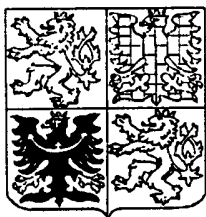


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

- (22) 30. 10. 92
(32) 01. 03. 91, 10. 12. 91, 26. 02. 92
(31) 91/9102513, 91/9115289, 92FR/9100176
(33) FR, FR, WO
(40) 13. 10. 93

(21) 3280-92

(13) A3

5(51)

A 61 K 39/385
A 61 K 37/02
C 07 K 7/06
A 61 K 39/395

(71) RHONE MERIEUX, societe anonyme, Lyon, FR;

(72) Dufour Raymond, Lyon, FR;
Roulet Claude, Venissieux, FR;
Chouvet Claire, Lyon, FR;
Bonneau Michel Bernard, Montfort, FR;

(54) Způsob zlepšení organoleptických vlastností
masa nevykastrovaných samců domácích zvířat

(57) Způsob na zlepšení organoleptických vlastností masa z nevykastrovaných samců domácích zvířat, vakcíny, jichž tato metoda používá, zejména nové peptid na výrobu těchto vakcín a příslušná souprava. Metoda na zlepšení organoleptických vlastností, zejména vůně, chuti a křehkosti masa z nevykastrovaných samců domácích zvířat, krátce před porážkou zvířete odstraňuje působení androgenních steroidů cestou aktivní nebo pasivní anti-LHRH imunoneutralizace přičemž výhody vyplývající ze samčího pohlaví zvířete zůstávají zachovány v zásadě až do porážky. Vakcína obsahuje jako peptid buď přirozený LHRH nebo peptid Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly. NH₂ navázaný na imunogenní nosičovou bílkovinu.

3280-92

PRŮVYVÁLEZY A OBJEVY	ÚŘAD	DOŠLO 30. X 92	061277
			č.j.

Tělesná zlepšení organoleptických vlastností masa nevykastrov-
vaných samců domácích zvířat

Oblast testování

Vynález se týká metody na zlepšení organoleptických
vlastností, zejména vůně, chuti a křehkosti masa nevykastro-
vaných samců domácích zvířat, zvláště skotu, ovci a prasat.
Vynález se rovněž týká vakcín použitelných touto metodou, no-
vého peptidu na přípravu takovýchto vakcín a příslušné vakci-
nační soupravy.

Usovací stav techniky

Výhody výkrmu intaktních místo kastrováných samců
při pěstování domácích zvířat na maso jsou zdůrazňovány
zooteknickými specialisty po několik desetiletí. Tyto výhody
jsou ve vyšší rychlosti růstu, zejména u skotu a ovci, v lep-
ším využití krmných dávek a v kvalitě masa poraženého zvíře-
te, které je libovější, ale má současně u všech domácích zví-
řat vyšší podíl svalové tkáně (S. C. SEIDEMAN a ost., J. of
Animal Science, 1982, 55 (4) 826 - 840, a M. BONNEAU, INRA
Prod. Anim., 1988, 1 (2) 133 - 140.

Hlavní nevýhody takového pěstování intaktních samců,
tak jak jsou vyzdvíženy ve výše uvedených přehledech, spočí-
vají v nepříjemném zápachu a chuti masa ze samců prasat a ov-
cí a v menší křehkosti masa z intaktních samců skotu a ovci
a opravňují proto současné praktiky chirurgické kastrace.

Je skutečností, že androgenní steroidy zahrnující and-
rostendiol, androstendion a testosteron, které jsou rozhodu-
jícími faktory pro získání výhod v pěstování domácích zvířat
potom jde o rychlý růst a lepší využití krmných dávek, jsou
i zodpovědné za menší křehkost masa získaného z intaktních
samců skotu a ovci. Neandrogenní steroidy anebo deriváty
16-androsteronu včetně 5 α -androsteronu (5 α -androsteron-16-en-3-on)
jsou částečně zodpovědné u samců prasat za nepříjemný zápach
a chuť masa získaného potom co samci dosáhli puberty, a tyto

faktory snižují kvalitu masa a jsou na zábranu jeho marketingu v čerstvém stavu.

Skatol, sloučenina odvozená od tryptofanu a produkovaná mikrobiální florou přítomnou ve vnitřnostech, je látkou zčásti zodpovědnou za nepříjemný zápach a chuť masa získaného z intaktních samců prasat. Jeho vznik závisí na ekologických, nutričních a pěstitelských faktorech. Kumulace skatolu v adiposové tkáni je vyšší v kancích a soudí se, že je svázána se sekrecí pohlavních steroidů gonádami.

Pokusně byla zkoumána možnost snížení anebo odtřanění samců vlastností v mladých zvířatech a sekrece testikulárních hormonů, zejména testikulárních steroidů, cestou aktivní anebo pasivní imunoneutralizace proti těmto hormonům anebo proti hormonům zúčastněným na jejich sekreci, jakými jsou zejména luteinizační hormon nebo LH a hormon gonadoliberin (GnRH), rovněž známý jako hormon uvolňující luteinizační hormon (LHRH). Na prasatech byly rovněž provedeny pokusy o snížení hladiny 5 α -androstenonu, hormonu ze skupiny 1 α -androstenu v tkáni, cestou aktivní imunizace proti této látce (E. D. WILLIAMSON a ost., *Livestock Production Science*, 1985, 12, 251-264) anebo pasivní imunizací proti téže látce (R. CLAUS, *Immunization with Hormones in Reproduction Research*, red. Nieschlag, 1975). Je možné pokoušet se o zastavení anebo snížení sekrece testikulárních steroidů imunoneutralizací gonadotropního hormonu LH, který je specifický pro daný druh (R. E. FALVO a ost., *J. Anim. Science*, 1986, 63, 986-994) anebo anti-LHRH imunoneutralizací endogenního LHRH. Pouze aktivní imunizace pomocí anti-LHRH byla doporučena různými autory. U prasat se podařilo docílit snížení 5 α -androstenonu touto metodou (A. CARATY a M. BONNEAU, *C. R. Acad. Sci. Paris* 1986, 303, Serie III (16) 673-676; R. E. FALVO a ost., *J. Anim. Sci.*, 1986, 63, 986-994).

U ovci doporučuje B. D. SCHANBACHER (*Am. J. Physiol.*, 1982, 242, E201-E205) anti-LHRH imunizaci ke zpomalení testikulárního vývoje a k vyvolání kastrálního účinku u samců jehňat. P. S. ROBERTSON (*Vet. Rec.*, 1979, 105, 516-517) popisuje imunologickou kastraci skotu na bázi anti-LHRH.

Testování imunoneutralizace na bázi anti-LHRH na

laboratorních zvířatech (ARIMURA a ost., Endocrinology, 1973, 93, 1092-1103; FRASER, H. M. a ost., J. Endocr. 1974, 63, 399-406; MAKINO T. a ost., Contraception, 1973, 8 (2), 133-145; CARELLI C. a ost., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1982, 79, 5392-5395) a na některých domácích zvířatech (JEFFCOATE a ost., Theriogenology, 1978, 10 (4), 323-335; ROBERTSON I. S. a ost., Veterinary Record, 1979, 105, 556; SCHANBACHER B. D. Am. J. Physiol., 1982, 242, E201-E205) ukázalo, že je možné dosáhnout zástavy sekrece testosteronu, poklesu váhy varlat a jejich přílehlých žláz, zástavy spermatogeneze a na behaviorální úrovni vymizení libida.

Výsledky této práce podnítily návrat k k první imunoneutralizační metodě, založené zejména na anti-LHRH, aby bylo možné se vyhnout tradiční chirurgické kastraci pro pěstelské účely.

Tak v US Patentu č. 4,556,555 je popisována metoda na pasivní imunizaci zvířat před pubertou a použitím antiséra, které obsahuje protilátky proti gonadotropinu.

Mezinárodní patentová přihláška WO 90/11,298 popisuje metodu anti-LHRH imunizace při narození; používá 2 LHRH sekvence spojené v tandemu a navázané k nosičové bílkovině, aby byla zlepšena kvalita masa u prasat.

Mezinárodní patentová přihláška WO 88/00,056 popisuje metodu imunologické kastrace na bázi anti-LHRH, aby se zlepšilo společenské a sexuální chování samců a tak byla odstraněna nutnost chirurgické kastrace, která ovlivňuje jejich růst. Býci byli očkováni ve věku 8 až 40 týdnů a pak dostali několik posilovacích dávek (boosterů).

Vakcína založená na anti-LHRH je prodávána pod obchodním názvem VAXTRATE australskou společností WEBSTERS a je používána u krav.

R. E. FALVO a ost. (J. Anim. Sci. 1986, 63:(986-994) imunizovali několik skupin býků pomocí konjugátů LHRH s lidským sérovým globulinem v kompletním Freundově adjuvantu anebo s muramyl peptidem jako adjuvantem. Po vakcinaci a použití několika posilovacích dávek (boosterů) autoři pozorovali

vali vysoké titry anti-LHRH protilátek, avšak museli opětovně podávat posilovací dávky (boosterů), aby tento vysoký titr protilátek udrželi.

1. S. ROBERTSON popisuje metodu na imunizaci pomocí LHRH navázaného k tetanickému anatoxinu anebo k thyroglobulinu a soudí, že tento imunologický postup by umožnil pozdní kastraci s příznivým dopadem na vahové přírůstky. Uzavírá však, že je nutno dále zkoušet postupy, které by vedly ke kastrační metodě použitelné v praxi, a to jak z hlediska metody samé tak i adjuvantu neboť Freundovo adjuvans je pro praxi zakázáno.

Konečně A. CARATY a M. BONNEAU (C. R. Acad. Sc. Paris, vol. 303, Serie III, č. 16 1986) provedli imunizaci na bázi anti-LHRH se samci prasat. Autoři soudí, že blokáda produkce steroidů 2 až 3 týdny před porážkou by poskytla možnost využít velký potenciál zvířat tohoto typu pro výrobu masa a současně že by se odstranily problémy spojené s kumulací androsteronu v adiposové tkáni. Uzavírají však, že bude nutno ještě dále pokročit v imunizačních technikách než bude možno navrhnout metodu aktivní anti-LHRH imunizace jakožto techniku použitelnou pro pěstelské účely.

Imunoneutralizace navíc vede v praxi k vážným problémům z hlediska bezpečnosti zákroku, zejména pokud jde o místní reakce vyvolané vakcínami, zejména olejovitými vakcínami, a k nebezpečí, že maso zvířete bude nepoužitelné anebo nízké kvality.

Návrhy na zlepšení organoleptických vlastností masa skotu a ovci nebyly dosud podány.

Podstatná vynálezu

Průmyslovatel našel průmyslově použitelnou metodu, která umožňuje zlepšení organoleptických vlastností masa zvířat, vynalézající se tím, že krátce před porážkou zvířete se působení androgenních a neandrogenních steroidů v podstatě zabrání aktivní anebo pasivní anti-LHRH imunoneutralizací, přičemž výhody jatečních samců jsou v zásadě zachovány až do porážky.

V prvním, preferovaném provedení této metody se anti-LHRH vakcína podává zvířeti, nejlépe ve formě emulze a nejlépe během vykrmení laktace anebo před ní, a pak krátce před před porážkou zvířete se anti-LHRH vakcína aplikuje znovu. Postup lze provést ve dvou oddělených podáních anebo metodou řízeného uvločování.

U prasat je zejména výhodné podávat anti-LHRH vakcínu spolu s vodným adjuvantem, zejména s gelem hydroxidu hlinitého anebo se saponinem. Aplikace se nejlépe provede 15 až 21 dní před porážkou.

Naopak u skotu a kde je to vhodné i u ovcí se podání provede před porážkou nejlépe s vakcínou v emulzním adjuvantu, nejlépe 1 až 2 měsíce před porážkou. Tato aplikace se nejlépe provádí přinejmenším 4 týdny a nejlépe několik měsíců po první aplikaci.

V každém případě vakcína v emulzi uvažovaná pro první aplikaci a u skotu pro druhou aplikaci je nejvhodnější ve formě emulze vody v oleji. Lze uvažovat ovšem i o jiných emulzích.

Vakcína, nejlépe emulzního typu je navrhována podle tohoto vynálezu tak, aby indukovala primární imunitní odpověď nízké intenzity bez měřitelného účinku na sekreci steroidů gonádami. Formulace založená na emulzi je preferována i když jiné formulace jsou rovněž použitelné pokud vedou k témuž účinku.

Podání vakcíny před porážkou je prováděno s vakcínou formulovanou tak, aby v tomto stadiu způsobila zástavu anebo významné omezení sekrece steroidů bez nežádoucí místní anebo celkové reakce schopné způsobit zhoršení vzhledu anebo kvality masa.

Je žádoucí, zejména u prasat, zvolit následující dvě formulace vodných roztoků konjugátu: předně, formulaci na bázi stále emulze vody v oleji, připravené z vysoce čištěného minerálního, živočišného anebo rostlinného oleje a neiontových povrchově aktivních látek, a to tak, aby byla vyvolána imunitní odpověď o nízké intenzitě bez měřitelného účinku na sekreci steroidů gonádami, a za druhé, formulaci neemulzifikovanou s gelem kysličníku hlinitého anebo

seponinu, která spouští rychlou a intenzivní imunitní reakci vedoucí k dostatečné produkci neutralizujících anti-LHRH protilátek tak, aby byly odstraněny anebo sníženy gonádové steroidy a aby poklesl s tím související transport skatolu vnitřně ve vnitřnostech.

Emulze, na rozdíl od té, která se získá s úplným anebo neúplným Freundovým adjuvantem, je stále emulze umožňující přípravu vakciny pro okamžité použití. Zánětlivá kožní reakce je velmi slabá a je lokalizována do míst aplikace vakciny v obou formulacích; reakce se projevuje při vnějším ohledání dobře chráněnými pupínky. Její vlastní vývoj se omezuje na dermis. Vyrážka mizí bez zanechání granulomů viditelných při porážce zvířete.

V jiném provedení této metody se hyperimunní anti-LHRH sérum nebo plazma anebo anti-LHRH monoklonální protilátky podají zvířeti několik dnů před porážkou, zejména 5 až 15 dnů předem.

Pasivní imunizace na bázi anti-LHRH, vyvolávající pokles anebo i zástavu sekrece androgenních a neandrogenních steroidů, bylo docíleno intramuskulárním podáním hyperimunní koňské plazmy. Po dovedení do dostatečné hladiny, měřené titrem protilátek proti LHRH v séru imunizovaného zvířete, tato imunizace vede k poklesu plazmového testosteronu od 3. dne; je-li udržována na téže úrovni po následujících 12 dnů je dostatečná k tomu, aby vyvolala snížení tkáňového androsteronu na hodnotu pod 0,50 mikrogramů/g, při kteréžto hodnotě spotřebitel již nezjistí nepříjemný zápach a zvláštní chuť masa ze samců prasat. Tato metoda pasivní imunizace ukazuje, že udržování významného poklesu obsahu testosteronu po 12 dnů je dostatečné pro snížení koncentrace testosteronu v tkáni pod prahovou hodnotu. Pro tuto pasivní imunizaci lze uvažovat o použití monoklonálních anti-LHRH protilátek vylučovaných prasečími hybridomami anebo heterohybridomami.

Způsob podání těchto formulací je nejlépe transkutaní, zejména s použitím injekčního přístroje bez jehly, a to tryskou pod tlakem, zvláště podle patentové přihlášky FR-A-2,652,257.

Metoda podle tohoto vynálezu má velkou výhodu v tom, že je zcela bezpečná, zejména, že nevyvolává místní reakce, které by mohly znehodnotit maso.

Zánětlivá reakce může zůstávat omezena na místa aplikace obou formulací a projevuje se při zevním ohledání formou dobře ohraničených pupinků. Její vnitřní vývoj zůstává omezen na povrchovou dermis. Vyrážka mizí bez zanechání granulomů zjevných v době porážky zvířat. Zánětlivá reakce, časově omezená na místa aplikace odráží toleranci k oběma formulacím vakcíny a je jí docíleno jejich transkutánní aplikací s použitím injektoru bez jehly.

Pro anti-LHRH imunizace je nutná kovalentní vazba peptidu LHRH nebo jeho fragmentu, které nejsou imunogenní za ekonomických podmínek použití, na imunogenní protein, zvaný nosič.

LHRH anebo GnRH, ať již přírodní nebo syntetický, je složen z 10 aminokyselin, číselovaných 1 až 10 od aminového konce ke karboxylovému konci, podle tohoto vzorce:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly.NH₂

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Tyto symboly podle konvence předatavují: pGlu, pyroglutamovou kyselinu; His, histidin; Trp, tryptofan; Ser, serin; Tyr, tyrosin; Gly, glycin; Leu, leucin; Arg, arginin; Pro, prolin.

Anti-LHRH imunogenní konjugáty, popsané různými autory, mohou být připraveny, pokud jde o haptén,

a) s celým LHRH anebo LHRH modifikovaným na jenom nebo více místech, aby bylo docíleno žádoucí aminoterminální, karboxyterminální nebo intermediární konjugace

b) s jedním z jeho peptidových fragmentů, složeným z 5 až 7 aminokyselin, modifikovaných anebo jinak upravených, aby bylo docíleno žádoucí aminoterminální, karboxyterminální anebo intermediární konjugace

c) s agonistou nesoucím substituovanou aminokyselinu, nejčastěji v poloze 6, aby bylo docíleno intermediární konjugace.

Pokud jde o nosičovou bílkovinu, je používáno hovězího sérového albuminu, lidského sérového albuminu, thyroglobul-

120, ovalbuminu a lidských anebo koňských globulinů.

Tak evropské patentová přihláška EP-A-181,236 popisuje imunogenní konjugáty obsahující nonapeptid anebo dekaeptid se sekvencí odpovídající poslední 8 aminokyselinám molekuly LAKH k níž je přidán lysin anebo sekvence cystein-lysin na aminoterminálním konci.

Navíc patentová přihláška WO 88/05,308 uvádí konjugáty připravené s použitím fragmentů obsahujících 5, 6 nebo 7 sousedních aminokyselin z molekuly přirozeného peptidu, kde pak každý fragment obsahuje N-terminální pyroglutamovou kyselinu anebo karboxyterminální glycinamid a kde je možné ke každému fragmentu přidat navíc další aminokyselinu anebo sled aminokyselin ke konci připojenému k imunogenní bílkovině.

Konjugační činidla spadají do třech hlavních kategorií: aktivační činidla, homobifunkční činidla a heterobifunkční činidla. Kdežto u aktivačních činidel je vazba mezi oběma molekulami uskutečněna vazbou mezi oběma funkcemi již přítomnými, u ostatních činidel je vazba uskutečněna uhlovodíkovým zbytkem zvaným ligand.

Z aktivačních činidel lze jmenovat kyselinu jodistou, používanou k oxidaci oligosacharidových zbytků na aldehydy, s nimiž aminová skupina druhé molekuly účastnící se na konjugátu následně reaguje.

Karbodiimidy jsou aktivační činidla široce používaná k vazbě antigenů na proteiny; z nich pak největšího použití doznal zejména N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC) hydrochlorid, který umožňuje provedení reakce ve vodném prostředí. Působení karbodiimidů vede k vytvoření amidové vazby mezi karboxylovou skupinou jednoho proteinu, aktivovaného ve formě intermediární O-alkylisomočoviny, a aminovou skupinou nesenou jinou molekulou. Jejich výhodou je ve snadném použití.

Homobifunkční činidla jsou molekuly nesoucí dvě identické reaktivní skupiny oddělené uhlovodíkovým řetězcem. Z těchto činidel lze jmenovat glutaraldehyd, který reaguje s dvěma primárními aminovými skupinami, alkyl- anebo arylisodithiokyanaty reagující s primárními aminy a thioley, a bis-diazotovaný benzidin, který se váže na aromatické zbytky

tyrosinu. Bismaleinimidy a bisemidináty lze jmenovat pro uplnost. Hlavní nevýhodou homobifunkčních činidel je nejspolehlivost regulace vznikajících konjugátů, jelikož tato činidla mohou reagovat s dvěma molekulami téhož charakteru a tak vést ke vzniku oligomerů anebo polymerů.

Chemici, aby tomu zabránili, vyvinuli heterobifunkční činidla v nichž tyto dvě skupiny mají odlišné specifity. V obecném případě, jedna z těchto skupin je ester N-hydroxysukcinimidu, který za mírných podmínek reaguje s volnými aminoskupinami bílkovin a poskytuje jednak N-hydroxysukcinimid, jednak bílkovinu spojenou kovalentní vazbou s kopulačním činidlem na němž je druhá funkce. Obecně tato funkce může reagovat s thiolu poskytovanými molekulou na níž se váže, ať již jsou tyto thioly buď od začátku přítomné v molekule jako cysteinové zbytky (mohou tvořit její přirozenou složku anebo v případě peptidů mohou být úmyslně zabudovány do molekuly během syntézy) anebo jsou poskytnuty takovými činidly jako jsou 2-iminothiolan nebo N-[3-(2-pyridyldithio)propanoxy]sukcinimid (SPDP) po redukci.

Z možností popsaných výše je nejlepší zvolit celý LHRH. V takovém případě se dá přednost přirozenému LHRH před agonisty jako je (D-Lys⁶)-LHRH což vyplývá ze srovnání imunogenní aktivity konjugátů připravených s použitím těchto dvou peptidů.

Karbodiimid má přednost před glutaraldehydem jakožto činidlo pro konjugaci přirozeného LHRH s alfa-globulinem.

Lidský nebo koňský alfa-globulin, frakce IV-1 nebo IV-4, jsou preferovány před lidským nebo hovězím serumalbuminem.

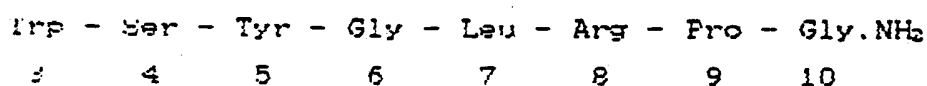
Je tedy, aby vakcíny obsahovaly tentýž aktivní princip, přednostně konjugát alfa-globulinu s LHRH; LHRH je nejlépe přirozený LHRH a alfa-globulin lidského nebo koňského původu jsou zejména frakce IV-1 a/nebo IV-4. Konjugát je přednostně získáván přidáním 0,5 až 2 objemů 2,5% roztoku hydrochloridu N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimidu (EDC) v 0,9% NaCl k 1 objemu směsi alfa-globulinu a LHRH v roztoku obsahujícím 2 až 20 mg této směsi v ml

0,9 % NaCl. Po promíchání je směs ponechána přes noc a pak přečištěna gelově permeační chromatografií.

Pokud jde o nosičovou bílkovinu je možné použít sérových albuminů, zejména hovězího nebo lidského, thyroglobulinu ovalbuminu, lidského nebo koňského globulinu a anatoxinů, zejména tetanového anatoxinu.

Preferovaný velký rozsah imunitní odpovědi samců prasat na karboxyterminální frakci LHRH peptidu konjugovaného pomocí karbodiimidu anebo jeho agonisty, (D-Lys⁶)-LHRH, konjugovaného pomocí SPDP, s alfa-globulinem, vedla k definici imunogenního konjugátu na bázi anti-LHRH používající s výhodou peptid obsahující karboxylový konec LHRH.

V důsledku toho a podle druhého preferovaného provedení vynálezu přihlašovatel našel, že je velmi výhodné použít nového peptidu, který obsahuje posledních 8 aminokyselin LHRH, tedy dekapektidu o složení



kteřý má velkou imunogenní aktivitu a přitom nevykazuje hormonální aktivitu přirozeného LHRH.

Předmětem vynálezu je tedy tento nový peptid (3 - 10) a konjugáty tento peptid zahrnující, navázaný na jednu z výše zmíněných imunogenních nosičových bílkovin, ovalbumin a koňský alfa-globulin, zejména na frakce IV-1 a/nebo IV-4, které jsou preferovány.

V tomto vynálezu je karbodiimid preferován před glutaraldehydem a před heterobifunkčními činidly jako činidlo pro konjugaci LHRH (3 - 10) peptidu zejména s koňským alfa-globulinem nebo s ovalbuminem.

Při přednostně používané přípravě konjugátu, LHRH (3 - 10) a nosičová bílkovina, ovalbumin nebo alfa-globulin, jsou rozpustěny každý v poměru 2 až 40 mg na ml pufru 0,1 M NaCl/0,1 M 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina. Pak se přidá 0,5 až 2 objemy 2,5%ního roztoku N-ethyl-N'-(3-dimethylamino-propyl)karbodiimidu v téměř pufru. Hodnota pH se nastaví 1 N NaOH. Po promíchání se směs odstaví přes noc a pak se přečistí gelově permeační chromatografií, která odstraní ne-
navázaný LHRH (3 - 10), zbytek karbodiimidu a hydrolyzační

produkty.

Předmětem vynálezu jsou rovněž nové vakcíny na bázi anti-LHRH, které používají takovéto konjugáty jako aktivní principy použitelné metodou podle tohoto vynálezu.

Předmětem vynálezu je rovněž pasivní anti-LHRH (3 - 10) imunizace v souladu s výše popsanou metodou.

Vynález se rovněž týká souprav v jednom balení obsahujících stejný počet dávek vakcíny, která má být aplikována před porážkou a vakcíny k aplikování v primární injekci. Přednostně jsou tyto vakcíny baleny ve sníženém objemu o zvýšené koncentraci pro aplikaci transkutánní tryskou, např. podle francouzské patentové přihlášky citované výše.

Vynález bude nyní popsán podrobněji pomocí srovnávacích testů různých produktů a vakcinačních metod podle tohoto vynálezu na straně jedné a a na straně druhé pomocí testů, které prokázaly velký rozsah imunitní odpovědi u samců prasat na karboxyterminální část LHRH peptidu a testů vakcinace na bázi LHRH prováděné na samcích prasat podle tohoto vynálezu.

1 - POUŽITÍ CELÉHO LHRH

A. Větší imunogenní aktivita konjugátu zachovávajícího nejdelší karboxyterminální část LHRH peptidu a výběr konjugátu založeného na přirozeném LHRH přednostně před konjugátem získaným na bázi agonisty (D-Lys⁶)-LHRH.

A1.- Anti-LHRH imunizace intaktních samců prasat a samic krys.

Porovnání aktivity dvou anti-LHRH vakcín složených z konjugátu přírodní formy LHRH (B1 a B2) nebo (D-Lys⁶)-LHRH (A1 a A2) s lidským albuminem, přičemž konjugáty jsou získány pomocí karbodiimidu ve vodní fázi resp. pomocí SPDP, uvedeny do emulze oleje ve vodě a podány intramuskulárně prasatům a subkutánně krysám, vede k těmto závěrům:

- Větší aktivita vakcíny založené na přirozeném LHRH: je zapotřebí menšího množství LHRH peptidu než konjugovaného (D-Lys⁶)-LHRH peptidu aby byl získán větší počet zvířat dávajících imunitní odpověď (Tabulka 1 a 3).

- Účinek dávky, který se projevuje v získání většího

poctu zvířat dávajících imunitní odpověď se stejným konjugátem (Tabulka 3).

A1.1 - Příprava konjugátů (D-Lys⁶)-LHRH s albuminem s pomocí SPDP.

Příprava konjugátů (D-Lys⁶)-LHRH s albuminem je prováděna ve třech stupních: příprava (N-[3-(pyridyldithio)propanoyl]-D-Lys⁶)-LHRH, příprava N-(3-merkaptopropanoyl)albuminu, pak navázání.

(N-[3-(3-Pyridyldithio)propanoyl]-D-Lys⁶)-LHRH je připraven reakcí přebytku SPDP s LHRH ve vodném roztoku (6 mmol SPDP na mol LHRH) a pak, po odatavení reakční směsi při 4°C přes noc, je produkt získán odstředěním. Ten se rozpustí v 2 M močovíně a testuje se přítomnost 2-pyridyldithio skupin.

N-(3-Merkaptopropanoyl)albumin se získá působením 0,2 mmol SPDP na 1 g lidského albuminu rozpuštěného ve 100 ml fosfátového pufru a, po odatavení reakční směsi při 4°C přes noc a jejím okyselení na pH 6, redukcí dithiothreitem. Pak je produkt přečištěn gelovou chromatografií. Zkouška thiolů a proteinu poskytne údaj o stupni substituce.

Navázání je provedeno s použitím jedné pyridylthiothioskupiny na 1,25 thiolových skupin. pH se nastaví na 7-7,5 a po jedné hodině se výtěžek stanoví měřením uvolněného 2-pyridinthionu.

Průměrný stupeň substituce je odvozen ze získaného údaje. Konečně je konjugát přečištěn chromatografií a zkoncentrován ultrafiltrací.

A1.2 - Příprava konjugátu LHRH s albuminem s pomocí karbodiimidu.

Hydrochlorid N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu v množství 1 000 mg, rozpuštěný bezprostředně před použitím ve 40 ml 0,9%ního NaCl, se přidá k 300 mg LHRH a 300 mg lidského albuminu, rozpuštěných v 30 ml 0,9%ního NaCl. Po promíchání se směs odstaví přes noc při laboratorní teplotě a chrání se před světlem. Pak se směs chromatografuje na Sephadexu G-50; frakce odpovídající konjugátu jsou sbírány, případně zkoncentrovány a zmrazeny.

Ve frakcích obsahujících nenavázaný LHRH se stanoví

jeho množství a tím průměrná hladina konjugace. Tato hodnota je reprodukovatelná a kolísá mezi 8 a 10 mg LHRH na 100 mg albuminu.

Výsledek chromatografie konjugátu a tím i množství (nebo koncentrace) LHRH jsou odvozeny z ultrafialových spekter konjugátu před a po chromatografii.

A1.3 - Testovací postupy

Titr protilátek se stanoví technikou popsanou JEFFCOATEM a ost., Acta Endocr., Copenh., 1974, 75: 625-635.

Testosteron se stanovuje přímo v plazmě technikou RIA používající testosteron C19-karboxymethyl ether-[125I] histamin jako radioligand.

Vazba na značený peptid je stanovena po substituci ročních peptidů jódem-125 podle COPPOLANDA a ost., Endocr., 1979 104, 1504-1506 a technikou popsanou JEFFCOATEM a ost., Acta Endocr., Copenh., 1974, 75: 625-635.

A1.4 - Znázornění

- Testy na krysách

. Tabulka 1: odpověď anti-LHRH protilátek měřená podle stupně vazby LHRH značeného jódem-125

. Tabulka 2: účinek anti-LHRH imunizace na koncentraci plazmového testosteronu

. Dávkování

Vakciny A1 : 50 µg konjugovaného (D-Lys⁶)-LHRH

B1 : 12 µg konjugovaného LHRH

- Testy na intaktních samcích prasat

. Tabulka 3 : odpověď anti-LHRH protilátek měřená stupněm vazby LHRH značeného jódem-125.

. Dávkování

Vakciny A1 : 0,5 mg konjugovaného (D-Lys⁶)-LHRH

A2 : 6 mg konjugovaného (D-Lys⁶)-LHRH

B1 : 0,15 mg konjugovaného LHRH

B2 : 1,20 mg konjugovaného LHRH

Tabulka 1

ODPOVĚĎ ANTI-LHRH PROTILÁTEK MĚŘENÁ STUPNĚM VAZBY LHRH
OZNAČENÉHO JÓDEM-125

TESTOVÁNÍ PROTILÁTEK (% pl/c) V SÉRU

Ind.	Čas tyd.	Skupina A1 50 µg D-Lys ⁶ -LHRH/HSA/AE1	Skupina B1 12 µg LHRH/EDC/HSA/AE1	Titř pl/c =50%
SC	0	-	-	-
		-	-	-
		-	-	-
		-	-	-
SC	4	0,0	15,4	<100
		7,8	7,6	<100
		0,0	35,3	<100
		0,0	51,1	100
	5	4,3	91,1	1 600
		14,1	85,3	980
		5,9	70,8	270
		15,8	94,9	2 100
	6	0,0	64,3	120
		11,3	67,9	220
		11,7	96,1	2 400
		0,0	68,3	280
	7	14,5	72,5	400
		0,0	92,4	2 100
		0,0	64,2	200
		11,5	67,2	240
	8	19,6	70,4	310
		0,0	98,8	3 200
		9,2	68,7	2 200
		0,0	38,8	310

Tabulka 2

VLIV LOKALNÍ ANTI-LHRH IMUNIZACE NA KONCENTRACI TESTOSTERONU
V PLAZMĚ

TESTOVÁNÍ TESTOSTERONU V PLAZMĚ KRYŠ (ng/ml)

inj.	Čas tyd.	Kontr.	Skupina A1 50 µg D-Lys ⁶ -LHRH/PDP/AE1	Skupina B1 12 µg LHRH/EDC/HSA
SC	0	0,40 0,26 0,47 0,00	- - - -	- - - -
SC	4	2,25 1,05 2,34 -	4,16 5,83 4,43 4,17	2,51 2,38 3,63 0,58
	5	3,80 1,76 5,05 6,67	2,99 2,33 2,85 1,54	0,00 0,00 0,00 0,00
	6	2,01 4,47 4,69 1,96	3,26 0,09 1,10 -	0,00 0,00 0,00 0,00
	7	2,28 1,92 1,89 1,65	1,32 0,89 1,59 2,17	0,00 0,00 0,00 0,00
	8	0,97 1,91 2,71 1,22	1,75 1,48 1,91 2,33	0,00 0,00 0,00 0,00

Tabulka 3

ODPOVĚĎ ANTI-LHRH PROTILÁTEK MĚŘENÁ STUPNĚM VAZBY LHRH ZNAČENÉHO JÓDEM-125
TESTOVÁNÍ ANTI-LHRH PROTILÁTEK V SÉRU (ZŘED. 1/50)

Čas týd.	D-Lys ⁶ -LHRH/PDP/HSA/AE1 0,5 µg (A1)					D-Lys ⁶ -LHRH/PDP/HSA/AE1 6 µg (A2)					Titr (pI/ž=50 %)	
	211	219	231	243	257	205	221	227	245	251	A1	
TO 1. inj.											počet prasat 221	
T3	0	0	0	0	0	0	71,8	0	0	0	150	
T4	0	0	0	0	0	0	67,3	0	0	0	100	
T5 2. inj.	0	0	0	0	0	0	53,4	0	0	0	50	
T6	0	0	0	0	0	14,2	58,5	42,1	6,6	0	55	
T7	0	0	0	0	0	7,5	48,5	36,7	5 ⁹	0	<50	
T8	0	0	0	0	0	7,7	44,1	28,8	5	0	<50	
T9	0	0	0	0	0	5	37,5	22,6	5	0	<50	
Čas týd.	LHRH-(KARBO)/HSA/AE1 0,150 mg (B1)					LHRH-(KARBO)-HSA/AE1 1,2 mg (B2)					B1	
	213	225	247	255	261	209	215	235	241	259	B2	
TO 1. inj.											počet prasat	
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	247	
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	235	
T5 2. inj.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	259	
T6	0	0	81,2	5	25,1	48,9	56,2	78,2	31,4	90,1	200	
T7	0	0	81,7	5	49,1	64,7	49,9	86,3	52,3	92,9	130	
T8	0	0	80,5	5	36,5	54,1	48,9	80,7	59,3	90,5	170	
T9	0	0	74,4	5	34,5	54,4	40,1	68,5	51,6	89,1	150	
											220	

A2 - srovnávací test dvou anti-LHRH vakcín složených z konjugátu LHRH s α -globulinem připraveného s pomocí karbodiimidu, resp. konjugátu (D-Lys⁶)-LHRH s α -globulinem připraveného pomocí SPDP a aplikovaných v emulzi oleje ve vodě intramuskulárně (IM) anebo transkutánně (ID) prasatům.

A2.1 - Příprava konjugátu (D-Lys⁶)-LHRH s α -globulinem s pomocí SPDP.

Metoda popsaná v Příkladu 1 se použije přesně stejným způsobem, ale albumin v koncentraci 10 mg/ml se nahradí α -globulinem v koncentraci 6 mg/ml.

Celkový výtěžek navázaného (D-Lys⁶)-LHRH je řádově 45 až 50 %.

Je navíc možné modifikovat libovolně stupeň substituce α -globulinu a tak stupeň konjugace tím, že se mění koncentrace SPDP a/nebo α -globulinu během přípravy MP- α -globulinu.

A2.2 - Příprava konjugátu LHRH s lidským α -globulinem s pomocí karbodiimidu (EDC).

Použije se metoda popsaná v Příkladu A1 přesně stejným způsobem, ale lidský albumin se nahradí lidským α -globulinem. Hladina konjugace je 24 až 28 mg LHRH vázaného na 100 mg lidského α -globulinu.

A2.3 - Účinnost vakcíny založené na konjugátu LHRH s α -globulinem je vyšší než u druhé vakcíny. Účinnost je vyjádřena v počtu zvířat, které vykazují úplné vymizení testosteronu z plazmy.

Tabulka 4

	LHRH- α -globulin.EDC (1,2 mg) IM + ID	(D-Lys ⁶)-LHRH- α -globulin.SPDP (6 mg) IM + ID
Vymizení testo- steronu steronu	5/10	2/10

A.2 - velký rozsah imunitní odpovědi samců prasat na aplikaci karboxyterminální peptidové frakce LHRH konjugované s pomocí karbodiimidu, nebo jeho agonisty, (D-Lys⁶)-LHRH, konjugovaného s pomocí SPDP, s lidským α -globulinem.

Tato odpověď se stanoví ze srovnání procenta vazby anti-LHRH a anti-(D-Lys⁶)-LHRH sér dvěma značenými fragmenty LHRH, a to LHRH (1 - 10) s deletí aminoterminální části, a LHRH (1 - 10), který je ve formě volné kyseliny v důsledku delece provedené v jeho karboxyterminální části. Tyto dvě frakce specificky rozeznávají protilátky proti karboxyterminální, resp. aminoterminální části řetězce peptidu.

Rozsahová odpověď na karboxyterminální část řetězce peptidu se projevuje v počtu zvířat, která mají protilátky vazící pouze peptid LHRH (3 - 10) oproti těm, která mají protilátky vazící výlučně LHRH ve formě volné kyseliny (10/58 u anti-LHRH séra a 3/10 u anti-(D-Lys⁶)-LHRH séra).

Sodné sérum nevykazovalo 100%ní vazbu LHRH ve formě volné kyseliny, která by ukazovala na specifické rozpoznání aminoterminální frakce.

Nejčastější byly smíšené odpovědi, které vykazovaly lepší rozpoznání aminoterminální frakce anti-(D-Lys⁶)-LHRH séry než anti-LHRH séry. Z anti-LHRH sér pouze 3 z 58 vykazovaly rozpoznávací schopnost pro aminoterminální frakci vyšší než 40 % kdežto u anti-(D-Lys⁶)-LHRH sér tato hodnota byla 4 séra z 10.

2 - větší imunogenní aktivita konjugátu LHRH s α -globulinem, připraveného s pomocí karbodiimidu, ve srovnání s konjugátem připraveným s pomocí glutaraldehydu.

B.1 - Příprava konjugátu LHRH s α -globulinem s pomocí glutaraldehydu

Objem 2,5 ml roztoku glutaraldehydu, který obsahuje 10 mg/ml, se přidá po kapkách během 30 min k 10 mg LHRH a 50 mg lidského α -globulinu (Serva), rozpuštěným v 5 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,5; po každém přidání se promíchá. Reakční směs se ponechá 2,5 h při laboratorní teplotě a reakce se zastaví přidáním 25 mg bisulfitu sodného

rozpuštěno v 5 ml vody. Konjugát se dialyzuje při 4 °C proti 150 mM NaCl v 10 mM fosfátovém pufru o pH 7,5 a pak se koncentruje ultrafiltrací.

22. - Srovnávací test anti-LHRH vakcín obsahujících stejné množství konjugovaného LHRH na prasatech (Tabulka 7)

Tabulka 7

	LHRH- α -globulin (přípr. s karbo- diimidem) podán IM nebo ID	LHRH- α -globulin (přípr. s glutar- aldehydem) podán IM nebo ID
Vymizení testo- steronu z plazmy	5/10	0/10

C - vyšší imunogenní aktivita konjugátu založeného na lidském α -globulinu ve srovnání s konjugátem na bázi lidského serumalbuminu.

Účinnost je vyjádřena počtem zvířat, která vykazují opětné vymizení testosteronu z jejich plazmy (Tabulka 8).

Tabulka 8

TESTY NA PRASATECH - INTRAMUSKULÁRNÍ INJEKCE

	LHRH-HSA připravený s karbodiimidem	LHRH- α -globulin připravený s karbodiimidem
Vymizení testo- steronu z plazmy	0/5	3/5

D - Imunogenní aktivita konjugátu používajícího koňský α -globulin, frakci IV-1, ekvivalentní konjugátu založenému na lidském α -globulinu.

D.1 - Příprava konjugátu LHRH s koňským α -globulinem s pomocí karbodiimidu.

Je použita metody přesně stejným způsobem jak popsáno v příkladu A1 s tím rozdílem, že lidský albumin se nahradí koňským α -globulinem (frakce IV-1).

D.2 - Subkutánní aplikace vakcíny v dávce 12 μ g LHRH konjugovaného s lidským anebo koňským α -globulinem krysám dvakrát v intervalu 4 týdnů.

Tabulka 9

TESTY NA KRYSÁCH

	LHRH-lidský α -globulin frakce IV-1 připravený s karbodi- imidem	LHRH-koňský α -globulin frakce IV-1 připravený s karbodi- imidem
Vymizení testosteronu z plazmy	12/12	12/12

E - větší adjuvantní aktivita emulze oleje ve vodě podle vynálezu oproti jiným emulzím (Tabulka 10).

Testy provedeny na prasatech s použitím téhož konjugátu složeného z LHRH a lidského α -globulinu a připraveného s pomocí karbodiimidu, aplikována též dávka transkutánně na 5 místech.

Zkoumané emulze: kapalná emulze oleje ve vodě (B), emulze podle vynálezu (vzorec C v tabulce), komerční emulze seřazená antigenem (E) a olejová fáze emulzifikovaná s konjugátem (F).

U všech těchto formulací bylo konečné množství antigenu v dávce stejné.

Emulze byly připraveny za obvyklých podmínek používaných těmi, kteří se zabývají formulacemi tohoto typu.

Tabulka 10

Emulze	B	C	E	F
Vymizení testosteronu z plazmy	2/5	4/4	1/5	3/5
Pocet zvířat vykazujících koncentraci androsteronu v tkáni pod 0,5 µg/g	2/5	4/4	3/5	3/5

F. - Účinnost pasivní anti-LHRH imunizace na zlepšení organoleptických vlastností masa, měřená poklesem androsteronu v tkáni

Tabulka 11

OPSAN ANDROSTENONU V ADIPOSOVÉ TKÁNI KONTROLNÍCH ZVÍŘAT A ZVÍŘAT PODROBENÝCH PASIVNÍ IMUNONEUTRALIZACI POMOCÍ HYPERIMUNNÍ KOŇSKÉ ANTI-(D-Lys⁶)-LHRH PLAZMY PODANÉ V OBJEMU 300 ML 16., 13., 9. a 5. DEN PŘED PORÁŽKOU

	Kontroly	Pokusná zvíř.
Pocet zvířat vykazujících koncentraci androsteronu pod 0,50 µg/g adiposové tkane	2/5	5/5

(signifikantní rozdíl při α -riziku = 0,2)

6. - Účinnost a tolerabilita formulací obsahujících LHRH konjugovány s α -globulinem s pomocí karbodiimidu ve izotmě emulze vody v oleji (1. vakcína) a v hydroxidu hlinitém s saponinů (2. vakcína); podány transkutánně s obsahem stejného množství LHRH v dávce na počátku výkrmného období, resp. 19 až 21 dnů před porážkou s použitím injektoru bez jeniv známého jako Pigjet.

Dva testy byly provedeny ve dvou různých intervalech, a to pro skupiny 1, 3 a 5 v prvním intervalu a pro skupiny 2 a 4 ve druhém intervalu (Tabulka 12 a 13).

6.1 - Účinnost imunoneutralizace s pomocí anti-LHRH roste při stejném objemu vakcíny s počtem míst transkutánní aplikace.

Tabulka 12

Skupina	1	2	3	4	5
1. vakcína	1 ml (5 míst)	1 ml (3 místa)	1 ml (5 míst)	0,4 ml (10 míst)	0,4 ml (2 místa)
2. vakcína	1 ml (5 míst)	1 ml (5 míst)	0,4 ml (2 místa)	0,4 ml (10 míst)	0,4 ml (2 místa)
Vymizení nebo výrazný pokles androsteronu (počet zvířat)	10/12	10/11	9/12	11/11	8/11
Koncentrace androsteronu v tkáni pod 0,5 $\mu\text{g/g}$ (počet zvířat)	11/12	n	10/23	n	n

n = nestanoveno

6.2 - Tolerance k vakcínám je posuzována podle vzniku

zaznamy reakce na kůži, odstupňované od 0 do 4, na daném zvířeti podle velikosti pupínků objevujících se po aplikaci; pupínek se objevuje na každém místě aplikace. Součet skóre v každé skupině je sumarizován takto: průměrné skóre na konci prvního týdne po aplikaci (apl. 1) a průměrné skóre v době porážky pro každou vakcínu (S1) (Tabulka 13). Nejlepší tolerance pozorována při použití vakcín ve skupině 4.

Tabulka 13

TOLERANCE PŘI TRANSKUTÁNNÍ APLIKACI BĚHEM DVOU TESTŮ

(test 1 se skupinami 1, 3 a 5, test 2 se skupinami 2 a 4)

Skupina	1		2		3		4		5	
Vakcina 1 nebo 2	1. vak.	2. vak.	1. vak.	2. vak.	1. vak.	2. vak.	1. vak.	2. vak.	1. vak.	2. vak.
Počet míst aplikace	5	5	5	5	5	2	10	10	2	2
Ad. 1	42	11	31	11	41	16	33	11	30	10
S1	2	4	0	0	5	3	0	0	2	0
Počet zvířat	12		11		12		11		11	

B1 - POLYMERIZACE PEPTIDU (3 - 10)

A. techniky měření anti-LHRH imunitní odpovědi a biologické účinnosti pomocí stanovení testosteronu v plazmě a tkáni.

Imunitní odpověď anti-LHRH je měřena stanovením titru protilátek postupem popsaným JEFFCOATEM a ost., Acto. Endocr. (Copenh.), 1974, 75, 625-635.

Vazba na značené peptidy se stanoví po substituci různých peptidů jódem-125 podle COPPOLANDA a ost., Endocrinology, 1979, 104, 1504-1506. Stanovení séra ve smyslu obsahu těchto peptidů se provede postupem JEFFCOATA a ost. popsaným výše.

Biologická účinnost se posuzuje podle snížení anebo vymizení testosteronu z plazmy a tkáni. Test testosteronu v plazmě se provádí přímo s plazmou RIA technikou s použitím radioligandu, kterým je testosteron C19-karboxymethylether-[125I]nistamin (FURUYAMA S. a ost., Steroids, 1972, 16, 415). Test testosteronu v tkáni se provádí se vzorkem adiposové tkáně pomocí RIA techniky s použitím radioligandu, kterým je α -[3H]androstenon popsaný CLAUSENEM, C. R. Acad. Sci., Paris, 1974, 229-302).

B. Velký rozsah imunitní odpovědi samců prasat na karboxyterminální frakci LHRH peptidu konjugovaného s α -globulinem pomocí karbodiimidu nebo jeho agonisty, (D-Lys⁶)-LHRH, konjugovaného s pomocí SPDP.

Konjugát s výhodou získaný přidáním 0,5 až 2 objemů 2,5%ního roztoku hydrochloridu N-ethyl-N'--(3-dimethylamino-propyl)karbodiimidu (EDC) v 0,9 % NaCl k jednomu objemu směsi α -globulin/LHRH v roztoku obsahujícím 2 až 20 mg této směsi v jednom ml 0,9%ního NaCl. Po promíchání se směs odstaví přes noc a pak předělá gelovou permeační chromatografií.

B2. Příprava konjugátů (D-Lys⁶)-LHRH s lidským α -globulinem pomocí SPDP.

Příprava konjugátů (D-Lys⁶)-LHRH s lidským α -globulinem se provede ve třech stupních, kterými jsou příprava (N-[3-(2-pyridyldithio)propanoyl]-D-Lys⁶)-LHRH, příprava N-(3-merkaptopropanoyl) derivátu lidského α -globulinu a nako-

(H-[3-(2-Pyridyldithio)propanoyl]-D-Lys⁶)-LHRH se připraví reakcí přebytku SPDP s LHRH ve vodném roztoku (6 mol LHRH na mol (D-Lys⁶)-LHRH), směs se ponechá při 4° C přes noc a pak se produkt získá centrifugací. Produkt se rozpustí v 0,2 M roztoku a pak se testuje obsah 2-pyridyldithioskupin.

H-[3-Merkaptopropanoyl] derivát lidského α -globulinu se získá působením 0,2 mmol SPDP na 0,6 g lidského α -globulinu rozpuštěného ve 100 ml 0,1 M fosfátového pufru; po reakci přes noc při 4° C a okyselení na pH 6 se produkt získá redukcí dithiothreitem. Produkt se pak přečistí gelovou chromatografií. Průměrný stupeň substituce se posuzuje podle stanovení obsahu thiolových skupin a bílkoviny.

Vazba se provede s použitím jedné 2-pyridyldithio-skupiny na 1,25 thiolových skupin. Hodnota pH se nastaví na 7 až 7,5 a pak, po jedné hodině, se stanoví výtěžek změřením uvolněného 2-pyridinthionu.

Průměrný stupeň substituce je dedukován z této hodnoty. Konjugát se konečně přečistí chromatografií a zkoncentruje ultrafiltrací. Celkový výtěžek navázaného (D-Lys⁶)-LHRH je řádově 45 až 50 %.

23. Rozsah imunitní odpovědi samců prasat na aplikaci karboxyterminální frakce peptidu LHRH konjugovaného za podmínek popsaných v A1 a A2 se stanoví ze srovnání vazebných schopností anti-LHRH séra a anti-(D-Lys⁶)-LHRH séra pro dva značené fragmenty LHRH, (LHRH (3 - 10) (LHRH s delecí v aminoterminální části řetězce) a LHRH (1 - 10) ve formě volné kyseliny (LHRH s delecí amidové skupiny v karboxyterminální části řetězce). Tyto dvě frakce rozeznávají s větší specificitou protilátky proti karboxyterminální frakci na straně jedné a aminoterminální frakci na straně druhé.

Odpověď na karboxyterminální frakci peptidu dávají obecně všechna zvířata imunizovaná jedním nebo druhým konjugátem (61/68). Séra 3 z 10 zvířat z celkového počtu 10 imunizovaných konjugátem (D-Lys⁶)-LHRH a séra 10 zvířat z celkového počtu 68 imunizovaných konjugovaným LHRH vázala výhradně karboxyterminální frakci. Ostatní zvířata dávají smíšenou odpověď převážně na karboxyterminální frakci.

Odpověď na aminoterminální frakci nemá obecný výskyt

konjugátu. Jedné sérum nevázálo specificky LHRH ve formě volné kyseliny.

C. Testy aktivní anti-LHRH imunoneutralizace s konjugátem konjugátu LHRH (3 - 10) s frakcí IV-4 koňského α -globulinu a konjugátu LHRH (3 - 10) s ovalbuminem, připravených s pomocí karbodiimidu.

Q1. - Příprava konjugátu LHRH (3 - 10) s frakcí IV-4 koňského α -globulinu s pomocí karbodiimidu.

LHRH (3 - 10) v množství 85 mg a 170 mg frakce IV-4 koňského α -globulinu se rozpustí v 12,8 ml pufru o složení 0,1 M NaCl/0,1 M 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina. Pak se přidá 212 mg N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu rozpustěného v 17 ml uvedeného roztoku. Hodnota pH se ihned nastaví na 6,0 pomocí 1,3 ml 1 N hydroxidu sodného.

Směs se promíchá a odstaví na 16 h při laboratorní teplotě a konjugát se pak přečistí gelovou permeační chromatografií, aby se oddělil konjugát od nekonjugovaného LHRH. Odcentem nekonjugovaného LHRH lze stanovit množství navázaného LHRH. Lze tedy tak stanovit výtěžek vazby.

Q2. Příprava konjugátu LHRH (3 - 10) s ovalbuminem pomocí karbodiimidu.

LHRH (3 - 10) v množství 60 mg a 120 mg ovalbuminu se rozpustí v 9 ml pufru 0,1 M NaCl/0,1 M 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina. Hydrochlorid N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu v množství 150 mg a rozpouštěný v 12 ml tohoto pufru se pak přidá k roztoku. Hodnota pH se nastaví na 7,0 pomocí 1N hydroxidu sodného (zhruba 1,9 ml). Směs se odstaví přes noc při laboratorní teplotě a pak se vyčerpá centrifugací. Supernatant se chromatografuje na Sephadexu, aby se odstranil konjugát od nereagovaného LHRH a produktů rozpadu karbodiimidu. Výtěžek vazby lze LHRH (3 - 10) stanovit z určení množství nenavázaného LHRH (3 - 10).

Q3. - Imunitní odpověď, biologická účinnost a tolerance k anti-LHRH vakcině založené na konjugaci fragmentů LHRH (3 - 10) a frakce IV-4 koňského α -globulinu pomocí karbodiimidu.

Formulace složené z konjugovaného LHRH (3 - 10) v emulzi vody v oleji (1. vakcína) a v emulzi gelu hydroxidu hlinitého

a saponinu (2. vakcína) byly aplikovány transkutánně 6 samcům prasat v objemu 0,4 ml jedna dávka, a to na počátku výkrmného období a 17 dne před porážkou s použitím injektoru bez jehly, znaného jako Ridjet injektor, tak, že dávka byla rozdělena na dva podíly po 0,2 ml vstříknuté na 5 místech.

Imunitní odpověď byla maximální 10 dnů po podání 2. vakcíny. Jednotlivé titry protilátek (reciproká hodnota zředení při němž bylo vázáno 50 % jódu-125) byly tyto:

Den 10	380	660	2 700	3 200	4 600	13 000
Den 16	290	400	2 000	2 400	3 100	8 600

Biologická účinnost této imunitní odpovědi se projevuje vymizením testosteronu z plazmy od 10. dne po podání 2. vakcíny ve všech 6 zvířatech. Vymizení testosteronu je za těchto podmínek provázeno vymizením androstenonu z tkáně.

Tolerance k vakcíně je posuzována podle vzniku zanětlivé kožní reakce odstupňované podle velikosti pupínků objevujících se na každém místě vakcíny po jejím podání. Místní zanět zcela zmizel od 10. dne po aplikaci 2. vakcíny.

PATENTSERVIS
PRAHA
Kadlecová

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Metoda na zlepšení organoleptických vlastností, zejména vonné, chuti a křehkosti masa z nevykastrovaných samců domácího zvířata, vyznačující se tím, že krátce před porážkou zvířete se působení androgenních a neandrogenních steroidů v podstatě odstraní aktivní anebo pasivní imunoneutralizací na bázi anti-LHRH přičemž výhody vyplývající ze samčího pohlaví zvířete jsou v zásadě zachovány až do doby porážky.
2. Metoda podle nároku 1 vyznačující se tím, že se nejprve poda anti-LHRH vakcína a pak krátce před porážkou zvířete se podání anti-LHRH vakcíny opakuje.
3. Metoda podle nároku 2 vyznačující se tím, že vakcína navržena tak, aby indukovala primární imunitní odpověď o nízké intenzitě bez výrazného či dokonce měřitelného účinku na sekreci gonádových steroidů, se aplikuje jako první a vakcína formulovaná tak, aby odstranila nebo výrazně snížila sekreci steroidů bez vyvolání nepříznivé místní či celkové reakce narušující vzhled či kvalitu masa, se aplikuje před porážkou.
4. Metoda podle nároku buď 2 nebo 3 vyznačující se tím, že anti-LHRH vakcína podávaná jako první se aplikuje před obdobím vykrmu zvířete.
5. Metoda podle kteréhokoli z nároků 2 až 4 vyznačující se tím, že anti-LHRH vakcína podávaná před porážkou je ve formě emulze.
6. Metoda podle kteréhokoli z nároků 2 až 5 vyznačující se tím, že prasatům se vakcína aplikuje s adjuvantem vodného typu.
7. Metoda podle nároku 6 vyznačující se tím, že hydroxid hliníový anebo saponin se použije jako adjuvans vodného ty-

pu.

8. Metoda podle nároku 6 nebo 7 vyznačující se tím, že vakcína se podá ve vodném adjuvantu 15 až 21 dnů před porážkou.
9. Metoda podle kteréhokoliv z nároků 2 až 5 vyznačující se tím, že u skotu a ovci se anti-LHRH vakcína podá před porážkou s adjuvantem ve formě emulze.
10. Metoda podle nároku 9 vyznačující se tím, že vakcína ve formě emulze se aplikuje jeden až dva měsíce před porážkou.
11. Metoda podle nároku 9 nebo 10 vyznačující se tím, že vakcína ve formě emulze se aplikuje čtyři týdny až několik měsíců po prvním podání.
12. Metoda podle kteréhokoliv z nároků 4 a 9 až 11 vyznačující se tím, že vakcína ve formě emulze je vakcína v emulzi vody v oleji.
13. Metoda podle nároku 12 vyznačující se tím, že emulze vody v oleji se připravuje ze směsi vysoce čištěných minerálních olejů a neiontových povrchově účinných látek.
14. Metoda podle kteréhokoliv z nároků 2 až 13 vyznačující se tím, že se aplikuje imunogenní konjugát na bázi anti-LHRH obsahující tyto složky:
 - celý nebo modifikovaný LHRH
 - peptidový fragment LHRH modifikovaný či jiný nebo
 - agonista LHRH navázaný na některou z těchto imunogenních nosičových bílkovin:
 - hovězí nebo lidský serumalbumin
 - thyroglobulin
 - ovalbumin
 - anatoxiny, zejména tetanový anatoxin
 - lidské anebo koňské globuliny

12. Metoda podle nároku 14 vyznačující se tím, že konjugát obsahuje LHRH (3 - 10) navázaný na koňský alfa-globulin, zejména na frakce IV-1 a/nebo IV-4.
13. Metoda podle nároku 14 vyznačující se tím, že konjugát obsahuje LHRH (3 - 10) navázaný na koňský alfa-globulin, zejména na frakce IV-1 a/nebo IV-4 nebo na ovalbumin.
14. Metoda podle nároků 15 nebo 16 vyznačující se tím, že LHRH/LHRH (3 - 10) je navazován na imunogenní nosič s pomocí karbodiimidu.
15. Metoda podle nároku 1 vyznačující se tím, že hyperimunní anti-LHRH sérum anebo plazma se aplikuje zvířeti několik dní před porážkou.
16. Metoda podle nároku 1 vyznačující se tím, že anti-LHRH monoklonální protilátky jsou aplikovány zvířeti několik dnů před porážkou.
17. Metoda podle nároku 18 anebo 19 vyznačující se tím, že podání se provede subkutánně anebo intramuskulárně pět až patnáct dnů před porážkou.
18. Metoda podle kteréhokoliv z nároků 2 až 17 vyznačující se tím, že podání se provede transkutánně, nejlépe na několika místech, s použitím injekčního aparátu bez jehly, a to pomocí tlakové trysky.
19. Peptid o složení Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly.NH₂.
20. Konjugát obsahující peptid podle nároku 22 navázaný na imunogenní protein.
21. Konjugát podle nároku 23 vyznačující se tím, že imunogenní bílkovina se vybere z těchto bílkovin: ovalbumin, hovězí a lidský globulin, thyroglobulin, anatoxiny, zejména tetanový anatoxin, a lidský a hovězí sérový albu-

min.

23. Konjugát podle nároku 24 vyznačující se tím, že imunogenní nosičová bílkovina ze skupiny globulinů je konkrétně alfa-globulin, zejména jeho frakce IV-1 a/nebo IV-4.
24. Konjugát podle kteréhokoliv z nároků 23 až 25 vyznačující se tím, že peptid je navázan k imunogenní nosičové bílkovině s pomocí karbodiimidu.
25. Anti-LHRH vakcína navržená tak, aby indukovala imunitní odpověď nízké intenzity bez výrazného či dokonce měřitelného účinku na sekreci gonádových steroidů, a obsahující jako aktivní princip konjugát alfa-globulinu s LHRH anebo konjugát podle kteréhokoliv z nároků 23 až 26.
26. Anti-LHRH vakcína navržená tak, aby odstranila či výrazně snížila sekreci steroidů bez nepříznivé místní anebo celkové reakce schopné poškodit vzhled nebo kvalitu masa, a obsahující jako aktivní princip konjugát alfa-globulinu s LHRH anebo konjugát podle některého z nároků 23 až 26.
27. Anti-LHRH vakcína podle nároku 27 anebo 28, která má formu emulze vody v oleji.
28. Anti-LHRH vakcína podle nároku 29 vyznačující se tím, že emulze obsahuje směs vysoce čištěných minerálních olejů a neiontových povrchově účinných látek.
29. Anti-LHRH vakcína podle nároku 27 anebo 28, která je ve vodném adjuvantu.
30. Anti-LHRH vakcína podle nároku 31, která obsahuje gel hydroxidu hlinitého a/nebo saponin.
31. Souprava na vakcinaci na bázi anti-LHRH obsahující v jednom balení stejný počet dávek vakcíny, která se

aplikuje jako primární injekce, a vakcíny, která se
aplikuje před porážkou podle kteréhokoliv z nároků 27 až
32.

~~PATENTSERVIS
PRAHA~~

~~Radlauer~~