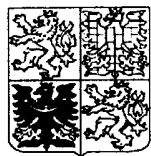


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287 775

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1992 - 3280

(22) Přihlášeno: 26.02.1992

(30) Právo přednosti:

01.03.1991 FR 1991/9102513

10.12.1991 FR 1991/9115289

(40) Zveřejněno: 13.10.1993

(Věstník č. 10/1993)

(47) Uděleno: 30.11.2000

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.01.2001

(Věstník č. 1/2001)

(86) PCT číslo: PCT/FR92/00176

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 92/15330

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/385

A 61 K 39/395

A 61 K 38/24

C 07 K 7/06

(73) Majitel patentu:

MERIAL, Lyon, FR;

(72) Původce vynálezu:

Dufour Raymond, Lyon, FR;

Roulet Claude, Venissieux, FR;

Chouvet Claire, Lyon, FR;

Bonneau Michel Bernard, Montfort, FR;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA, Jivenská 1/1273, Praha

4, 14021;

(54) Název vynálezu:

**Způsob zlepšení organoleptických vlastností
masa nevykastrovaných samců domácích zvířat**

(57) Anotace:

Vykrmují se nevykastrovaní samci skotu, ovcí a vepřů, obsahující androgenní a neandrogenní steroidy, umožňující vývoj samčí povahy zvířat. Před výkrmem nebo během něho se podá zvířatům anti-LHRH vakcína k vyvolání primární imunní odezvy o nízké intenzitě bez význačného nebo dokonce měřitelného účinku na gonadální steroidní sekreci za účelem umožnění rozvoje samčí povahy zvířat, načež se zvířatům před porážkou podá anti-LHRH vakcína k vyvolání anti-LHRH imunoneutralizace ke zrušení účinku androgenních a neandrogenních steroidů.

CZ 287775 B6

Způsob zlepšení organoleptických vlastností masa nevykastrovaných samců domácích zvířat

5 Oblast techniky

Vynález se týká metody na zlepšení organoleptických vlastností, zejména vůně, chuti a křehkosti, masa nevykastrovaných samců domácích zvířat, zvláště skotu, ovcí a prasat.

10

Dosavadní stav techniky

Výhody výkrmu intaktních místo kastrovaných samců při pěstování domácích zvířat na maso jsou zdůrazňovány zootechniky-specialisty po několik desetiletí. Tyto výhody jsou ve vyšší rychlosti růstu, zejména u skotu a ovcí, v lepším využití krmných dávek a v kvalitě masa poraženého zvířete, které jsou libovější, ale má současně u všech domácích zvířat vyšší podíl svalové tkáně (S.C. SEIDEMAN a ost., J. of Animal Acience, 1982, 55 (4) 826-840, a M. BONNEAU, INRA Prod. Amin., 1988, 1 (2) 133-140).

20 Hlavní nevýhody takovéhoho pěstování intaktních samců, tak jak jsou vyzdviženy ve výše uvedených přehledech, spočívají v nepříjemném zápachu a chuti masa ze samců prasat a ovcí a v menší křehkosti masa z intaktních samců skotu a ovcí a ovlivňují proto současné praktiky chirurgické kastrace.

25 Je skutečností, že androgenní steroidy, zahrnující androstendiol, androstendion a testosteron, které jsou rozhodujícími faktory pro získání výhod v pěstování domácích zvířat, pokud jde o rychlý růst a lepší využití krmných dávek, jsou i zodpovědné za menší křehkost masa, získaného z intaktních samců skotu a ovcí. Neandrogenní steroidy anebo deriváty 16-androsteronu včetně 5 α -androstenu (5 α -androst-16-en-3-onu) jsou zčásti zodpovědné u samců prasat za nepříjemný zápach a chuť masa, získaného potom, co samci dosáhli puberty, a tyto
30 faktory snižují kvalitu masa a jsou na zábranu jeho marketingu v čerstvém stavu.

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

40 Pokusně byla zkoumána možnost snížení anebo odstranění samčích 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
45 provedeny pokusy o snížení hladiny 5 α -androstenu, hormonu ze skupiny 16-androstenu, v tkáni cestou aktivní imunizace proti této látce (E.D. WILLAMSON a ost., Livestock Production Science, 1985, 12, 251-264) anebo pasivní imunizací proti téže látce (R. CLAUS, Immunization with Hormenes in Reproduction Research, red. Nieschlag, 1975). Je možné pokoušet se o zastavení anebo snížení sekrece testikulárních steroidů imunoneutralizací genodotropního hormonu LH, který je specifický pro daný druh (R.E. FALVO a ost., J. Amin. Acience, 1986, 63, 986-994), anebo anti-LHRH imunoneutralizací endogenního LHRH. Pouze
50 aktivní imunizace pomocí anti-LHRH byla doporučena různými autory. U prasat se podařilo docílit snížení α -androstenu 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. Amin. Sci., 1986, 63, 986-994).

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

5

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 přilehlých žláz, zástavy spermatogeneze a na behaviorální úrovni vymizení libida.

10

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

Tak v US Patentu 4 556 555 je popisována metoda pasivní imunizace zvířat před pubertou s použitím antiséra, které obsahuje protilátky proti genadotropinu.

20

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

25

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 očkovaní ve věku 8 až 40 týdnů a pak dostali několik posilovacích dávek (boosterů)

30

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

35

R.E. FALVO a ost. (J. Amin. Sci. 1986, 63:(986–994) imunizovali několik skupin býků pomocí konjugátů LHRH s lidským sérovým globulinem v kompletním Freundově adjuvantu anebo s muramylpeptidem jako adjuvantem. Po vakcinaci a použití několika posilovacích dávek (boosterů) autoři pozorovali vysoké titry anti-LHRH protilátek, avšak museli opětovně použít posilovacích dávek (boosterů) aby tento vysoký titer protilátek udrželi.

40

I. S. ROBERTSON popisuje metodu imunizace pomocí LHRH, navázaného k tetanovému anatoxinu anebo k thyroglobulinu a soudí, že tento imunologický postup by umožnil pozdní kastraci s příznivým dopadem na váhové 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 Freudovo adjuvans je pro praxi zakázáno.

45

Konečně A. CARATY a M. BONNEAU (C. R. Acad. Sc., Paris, sv. 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 by se odstranily problémy, spojené s kumulací androsteronu v andiposové 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 pěstitelské účely.

50

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 bude nižší kvality.

55

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

Příhlašovatel tohoto vynálezu nyní vypracoval průmyslově použitelný postup, který umožňuje zlepšení organoleptických vlastností masa nevykastrovaných samců domácích zvířat.

5

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je způsob zlepšení organoleptických vlastností masa nevykastrovaných samců domácích zvířat, při němž se vykrmují nevykastrovaní samci skotu, ovčí a vepřů, obsahující androgenní a neandrogenní steroidy, umožňující vývoj samčí povahy zvířat.

10

Podstata vynálezu podle tohoto vynálezu je v tom, že se před výkrmem nebo během něho podá zvířatům anti-LHRH vakcína k vyvolání primární imunní odezvy o nízké intenzitě bez význačného nebo dokonce měřitelného účinku na gonadální steroidní sekreci za účelem umožnění rozvoje samčí povahy zvířat, načež se zvířatům krátce před porážkou podá anti-LHRH vakcína k vyvolání anti-LHRH imunoneutralizace ke zrušení účinku androgenních a androgenních steroidů.

15

Při způsobu podle vynálezu se nejprve podávaná anti-LHRH vakcína podává před výkrmem.

20

Nejprve podávaná anti-LHRH vakcína se podává jako vakcína v emulzní formě.

Anti-LHRH vakcína, podávaná před porážkou, se podává vepřům před porážkou s adjuvancem vodného typu.

25

S výhodou se podává vakcína, podávaná před porážkou, obsahující jako adjuvant vodného typu gel hydroxidu hlinitého nebo saponin, nebo jejich směs.

Výhodně se vakcína podává ve vodném adjuvancu 15 až 21 dní před porážkou.

30

Anti-LHRH vakcína se podává býkům a beranům před porážkou s adjuvancem v emulzní formě.

Vakcína, podávaná před porážkou, se v emulzní formě podává 1 až 2 měsíce před porážkou.

35

Výhodně se vakcína, podávaná před porážkou, v emulzní formě podává 4 týdny až několik měsíců po podání první vakcíny, podávané před výkrmem nebo během něho.

Je výhodné podávat vakcínu v emulzní formě, přičemž emulze je typu voda v oleji.

40

Při jednom provedení způsobu podle tohoto vynálezu se podává vakcína v emulzní formě typu voda v oleji, přičemž emulze obsahuje směs vysoce čistých minerálních olejů a neiontových povrchově aktivních látek.

Při způsobu podle vynálezu se podávají anti-LHRH vakcíny, obsahující konjugát LHRH, napojeného na imunogenní nosičový protein, vybraný ze skupiny, zahrnující hovězí sérový albumin, lidský sérový albumin, thyroglobulin, ovalbumin, anatoxinu, tetanus anotoxin, koňské globuliny a lidské globuliny.

45

Výhodně se vakcína podává transkutánně na několika místech za použití bezjehlového injekčního zařízení vstříkem pod tlakem.

50

S výhodou se podává vakcína, obsahující konjugát, který je složený z LHRH, napojeného na imunogenní nosičový protein, vybraný ze skupiny, zahrnující koňský alfa-globulin, koňský alfa-globulin frakce IV-1, koňský alfa-globulin frakce IV-4 a jejich směsi.

55

Při jiném postupu se podává vakcína, obsahující LHRH peptid a imunogenní nosičový protein, jež jsou napojené na karbodiimid.

5 S výhodou se podává vakcína, obsahující konjugát, složený z LHRH (3–10), který je napojen na imunogenní nosičový protein, vybraný ze skupiny, zahrnující ovalbumin, koňský alfa-globulin, koňský alfa-globulin frakce IV–1, koňský alfa-globulin frakce IV–4 a jejich směsi.

10 Nebo se výhodně podává vakcína, obsahující LHRH (3–10) peptid a imunogenní nosičový protein, napojené na karbodiimid.

S výhodou se vakcína podává transkutánně na několika místech za použití bezjehlového injekčního zařízení vstříkem pod tlakem.

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

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

25 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 nevhodnější ve formě emulze vody v oleji. Lze uvažovat ovšem i o jiných emulzích.

30 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 těmto účinkům.

35 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.

40 Je žádoucí, zejména u prasat, zvolit následující dvě formulace vodných roztoků konjugátu: předně, formulaci na bázi stálé 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 saponinu, 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, vzniklého ve vnitřnostech.

50 Emulze, na rozdíl od té, která se získá s úplným nebo neúplným Freundovým adjuvantem, je stálá emulze, umožňující přípravu vakcíny pro okamžité použití. Zánětlivá kožní reakce je velmi slabá a je lokalizována do míst aplikace vakcíny v obou formulacích; reakce se projevuje při vnějším ohledání dobře ohraničenými 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.

- 5 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 mikrogram/g, při kteréžto hodnotě spotřebitel již
- 10 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 hybridomy
- 15 anebo heterohybridomy.

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

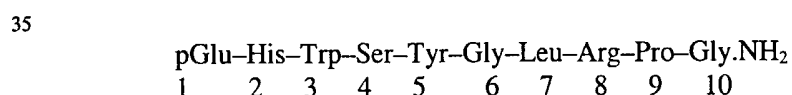
- 20 Metoda podle tohoto vynálezu má velkou výhodu v tom, že je zcela bezpečná, zejména, že nevyvolává místní frakce, které by mohly znehodnotit maso.

Zánětlivá reakce kůže zůstává omezena na místa aplikace obou formulací a projevuje se při zevním ohledání formou dobře ohraničených pupínek. Její vnitřní vývoj zůstává omezen na povrchovou dermis. Vyrážka mizí bez zanechání granulomů, zjevných v době porážky zvířat.

25 Zánětlivá reakce, časově omezená na místa aplikace, odráží toleranci k oběma formulacím vakcíny a je jí docílené jejich transkutánní aplikací s použitím injektoru bez jehly.

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

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



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

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

- 45 a) s celým LHRH anebo LHRH modifikovaným na jednom nebo více místech, aby bylo docíleno žádoucí aminoterminální, karboxyterminální nebo intermediární konjugace,
- 50 b) s jedním z jeho peptidových fragmentů, složeným z 5 až 7 aminokyselin, modifikovaných anebo jinak upraveným, aby bylo docíleno žádoucí aminoterminální, karboxyterminální anebo intermediární konjugace,
- c) s agonistou, nesoucím substituovanou aminokyselinu, nejčasněji v poloze 6, aby bylo docíleno intermediární konjugace.

55

Pokud jde o nosičovou bílkovinu, je používáno hovězího sérového albuminu, lidského sérového albuminu thyroglobulinu, ovalbuminu a lidských nebo koňských globulinů.

5 Tak evropská patentová přihláška EP-A-181 236 popisuje imunogenní konjugáty, obsahující nonapeptid anebo dekapeptid se sekvencí, odpovídající posledním 8 aminokyselinám molekuly LHRH, k nimž je přidán lysin anebo sekvence cystein-lysin na aminoterminálním konci.

10 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 sles aminokyselin ke konci, připojenému k imunogenní bílkovině.

15 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.

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

25 Karbodiimidy jsou aktivační činidla, široce používaná k vazbě antigenů na proteiny; z nich pak největšího použití dostal zajisté 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-alkylizomočoviny, a aminovou skupinou, nesenou jinou molekulou. Jejich výhoda je ve snadném použití.

30 Homobifunkční činidla jsou molekuly, nesoucí dvě identické reaktivní skupiny, oddělené uhlovodíkovým řetězcem. Z těchto činidel lze jmenovat glutarelddehyd, který reaguje se dvěma primárními aminovými skupinami, alkyl- anebo arylizodithiokyanáty reagující s primárními aminy a thioly, a bisdiazotovaný benzidin, který se váže na aromatické zbytky tyrosinu. Bismaleinimidy a bisamidináty lze jmenovat pro úplnost. Hlavní nevýhodou 35 homobifunkčních činidel je neschopnost regulace vznikajících konjugátů, jelikož tato činidla mohou reagovat se dvěma molekulami téhož charakteru a tak vést ke vzniku oligomerů anebo polymerů.

40 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 thioly, poskytovanými molekulou, na 45 níž se váže, ať již jsou to 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-pyridylthio)propanoyloxy]sukcinimid (SPDP) po redukci.

50 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 sérumalbuminem.

5 Je žádoucí, aby vakcíny obsahovaly tentýž aktivní princip, přednostně konjugát alfa-globulin 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
10 objemových dílů 2,5% roztoku hydrochloridu N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC) v 0,9% NaCl k 1 objemovému dílu směsi alfa-globulinu a LHRH v roztoku, obsahujícím 2 až 20 mg této směsi v 1 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.

15 Pozorovaný 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, vedle k definici imunogenního konjugátu na bázi anti-LHRH, používající s výhodou peptid obsahující karboxylový konec LHRH.

20 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 deka-peptidu o složení

25

$$\begin{array}{cccccccccc} \text{Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly.NH}_2 \\ 3 \quad 4 \quad 5 \quad 6 \quad 7 \quad 8 \quad 9 \quad 10 \end{array}$$

30 který má velkou imunogenní aktivitu a přitom nevykazuje hormonální aktivitu přirozeného LHRH.

Výhodný 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,
35 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.

40 Při přednostně používané přípravě konjugátu se LHRH (3-10) a nosičová bílkovina, ovalbumin nebo alfa-globulin, rozpustí každý v poměru 2 až 40 mg na 1 ml pufru 0,1M NaCl/0,1M 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyseliny. Pak se přidá 0,5 až 2 objemové díly 2,5% roztoku N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu v témže pufru. Hodnota pH se nastaví 1N NaOH. Po
45 promíchání se směs odstává přes noc a pak se přečistí gelově permeační chromatografií, která odstraní nenavázaný LHRH (3-10), zbytek karbodiimidu a hydrolyzační produkty.

Vynález bude nyní popsán podrobněji pomocí příkladů srovnávacích testů různých produktů a vakcinační metody podle tohoto vynálezu na straně jedné a na straně druhé pomocí testů, které
50 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.

Příklady provedení vynálezuI – POUŽITÍ CELÉHO LHRH

5

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.

10

A1. – Anti-LHRH imunizace intaktních samců prasat u samců krys.

15

Porovnání aktivity dvou anti-LHRH vakcín, složených z konjugátů 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 SDP, uvedeny do emulze oleje ve vodě a podány intemuskulárně prasatům a subkutánně krysám, vede k těmto závěrům:

20

– vyšší 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).

25

– Účinek dávky, který se projevuje v získání většího počtu zvířat, dávajících imunitní odpověď se stejným konjugátem (tabulka 3).

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

30

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 vazba.

35

{N'-[3-(2-pyridyldithio)propanoyl]-D-Lys⁶}-LHRH se připraví reakcí přebytku SPDP s LHRH ve vodném roztoku (6 mol SPDP na 1 mol LHRH) a pak po odstavení reakční směsi při 4 °C přes noc, se produkt získá odstředěním. Ten se rozpustí v 8M močovíně a testuje se přítomnost 2-pyridyldithioskupin.

40

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

45

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

Průměrný stupeň substituce je odvozen ze získaného údaje. Konečně se konjugát přečistí chromatografií a zkoncentruje ultrafiltrací.

50

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

Hydrochlorid N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu v množství 1000 mg, rozpuštěný bezprostředně před použitím ve 40 ml 0,9% NaCl, se přidá k 300 mg LHRH a 300 mg lidského albuminu, rozpuštěných v 30 ml 0,9% 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.

5 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.

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

A1.3 – Testovací postupy

15 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–karboxymethylether–[125I]histamin jako radioligand.

20 Vazba na značený peptid Se stanoví po substituci různých 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.

25 A1.4 – Znázornění

– Testy na krysách

30 • Tabulka 1: odpověď anti–LHRH protilátek, měřená podle stupně vazby LHRH, značeného jódem–125

• Tabulka 2: účinek anti–LHRH imunizace na koncentraci plazmového testosteronu

35 • Dávkování

Vakcína A1 : 50 µg konjugovaného (D–Lys⁶)–LHRH,

B1 : 12 µg konjugovaného LHRH.

40 – Testy na intaktních samcích prasat

• Tabulka 3: odpověď anti–LHRH protilátek, měřená stupněm vazby LHRH, značeného jódem–125.

45 • Dávkování

Vakcína A1: 0,5 mg konjugovaného (D–Lys⁶)–LHRH,

A2: 6 mg konjugovaného (D–Lys⁶)–LHRH,

50

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

5

TESTOVÁNÍ PROTILÁTEK (% pl/č) V SÉRU

Injekce	Čas – týden	Skupina A1 50 µg D-Lys ⁶ -LHRH/HSA/AE	Skupina B1 12 µg LHRH/EDC/HSA/AE1	Titr pl/č =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	1600
		14,1	85,3	980
		5,9	70,8	270
		15,8	94,9	2100
	6	0,0	64,3	120
		11,3	67,9	220
		11,7	96,1	2400
		0,0	68,3	280
	7	14,5	72,5	400
		0,0	92,4	2100
		0,0	64,2	200
		11,5	67,2	240
	8	19,6	70,4	310
		0,0	98,8	3200
		9,2	68,7	2200
		0,0	38,8	310

Tabulka 2

ÚČINEK ANTI-LHRH IMUNIZACE NA KONCENTRACI TESTOSTERONU V PLAZMĚ

5

TESTOVÁNÍ TESTOSTERONU V PLAZMĚ KRYŠ (ng/ml)

Injekce	Čas – týden	Kontroly	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	4,16	2,51
		1,05	5,83	2,38
		2,34	4,43	3,63
		–	4,17	0,58
	5	3,80	2,99	0,00
		1,76	2,33	0,00
		5,05	2,85	0,00
		6,67	1,54	0,00
	6	2,01	3,26	0,00
		4,47	0,09	0,00
		4,69	1,10	0,00
		1,96	–	0,00
	7	2,28	1,32	0,00
		1,92	0,89	0,00
		1,89	1,59	0,00
		1,65	2,17	0,00
	8	0,97	1,75	0,00
		1,91	1,48	0,00
		2,71	1,91	0,00
		1,22	2,33	0,00

Tabulka 3

ODPOVĚĎ ANTI-LHRH PROTILÁTEK, MĚŘENÁ STUPNĚM VAZBY LHRH,
ZNAČENÉHO JÓDEM-125.

TESTOVÁNÍ ANTI-LHRH PROTILÁTEK V SÉRU (ZŘEĎ. 1/50)

Čas, týden	D-Lys ⁶ -LHRH/PDP/HSA/AE1 0,5 µg (A1)					D-Lys ⁶ -LHRH/PDP/HSA/AE1 6 µg (A2)					Titr (pl/č=50%) A1			
	počet prasat					počet prasat					počet prasat			
	211	219	231	242	257	205	221	227	245	251	221			
T0 1.inj.														
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	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, týden	LHRH-(KARBO)/HSA/AE1 0,150 mg (B1)					LHRH-(KARBO)-HSA/AE1 1,2 mg (B2)					B1		B2	
	počet prasat					počet prasat					počet prasat		počet prasat	
	213	225	247	255	261	209	215	235	241	259	247		235 259	
T0 1.inj.														
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
T5 2.inj.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
T6	0	0	81,2	5	25,1	48,9	56,2	78,2	31,4	90,1	200		130 990	
T7	0	0	81,7	5	49,1	64,7	49,9	86,3	52,3	92,9	170		220 880	
T8	0	0	80,5	5	36,5	54,1	48,9	80,7	59,3	90,5	150		140 640	
T9	0	0	74,4	5	34,5	54,5	40,1	68,5	51,6	89,1	220		220 490	

10

A2 – Srovnávací test dvou anti-LHRV vakcín, složených z konjugátu LHRH s α -globulinem, připraveného 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.

15

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

20

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.

25

A2.2 – Příprava konjugátu LHRH s lidským α -globulinem 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.

30

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.

5

Tabulka 4

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

10

A.3 – Velký rozsah imunitní odpovědi samců prasat na aplikaci karboxyterminální peptidové frakce LHRH, konjugované pomocí karbodiimidu, nebo jeho agonisty (D-Lys⁶)-LHRH, konjugovaného pomocí SPDP na lidský α -globulin.

15

Tato odpověď se stanoví ze srovnání procenta vazby anti-LHRH a anti-(D-Lys⁶)-LHRH séra dvěma značenými fragmenty LHRH, a to LHRH (3–10) s delecí aminoterminální části s 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.

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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), rozpuštěných v 5 ml 0,1M 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 bisulfidu sodného, rozpuštěného v 5 ml vody. Konjugát se dialyzuje při 4 °C proti 150mM NaCl v 10mM fosfátovém pufru o pH 7,5 a pak se zkoncentruje ultrafiltrací.

50

B2. – Srovnávací test anti-LHRH vakcín, obsahujících stejné množství konjugovaného LHRH na prasatech (tabulka 7)

Tabulka 7

	LHRH- α -globulin (připr. s karbodiimidem) podán IM nebo ID	LHRH- α -globulin (připr. s glutaraldehydem) podán IM nebo ID
Vymizení testosteronu z plazmy	5/10	0/10

5

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 úplné vymizení testosteronu z jejich plazmy (tabulka 8).

10

Tabulka 8

15

TESTY NA PRASATECH – INTRAMUSKULÁRNÍ INJEKCE

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

20

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 pomocí karbodiimidu.

25

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

30

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

35

TESTY NA KRYSAČH

	LHRH-lidský α -globulin frakce IV-1	LHRH-koňský α -globulin frakce IV-1
Vymizení testosteronu z plazmy	12/12	12/12

40

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 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, ředěná antigenem (E), a olejová fáze, emulzifikovaná s konjugátem (F).

5 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.

10 Tabulka 10

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

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

Tabulka 11

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

	Kontroly	Ošetřeno pokusných zvířat
Počet zvířat, vykazujících koncentraci androstenonu pod 0,50 µg/g adiposové tkáně	2/5	5/5

25 (signifikantní rozdíl při riziku $\alpha = 0,2$)

30 G.– Účinnost a tolerance formulací, obsahujících LHRH konjugovaný s α -globulinem pomocí karbodiimidu ve formě emulze vody v oleji (1. vakcína) a v hydroxidu hlinitém a saponinu (2. vakcína); podány transkutánně s obsahem stejného množství LHRH v dávce na počátku výkrmného období, resp. 18 až 21 dnů před porážkou, s použitím injektoru bez jehly, známého jako Pigjet.

35 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).

40 G.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 testosteronu (počet zvířat)	10/12	10/11	9/12	11/11	8/11
Koncentrace androstenonu v tkánipod 0,5 µg/g (počet zvířat)	11/12	n	10/23	n	n

n = nastaveno

5

G. 2 – Tolerance k vakcínám je posuzována podle vzniku zánětlivé 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.

10

Tabulka 13

15

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	
	1. vak.	2. vak.	1. vak.	2. vak.	1. vak.	2. vak.	1. vak.	2. vak.	1. vak.	2. vak.
Vakcína 1 nebo 2										
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	

20

II. POUŽITÍ PEPTIDU (3–10)

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

25

Imunitní odpověď anti-LHRH je měřena stanovením titru protilátek postupem, popsáným JEFFCOATEM a ost., Acto. Endocr. (Copenh.), 19/4, 75, 625–635.

30

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 JOFFCOATA a ost., popsáným výše.

Biologická účinnost se posuzuje podle sníženého 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]histamin (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 5α-[³H]androstenon, popsáný CLAUSENEM, C. R. Acad. Sci., Paris, 1974, 229–302).

40

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

5

B1. Příprava konjugátu LHRH-lidského α -globulinu s karbodiimidem

Konjugát se s výhodou získává přidáním 0,5 až 2 objemových dílů 2,5% roztoku hydrochloridu N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC) v 0,9% NaCl k jednomu objemu směsi α -globulin/LHRH v roztoku, obsahujícím 2 až 20 mg této směsi v 1 ml 0,9% NaCl. Po promíchání se směs odstaví přes noc a pak přečistí 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 nakonec po jedné noci při 4 °C odstředěním získaného produktu, který se rozpustí v 8M močovíně a stanoví se 2-pyridyldithioskupiny.

{N'-[3-(2-pyridyldithio)propanol]-D-Lys⁶}-LHRH se připraví reakcí přebytku SPDP s LHRH ve vodném roztoku (6 mol SPDP na 1 mol (D-Lys⁶)-LHRH), směs se ponechá při 4 °C přes noc a pak se produkt získá centrifugací. Produkt se rozpustí v 8M močovíně a pak se testuje obsah 2-pyridyldithioskupin.

N-(3-merkaptopropanoyl)derivát lidského α -globulinu se získá působením 0,2 mmol SPDP na 0,6 g lidského α -globulinu, rozpuštěného ve 100 ml 0,1M 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-pyridyldithioskupiny 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 %.

40

B3. Rozsah imunitní odpovědi samic 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 specifitou 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 (68/68). 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.

50

Odpověď na aminoterminální frakci nemá obecný výskyt (55/68). Žádné sérum nevázalo specificky LHRH ve formě volné kyseliny.

5

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

10

C1. – Příprava konjugátu LHRH (3-10) s frakcí IV-4 koňského α -globulinu pomocí karbodiimidu.

15

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 0,1M NaCl/0,1M 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina. Pak se přidá 212 mg N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu, rozpuštěného v 17 ml uvedeného roztoku. Hodnota pH se ihned nastaví na 6,0 pomocí 1,3 ml 1N hydroxidu sodného.

20

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. Odečtením nekonjugovaného LHRH lze nastavit množství navázaného LHRH. Lze tedy tak stanovit výtěžek vazby.

25

C2. Příprava konjugátu LHRH (3-10) s ovalbuminem pomocí karbodiimidu.

30

LHRH (3-10) v množství 60 mg a 120 mg ovalbuminu se rozpustí v 9 ml pufru 0,1M NaCl/0,1M 2-(M-morfolino)ethansulfonová kyselina. Hydrochlorid N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu v množství 150 mg a rozpuštěný v 12 ml téhož 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 vyčechá centrifugací. Supernatant se chromatografuje na Sephadexu, aby se odstranil konjugát od nezreagovaného LHRH a produktů rozpadu karbodiimidu. Výtěžek vazby LHRH (3-10) lze stanovit z určení množství nenavázaného LHRH (3-10).

35

C3. – Imunitní odpověď, biologická účinnost a tolerance k anti-LHRH vakcíně, založené na konjugaci fragmentů LHRH (3-10) a frakce IV-4 koňského α -globulinu pomocí karbodiimidu.

40

Formulace složené z konjugovaného LHRH (3-10) v emulzi vody v oleji (1. vakcína) a v emulzi gelu hydroxidu hlinitého a saponinu (2. vakcína) byla aplikována transkutánně 6 samcům prasat v objemu 0,4 ml jedna dávka, a to na počátku výkrmného období a 17 dnů před porážkou s použitím injektoru bez jehly, známého jako Pidjet injektor, tak, že dávka byla rozdělena na dva podíly po 0,2 ml, vstříknuté na 5 místech.

45

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

50

Den 10	280	660	2700	3200	4600	1300
Den 16	290	400	2000	2400	3100	8600

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 týchž podmínek provázeno vymizením androstenonu z tkáně.

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

10

PATENTOVÉ NÁROKY

- 15 1. Způsob zlepšení organoleptických vlastností masa nevykastrovaných samců domácích zvířat, při němž se vykrmují nevykastrovaní samci skotu, ovcí a vepřů, obsahující androgenní a neandrogenní steroidy, umožňující vývoj samčí povahy zvířat, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se před výkrmem nebo během něho podá zvířatům anti-LHRH vakcína k vyvolání primární imunní odezvy o nízké intenzitě bez význačného nebo dokonce měřitelného účinku na gonadální
- 20 steroidní sekreci za účelem umožnění rozvoje samčí povahy zvířat, načež se zvířatům před porážkou podá anti-LHRH vakcína k vyvolání anti-LHRH imunoneutralizace ke zrušení účinku androgenních a neandrogenních steroidů.

- 25 2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se nejprve podává anti-LHRH vakcína podává před výkrmem.

3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se nejprve podává anti-LHRH vakcína podává jako vakcína v emulzní formě.

- 30 4. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se anti-LHRH vakcína, podávaná před porážkou, podává vepřům před porážkou s adjuvantiem vodného typu.

- 35 5. Způsob podle nároku 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se podává vakcína, podávaná před porážkou, obsahující jako adjuvant vodného typu gel hydroxidu hlinitého nebo saponin nebo jejich směs.

6. Způsob podle nároku 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se vakcína podává ve vodném adjuvantu 15 až 21 dní před porážkou.

- 40 7. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se anti-LHRH vakcína podává býkům a beranům před porážkou s adjuvantiem v emulzní formě.

8. Způsob podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se vakcína, podávaná před porážkou, v emulzní formě podává 1 až 2 měsíce před porážkou.

45

9. Způsob podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se vakcína, podávaná před porážkou, v emulzní formě podává 4 týdny až několik měsíců po dování první vakcíny, podávané před výkrmem nebo během něho.

- 50 10. Způsob podle nároku 3 nebo 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se podává vakcína v emulzní formě, přičemž je typu voda v oleji.

- 55 11. Způsob podle nároku 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se podává vakcína v emulzní formě typu voda v oleji, přičemž emulze obsahuje směs vysoce čistých minerálních olejů a neiontových povrchově aktivních látek.

- 5 12. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se podávají anti-LHRH vakcíny, obsahující konjugát LHRH napojeného na imunogenní nosičový protein, vybraný ze skupiny, zahrnující hovězí sérový albumin, lidský sérový albumin, thyroglobulin, ovalbumin, anatoxiny, tetanus anatoxin, koňské globuliny a lidské globuliny.
13. Způsob podle nároku 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se vakcína podává transkutánně na několika místech za použití bezjehlového injekčního zařízení vstříkem pod tlakem.
- 10 14. Způsob podle nároku 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se podává vakcína, obsahující konjugát, který se složený z LHRH, napojeného na imunogenní nosičový protein, vybraný ze skupiny, zahrnující koňský alfa-globulin, koňský alfa-globulin frakce IV-1, koňský alfa-globulin frakce IV-4 a jejich směsi.
- 15 15. Způsob podle nároku 14, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se podává vakcína, obsahující LHRH peptid a imunogenní nosičový protein, jež jsou napojené na karbodiimid.
- 20 16. Způsob podle nároku 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se podává vakcína, obsahující konjugát složený z LHRH (3-10), který je napojen na imunogenní nosičový protein, vybraný ze skupiny, zahrnující ovalbumin, koňský alfa-globulin, koňský alfa-globulin frakce IV-1, koňský alfa-globulin frakce IV-4 a jejich směsi.
- 25 17. Způsob podle nároku 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že podává vakcína, obsahující LHRH (3-10) peptid a imunogenní nosičový protein, napojené na karbodiimid.
- 30 18. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se vakcína podává transkutánně na několika místech za použití bezjehlového injekčního zařízení vstříkem pod tlakem.

Konec dokumentu
