

P9502HGF

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

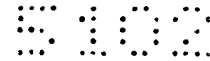
72919

Antihelmintikus vakcinák alkalmazása a természetes immunitás elvesztésével kapcsolatos parazita fertőzések szabályozására

KIVONAT

A találmány tárgya egy vagy több bélféreg parazita ellen immunogén aktivitással bíró bélféreg rejtett antigén vagy antigén fragmentum, prekursor és funkciós származékaik vagy variánsaik alkalmazása vakcina készítmény előállítására, amely az ellést megelőző és/vagy ellés körüli időben legalább egyszer adagolva az állat védő immunitását fokozza az ellés körüli időszakban az adott bélféreg parazitával szemben.

2 db a ...
jellemző ...
J.d



" A " 9

Antihelmintikus vakcinák alkalmazása a természetes immunitás elvesztésével kapcsolatos parazita fertőzések szabályozására

A találmány tárgyát bélféreg antigének alkalmazása képezi bélféreg paraziták által okozott, főleg háziállatokban okozott betegségek szabályozására szolgáló vakcinák készítésénél, különösen az ilyen antigének alkalmazása a természetes immunitás csökkenésével/megváltozásával kapcsolatos parazitás megbetegedések szabályozásában, például az úgynevezett vajúdas körüli vagy II típusú ostertagiasis szabályozásában.

A bélféreg paraziták a háziállatok és más állatok betegségeinek és fertőzéseinek széles köréért felelősek, ezek a betegségek és fertőzések a termelés csökkenéséhez, sőt az állat elpusztulásához járulva jelentős gazdasági fontosságúak. Emberek esetén a bélféreg fertőzések súlyos legyengüléshez és halálhoz vezethetnek. A háziállatok tekintetében különös említést érdemel a *Haemonchus*, amely egy a kérődzők oltógyomrát megtámadó, vérrel táplálkozó nematóda, amely anémiát és súlyvesztést okoz, és kezelés híján gyakran vezet halálhoz, továbbá említésre méltó a nem vérrel táplálkozó *Ostertagia* (*Teladorsagia*) nematóda, amely állatok, különösen marhák és birkák mortalitása és megbetegedése szempontjából hasonló problémákat okoz.

A további, gazdasági szempontból jelentős egyéb bélféreg körébe tartoznak a *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Chabertia*, *Oesophagostomum*, *Nematodirus*, *Dictyocaulus*, és különféle mótelyek (például a *Fasciola*).

A bélféreggel, például a *Haemonchus*-szal szembeni természetes immunitás kifejlődhet olyan nyájokban vagy csordákban, amelyek állandóan bélféreg által fertőzött legelőknek kitéttek, de a bélféreg fertőzések szabályozását hagyományosan a legelők kezelése mellett antihelmintikus (bélféreg ellenes) gyógyszerek alkalmazásával végezték. Egy antihelmintikus vakcina nyilvánvalóan előnyös lenne a gyógyszerekkel szemben, amelyeket gyakran kell adagolni, és amelyekkel szemben rezisztencia fejlődhet ki, így az utóbbi években

erőfeszítéseket tettek a szabályozás immunológiai módszereinek kifejlesztésére.

A legígéretesebb eredményeket ez ideig *Haemonchus* beléből extrahált proteinnel érték el, amelyek lehetségesek védő antigénekként nemcsak *Haemonchus*-szal szemben, hanem bélféreg más körével szemben is. Különösen a *H. contortus* belének luminális felszínén talált H110D protein dublett bizonyult védő immunitást átvivőnek birkákban haemonchosis-szal szemben (lásd például a WO88/00835 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásban).

Egy sajátos probléma azonban az úgynevezett ellés ideje körüli szaporodás, amelyet ellést követő megjelenésnek is neveznek. Ez a jelenség a bélféreg (általában nematóda) tojások számának szaporodására vonatkozik, jellemzően számos különböző faj, köztük a *H. contortus* tojásai számának növekedésének, amelyet az állat székletében figyelnek meg a vemhesség legutolsó időszaka alatt, és különösen az ellés körüli időben és a szoptatás korai szakaszában, és bár ez nem teljesen tisztázott, felteszik, hogy az immunitás időszakos csökkenésének következménye, amely az állatban a vemhesség alatt a keringő prolaktin hormon szint változásával vagy a bél nyálkahártya felületen kiválasztott immunglobulin mennyiség csökkenésével kapcsolatos, amely utóbbi annak következménye, hogy az immunglobulin a plazmában az emlő epitéliumba megy át, majd a tejben választódik ki. A gazdaszervezet immunitásának csökkenése azt eredményezi, hogy növekszik a tojás kibocsátás, amely vagy az újonnan elfogyasztott fertőző lárvák kifejlődéséből adódik, vagy a visszatartott lárvák kifejllettekké való aktiválódásából/továbbfejlődéséből, vagy mindkettőből, ami a legelők magas tojás szintjeivel (és a fertőző lárváknak ezt követő kifejlődésével) jár az állatok következő generációjának, és ezáltal érzékeny gazdaszervezeteknek a megszületése idejére, biztosítva ezzel a bélféreg fajok túlélését és szaporodását. A fertőzési ciklus így folytatódik.

Annak biztosítására, hogy az érzékeny állatok kellően védettek legyenek, és a bélféreg fertőzés rendszeres ismételt megjelenésének megelőzésére ezért kívánatos ennek az ellés körüli fertőzési ciklusnak a megtörése. Amint azt az előzőekben említettük, a kritikus időszakban a természetes immunitás lecsökken, így az ellés ideje körüli tojás szaporodás szabályozásának egyetlen eszköze ez ideig az antihelmintikus gyógyszerek adagolása volt általában a fedezést megelőzően. A vemhesség alatt azonban az állatok általában továbbra is felszedik a fertőző lárvákat, és a parazitizmus újra teret nyerhet. Ezért egyértelműen igény van az ellés körüli tojás szaporodás szabályozására és az ellés után az érzékeny fiatal állatok bélféreg fertőzési gyakoriságának csökkentésére szolgáló javított módszerre. Betegséget, gyakran végzetes betegséget, például marhánál II típusú ostertagiasist eredményezhet továbbá a nem vemhes állatok gasztrointesztinális nematódák iránti természetes immunitásának elvesztése, amely származhat a táplálkozás évszakos változásaiból, a tartási körülményekből és a parazitáknak való kitettségéből.

Nem várt módon arra a felismerésre jutottunk, hogy egy sajátos vakcinálási rend, amelyben bélférgekből származó rejtett antigéneket alkalmazunk a későbbiekben leírásra kerülő körülmények mellett, sikeresen csökkenti a természetes immunitás csökkenésétől szenvedő állatok bélféreg tojás termelését, különösen a fertőzött vemhes állatok esetén, és ezért ez a kezelési rend megelőzi az ellés ideje körüli szaporodást, és megtöri a fertőzési ciklust.

Ennek megfelelően egyik szempontját tekintve a találmány egy vagy több bélféreg parazitával szemben immunogén aktivitással bíró bélféreg rejtett antigén vagy antigén fragmentum, prekursor és funkcióosan ekvivalens származékai vagy variánsai alkalmazására vonatkozik olyan vakcina készítmény gyártására, amely állatnak a gasztrointesztinális bélféreg paraziták elleni természetes immunitás elvesztésének vagy legyengülésének időszaka előtt és/vagy alatt leg-

alább egyszer beadva fokozza a bélféreg parazita elleni védő immunitást a természetes immunitás meggyengülésének időszakában.

Közelebbről, a találmány egy vagy több bélféreg parazita ellen immunogén aktivitással bíró bélféreg rejtett antigén vagy antigén fragmentum, prekursor és funkcionálisan ekvivalens származékai vagy variánsai alkalmazására vonatkozik olyan vakcina készítmény gyártásánál, amely nőtény állatnak a fedezést megelőző és/vagy a vemhesség harmadik trimeszterének kezdetéig legalább egyszer beadva fokozza az említett bélféreg paraziták iránti védő immunitást az ellés körüli időben, és különösen megelőzi vagy csökkenti az ellés ideje körüli tojás szaporodást.

Más szemszögből, a találmány eljárást nyújt állatok bélféreg paraziták elleni immunválaszának fokozására természetes immunitásuk károsodása idején, amely eljárás abban áll, hogy az állatnak a gasztrointesztinális bélféreg paraziták elleni természetes immunitás elvesztésének vagy gyengülésének ideje előtt és/vagy alatt legalább egyszer beadunk egy olyan vakcina készítményt, amely egy vagy több bélféreg parazitával szemben immunogén aktivitással bíró egy vagy több bélféreg rejtett antigént vagy antigén fragmentumot, prekuzort és funkciósan ekvivalens származékát vagy variánsát tartalmazza.

Közelebbről, a találmány eljárást nyújt nőtény állatok bélféreg paraziták elleni immunválaszának fokozására az ellés körüli időben, különösen az ellés ideje körüli tojás szaporodás megelőzésére vagy csökkentésére, az eljárás abban áll, hogy az állatnak a fedezés előtti és/vagy a vemhesség harmadik trimeszterének kezdetéig terjedő időszakban legalább egyszer beadunk egy olyan vakcina készítményt, amely egy vagy több bélféreg parazita ellen immunogén aktivitással bíró egy vagy több bélféreg rejtett antigént vagy antigén fragmentumot, prekuzort és funkcionálisan ekvivalens származékát vagy variánsát tartalmazza.

A "károsodott természetes immunitás" megjelölésen a természetes immunitás elvesztését vagy gyengülését értjük, amely hatástalan vagy nem kielégítő védelemhez vezet.

Így a találmány szerint a vakcinát az állatnak egy olyan időszakban adjuk be, amikor immunrendszere kompetens, és a kérdéses antigén elleni emlékezet-válasz megalapozására szolgál. Az ellés ideje körüli immunizálás esetén előnyösen a vakcinát a fedezés ideje előtt és/vagy a vemhesség második trimeszterének kezdetéig terjedő időben legalább egyszer adjuk be. Amint azt a későbbiekben részletesen ismertetjük, általában előnyös az immunizálásnak a vemhesség során még egyszer vagy többször való megisméltése az állattartási gyakorlattal összhangban.

A gasztrointesztinális nematódák iránti természetes immunitás gyengülése a következőkben manifesztálódhat:

1. a visszatartott lárvák érésének folytatódása;
2. az elfogyasztott fertőző lárvák megtelepedési arányának növekedése;
3. a létező kifejlett férgek csökkent kiűzése;
4. a megtelepedett kifejlett populáció megnövekedett termékenysége.

Mind a négy fenti faktor hozzájárulhat az ellés ideje körüli tojás szaporodáshoz. Amennyiben a természetes immunitás elvesztésével vagy csökkenésével más körülmények kapcsolatosak, például a II típusú ostertagiasis, elsőrendű fontosságúnak gondoljuk az érés folytatódásának hatását.

Továbbá, a hipobiotikusan vagy immunológiailag visszatartott lárvák, azaz a fejlődésükben szezonálisan visszatartott lárvák, ami bizonyos nematóda fajoknál jellemző, tavasszal, a gazdaállat ellése körüli időben hajlamosak az érésre, és ez a tavaszi szaporodás hozzájárulhat az ellés ideje körüli tojás szaporodáshoz. A bélférgek, például a *Haemonchus* elleni természetes immunitás főként a korai L4 lárva állapotra hat, amely az az állapot, amelyben ennél a nemzetségnél a fejlődés visszatartása történik. Ha már a lárvák fejlődése sikeresen

folytatódott, a gazdaszervezet természetes immunitása révén a bélférgek többé nem szabályozhatók. Ellentétben ezzel, a rejtett antigének hatásosan serkentik a későbbi lárva állapotok és kialakult kifejlett állapot elleni védő immunitást, amely lárvákra és kifejlett egyedekre a gazdaszervezet természetes immunmechanizmusa nem fejt ki hatást. A találmány szerinti hatás, azaz a védő immunválasz fokozása a férgek elleni természetes immunitás meggyengülésének időszakában, például a gazdaállat vemhességének időszakában szokásosan legyengült parazita elleni immunválasz idején, aminek folytán az ellés ideje körüli tojás szaporodás megelőzhető vagy csökkenthető, meglepő és előre nem látható; a korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy birkák és marhák olyan antigénekké való vakcinálása, amelyekről immunológiai felmérő vizsgálatban az bizonyosodott be, hogy a természetes immunválaszhoz hozzájárulnak, nem hatékony. Ennek folytán nem volt várható, hogy az ellés ideje körüli immunizálás révén, amely az állatnak egy primer immunizálást ad a fedezést megelőzően vagy közvetlen azt követően, adott esetben egy a vemhesség során végzett második immunizálással kiegészítve, sikeresen ki lehetne váltani egy olyan immunválaszt, amely képes megelőzni az ellés ideje körüli tojás szaporodást. Hasonló módon, az sem volt várható, hogy más, a természetes immunitás elvesztésével vagy csökkenésével kapcsolatos állapotok, például a II típusú ostertagiasis a természetes immunitás károsodásának idején végrehajtott immunizálással szabályozható lenne.

Bár találmányunkat nem kívánjuk egy elmélethez kötni, úgy véljük, hogy a hatás elsősorban annak következménye, hogy megelőzi a hipobiotikusan vagy immunológiailag visszatartott lárváknak kifejlett egyedekké való érését, ezáltal csökkenti a kifejlett fertőzés szintjét. A kifejlett paraziták által termelt tojások számának csökkenése is jelentős szerepet játszhat. Ez különösen fontos lehet olyan bélférgeknél, mint az Ostertagia, ahol a vemhes állatokban visszatartott lárvák vagy a szezonális klimatikus változások által visszatartott lárvák érése

mind a hím, mind a nőtény marháknál gyakran végzetes kórhoz, például II típusú ostertagiasis-hoz vezet.

Az ellés körüli időszak hatásaiban egy további fontos faktor lehet a rejtett antigének által való immunizálással kiváltott védő anyai antitestek kolosztrum révén a táplált utódba való átvitele, ami ugyancsak jelentős lehet a fertőzés, például a Haemonchussal való fertőzés gyakoriságának csökkentésében a fiatal állatokban az ellés ideje körüli szaporodásból származó tojásokból fejlett lárvák elfogyasztását követően. Ez szöges ellentétben van a természetes immunitással, amely nem vihető át az anyáról az utódra.

A "rejtett antigén" kifejezés itt azokat az antigéneket jelöli, amelyek "kriptikus", "titkos" antigénekként is ismertek, és amelyek a fertőzés szokásos lefolyása mellett nem kerülnek érintkezésbe a gazdaszervezet immunrendszerével, és amelyeket ennek következtében a kérdéses parazitákkal szemben szerzett természetes immunitással bíró állat széruma nem ismer fel. Az ilyen antigének így általában a bélférgeknek azokból az - általában - belső részeiből származnak, amelyek a fertőzés során nincsenek kitéve a gazdaállat immunrendszerének. Így például különösen a bélféreg bele mutatkozott gazdag rejtett antigén forrásnak.

A kérdéses antigén egy prekuzora lehet egy nagyobb protein, amely például proteolízissel alakul magává az antigénné. Az ilyen prekuzorok felvehetik zimogének formáját is, azaz enzimek inaktív prekuzorai lehetnek, amelyek proteolitikus hasítással aktiválódnak, például a pepszin/pepszinogén rendszerhez analóg módon vagy a véralvadási kaszkádban érintett zimogénekénél jól ismert módon.

Mivel a rejtett antigének hatásukat úgy fejtik ki, hogy a gazdaállat véráramában immun effektor molekulák, például antitestek vagy komplementek termelődését váltják ki, amelyeket a paraziták a gazdaállat vérenek fogyasztásakor vesznek fel, a rejtett antigén elméletet kezdetben vérrel táplálkozó parazitákra

korlátozódónak tartottuk. Kimutattuk azonban, hogy a rejtett antigének használhatók vakcinák alapjaként nem vérrel táplálkozó bélféreg paraziták esetén is.

Az "immunogén aktivitás" megjelölést azon antigének, fragmentumaik, prekurzoraik, származékaik és variánsaik esetére értjük, amelyek a gazdaállatban védő immunválasz kifejlesztésére képesek, azaz a gazdaállat olyan válaszára, amely olyan immun effektor molekulák, antitestek vagy sejtek képződésére vezet, amelyek a parazita termékenységét sterilizálják vagy csökkentik vagy károsítják, gátolják vagy megölik a parazitát, és ezáltal egyidejűleg csökkentik a parazita tojás rakását és "védik" a gazdaállatot a klinikai vagy szub-klinikai kórtól és termékenységének elvesztésétől.

A rejtett antigénekre adott ilyen védő immunválasz legszokásosabban antitestek képződésében manifesztálódik, amely antitestek a parazita metabolikus funkciójának gátlására képesek, ezáltal növekedését leállítják, tojástermelését meggátolják és/vagy pusztulásához vezetnek. Ezeknek a védő, főként IgG antitesteknek a termelődése, amelyek a gazdaszervezet szérumában vannak jelen, a rejtett antigének által kiváltott immunválasz típusának fontos megkülönböztető tényezői a természetes immunitásnál megfigyelhetőtől; míg a rejtett antigéneken alapuló immun effektor mechanizmus elsődlegesen humorális, azaz antitest alapú, a paraziták iránti természetes immunitás első sorban sejtek által közvetítettnek tűnik, azaz eozinofilok és hízósejtek által, amelyek működésbe lépve a parazitát károsító anyagokat bocsátanak ki, az immunválasz humorális része kevésbé jelentős.

Úgy véljük, hogy a rejtett antigének által kiváltott immunitásnak ezek a különbözőségei fontos módon járulnak hozzá a rejtett antigének sikerességéhez parazita fertőzések szabályozásában a meggyengült természetes immunitás időszakában, például az ellés körüli tojás szaporodás és marhák II típusú ostertagiasisa esetén.

Amint azt az előzőekben említettük, a találmány oltalmi körébe tartoznak a parazita rejtett antigének különféle funkciósan ekvivalens fragmentumai, származékai és variánsai. A "funkciósan ekvivalens" megjelölést olyan proteinekre alkalmazzuk, köztük a natív proteinekből származó vagy azokkal rokon glikoproteinekre, amelyeknek aminosav szekvenciája egyetlen vagy néhány aminosav helyettesítéssel, addícióval és/vagy delécióval módosított, valamint olyan szekvenciákra, amelyekben kémiaiailag módosított aminosavak fordulnak elő, beleértve ebbe a deglikozilálást vagy glikozilálást, de amelyek mégis megtartják védő antigén (immunogén) aktivitásukat, például képesek bélférgek ellen a gazdaszervezetet védő antitesteket és/vagy funkciósan immunitást kiváltani. Az ilyen funkciósan ekvivalens variánsok előfordulhatnak természetes biológiai variánsokként vagy előállíthatók ismert eljárásokkal. Például a funkciósan ekvivalens rekombináns proteinek előállíthatók ismert hely-specifikus mutagenézissel, random mutagenézissel vagy enzimes hasítással és/vagy nukleinsav ligálásával.

Amint azt az előzőekben említettük, az ellés ideje körüli immunizálásnál a rejtett antigén alapú vakcina készítményt a nőtény állatnak a fedezést megelőző és/vagy a vemhesség harmadik trimeszterének kezdetéig, előnyösebben a második trimeszterének kezdetéig tartó időszak során legalább egyszer adjuk be. Általában azonban a vakcinát egynél többször adagoljuk, például a primer injekciót a fedezést megelőzően, majd egy vagy több emlékeztetőt a vemhesség harmadik trimeszterének kezdetéig, előnyösebben a második trimeszterének kezdetéig tartó időtartam alatt adunk.

Célszerűen a vakcinát először a fedezést megelőző 60. nap, és azt követő 20. nap, vagy még előnyösebben azt követő 10. nap időtartamon belül adjuk be, például a fedezést megelőző 45 napon belül, vagy még előnyösebben a fedezést megelőző 40. és 5. nap között, különösen a fedezést megelőző 40. és 10. nap közötti időtartamon belül adjuk be. Bár az első vakcina injekció beadá-

sának előnyös ideje kevéssel a fedezést megelőzően van, a különböző farmokon folytatott különböző állattartási gyakorlat azonban megkívánhatja az ettől eltérő időkből történő immunizálást, például 6 hónappal a fedezést megelőzően vagy röviddel a fiatal állatok megszületését követően történő immunizálás célszerűbb lehet.

Az emlékeztető injekció beadása a fedezést követően a vemhesség harmadik trimeszterének kezdetéig tartó bármely időben megfelelő lehet. Például adható egy vagy több emlékeztető a vemhesség korai második trimesztere és korai harmadik trimesztere közötti időtartamon belül.

Amint azt az előzőekben tárgyaltuk, a vakcinálás azonos immunogénnel a releváns időtartamon belül egynél többször végezhető, különböző állatok vagy különböző vakcinák esetén a kombinációk különbözőek lehetnek. Más megoldás szerint azonban egyetlen vakcinálással, egy szabályozott felszabadulású antigén szállító rendszer alkalmazásával hosszú időtartamú immunválasz váltatható ki [O'Hagan és munkatársai, *Immunology*, 73, 239-242 (1991)]. Ha a primer injekciót a fedezést megelőzően 6 hónappal korábban adjuk be, a fedezést megelőző 6 hónapban általában egy további injekció beadása szükséges. Bizonyos esetekben évenkénti emlékeztető injekció megfelelő, például a téli időszakban, amikor a fertőzés kockázata alacsony. Egy megfelelő immunizációs rendszer példaként említjük H110D-alapú vakcina kétszer történő beadását, először a fedezést megelőző 40. és 10. nap közötti időszakban, majd mintegy 90 nappal a fedezést követően, így módon birkákat hatásosan immunizálhatunk *Haemonchus* ellen.

Bár az állatoknak pusztán a vemhesség késői időszakában történő immunizálását hatástalannak találtuk, abban az esetben, ha nem szabályozottan felszabaduló vakcina készítményt alkalmazunk, egy vagy több emlékeztető vakcina adagolást kell végeznünk, előnyösen a vemhesség során, annak harmadik

trimesztere kezdetéig, például birkák esetén a vemhesség 50. és 100. napja között, például 45. és 90. napja között.

A találmány előnyében részesülhet az ember vagy nem-ember állat, de előnyösen az ember társ-állatai, különösen a kutyák és macskák, valamint a háziállatok, különösen a kérődzők. Külön említésre méltóak a birkák, marhák, szarvasok és kecskék.

Az ellés ideje körüli tojás szaporodás számos különféle bélféreg fajjal kapcsolatos, így ezek a vakcina készítmény megfelelő célpontjai. Ezek közé tartoznak elsősorban a *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Chabertia*, *Oesophagostomum*, *Hyostrongylus*, *Nematodirus*, *Toxocara* és *Cooperia* fajok. Az ilyen bélféreg sorából nyerhetők rejtett antigének.

Előnyösek azok az antigének, az úgynevezett "széles spektrumú" antigének, amelyek túlmenően azon a bélférgen, amelyikből izolálták őket, képesek a gazdaszervezet védő immunválaszát kiváltani egyéb bélféreg paraziták körével szemben is.

A találmány szerint alkalmazott rejtett antigének célszerűen bármely, a bélféreg beléből izolált integrális membrán proteinek, köztük például enzimek, szerkezeti proteinek vagy bármely más funkcionális protein, amely a bélféreg fenntartásához és/vagy fejlődéséhez szükséges, például olyan proteinek, amelyek a bélféreg táplálkozási-éhezési mechanizmusában érintettek. Az ilyen proteinek körébe tartoznak például enzimek, például proteázok vagy exo- és endo-peptidázok, amelyek az elfogyasztott proteint szabad aminosavakká bontják le.

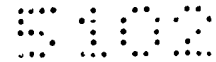
A megfelelő rejtett antigének körébe tartozik az előzőekben említett H110D, ennek rekombináns formája előállítására szolgáló eljárás a WO93/23542 számon közzétett PCT szabadalmi leírásban található. Megemlítjük még a H45 protein komplexet, amelynek leírása a WO90/11086 számú és az antigéneket, amelyek leírása a WO94/02169 számú PCT szabadalmi leírás-

ban található. Az utóbbi esetben említett antigének olyan integrális membrán proteinekkel bírnak, amelyek natív lokalizációja a parazita belében van, és amelyekre az jellemző, hogy pepsztatinhoz, búzacsíra lektinhez, földimogyoró lektinhez és más olyan lektinekhez képesek kötődni, amelyek β -kötésű N-acetil-galaktózaminra fajlagosak. Az ilyen antigének proteolitikus enzimek lehetnek, különösen aszpartil-proteáz és/vagy neutrális endopeptidáz aktivitással bíró enzimek. Külön említést érdemelnek a H-gal-GP és O-gal-GP antigének, amelyek részletes leírása a WO94/02169 számon közzétett PCT szabadalmi leírásban szerepel.

Az antigének, fragmentumaik, prekursoraik, funkciósan ekvivalens variánsaik és származékaik lehetnek közvetlenül a bélférgekből izolált natív antigének vagy lehetnek szokásos eljárások, például a Sambrook és munkatársai [Molecular Cloning, a laboratory manual 2. kiadás, Cold Spring Harbour Press, (1989)] által leírt standard eljárások alkalmazásával végrehajtott rekombináns DNS eljárásokkal előállított antigének, vagy kémiai szintézissel, például a jól ismert Merrifield szilárd fázisú szintézis eljárással előállított antigének.

Az állatnak beadott vakcina készítmény lehet polivalens, tartalmazhatja antigén komponensek sorát, például olyanokat, amelyek a bélféreg fajok egy sora ellen aktívak.

A vakcina készítmény a találmány szerint előállítható a vakcina gyártás területén ismert módokon. A hagyományos vakcina készítmények egy vagy több találmány szerinti antigént vagy antitestet tartalmazhatnak, kívánt esetben egy vagy több további adjuvánssal, például alumínium-hidroxiddal, kálium-alumináttal, szaponinnal vagy származékaival, muramil dipeptiddel, ásványi vagy növényi olajokkal, NAGO, novaszómák vagy nemionos blokk kopolimerek, DEAE dextrán vagy szabályozott felszabadulású antigén szállító rendszerek, például biológiailag lebomló mikrorészecskék jelenlétében, egy vagy több gyógyászati szempontból elfogadható hordozó vagy hígítóanyaggal együtt.



Megfelelő hordozóanyagok például a folyékony közegek, például a peptidek vagy polipeptidek állatba vagy betegbe való bevitelére alkalmas sóoldat. További komponensként a készítmények tartósítószeret is tartalmazhatnak.

Egy másféle vakcina készítmény tartalmazhat egy vírust vagy gazdasejtet, például egy élő, elölt vagy legyengített mikroorganizmust, amelybe egy nukleinsav molekula (például egy DNS molekula) van inszertálva, az inszertált nukleinsav molekula által kódolt polipeptid elleni immunválasz fokozására.

A vakcina készítmény adagolása bármely szokásos úton, például orálisan, parenterálisan, például intramuszkuláris vagy szubkután vagy intradermális injekció formájában történhet. Előnyös az injekció alkalmazása.

A találmányt a továbbiakban részletesebben mutatjuk be sajátos hivatkozással Haemonchus ellési ideje körüli tojás szaporodására birkában H110D rejtett antigén alkalmazásával. Bár a találmány általánoosságát nem kívánjuk korlátozni, megjegyezzük, hogy a Haemonchus antigének alkalmazása birkák Haemonchus tojás lerakásának ellési ideje körüli szaporodásában a találmány egy előnyös szempontja. A következő példákban hivatkozott ábrák jelentése a következő:

Az 1. ábrán a széketben lévő átlagos tojásszámot mutatjuk be (1000 tojás/gram) az idő függvényében vakcinált és nem-vakcinált, vemhes és nem vemhes juhok esetén, amelyeket a vemhesség 110. napján fertőző Haemonchus lárvákkal provokáltunk.

- D csoport (17 vemhes, H110D-vel és COVEXIN 8 clostridium vakcinával vakcinált juh)
- + E csoport (18 vemhes, H110D-vel vakcinált juh)
- ◇ F csoport (5 nem-vemhes, H110D-vel és COVEXIN 8 vakcinával vakcinált juh)
- △ G csoport (3 nem-vemhes, H110D-vel vakcinált juh)
- x C csoport (17 vemhes, kontrollként ferritinnel vakcinált juh)

A nyíl a provokálás idejét mutatja.

A 2. ábrán 5-hetes korukban H. contortus provokációnak kitett bárányok kolosztrummal átvitt H110D antitestek által való védelmét mutatjuk be (tojás szám a székletben, 1000 tojás/g) az idő függvényében (az időt az átlagos ellési időtől eltelt napokban adjuk meg). • vakcinált juhok bárányai; • kontroll juhok bárányai.

1. Példa

A példa célja:

- (i) H110D vakcina szabályozó hatásának vizsgálata az ellési időszak körüli időben H. contortus fertőzésnek kitett juhok bélféreg tojás kibocsátásával kapcsolatban.
- (ii) Vemhes és nem-vemhes juhok antitest válaszána felmérése a vemhességnek H110D antigén immunogenitására gyakorolt hatásának vizsgálatára.
- (iii) COVEXIN 8 klosztridium vakcina egyidejű adagolásának H11 vakcina hatékonyságára gyakorolt hatásának vizsgálata. A létező baktérium vakcinának az új parazita vakcinákkal való kompatibilitása előfeltétele gyakorlati alkalmazhatóságuknak.

Ebben a vizsgálatban H110D vakcina hatásosságát vizsgáljuk a fogamzás előtt kétszer vakcinált, és a vemhesség alatt emlékeztető vakcinálásban részesült, majd a vemhesség harmadik trimeszterében H. contortus fertőző lárvákkal mesterségesen provokált jerke bárányokra (kétéves nőtény bárányok). A jerke bárányok esetén kapott eredményeket korban hozzájuk illesztett, vakcinált, nem-vemhes csoportéhoz hasonlítottuk.

Időrend (fő dátumok)

Dátum	A napok száma	Hatás
Szeptember eleje	-50	Legeltetett jerke bárányok levamisollal való

		kezelése (NILVERM GOLD).
	-40	A csoport randomizálása és primer vakcinálások.
	-10	Másodlagos vakcinálások
	- 8	A kosok bevezetése mintegy 3 hét időtartamra.
	0	(A fogantatás átlagos időpontja.)
	80	Minden jerke báránynak ivermektin (ORAMEC DRENCH) adása és behajtásuk.
	90	Tercier vakcinálások.
	110	Minden jerke báránynak mintegy 10 000 H. contortus fertőző lárvát adunk. Megkezdjük a kéthetenkénti székletmintázást.
Március/április	147	Az ellés kezdete.
Július/augusztus	267	A bárányok elválasztása.

A következőkben a módszereket és a kísérleti rendet ismertetjük.

60 jerke bárányt, amelyekből a bennük megtelepedett bélférgeket levamisol (NILVERM GOLD) adagolásával eltávolítottuk, 1991 kora-szeptemberétől szabadon legeltettük. Egy minimális 7 napos akklimatizálást követően a jerke bárányokat véletlenszerűen három, az A, B illetve C csoportra osztottuk, amelyek rendre 35, 8, illetve 17 jerke bárányból álltak. Az A és B csoport jerke bárányait H110D-vel vakcináltuk (-40. nap), míg a C csoportét kontrollként ferritinnel vakcináltuk. 30 nap múlva (-10. nap) a jerke bárányok második vakcinálásban részesültek, majd ezt követően további csoportokra osztottuk őket: az A csoport jerke bárányait az új D és E csoportokra osztottuk, míg a B csoportéból hasonlóan képeztük az F és G csoportokat. A kosokat október utolsó hetében vittük a C, D és E csoport állataihoz, hogy a fogantatás átlagos dátuma lehetőleg a 0. naphoz legközelebb legyen, és az ellés tervezett

ideje március utolsó és április első hetére essen. Az F és G csoportok jerke bányait nem hoztuk össze kosokkal, ezek szolgáltak vakcinált, nem-venhes kontrollként. Mintegy 6 hét elteltével a kosokat eltávolítottuk a körülkerített legelőről, és a jerke bányákat egy nyájként együtt hagytuk legelni. A 80. napon minden jerke bányának ivermektint (ORAMEC DRENCH) adtunk, hogy eltávolítsunk minden kifejlett bélférget és visszatartott lárvát, és behajtottuk őket. A D, F, E és G csoportokban lévő minden jerke bányát tercier vakcinálásban részesítettünk H110D beadásával a 90. napon (azaz a vemhesség 90. napja \pm 10 nap időpontban). A D és F csoportok jerke bányái ebben az időpontban COVEXIN 8 injekciót is kaptak. A vemhesség 110. napja \pm 10 nap időpontban minden állatot mintegy 10 000 H. contortus fertőző lárvával provokáltunk. A nematódák számát a széklet mintázásával követtük nyomon. A H110D rejtett antigénre adott immunválasz lehetséges szuppressziójának hiányát a terhesség alatt az antitest szint nyomonkövetésével igazoltuk.

Az állatok csoportosítását és kezelését az alábbi táblázatban foglaljuk össze:

Csoport Azonosítás:	Vakcináltsági állapot	Vemhes/nem-vemhes
A csoport:	A fogamzás előtt kétszer vakcinált (H110D)	vemhes
D csoport	H110D + COVEXIN 8 a vemhesség 90. napján	vemhes
E csoport	H110D a vemhesség 90. napján	vemhes
B csoport	vakcinált (H110D) }	nem-vemhes
F csoport	H110D + COVEXIN 8 }	nem-vemhes
G csoport	H110D }	nem-vemhes
C csoport	vakcinált (ferritin) }	vemhes

} = A D és E csoportokkal időben egyeztetett vakcinálás.

A vizsgálathoz alkalmazott *Haemonchus contortus* (H110D) vakcinát az Institute of Animal Physiology and Genetics Research, Babraham, Cambridge készítette és biztosította számunkra. A primer vakcináláshoz adjuváns rendszerként Freund-féle komplett adjuváns/alumínium-hidroxid (FCA/A1 (OH)₃) rendszert és Freund-féle inkomplett adjuváns/alumínium-hidroxid (FIA/AI (OH)₃) rendszert alkalmaztunk mind a szekunder, mind a terciér vakcinálásoknál.

Az alkalmazott ló ferritin kontroll vakcinát az Institute of Animal Physiology and Genetics Research, Babraham, Cambridge készítette és biztosította számunkra. Az alkalmazott adjuváns rendszer a fentivel azonos.

A következőkben a parazita-provokáláshoz alkalmazott anyagokat és módszereket ismertetjük.

Fajok/törzsek

A vizsgálatban egy benzimidazol-rezisztens *H. contortus* törzset (H/CR) alkalmaztunk. A törzset harmadik lárva állapotában kaptuk, származási helye: Central Veterinary Laboratory, Weybridge. A benzimidazol-rezisztenciát tojás

kikelési vizsgálattal és kontroll vizsgálattal erősítettük meg [Cawthorne R.J.G. és Cheong F.H.; Veterinary Record 114, 562 (1984)].

Lárva tenyészet

Elegendő számú harmadik állapotú lárvát hoztunk létre bélféregtől mentes bárányon való passzálással. A tojásokat tartalmazó széketet összegyűjtöttük, és fertőző állapotig tenyésztettük. A fertőző lárvákat Baermann berendezéssel nyertük ki és tisztítottuk.

Fertőző dózisok

Mintegy 10 000 fertőző lárvát tartalmazó oltóanyagokat készítettünk standard hígításos eljárással. A lárvákat szájon át adagoltuk tiszta műanyag csövek alkalmazásával.

Provokálási eljárás

Annak érdekében, hogy szabályozott provokálást valósítsunk meg, a jerke bárányokat vemhességük utolsó trimeszterében ivermektinnel (ORAMEC DRENCH) kezeltük, hogy minden felgyülemlett bélféreg terhelést eltávolítsunk, és azonnal behajtottuk őket, ez a 80. napon történt. A vemhesség 110. napján minden jerke báránynak mintegy 10 000 H. contortus fertőző lárvát adtunk, ezzel utánoztuk szabályozott módon az ellés ideje körüli tojás szaporodás körülményeit.

A következőkben a vizsgálati eljárást ismertetjük.

Az állatokat csoportokba randomizáltuk az adott időben lévő testtömegük alapján.

Az A és B csoportok jerke bárányait a -40. napon hátsó lábaikba adott 150 µg H. contortus antigénnel (H110D, 1 ml/láb, összesen 2 ml) intramuszkuláris injekcióval vakcináltuk, majd a -10. napon első lábaikba adott (1 ml/láb, összesen 2 ml) intramuszkuláris injekcióval vakcináltuk. A 90. napon a D, E, F és G csoportok kialakítása után ezen négy csoport mindegyikének jerke bárányai egy



harmadik intramuszkuláris injekció formájában beadott vakcinát kaptak hátsó lábaikba (az eljárás a primer vakcináláséval azonos). Egyidejűleg a D és F csoportba tartozó jerke bárányoknak szubkután a nyakukba (a gyártó adatlapja szerint) COVEXIN 8 klosztridiális vakcinát adtunk. A C csoport jerke bárányait kontrollként kezeltük, ezek ló ferritin injekciókat kaptak (a H110D vakcinánál alkalmazottal azonos adagolási úton és térfogatban) a -40., -10. és 90. napon, valamint COVEXIN 8-t (szubkután) a 90. napon.

A következőkben a védőhatás vizsgálatát ismertetjük.

Széklet tojásszám

Minden jerke báránytól a végbélből hetenkénti gyakorisággal székletmintákat vettünk az ellést megelőző mintegy hatodik héttől a vizsgálat lezárásáig. A széklet tojásszámot McMaster módszerrel határoztuk meg a székletben előforduló 10 tojás/gram pontossággal. A széklet mintákat kéthetenként 7 napon át tenyésztettük 27 °C hőmérsékleten a lárvák azonosítására, valamint a provokálás tisztaságának megerősítésére.

A ConAH11-val történő vakcinálást követő antitest válasz

A primer vakcinálást követően kéthetenkénti gyakorisággal egyszerű vértartályba vérmintákat vettünk minden jerke bárány juguláris vénájából. Referencia szérumként a primer immunizálás napján elő-véreket gyűjtöttünk. Az antitest szinteket ELISA eljárással határoztuk meg.

A következőkben eredményeinket ismertetjük.

A vizsgálat eredményeit az 1. ábrán mutatjuk be. Világosan látható, hogy a nem-vakcinált vemhes jerke bárányok (C csoport) a mesterséges provokációt követően az ellés körüli időben magas szinten termelnek nematóda tojásokat. Ezzel ellentétben minden vakcinált jerke bárány lényegesen csökkent számban termel tojásokat székletében. A védőhatás nem csökkent azokban a jerke bárányokban, amelyek együttes adagolással klosztridium vakcinát kaptak.

Az 1. táblázatban a vizsgálatba vont állatok antitest szintjének meghatározására szolgáló ELISA vizsgálat eredményeit ismertetjük. Látható, hogy minden vakcinált jerke bárány magasabb antitest szinttel bír, mint a nem-vakcinált kontrollok. A vakcinált vemhes jerke-bárányok antitest szintje hasonló a nem-vemhes vakcináltakéhoz, megerősítve, hogy a rejtett antigénekre adott antitest válasz szuppressziója nem következik be. A COVEXIN 8 klosztridium vakcina egyidejű adagolása nem hat az antitest szintekre.

1. Táblázat

**1:1000 arányban hígított szérum minták H110D-vel szemben adott ELISA
abszorpciós leolvasásai**

Az állat száma	Csoport	90 nap vemhesség	100 nap vemhesség	Az állat száma	Csoport	90 nap vemhesség	100 nap vemhesség
223	C	0,459	0,419	180	E	1,714	2,132
226	"	0,267	0,287	191	"	1,905	2,420
231	"	0,203	0,148	193	"	1,856	2,290
234	"	0,096	0,178	199	"	2,123	2,309
235	"	0,112	0,234	209	"	1,965	1,998
236	"	0,098	0,294	212	"	1,093	2,104
237	"	0,150	0,108	214	"	1,654	2,520
238	"	0,741	0,552	224	"	1,556	2,708
175	"	0,119	0,108	227	"	1,486	2,314
195	"	0,229	0,175	228	"	1,278	2,236
202	"	0,495	0,267	233	"	1,202	2,218
204	"	0,368	0,247	239	"	1,155	2,251
207	"	0,118	0,153	240	"	1,673	2,531
210	"	0,339	0,308	241	"	1,391	2,548
215	"	0,190	0,117	245	"	1,921	2,484
				248	"	1,268	2,505
217		NS	NS	253	"	1,750	2,408
216		NS	NS	298	"	1,911	2,222
	Átlag	0,271	0,247		Átlag	1,606	2,344

1. Táblázat (folytatás)

Az állat száma	Csoport	90 nap vemhesség	100 nap vemhesség	Az állat száma	Csoport	90 nap vemhesség	100 nap vemhesség
222	D	0,880	2,165	198	F	2,062	2,105
230	"	1,289	2,288	203	"	1,792	NS
244	"	2,126	2,523	243	"	1,373	2,446
247	"	1,871	2,553	246	"	1,865	2,326
249	"	1,910	2,505	264	"	1,436	2,418
250	"	1,894	NS		Átlag	1,706	2,23
255	"	1,710	2,459				
190	"	1,918	2,283				
194	"	1,837	2,311				
196	"	1,556	2,421				
197	"	1,658	1,875	189	G	1,565	2,285
200	"	1,864	2,137	205	"	1,271	1,761
208	"	2,066	2,199	272	"	1,637	2,484
211	"	1,869	2,066		Átlag	1,409	2,217
213	"	1,418	2,443				
274	"	1,612	2,239				
300	"	1,301	2,214				
	Átlag	1,692	2,281				

D csoport = Vemhes (H110D + COVEXIN 8)

E csoport = Vemhes (csak H110D)

F csoport = Nem-vemhes (H110D + COVEXIN 8)

G csoport = Nem-vemhes (csak H110D)

C csoport = Vemhes, ferritin kontrollal

NS = Nem vettünk mintát

2. Példa

H110D közvetítette immunitás átvitele kolosztrummal

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a védőhatásnak fiatal bárányokra kolosztrummal való átvitelét, meghatároztuk a védőhatást mintegy 5 hetes, H110D-vel immunizált jerke bárányok szopósbárányaiban nem-immunizált anyák szopósbárányaihoz viszonyítva. A védőhatást mint a kapszulás adagolással történő provokálást követően a széklettel való tojáskibocsátás és bélféreg terhelés csökkenését határoztuk meg.

Az alábbi 2. táblázatban a kísérlet tervezését mutatjuk be.

2. Táblázat

Csoport	Provokált bárányok száma	Provokálás 5 hetes korban (L ₃ lárvák)
A vemhesség alatt H110D vakcinával vakcinált juhok bárányai	6	3000
A vemhesség alatt H110D vakcinával nem vakcinált juhok bárányai	6	3000

A vemhes bárányok H110D-vel való immunizálásának részletei azonosak az 1. példában leírttal. Tíz H110D-vel immunizált jerke báránytól származott bárányt és tíz kontroll bárányt választottunk ki 2-3 hetes korukban az elsőként való megfogás alapján. Ezek antiszérumát anti-H110D antitest szintre ELISA vizsgálattal szkríneltük. A H110D-vel immunizált jerke bárányok csoportjából kiválasztottuk a hat legmagasabb antitest szintet mutató bárányt. Hat kontroll bárányt választottunk, amelyek korban az előbbiekkal összeillesztettek. Ezt a két bárány csoportot 3000 L₃H. contortus lárzával (H/CR törzs) provokáltuk 4-5 hetes korukban. A bárányok székletének tojásszámát 8-11 hetes koruk között nyomon

köveltük, majd 11 hetes korukban boncolást követően megszámláltuk bélféreggel való terheltségüket.

A következőkben a vizsgálat eredményeit ismertetjük.

Az anti-H110D antitestek kolosztrummal való átvitelét a H110D-vel immunizált anyáktól származó hat bányai magas antitest szintje igazolja (lásd a 3. táblázatot). Ezzel ellentétben a kontroll anyáktól származó bányákban nem mutattunk ki anti-H110D antitesteket.

3. Táblázat

A bányák kora (hét)	2/3	3/4	7/8	8/9	10/11
	Átlagos optikai denzitás 405 nm-nél				
H110D-vel immunizált juhok bányái	1,5	1,6	0,9	0,9	0,6
Kontroll juhok bányái	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = nem kimutatható

A szérum hígítása 1/1000

Az összes tojásszám a székletben a 8 - 11 hetes kor között mintegy 50 %-kal alacsonyabb ($p < 0,05$) az immunizált bányáknál, mint a kontroll bányáknál (lásd a 2. ábrán), ez összhangban áll a kifejlett nőstény bélféreg alacsonyabb számával (lásd alább). 5 héttel a provokálást követően az átlagos bélféreg terhelés a következő:

4. Táblázat

Csoport	Átlagos féregszám	% Védelem	Átlagos Nőstény/hím arány
H110D-vel immunizált juhok bányái	625	30,0	0,35
Kontroll juhok bányái	892		1,15

A bélféreg terhelés csökkenése nem szignifikáns ($P > 0,05$). Jelentős csökkenés van azonban a nőstény/hím arányban ($P < 0,05$), ami a H110D immunizálás legtöbb érett báránynál mutatott jellemző hatása.

Összegezve, a H110D-vel immunizált anyáktól született, és ezek által nevelt bárányok H110D elleni antitest szintje a kolosztrum transzferből származóan jelentős. Ez az antitest védelmet nyújt az 5-hetes korban pilulaként végrehajtott provokálásból származóan székletben való tojáskibocsátás és bélféreg terhelés ellen.

Szabadalmi igénypontok

1. Egy vagy több bélféreg parazita ellen immunogén aktivitással bíró bélféreg rejtett antigén vagy antigén fragmentum, prekursor és funkciós származékaik vagy variánsaik alkalmazása vakcina készítmény előállítására, amely az ellést megelőző és/vagy ellés körüli időben legalább egyszer adagolva az állat védő immunitását fokozza az ellés körüli időszakban az adott bélféreg parazitával szemben.

2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vakcina készítmény előállítására, amely egy nőtény állatnak a fedezést megelőzően és/vagy a vemhesség harmadik trimeszterének kezdetéig legalább egyszer beadva fokozza az állat ellés körüli időben való védő immunitását az adott bélféreg parazitával szemben.

3. A 2. igénypont szerinti alkalmazás a bélférgek ellés ideje körüli szaporodásának megelőzésére vagy csökkentésére.

4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti alkalmazás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a vakcina készítményt egy nőtény állatnak adjuk be a fedezést megelőzően legalább egyszer, és a vemhessége során a vemhesség harmadik trimeszterének kezdetéig legalább egyszer.

5. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a vakcina készítményt a nőtény állatnak a fedezést megelőzően legalább egyszer, és a vemhesség második trimeszterének kezdetéig legalább egyszer beadjuk.

6. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás a II típusú ostertagiasis ellen.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a bélféreg rejtett antigén egy integrális bélmembrán protein.

8. A 7. igénypont szerinti alkalmazás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a bélféreg antigén egy enzim vagy egy transzport protein.

9. A 8. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a bélféreg antigén egy proteáz vagy exo- vagy endopeptidáz.

10. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a bélféreg antigén a H110D, H45, H-gal-GP és O-gal-GP antigének körébe tartozó, vagy azok antigén fragmentuma vagy prekurzora.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy egy kérődző állatot kezelünk.

12. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy birkát, marhát, szarvast, kecskét vagy kutyát kezelünk.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a Haemonchus, Ostertagia, Trichostrongylus, Chabertia, Oesophagostomum, Hyostrongylus, Nematodirus, Toxocara és Cooperia fajok körébe tartozó paraziták elleni védő aktivitást fokozzuk.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a vakcina egy szabályozottan felszabaduló készítménnyé formált.

15. A H110D antigén vagy antigén fragmentuma 1-5. és 7-14. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazása birkák ellési ideje körüli időben Haemonchus tojások széklettel való ürítésének szaporodása ellen ható vakcina készítmény gyártására.

27 oldal
+ 2 oldal

29 oldal
Lcl

A meghatalmazott:

Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.

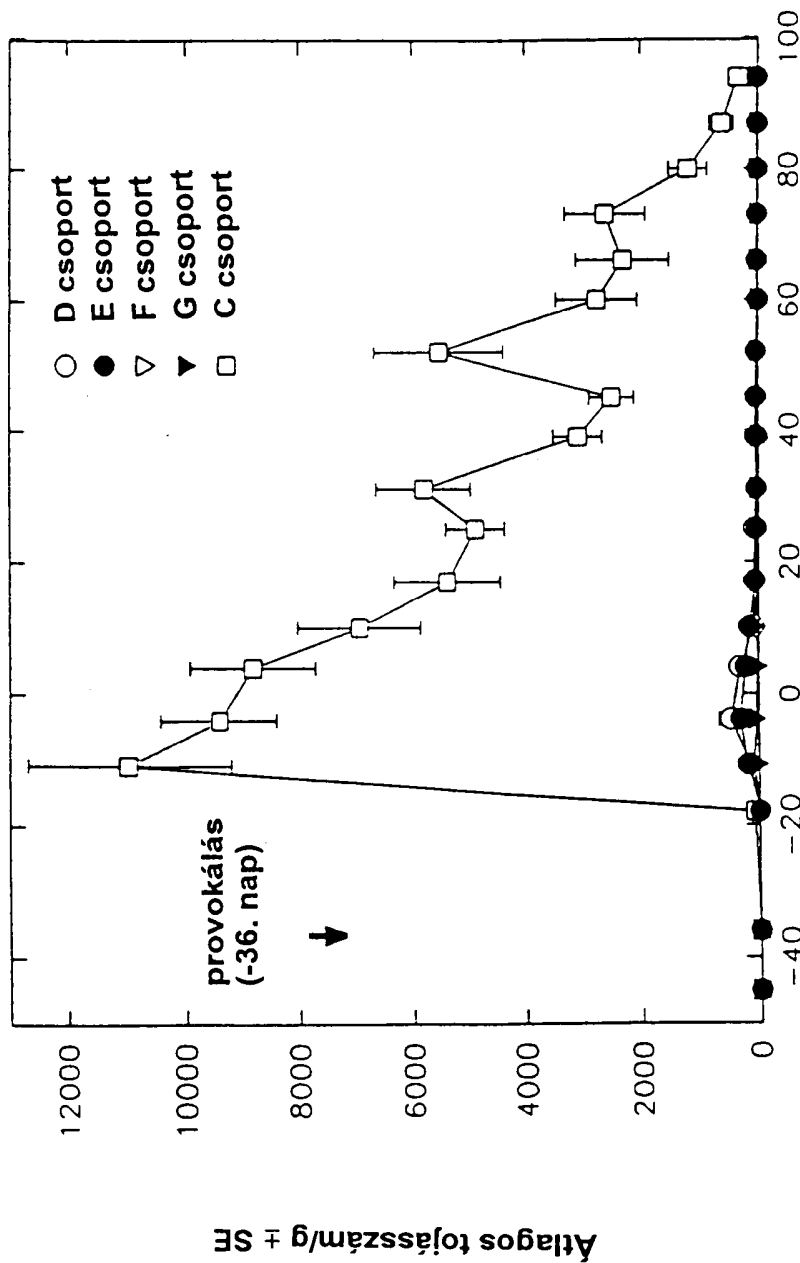
Válas Györgyné dr.

szabadalmi ügyvivő

2467/95

P 95 02467

1/2



Az átlagos ellési időhöz viszonyított napok száma

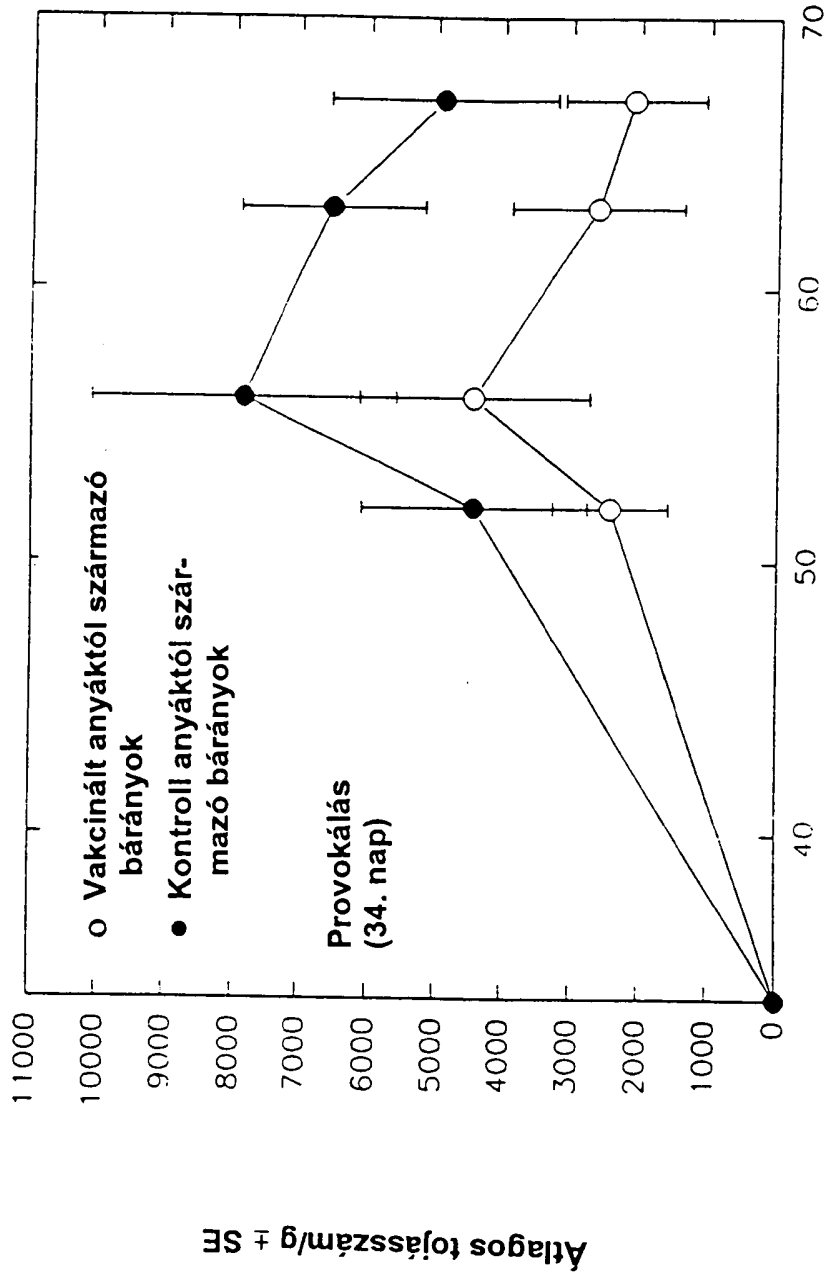
1. ábra



2467/95

P 95 02467

2/2



Az átlagos ellési időt követő napok száma

2. ábra