 K 39/116

(71) Přihlašovatel:

WYETH, Madison, NJ, US

(72) Původce:

Chu Hsien-Jue (Steve), Fort Dogde, IA, US
Li Wumin, Fort Dogde, IA, US
Xu Zhichang, Fort Dogde, IA, US

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:

Vakcína

(57) Anotace:

Vakcína zahrnuje inaktivovaný bakterin Mycoplasma hyopneumoniae a adjuvantní směs, což v kombinaci poskytuje imunitu vůči infekci Mycoplasma hyopneumoniae už po jednom podání a vyvolává imunitní odpověď vůči bakterinu Mycoplasma hyopneumoniae. Adjuvantní směs zahrnuje polymer kyseliny akrylové a směs metabolizovatelného oleje, jako je směs jednoho nebo více z nenasycených terpenových uhlovodíků, s výhodou skvalenu nebo skvalanu, a blokového kopolymery polyoxyethylenu a polyoxypropylenu a farmaceuticky přijatelný nosič.

CZ 2003 - 1721 A3

Vakcína

Oblast techniky

Tento vynález se týká zlepšených způsobů indukování ochranné imunity vůči *Mycoplasma hyopneumoniae*, specificky využívajících inaktivovaný bakterin *Mycoplasma hyopneumoniae* v množství, které je v jedné dávce účinné pro imunizaci zvířete, jež je příjemcem, vůči infekci vyvolané *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Dosavadní stav techniky

Mycoplasma hyopneumoniae je etiologické agens prasečí mykoplazmatické pneumonie (zánětu plic). Toto onemocnění je důležitou příčinou ekonomických ztrát v průmyslovém chovu vepřů, způsobených snížením hmotnostních přírůstků a malou účinností výkrmu. Toto onemocnění vyvolává chronický kašel, matnost srsti, opožděný růst a špatný vzhled v průběhu několika týdnů. U nakažených zvířat jsou pozorovány charakteristické leze, tvořící nachové až šedé oblasti, splývající zejména na břišní straně plicních hrotů a srdečních chlopních. Ačkoliv toto onemocnění zapříčiňuje jen nízkou úmrtnost, zasažená zvířata jsou často náchylná k druhotnému infikování příležitostnými patogeny, jejichž důsledkem je úhyn nebo stres. Samotné ekonomické ztráty byly odhadnuty na 200 až 250 milionů dolarů ročně.

Mycoplasma hyopneumoniae je pomalu rostoucí, povázkovitá bakterie, postrádající buněčnou stěnu. Často je obtížné ji izolovat z dýchacího traktu vzhledem k *Mycoplasma hyorhinis*, běžnému druhotnému agens, které se rovněž nachází v dýchacím traktu. Onemocnění se rozšiřuje aerosolem, vytvářeným při kašlání a přímým stykem s nakaženým nebo zotavujícím se prasečím přenašečem, bacilonosičem. Důsledkem smíchání infikovaných a neinfikovaných

zvířat jsou časně a časté opakované infekce. Infekce často počíná infikováním selat prasnicí bacilonosičkou už v průběhu jejich vrhu. Vzhledem k technologiím řízeného chovu se infekce stane zřejmou až v pozdějším období jejich života. Přídavná infekce je často pozorována až po odstavení selat, když jsou dána dohromady. Zřetelná infekce je u prasat běžně pozorována v jejich šestém měsíci věku nebo později. U nakažených zvířat jsou významně sníženy rychlosti růstu a rychlosti zužitkování krmiva. Léčení za použití antibiotik je nákladné a vyžaduje delší časové období. Problémem je také opakování infekce. V současné době jsou nejúčinnější metodou k zabránění infekcí a jejich následkům vakcíny.

Fort Dodge Animal Health (FDAH) dodává na trh bakterin *Mycoplasma hyopneumoniae* pod názvem Suvaxyn® Respifend® MH pro použití jako vakcína k ochraně zdravých prasat vůči klinickým příznakům, které vyvolává *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vakcína obsahuje Carbopol® jako adjuvantní látku a doporučuje se jako ve dvou dávkách podávaná vakcína pro selata alespoň týden stará, přičemž druhá dávka se aplikuje dva až tři týdny po první vakcinaci. Ovšem vakcína podávaná ve dvou dávkách má běžnou nevýhodu nutnosti dvojí manipulace se zvířaty k dosažení plné ochrany vůči onemocnění.

Předmětem předkládaného vynálezu je tedy poskytnutí účinné vakcíny vůči *Mycoplasma hyopneumoniae*, která vyvolá ochrannou imunitu a zabrání onemocnění vyvolávanému tímto mikroorganismem při podání pouze jedné dávky vakcíny.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí vakcinačního, očkovacího prostředku, vhodného pro použití u prasat vůči infekci a onemocnění, které vyvolává *Mycoplasma hyopneumoniae*, který může být použit v kombinaci s jinými bakteriny a/nebo toxoidy.

Ještě dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí způsobu prevence onemocnění nebo způsobu zlepšení stavu, jehož původcem je *Mycoplasma hyopneumoniae*, použitím adjuvantního prostředku zvyšujícího imunogennost bakterinu tak, aby po jedné dávce vakcíny vyvolal ochrannou imunitu.

Další předměty a rysy tohoto vynálezu se stanou zřejmými z podrobného popisu vynálezu, uvedeného níže.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká vakcinačního prostředku pro imunizaci zvířat vůči infekci *Mycoplasma hyopneumoniae*, zahrnujícího imunizující množství inaktivovaného bakterinu *Mycoplasma hyopneumoniae*; adjuvantní směs, obsahující polymer kyseliny akrylové a směs metabolizovatelného oleje s blokovým kopolymerem polyoxyethylenu a polyoxypropylenu; a farmaceuticky přijatelný nosič, přičemž tento vakcinační prostředek vyvolá po jednom podání ochrannou imunitu vůči *Mycoplasma hyopneumoniae*.

V jiném aspektu předkládaný vynález poskytuje imunogenní prostředek pro imunizaci zvířat vůči infekci *Mycoplasma hyopneumoniae*, obsahující inaktivovaný bakterin *Mycoplasma hyopneumoniae* kombinovaný s výše uvedenou adjuvantní směsí a farmaceuticky přijatelným stabilizátorem, nosičem nebo ředidlem. Adjuvans je v tomto vakcinačním prostředku obvykle přítomno v konečné koncentraci přibližně 1 až 25 % (objem/objem) a lépe přibližně 5 až 12 % (objem/objem). Prostředek může také zahrnovat další složky vakcíny, zahrnující inaktivované bakteriny nebo vyčištěné toxoidy jednoho nebo více z patogenů, jako jsou *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis* a leptospira, a může

být podáván intramuskulárně, subkutáně, orálně, v aerosolu nebo intarnasálně.

V ještě jiném aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob ochrany zvířat vůči onemocnění, způsobenému *Mycoplasma hyopneumoniae*, podáním jedné dávky výše uvedené vakcíny s obsahem inaktivovaného bakterinu *Mycoplasma hyopneumoniae* a adjuvantní směsi.

Podrobný popis vynálezu

Veškeré patenty, patentové přihlášky zde uváděné a jiná zde uváděná literatura jsou do tohoto vynálezu začleněny ve své úplnosti jako odkaz. V případě nesrovnalostí bude rozhodující předkládaný vynález.

Tak, jak je zde používán, ozbačuje výraz "bakterin" bakteriální výtažek, který byl inaktivován a který může při podávání zvířatům vyvolat v kombinaci s určitými adjuvantními látkami ochrannou imunitu k obraně vůči onemocnění nebo infekci.

Výraz "adjuvantní" označuje prostředek, obsahující jednu nebo více z látek, které zvyšují imunogennost a účinnost bakterinu *Mycoplasma hyopneumoniae* ve vakcinačním prostředku.

Tak, jak je používán v popisu vynálezu a v patentových nárocích, označuje výraz "MHDCE" buněčné ekvivalenty DNA z *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mycoplasma hyopn.* DNA cell equivalents).

"Imunizující množství" je takové množství bakterinu, které bude poskytovat imunitu vůči *Mycoplasma hyopneumoniae*. "Imunizující množství" bude závislé na druhu, rase, věku, velikosti, zdravotním stavu

a na tom, zda byla zvířeti již před tím aplikována vakcína vůči stejnému organismu.

Předkládaný vynález poskytuje vakcínu vůči *Mycoplasma hyopneumoniae*, která je vhodná pro imunizaci jednou dávkou. Vakcína podle předkládaného vynálezu zahrnuje adjuvantní směs, která zvyšuje imunogenost bakterinu a umožňuje tak vyvolání ochranné imunity jedním podáním.

Vakcína může být připravena z čerstvě shromážděných (sklizených) kultur způsobu, které jsou v oboru standardní (viz například US Patent 5 338 543 nebo US patent 5 565 205, stejně jako níže uvedený Příklad 2). Při takovém způsobu může být organismus rozmnožován v kultivačním médiu, jako je kompletní médium pro PPLO (organismus podobný Pleuropneumoniím, Pleuropneumonia-like organism), dodávaný firmou Difco Laboratories. Růst organismu je sledován standardními technikami, jako je stanovení jednotek změny barvy (CCU, color changing units) a organismus je získáván, shromažďován po dosažení dostatečně vysokého titru. Před začleněním do vakcinačního prostředku mohou být výtažky dále zahuštěny nebo lyofilizovány běžnými metodami. Použity mohou být i další metody, jako jsou metody, popsané Thomasem a spoluautory v *Agri-Practice* 7(5), 26-30.

Vakcína podle předkládaného vynálezu zahrnuje inaktivovaný bakterin *Mycoplasma hyopneumoniae*, kombinovaný s adjuvantní směsí a s jedním nebo více z farmaceuticky přijatelných nosičů. Nosiče vhodné pro takové použití zahrnují vodná média, například fyziologický roztok, fosfátem pufrovaný solný roztok, minimální esenciální médium (MEM) nebo MEM s pufrem HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonová] kyselina).

Adjuvantní směs pro použití ve vakcinačních prostředcích podle předkládaného vynálezu zvyšuje imunitní odpověď a obsahuje směs polymeru kyseliny akrylové se směsí metabolizovatelného oleje, například nenasyčeného terpenového uhlovodíku nebo hydrogenační produkt takové látky, s výhodou skvalanu (2,3,10,15,19,23-hexamethyltetracosanu) nebo skvalenu a blokového kopolymeru polyoxyethylenu a polyoxypropylenu. Takovým polymerem kyseliny akrylové může být homopolymer nebo kopolymer. Polymerem kyseliny akrylové je s výhodou karbomer. Karbomery jsou obchodně dostupné pod výrobním názvem Carbopol. Polymery kyseliny akrylové jsou popsány například v patentech US 2 909 462 a 3 790 665, jejichž poznatky jsou zde začleněny jako odkaz. Blokovanými kopolymery polyoxyethylenu a polyoxypropylenu jsou povrchově aktivní látky, s výhodou kapalně povrchově aktivní látky, napomáhající vytvoření suspenze pevných a kapalných složek. Povrchově aktivní látky jsou obchodně dostupné jako polymery pod výrobním názvem Pluronic®. Upřednostňovanou povrchově aktivní látkou je poloxamer 401, který je obchodně dostupný pod výrobním názvem Pluronic® L121.

Imunogenně stimulující adjuvantní směs je ve vakcinačním prostředku podle tohoto vynálezu typicky přítomná v množstvích (objem/objem) od 1 do 25 %, lépe od 2 do 15 % a nejlépe od 5 do 12 %. Množství použité adjuvantní směsi a poměr obou složek adjuvantní látky se může lišit v závislosti na přidavku dalších bakterinů nebo vyčištěných toxoidů. Adjuvantní směs obecně obsahuje metabolizovatelný olej, polymer kyseliny akrylové a blokový kopolymer polyoxyethylenu a polyoxypropylenu, formulované jako emulze ve vodném médiu.

V této adjuvantní směsi mohou být metabolizovatelný olej a polymer kyseliny akrylové přítomné v množstvích přibližně od 10 do 150 ml/l, respektive přibližně 0,5 až 10 g/l. V upřednostňovaném ztěsnění ztěsnění adjuvantní směsi je směs složky metabolizovatelného oleje a

složky blokového kopolymeru polyoxyethylenu a polyoxypropylenu směsí skvalanu a Pluronic® L121 (poloxameru 401), která může být přítomna v množství přibližně 50 až 100 ml/l. Karboxymethylenovým polymerem je Carbopol 934P (Carbamer 934P), který může být přítomný v množství přibližně 2 ml/l. Adjuvantní směs typicky obsahuje složku polymeru kyseliny akrylové a složku metabolizovatelného oleje a směsi blokového kopolymeru polyoxyethylenu a polyoxypropylenu v poměru přibližně 1:25 až 1:50.

Upřednostňovanými polymery kyseliny akrylové jsou ty, prodávané firmou B. F. Goodrich jako Carbopol 934 P NF a 941 NF, což jsou polymery akrylové kyseliny, zesítené polyallylsacharózou a mající chemický vzorec $(CH_2CHOOH)_n$. Tyto polymery vytvářejí vodné gely, které se vhodně formují s vodnými nosiči. Upřednostňovanými blokovými kopolymery polyoxyethylenu a polyoxypropylenu jsou neiontové povrchově aktivní látky, prodávané firmou BASF pod názvem Pluronic® L121, L61, L81 nebo L101.

Vakcína podle předkládaného vynálezu může být podávána intramuskulárně, subkutánně, intranasálně, intraperitoneálně nebo orálně (do svalu, podkožně, do nosu, do břišní dutiny nebo ústy), s výhodou pak intramuskulárně nebo subkutánně.

Vakcína podle předkládaného vynálezu obecně obsahuje inaktivované *Mycoplasma hyopneumoniae*, metabolizovatelný olej, blokový kopolymer polyoxyethylenu a polyoxypropylenu a polymer kyseliny akrylové ve formě emulze typu oleje ve vodě. Vakcína s výhodou obsahuje polymer kyseliny akrylové v koncentraci v rozmezí od 0,5 do 10 g/l. Vakcína s výhodou obsahuje metabolizovatelný olej v koncentračním rozmezí od 2 do 6 ml/l. Vakcína s výhodou obsahuje blokový kopolymer polyoxyethylenu a polyoxypropylenu v koncentračním rozmezí od 1 do 3 ml/l.

Pro podání v jedné dávce by vakcína měla s výhodou obsahovat množství bakterinu *Mycoplasma hyopneumoniae*, odpovídající přibližně 1×10^8 až 3×10^{11} MHDCE/ml a lépe 1×10^9 až 3×10^9 MHDCE/ml. Zvířeti je možné podávat přibližně 1 až 5 ml a lépe 2 ml vakcíny intramuskulárně, subkutáně nebo intraperitoneálně. Orálně nebo nasálně je možné podávat 1 až 10 ml a s výhodou 2 až 5 ml vakcíny.

Následující příklady jsou uváděny k dalšímu dokreslení vynálezu, aniž by omezovaly jeho rozsah.

Příklady provedení vynálezu

Bakterin *Mycoplasma hyopneumoniae*
Příprava vakcinačního prostředku

Popis virových kmenů

Mycoplasma hyopneumoniae lze získat z jakéhokoliv počtu snadno dostupných zdrojů. V jednom ztělesnění může být použito *Mycoplasma hyopneumoniae* rodu P-5722-3. Kultura byla získána od C. Armstronga z Purdue University ve West Lafayette v Indianě. Podle pokynů, týkajících se kultivace *Mycoplasma hyopneumoniae*, byla kultura sedminásobně pasážována v živné půdě pro *Mycoplasma hyopneumoniae* k vytvoření základního inokula.

Buněčná kultura

Mycoplasma hyopneumoniae bylo pěstováno v médiu (živném prostředí), zahrnujícím složku "Bacto PPLO Powder", kvasničný extrakt, glukózu, hydrochlorid L-cysteinu, ampicilin, acetát thalia, fenolovou červeň, protipěňivé činidlo, normální sterilní prasečí sérum a vodu, během časových období od 18 do 144 hodin. Pro inaktivaci se do

kvasné nádoby přidává binární ethylenimin (BEI), zacílený proti produkční kultuře. Hodnota pH se upraví na 7,4 a kultura se shromáždí, či sklídí běžnými postupy k poskytnutí bakterinu *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Příprava vakcinačního prostředku

Složení konzervačních látek a použité poměry: Shromážděný bakterin se konzervuje přidavkem thimerosalu a čtyřsodné sole kyseliny ethylendiamintetraoctové, (EDTA), v množstvích nepřevyšujících 0,01 %, respektive 0,07 %. Ampicilin podle US lékopisu je v růstovém médiu přítomen v koncentraci 0,250 g/l. Koncentrace zbytkového ampicilinu se bude v konečném výrobku měnit v závislosti na objemu shromážděných kapalin, přičemž tato koncentrace zbytkového ampicilinu v konečném výrobku nepřekročí 30 µg/ml.

Standardizace produktu

Koncentrát *Mycoplasma hyopneumoniae* se kvantifikuje fluorometrickým stanovením DNA.

Směs metabolizovatelného oleje, která zahrnuje jeden nebo více z terpenových uhlovodíků a blokový kopolymer polyoxyethylenu a polyoxypropylenu, například směs skvalenu a Pluronic® L121, se připraví rozpuštěním 10 g chloridu sodného, 0,25 g chloridu draselného, 2,72 g dvojsytného fosforečnanu sodného, 0,25 g jednosytného fosforečnanu draselného, 20 ml Pluronic L121 (BASF Corporation), 40 ml skvalenu (Kodak), 3,2 ml Tween 80 (monooleátu polyoxyethylen-sorbitanu) v 900 ml přečištěné vody a doplní se do 1000 ml. Po smíchání mohou být přísady autoklávovány. Pak se směs homogenizuje, dokud nevznikne stálá emulze. Přidán může být

stálá emulze. Přidán může být formaldehyd až do konečné koncentrace 0,2 % nebo thimerosal až do konečné koncentrace 1:10 000.

Kompletování jednotek k vytvoření řady

Vyhovující koncentráty *Mycoplasma hyopneumoniae* se asepticky spojují s adjuvantními látkami, konzervačními látkami a s ředidlem ve sterilním zásobníku, doplněném míchadlem a míchají se alespoň 30 minut.

Množství pro 1 000 000 dávek (po 2 ml): (% objem/objem)

| | | |
|--|------------|------|
| koncentrát <i>Mycoplasma</i> ($> 1,0 \times 10^{10}$ MHDCE/ml) | 400 000 ml | 20,0 |
| směs skvalen/Pluronic L121 | 100 000 ml | 5,0 |
| Carbopol (2% hmotn./objem ve vodě) | 200 000 ml | 10,0 |
| roztok thimerosalu, 1% hmotn./objem ve vodě a čtyřsodné sole EDTA, 7% hmotn./objem | 18 000 ml | 0,9 |
| sterilní fyziologický roztok | 1 282 000 | 64,1 |

Hodnota pH řady byla upravena na $7,0 \pm 0,2$

MHDCE = buněčné ekvivalenty DNA *Mycoplasma hyopneumoniae*

Způsob a technika plnění a uzavření konečných zásobníků

Produkt může být hrubě zfiltrován přes sterilní filtr o velikosti pórů 200 až 500 mikrometrů a plněn za podmínek, stanovených v 9 CFR 114.6 do sterilních konečných zásobníků v místnosti, určené pro sterilní operace. Skleněné nebo plastové zásobníky jsou uzavřeny gumovou zátkou a na obrubě uzavřeny hliníkovými uzávěry. Každá dávka o

objemu 2,0 ml bude obsahovat ne méně než 2×10^9 buněčných ekvivalentů DNA *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Testování účinnosti

Objemové vzorky nebo vzorky z konečných zásobníků dokončeného produktu mohou být s ohledem na svou účinnost testovány následujícím způsobem:

Metoda stanovení pro test účinnosti: používají se myši samice ICR ve věku 6 až 7 týdnů, z jedné dodávky, od Harlan Sprague Dawley nebo jiného vhodného dodavatele. Pro imunizaci jak neznámým, tak srovnávacím bakterinem je potřeba nejméně 20 myší. Minimálně 5 myší se ponechává neočkovaných, jako kontroly. Testovací i srovnávací bakterin jsou jednotlivě důkladně promíchány. K subkutánnímu naočkování do oblasti třísel v množství 1/10 dávky z hostitelského zvířete (0,2 ml) se používají sterilní stříkačky na jedno použití, doplněné jehlou podle standardu 25 o velikosti 1,58 cm (5/8 palce). Každá skupina myší je ustájena jako samostatná jednotka a má po 14 dnů volný přístup k potravě a vodě. Poté je u každé z myší provedena anestezie. Myš pod narkózou je položena na záda. Za použití jedné ruky je hlava držena dolů a jedna přední tlapka se natáhne od těla. Za použití skalpelu se provede naříznutí kůže přibližně v délce 1,25 cm mezi nataženou nohou a hrudníkem, přetínající pažní tepnu. Za použití injekční stříkačky o objemu 3,0 ml bez nasazené jehly se shromáždí krev, nahromaděná v řezu. Krev se převede do označené testovací zkumavky a je ponechána vysrážet se. Zkumavky vysrážené krve jsou odstředěny při 1 000 g k oddělení séra a sraženiny. Jednotlivá séra jsou skladována při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo nižší až do testování.

Serologické testování: k měření protilátkové odpovědi u myší vůči srovnávacím a/nebo neznámým bakterinům byl použit postup ELISA.

Postup ELISA byl prováděn za použití jednorázových mikrotitračních destiček Immulon II s plochým dnem od firmy Dynatech, nebo podobných a odečítače těchto destiček ve stanovení ELISA.

Testovací reagensie

Soustava fosfátem pufovaného fyziologického roztoku a Tweenu (PBST), u níž byla hodnota pH upravena na 7,2 až 7,4 přidavkem 5 mol.l⁻¹ roztoku NaOH nebo 5 mol.l⁻¹ roztoku HCl.

Množství na litr:

| příklady | množství/l |
|---|------------|
| NaCl | 8,50 g |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,22 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,19 g |
| Tween-20 | 0,50 ml |
| deionizovaná voda, dle potřeby do 1 000,00 ml | |

Glycinem pufovaný fyziologický roztok (GBS) o hodnotě pH upravené na 9,5 až 9,7 přidavkem 5 mol.l⁻¹ roztoku NaOH nebo 5 mol.l⁻¹ roztoku HCl.

| příklady | množství/l |
|---|------------|
| glycin | 0,75 g |
| NaCl | 8,50 g |
| deionizovaná voda, dle potřeby do 1 000,00 ml | |

Pozitivní kontrolní sérum: pozitivním kontrolním sérem je souhrn sér odebraných myším, očkovaným bakterinem *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Konjugát a substrát

Afinitně vyčištěný, peroxidázou značený konjugát proti myšímu IgG byl získán od firmy Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc. (katalog. číslo 074-1802). Postup stanovení optimálního naředění konjugátu je podrobně uveden níže. Roztoky pro peroxidázové substráty (ABTS) byly získány od firmy Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.

Titrace konjugátu

Mikrotitrační destička s plochým dnem Immulon II se povleče, v množství 100 μ l na jamku, celobuněčným antigenem *Mycoplasma hyopneumoniae*, naředěným v množství 20 μ g/ml prostřednictvím 10 mmol.l⁻¹ roztoku GBS. Destička se inkubuje ne méně než 1 hodinu při teplotě 37 \pm 2 °C a poté se na dobu nejméně 18 hodin a nejvýše 1 týdne vystaví teplotě 2 až 7 °C. Před použitím se destička trojnásobně promyje prostřednictvím PBST za zachování 60 sekundové nasakovací prodlevy mezi promýváními a poté je vysušena poklepáním.

Připraví se naředění pozitivního kontrolního séra v PBST v poměru 1:40 a takto naředěné pozitivní kontrolní sérum (100 μ l/jamku) se přidá do poloviny jamek na destičce. Do druhé poloviny jamek se přidá PBST. Destička se pak inkubuje 1 hodinu při teplotě místnosti a poté se trojnásobně promyje. Konjugované sérum se duplicitně sériově naředí, počínaje naředěním 1:100 a konče naředěním 1:10 240. Množství 100 μ l každého naředění konjugátu se přidá do čtyř jamek s pozitivním sérem a do čtyř jamek s PBST a ponechá se při teplotě místnosti reagovat 30 minut. Destičky se čtyřnásobně promyjí a do každé jamky se přidá 100 μ l roztoku peroxidázového substrátu (ABTS). Destička se odečítá při nastavení dvojí vlnové délky $T \lambda = 450$. Zvoleno je takové naředění konjugátu, které pro pozitivní kontrolní sérum poskytuje odečtenou hodnotu 0,850 až 1,050, přičemž se od hodnoty pro kontrolní pozitivní sérum odečte hodnota, zjištěná pro kontrolu PBST.

Testovací antigen:

Antigen *Mycoplasma hyopneumoniae* je celobuněčný přípravek, dodávaný firmou Fort Dodge Animal Health.

Stanovení ELISA se provádí následovně: Použijí se jednorázové mikrotitrační destičky Immulon II s plochým dnem od firmy Dynatech. Jedna ampule lyofilizovaného celobuněčného antigenu *Mycoplasma hyopneumoniae* se rekonstruuje 10 ml glycinem pufovaného fyziologického roztoku (GBS). Koncentrace takto připraveného proteinu *Mycoplasma hyopneumoniae* je 20 $\mu\text{g/ml}$. Do každé jamky destičky se pak nanese 100 μl (2 μg) naředěného antigenu. Destička se inkubuje nejméně jednu hodinu při teplotě 37 ± 2 °C a poté se na dobu nejméně 18 hodin a nejvýše 1 týdne vystaví teplotě 2 až 7 °C. Destičky se trojnásobně promyjí prostřednictvím PBST za zachování 60 sekundové nasakovací prodlevy mezi promýváními a poté jsou vysušeny poklepáním. Séra jsou naředěna v PBST v poměru 1:40. Positivní kontrolní sérum bude na každé destičce zahrnuto kvadruplicitně. Objem vzorku v každé jamce činí 100 μl . Sériově naředěné vzorky testovaného séra a srovnávací vzorky séra se na stejné destičce testují duplicitně.

Destičky se inkubují jednu hodinu při teplotě místnosti a následně se trojnásobně promyjí v PBST. Do všech jamek se přidá 100 μl peroxidázou značeného konjugátu proti myšimu IgG (Kirkegaard a Perry), naředěného v PBST a jamky se inkubují 30 minut při teplotě místnosti. Poté se destičky čtyřnásobně promyjí v PBST. Do všech jamek se přidá 100 μl roztoku peroxidázového substrátu (ABST) a destičky se inkubují tak dlouho, dokud pozitivní sérové kontroly nedosáhnou hodnoty $\text{OD}_{405} (450) = 0,850$ a 1,050 při vynulování zařízení oproti kontrolním jamkám s PBST. K provedení platného testu musejí séra myší, naočkovaných srovnávacím bakterinem, poskytovat minimální průměrnou hodnotu 0,500 a séra neočkovaných kontrolních myší

nesmějí překročit maximální průměrnou hodnotu 0,100. Jinak řečeno, rozdíl mezi průměrnou hodnotou, získanou v sérech myši naočkovaných srovnávacím bakterinem a získanou v sérech neočkovaných myších kontrol musí být větší nebo rovnající se 0,400.

Střední hodnoty pro sériově očkované myši, srovnávací očkované myši a kontroly jsou vypočítány a hodnoceny následovně: Aby byl hodnocen jako vyhovující, musí testovaný bakterin vykazovat hodnotu průměrné střední optické hustoty rovnající se téže hodnotě u srovnávací skupiny, nebo větší. Nebo, za použití Studentova T-testu, hodnota testovaného bakterinu nesmí být významně (úroveň splehlivosti $p \leq 0,05$) nižší než u srovnávacího bakterinu. Jakákoliv vypočítaná hodnota T, která se rovná 1,686 nebo je vyšší, bude ukazovat na významný rozdíl mezi srovnávacím a testovaným bakterinem a bude důvodem k zamítnutí testovaného bakterinu. Jakákoliv hodnota T, která je menší než 1,686, prokazuje vyhovující provedení. Kterýkoliv bakterin, hodnocený v T-testu jako nevyhovující z jakéhokoliv důvodu, netýkajícího se účinnosti produktu, je opakovaně testován a původní test je nazírán jako neplatný.

Příklad 2

Testovaná vakcína

Vakcína pro testování byla připravena podle postupů, podrobně popsaných v Příkladu 1, za použití 5% směsi metabolizovatelného oleje jako adjuvantní látky, která obsahovala jeden nebo více z terpenových uhlovodíků a blokový kopolymer polyoxyethylenu a polyoxypropylenu (směs Squalane/Pluronic L121) spolu s 0,2% polymerem kyseliny akrylové (Carbopol), a 2×10^9 buněčných ekvivalentů DNA *M. hyopneumoniae* (MHDCE) na dávku.

Příklad 3

Tato studie byla určena k prokázání čtyřměsíčního trvání imunity (DOI, duration of immunity) u prasat po indukci naočkováním ve věku tří měsíců jednou dávkou vakcíny podle Příkladu 2.

V této studii byly provedeny dva oddělené pokusy na zvířatech. Veškerá prasata v obou pokusech byla v době vakcinace či očkování serologicky negativní (titr protilátek byl menší než 10), což ukazovalo, že zvířata byla vnímavá k *Mycoplasma hyopneumoniae*. Všechna prasata v kontrolních skupinách zůstala před stimulací serologicky negativní. To prokazuje, že imunitní odpověď byla vyvolána vakcínou a nikoli jakýmkoliv vystavením vnějšímu prostředí.

V prvním pokusu byla vakcína podle Příkladu 2 hodnocena spolu s komerčně dostupným výrobkem, Ingelvac M. hyo®, vyráběným firmou Boehringer Ingelheim (BI), prostřednictvím stimulace vysokou hladinou virulentního *M. hyopneumoniae* (4×10^6 organismů). Dvacet dva (22) prasat ve stáří 18 až 21 dnů bylo intramuskulárně (IM) očkováno vakcínou z Příkladu 2 a osm (8) prasat prostředkem Ingelvac M. hyo® [č. 271 032]. Dvacet dva (22) prasat sloužilo jako stimulované kontroly a 10 prasat jako nestimulované kontroly. Prasata ve skupině očkovaných a ve skupině stimulovaných kontrolních zvířat byla stimulována virulentním *M. hyopneumoniae* čtyři měsíce po vakcinaci. Prasata, očkováná vakcínou podle Příkladu 2, měla průměrné plicní leze v rozsahu 15,9% a stimulovaná kontrolní prasata vykazovala plicní leze v rozsahu 19,6 %. Průměrné plicní leze u skupiny, očkované vakcínou podle Příkladu 2, byly menší než u kontrol i přes to, že prasata byla stimulována vyšší dávkou, než jaká je doporučována Státní universitou v Iowě (ASU, Iowa State University), ovšem rozdíl nebyl významný ($p=0,19$). Podobně pokud byl hodnocen komerční výrobek, Ingelvac M. hyo® u stejné skupiny zvířat a při stejné dávce pro stimulaci, byl pozorován také stejný

rozsah plicních lezí (14,6 %). Rovněž nebyl nalezen významný rozdíl mezi skupinou očkovanou přípravkem Ingelvac M. hyo® a kontrolní skupinou ($p=0,27$) a mezi skupinou očkovanou přípravkem Ingelvac M. hyo® a skupinou očkovanou vakcínou podle Příkladu 2.

Ve druhém pokusu byla testována vakcína podle Příkladu 2, a to stimulací prostřednictvím virulentního *M. hyopneumoniae* v množství stanoveném ISU (1.0×10^6 organismů) 4 měsíce po očkování. 23 prasat bylo očkováno jednou dávkou vakcíny ve věku 21 dnů, 25 prasat sloužilo jako stimulované kontroly a 7 prasat jako nestimulované kontroly. Prasata v očkové a stimulované kontrolní skupině byla stimulována virulentním *M. hyopneumoniam* 4 měsíce po očkování. Kontrolní skupina vykazovala průměrné plicní leze v rozsahu 10,4 % a očkováná skupina vykazovala průměrné plicní leze v rozsahu 5,5 %. Existoval významný rozdíl mezi očkovanou skupinou a kontrolní skupinou ($p = 0,031$). To ukazuje, že vakcína podle Příkladu 2 je účinná při stimulaci ochranné imunity, která může přetrvávat přinejmenším 4 měsíce po naočkování prasat ve věku tří týdnů jednou dávkou.

Analýzou a kombinací údajů týkajících se vakcíny podle Příkladu 2, získaných v obou pokusech, bylo zjištěno, že průměrné plicní leze očkové skupiny byly významně menší než u kontrolní skupiny.

Lze uzavřít, že vakcína podle Příkladu 2 indukuje ochrannou imunitu vůči stimulaci virulentním *M. hyopneumonie* během 4 měsíců po očkování prasat ve věku tří týdnů jednou dávkou.

Pokusné údaje

V této studii byly provedeny dva oddělené pokusy. V pokusu 1 bylo 67 prasat rozděleno do 4 skupin za použití randomizačního programu Microsoft Excel. Dvacetčtyři prasat bylo ve věku 18 až 21 dní

intramuskulárně (IM) naočkováno jednou dávkou vakcíny, připravené podle Příkladu 2. Dvacetčtyři prasat sloužilo jako stimulované kontroly a 10 prasat jako nestimulované kontroly. Devět prasat bylo intramuskulárně očkováno komerčním produktem, Ingelvac M. hyo® (série 271 032, výrobce Boehringer Ingelheim, BI), podle údajů výrobce. Pět prasat (2 prasata očkovaná vakcínou podle Příkladu 2, jedno vakcínou BI a dvě kontrolní) uhynula během očkovacího období z důvodů, které neměly spojitost s očkováním. Zbývající prasata v očkované skupině a ve skupině stimulovaných kontrol byla stimulována 14 ml virulentního *M. hyopneumoniae* ($1,4 \times 10^6$ organismů) 4 měsíce po očkování. Prasata ve všech 4 skupinách byla usmrcena 30 dní po stimulaci a u každého zvířete byly hodnoceny plicní leze.

V pokusu 2 bylo 25 prasat ve věku 21 dní intramuskulárně očkováno jednou dávkou vakcíny, připravené podle Příkladu 2. Dvacetpět prasat sloužilo jako stimulované kontroly a 10 prasat jako nestimulované kontroly. Dvě prasata uhynula z důvodů nesouvisejících s očkováním a jedno prase bylo omylem prodáno v období očkování. Zbývající prasata v očkované a stimulované kontrolní skupině byla stimulována 10 ml virulentního *M. hyopneumoniae* ($1,0 \times 10^6$ organismů) 4 měsíce po očkování. Dvě prasata uhynula ve sledovaném období po stimulaci z důvodů nesouvisejících s očkováním nebo stimulací. Zbývající prasata ve všech 3 skupinách byla usmrcena 30 dní po stimulaci a u každého zvířete byly hodnoceny plicní leze.

Očkování:

Každé prase v očkované skupině obdrželo dávku 2 ml testované vakcíny intramuskulárně po straně krku.

Stimulace a nekropsie:

Virulentní stimulační výtažek *M. hyopneumonie*, zmrazený (-70 °C) plicní homogenát, byl připraven dr. Eileen Thacker z Iowa State University (ISU). Bylo ověřeno, že stimulační výtažek byl čistý a obsahoval přibližně 10^7 organismů *M. hyopneumonie* na 1 ml. Doporučená stimulační dávka je 10 ml kmene naředěného v poměru 1:100 (tj. $1,0 \times 10^6$ organismů).

Prasata v očkované a stimulované kontrolní skupině v pokusu 1 byla stimulována 14 ml výtažku, naředěného v poměru 1:100 (tj. $1,4 \times 10^6$ organismů). Prasata v pokusu 2 byla stimulována tak, jak bylo doporučeno, 10 ml výtažku, zředěného v poměru 1:100 (tj. $1,0 \times 10^6$ organismů).

V den stimulace byl homogenát rychle rozpuštěn pod teplou vodou a naředěn podle doporučení ISU za použití sterilního růstového média pro *M. hyopneumonie*. Prasata byla zklidněna směsí léčiv Xylazine-Ketamine-Telazol™, sestávající z 50 mg/ml Xylazinu, 50 mg/ml Ketaminu a 100 mg/ml Telazolu. Anestetická směs byla podávána intramuskulárně v množství 0,022 až 0,044 ml/kg tělesné hmotnosti. Každé prase obdrželo jednu dávku o objemu 14 ml (pokus 1) nebo 10 ml (pokus 2) stimulujícího materiálu, a to do průdušnice. K potvrzení správného umístění jehly byl před podáním stimulační dávky do injekční stříkačky natažen vzduch. Neočkovaná, nestimulovaná kontrolní zvířata byla uchovávána v oddělených místnostech a nebyla stimulována.

Třicet dnů po stimulaci (DPC, day post challenge) byla všechna zvířata usmrcena. Byly odebrány plíce a celkové plicní leze byly jednotlivě hodnoceny bez znalosti testované skupiny.

Shromažďování vzorků a testování:

Krevní vzorky byly od všech prasat shromážděny v den očkování (0 DPV), jeden měsíc po očkování (1 MPV), čtvrtý měsíc po očkování, tj. v den stimulace (4 MPV/0 DPC) a 30 dní po stimulaci (30 DPC) pro stanovení sérových protilátek vůči *M. hyopneumonie*, které se detegují za použití kompetitivní sady ELISA (vyrobené firmou DAKO Co.). Před testováním byly vzorky séra skladovány při teplotě -20 °C.

Analýza údajů:

Hodnoty plicních lezí byly srovnány u očkovaných a neočkovaných skupin na základě variační analýzy (ANOVA). Plicní hodnocení byla ke zlepšení distribuce nezjištěných chyb transformována funkcí arcsinus.

Výsledky a diskuze

Serologie:

Všechna prasata v obou pokusech byla testována vzhledem k sérovým protilátkám vůči *M. hyopneumonie* komerční kompetitivní sadou ELISA za použití ředění séra 1:10 ve všech stanoveních. Všechna prasata byla v době očkování seronegativní (titr protilátek menší než 10), což ukazuje, že zvířata byla vnímavá vůči *M. hyopneumonie*. Všechna prasata v kontrolních skupinách zůstala před stimulací seronegativní. To ukazuje, že imunitní odpověď byla u očkovaných prasat zprostředkována vakcínou a nikoliv vystavením okolnímu prostředí. Všechna prasata v očkovaných skupinách a většina prasat v stimulovaných kontrolních skupinách (18 z 22 zvířat v pokusu 1 a 15 z 25 v pokusu 2) po stimulaci serologicky konvertovala k *M. hyopneumonie*, zatímco všechna nestimulovaná zvířata zůstala seronegativní. To ukazuje, že stimulace byla specifická vůči *M. hyopneumonie*. Serologické stavy testovaných zvířat jsou shrnuty v Tabulce 1.

Imunogennost testovaná v pokusu 1

Pokus 1 byl prováděn k určení toho, zda vakcína podle Příkladu 2 může stimulovat silnou imunitu, která by mohla chránit vůči vyšší úrovni stimulace než je ta, doporučená ISU 4 měsíce po očkování. V tomto pokusu byla rovněž srovnána vakcína podle Příkladu 2 s komerčně dostupným prostředkem, Ingelvac M.hyo®, pokud se týká schopnosti stimulovat ochrannou imunitu během 4 měsíců po očkování.

Dvacetpět prasat očkovaných prostředkem FDAH Suvaxyn MH-One a 8 prasat očkovaných povoleným výrobkem, Ingelvac M.hyo®, série 271 032, bylo stimulováno množstvím stimulačního materiálu $1,4 \times 10^6$ organismů na zvíře ($1,0 \times 10^6$ organismů na zvíře bylo doporučováno ISU, viz oddíl 5.5). Dvacet dva prasat sloužilo jako stimulované kontroly a 10 prasat jako nestimulované kontroly. Procentní hodnoty plicních lezí jsou shrnuty v Tabulce 2. Prasata očkovaná vakcínou podle Příkladu 2 měla průměrné plicní leze v rozsahu 15,9 % a stimulovaná kontrolní prasata měla průměrné plicní leze v rozsahu 19,6 %. Plicní leze ve skupině očkované vakcínou podle Příkladu 2 byly menší než kontrol i tehdy, pokud byla prasata stimulována vyšší dávkou *M. hyopneumonie*. Ovšem rozdíl nebyl významný ($p = 0,19$). Podobně pokud byl na stejné skupině zvířat se stejnou dávkou stimulace hodnocen komerčně dostupný výrobek, Ingelvac M.hyo®, byla rovněž dosažena stejná úroveň plicních lezí (14,6 %). Nebyl pozorován žádný významný rozdíl mezi skupinou očkovanou Ingelvac M.hyo® a kontrolní skupinou ($p = 0,27$) a mezi skupinou očkovanou Ingelvac M.hyo® a skupinou očkovanou vakcínou podle Příkladu 2 ($p = 0,88$).

I když bylo u skupiny, očkované vakcínou podle Příkladu 2, zaznamenáno nevýznamné číselné zmenšení lezí, údaje získané v tomto pokusu naznačují, že vyšší stimulační dávka ($1,4 \times 10^6$ organismů) použitá v tomto pokusu byla pravděpodobně ochromující, dokonce i pro imunitu prasat, stimulovaných komerčním výrobkem Ingelvac. Tato

úroveň stimulace není pravděpodobně vhodná pro hodnocení studií očkování/stimulace, využívajících skupiny zvířat o velikosti 20 až 25 prasat, i když je možné, že u větších skupin by významnost mohla být potvrzena.

Imunogennost testovaná v pokusu 2:

Prasata v očkované skupině a ve stimulované kontrolní skupině pokusu 2 byla hodnocena za použití stimulační dávky ($1,0 \times 10^6$ organismů) doporučené ISU, 4 měsíce po očkování, k prokázání čtyřměsíčního DOI (čtyřměsíčního trvání imunity, duration of immunity). Procentní údaje, týkající se plicních lezí, jsou shrnuty v Tabulce 3. Kontrolní skupina měla průměrné plicní leze v rozsahu 10,4 %. Očkovaná skupina měla průměrné plicní leze v rozsahu 5,5 %. Je zde významný rozdíl mezi očkovanými a kontrolními skupinami ($p = 0,31$). To ukazuje, že vakcína podle Příkladu 2 je účinná pro stimulaci ochranné imunity, která může přetrvat alespoň 4 měsíce po očkování jednou dávkou prasat ve věku 3 měsíců.

Hodnocení spojených výsledků z obou pokusů:

I když oba pokusy byly významně odlišné, účinek pokusu na skupinu nebyl významný. Velikost účinku na skupinu byla u obou pokusů podobná. Účinek na skupinu tedy může být hodnocen bez rozlišení pokusu. Vzhledem k tomu, že analýza celého modelu ukázala, že interakce mezi skupinou a pokusem nebyla významná, podporuje to názor, že účinek skupiny byl stejný u obou pokusů a opravňuje ke spojení údajů z obou pokusů do jedné analýzy. Pokud tedy byly spojeny údaje z obou pokusů, týkající se vakcíny podle Příkladu 2, a arcsinem transformované proměnné pro plicní leze byly analyzované se skupinou a pokusem jako nezávislými proměnnými (redukovaný model), skupina je statisticky významná ($p = 0,013$).

Tabulka 1: shrnutí serologických stavů vzhledem k *M. hyopneumoniae* u kontrolních a očkovaných prasat

Pokus 1

| skupina | počet prasat | ODPV | -1 DPC | 30 DPC |
|------------------------|--------------|------|--------|--------|
| vakcína FDAH | 22 | 0/22 | 0/22 | 22/22 |
| vakcína BI | 8 | 0/8 | 4/8 | 8/8 |
| stimulované kontroly | 22 | 0/22 | 0/22 | 18/22 |
| nestimulované kontroly | 10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |

Pokus 2

pozitivní/negativní (1:10) při

| skupina | počet prasat | ODPV | -3 DPC | 30 DPC |
|------------------------|--------------|------|--------|--------|
| vakcína FDAH | 23 | 0/23 | 6/23 | 23/23 |
| kontroly | 25 | 0/25 | 0/25 | 14/25 |
| nestimulované kontroly | 7 | 0/7 | 0/7 | 0/7 |

Tabulka 2: shrnutí procentního rozsahu plicních lezí v pokusu 1 (předávkování)*

| skupina | počet prasat | průměrná % plicních lezí | P - hodnoty |
|-------------------|--------------|--------------------------|-------------|
| vakcína FDAH | 22 | 15,90 % | 0,19** |
| vakcína BI | 8 | 14,60 % | 0,27*** |
| kontroly | 22 | 19,60 % | |
| nestimul.kontroly | 10 | 0 % | 0,88**** |

* prasata byla stimulována množstvím $1,4 \times 10^6$ organismů na zvíře (dávka doporučená ISU = $1,0 \times 10^6$ organismů na zvíře)

** srovnání mezi skupinou očkovanou FDAH a kontrolní skupinou

*** srovnání mezi skupinou očkovanou BI a kontrolní skupinou

****srovnání mezi skupinou očkovanou BI a skupinou očkovanou FDAH

Tabulka 3: shrnutí procentního rozsahu plicních lezí v pokusu 2
(doporučená dávka)*

| skupina | počet prasat | průměrná % plicních lezí | P - hodnoty |
|-------------------|--------------|--------------------------|-------------|
| vakcína FDAH | 23 | 5,50 % | 0,031** |
| kontroly | 25 | 10,40 % | |
| nestimul.kontroly | 7 | 0,77 % | |

* zvířata byla stimulována dávkou doporučenou ISU ($1,0 \times 10^6$ organismů na zvíře)

** srovnání mezi skupinou očkovanou FDAH a kontrolní skupinou

Příklad 4

Hodnocení dlouhodobé imunity, indukované vakcinačním prostředkem podle tohoto vynálezu, vůči virulentní stimulaci 6 měsíců po podání jedné dávky vakcíny

Testovaná vakcína A byla připravena za použití v podstatě stejných postupů, jaké jsou popsány v Příkladech 1 a 2 a za použití níže uvedených množství.

Testovaná vakcína A

Množství pro 1 000 000 dávek (2 ml každá): % objem/objem

| | | |
|--|--------------|------|
| koncentrát Mycoplasma ($> 1,0 \times 10^{10}$ MHDCE/ml) | 1 200 000 ml | 60,0 |
| směs skvalan/Pluronic L121 | 200 000 ml | 10,0 |
| Carbopol (2 % hmotnost/objem ve vodě) | 200 000 ml | 10,0 |
| roztok Thimerosalu, 1% hmotn./objem ve vodě a EDTA (čtyřsodná sůl) 7 % hmotn./objem | 18 000 ml | 0,9 |
| sterilní fyziologický roztok | 382 000 ml | 19,1 |

Hodnota pH série je upravena na $7,0 \pm 0,2$

MHDCE = buněčné ekvivalenty DNA *Mycoplasma hyopneumoniae*

Souhrn

Do tohoto hodnocení bylo zahrnuto 33 prasat ve věku 21 dní. Dvacet prasat bylo ve věku 3 týdnů intramuskulárně očkováno jednou dávkou vakcíny A. Deset prasat sloužilo jako neočkované kontroly a 3 prasata jako nestimulované vnější kontroly.

Všechna prasata byla v době očkování seronegativní (titr protilátek menší než 10), což ukazuje, že zvířata byla vnímavá vůči *M. hyopneumoniae*. Všechna zvířata v kontrolních skupinách zůstala před stimulací seronegativní. To ukazuje, že imunitní odpověď u očkovaných prasat byla zprostředkována vakcínou a nikoliv vystavením vnějšímu prostředí.

Šest měsíců po očkování bylo 20 očkovaných prasat a 10 neočkovaných kontrolních prasat stimulováno virulentním *M. hyopneumoniae* (1×10^6 organismů na zvíře). Tři prasata sloužila jako

nestimulované kontroly. Očkováná prasata měla průměrný rozsah plicních lezí 3,6 % a stimulovaná kontrolní prasata měla průměrný rozsah plicních lezí 14,6 %. Plicní leze očkové skupiny byly významně menší než u kontrol ($p = 0,0215$).

Údaje získané z tohoto hodnocení ukazují, že testovaná vakcína A indukovala dlouhodobou ochrannou imunitu vůči stimulaci virulentním *M. hyopneumonie* 6 měsíců po očkování jednou dávkou.

Uspořádání pokusu

Třicet tři prasat ve věku 21 dnů bylo náhodně rozděleno do 3 skupin (očkováná skupina, stimulovaná kontrolní skupina a nestimulovaná vnější kontrolní skupina) za použití randomizačního programu Microsoft Excel u stejného vrhu. Dvacet prasat bylo ve věku 3 týdnů intramuskulárně očkováno testovanou vakcínou A. Deset prasat sloužilo jako stimulované kontroly a 3 prasata jako nestimulované vnější kontroly. Prasata v očkové skupině a ve stimulované kontrolní skupině byla stimulována 10 ml virulentní kultury *M. hyopneumonie* (1×10^6 organismů) na zvíře, 6 měsíců po očkování. Tři neočkováná prasata byla použita jako nestimulované kontroly. Stimulovaná prasata a nestimulovaná kontrolní prasata byla usmrcena 26 dnů po stimulaci a u každého zvířete byly hodnoceny plicní leze.

Každé zvíře v očkových skupinách obdrželo jednu dávku testované vakcíny o objemu 2 ml, aplikovanou intramuskulárně po straně krku.

Stimulace a nekropsie

Virulentní stimulační výtažek *M. hyopneumonie*, zmrazený (≤ -70 °C) plicní homogenát, byl připraven dr. Eileen Thacker z Iowa State

University (ISU). Bylo ověřeno, že stimulační výtažek je čistý a obsahuje přibližně 10^7 organismů *M. hyopneumoniae* na 1 ml.

Prasata byla stimulována 10 ml výtažku, naředěného v poměru 1:100 (tj. přibližně $1,0 \times 10^6$ organismů).

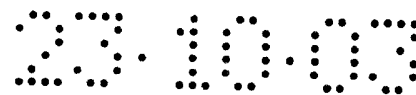
V den stimulace byl homogenát rychle rozpuštěn pod teplou vodou a naředěn podle doporučení ISU za použití sterilního růstového média pro *M. hyopneumoniae*. Prasata byla zklidněna směsí Xylazine-Ketamine-Telazol™, sestávající z 50 mg/ml Xylazinu, 50 mg/ml Ketaminu a 100 mg/ml Telazolu. Anestetická směs byla podávána intramuskulárně v množství 0,022 až 0,044 ml/kg tělesné hmotnosti. Každé prase obdrželo jednu dávku o objemu 10 ml stimulujícího materiálu ($1,0 \times 10^6$ organismů) a to do průdušnice. K potvrzení správného umístění jehly byl před podáním stimulační dávky do injekční stříkačky natažen vzduch. Neočkovaná, nestimulovaná kontrolní zvířata byla uchovávána v oddělených místnostech a nebyla stimulována.

Dvacetšest dnů po stimulaci (DPC) byla všechna prasata usmrcena. Byly jim odebrány plíce a celkové plicní leze byly hodnoceny tak, jak je popsáno v Příkladu 3.

Shromažďování a testování vzorků

Krevní vzorky byly od všech prasat shromážděny v den očkování (0 DPV), 35. den po očkování (35 DPV), v den stimulace (-1 DPC) a 26 DPC pro stanovení sérových protilátek vůči *M. hyopneumoniae*, které bylo prováděno za použití kompetitivní sady ELISA (vyrobené firmou DAKO Co.). Před testováním byly vzorky séra skladovány při teplotě ≤ -20 °C.

Analýza údajů



Hodnoty plicních lezí byly srovnány u očkovaných a neočkovaných skupin na základě jednocestné analýzy (ANOVA). Hodnocení plicních lezí byly arcsinem transformované ke zlepšení rozdělení trvalých chyb. Vzhledem k tomu, že předpoklady normality hodnot plicních lezí byly diskutovatelné, jak hodnocení plicních lezí, tak i arcsinem transformované hodnocení plicních lezí byly analyzovány Wilcoxon-Rankovým sumárním testem (Wilcoxon Rank Sum test). Úroveň významnosti byla stanovena na $p < 0,05$. Výsledky neparametrického Wilcoxon-Rankova sumárního testu byly použity pro udávané účely.

Výsledky a diskuze

Serologie

Všechna zvířata byla testována na přítomnost sérových protilátek vůči *M. hyopneumonie* za použití komerční kompetitivní sady ELISA, přičemž naředění séra bylo u všech testů 1:10. Vzorky, jejichž výsledky testu byly podle pokynů přiložených k testu podezřelé, byly v analýze údajů brány jako pozitivní. Všechna prasata byla v době očkování seronegativní (titr protilátek menší než 10), což ukazuje, že zvířata byla vnímavá vůči *M. hyopneumonie*. Všechna prasata v kontrolních skupinách zůstala před stimulací seronegativní. Po očkování se 15 z 20 očkovaných zvířat stalo alespoň jednou seropozitivními vzhledem k *M. hyopneumonie* (vzorky byly shromážděny 35. den po očkování a -1 DPC). To ukazuje, že imunitní odpověď byla u očkovaných prasat vyvolána vakcínou a nikoliv vystavením okolnímu prostředí. Všechna očkovaná zvířata a 4 z 10 zvířat ve stimulované kontrolní skupině se po stimulaci stala seropozitivními vůči *M. hyopneumonie*, zatímco všechna nestimulovaná zvířata zůstala seronegativní. Serologický stav testovaných zvířat je shrnut v Tabulce 4.

Hodnocení plicních lezí

Dvacet prasat očkovaných testovanou vakcínou A a 10 neočkovaných kontrolních zvířat bylo 6 měsíců po očkování stimulováno virulentním *M. hyopneumonie* ($1,0 \times 10^6$ organismů na zvíře). Tři prasata sloužila jako nestimulované kontroly. U 8 z 20 očkovaných prasat (40 %) se po stimulaci nevyvinuly plicní leze, zatímco v kontrolní skupině nemělo plicní lezi pouze 1 z 10 prasat. Procentní údaje, týkající se plicních lezí, jsou shrnuty v Tabulce 5. Očkovaná prasata měla průměrný rozsah plicních lezí 3,6 % a stimulovaná kontrolní prasata měla průměrný rozsah plicních lezí 14,6 %. Plicní leze u očkované skupiny byly významně menší než u kontrol ($p = 0,0215$).

Tabulka 4: serologický stav prasat ve studii* s ohledem na *M. hyopneumonie*

| skupina | léčba | počet prasat | počet pozitivních (1:10)/celkový počet | | | |
|---------|---------------------------|--------------|--|--------|-----------|--------|
| | | | 0 DPV** | 35 DPV | -1 DPC*** | 26 DPC |
| 1 | vakcína/ stimulace | 20 | 0/20 | 9/20 | 12/20 | 20/20 |
| 2 | kontrola/ stimulace | 10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 4/10 |
| 3 | kontrola/bez stimulace | 3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |

* Vzorky séra byly testovány vzhledem k sérovým protilátkám vůči *M. hyopneumonie* prostřednictvím komerční sady ELISA

Všechny vzorky byly testovány při naředění séra 1:10. Výsledky byly hodnoceny podle instrukcí v sadě.

Vzorky, podezřelé při naředění 1:10, byly hodnoceny jako pozitivní.

** DPV = dny po očkování

***DPC = dny po stimulaci

Tabulka 5: souhrn hodnocení plicních lezí (%) u prasat stimulovaných *M. hyopneumonie* a u nestimulovaných kontrol.

| skupina | léčba | počet prasat | prům.% hodnoc. plicních lezí | směr. odchylka | spodní 95% CL* průměru | horní 95% CL* průměru | hodnota P** |
|---------|--------------------------|--------------|------------------------------|----------------|------------------------|-----------------------|-------------|
| 1 | vakcína/ stimulace | 20 | 3,6 | 7,6 | 0,07 | 7,19 | 0,0215 |
| 2 | kontrola/ stimulace | 10 | 14,6 | 20,0 | 0,33 | 28,94 | |
| 3 | kontrola/ bez stimul. | 3 | 1,8 | 1,8 | -2,67 | 6,27 | |

* CL = úroveň spolehlivosti

**hodnota P byla získána srovnáním skupin 1 a 2.

Jak je zřejmé z údajů uvedených v Tabulkách 4 a 5, testovaná vakcína A indukuje ochrannou imunitu vůči stimulaci virulentním *M. hyopneumonie* po dobu 6 měsíců po podání jedné dávky prasatům, očkovaným ve věku 3 týdnů.

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Vakcína pro imunizaci zvířete vůči infekci způsobené *Mycoplasma hyopneumonie*, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

- imunizující množství bakterinu *Mycoplasma hyopneumonie*;
- adjuvantní směs, obsahující polymer kyseliny akrylové a směs metabolizovatelného oleje a blokového kopolymeru polyoxyethylenu a polyoxypropylenu; a
- farmaceuticky přijatelný nosič,

přičemž tato vakcína vyvolává po jednom podání ochrannou imunitu vůči *Mycoplasma hyopneumonie*.

2. Vakcína podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že adjuvantní směs sestává z polymeru kyseliny akrylové a směsi metabolizovatelného oleje, která zahrnuje jeden nebo více z terpenových uhlovodíků a blokový kopolymer polyoxyethylenu a polyoxypropylenu v poměru přibližně od 1:25 do 1:50 polymeru kyseliny akrylové vůči směsi metabolizovatelného oleje a blokového kopolymeru polyoxyethylenu a polyoxypropylenu.

3. Vakcína podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že adjuvantní směs představuje přibližně 1 až 25 %, objem/objem, vakcíny.

4. Vakcína podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že polymer kyseliny akrylové je přítomný v konečné koncentraci přibližně 1 %, objem/objem, a směs terpenových uhlovodíků a blokového kopolymeru polyoxyethylenu a polyoxypropylenu je přítomna v konečné koncentraci přibližně od 5 % do 10 %, objem/objem.

5. Vakcína podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že adjuvantní směs představuje přibližně 2 % až 15 %, objem/objem, vakcíny.

6. Vakcína podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že adjuvantní směs představuje přibližně 5 % až 12 %, objem/objem, vakcíny.

7. Vakcína podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že metabolizovatelným olejem je skvalan nebo skvalen.

8. Vakcína podle nároku 6 nebo 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že polymerem kyseliny akrylové je Carbopol.

9. Vakcína podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje alespoň jeden bakterin zvolený ze skupiny, sestávající z bakterií *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis* a leptospiry.

10. Způsob ochrany zvířete vůči onemocnění způsobenému *Mycoplasma hyopneumoniae*, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje krok, při němž se uvedenému zvířeti podává vakcína, obsahující

- imunizující množství bakterinu *Mycoplasma hyopneumoniae*;
- adjuvantní směs, obsahující polymer kyseliny akrylové a směs metabolizovatelného oleje a blokového kopolymeru polyoxyethylenu a polyoxypropylenu; a
- farmaceuticky přijatelný nosič,

příčemž tato vakcína vyvolává po jednom podání ochrannou imunitu vůči infekci *Mycoplasma hyopneumoniae*.

11. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunizujícím množstvím uvedené bakterie je přibližně 1×10^8 až 3×10^{11} buněčných ekvivalentů DNA *Mycoplasma hyopneumoniae*.

12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunizujícím množstvím uvedené bakterie je přibližně 1×10^9 až 3×10^9 buněčných ekvivalentů DNA *Mycoplasma hyopneumoniae*.

13. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že způsob podávání v uvedeném kroku podávání je intramuskulární, subkutánní, intraperitoneální, jako aerosol, orální nebo intranasální.

14. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že adjuvantní směs sestává z polymeru kyseliny akrylové a směsi metabolizovatelného oleje, která obsahuje jeden nebo více z terpenových uhlovodíků a blokový kopolymer polyoxyethylenu a polyoxypropylenu, v konečné koncentraci přibližně 1 % až 25 %, objem/objem.

15. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že polymerem kyseliny akrylové v adjuvantní směsi je Carbopol.

16. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že metabolizovatelným olejem v adjuvantní směsi je terpenový uhlovodík, zvolený ze skupiny, tvořené skvalenem a skvalanem.

17. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 10 až 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje krok, v němž se současně podává alespoň jeden další bakterin, zvolený ze skupiny, sestávající z bakterií *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis* a leptospiry.

18. Vakcína obsahující inaktivované *Mycoplasma hyopneumoniae*, metabolizovatelný olej, blokový kopolymer polyoxyethylenu a

polyoxypropylenu a polymer kyseliny akrylové, ve formě emulze typu oleje ve vodě.

Zastupuje: