



(12) **PATENT**

(11) **342654**

(13) **B1**

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20035762	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.06.07 PCT/IB2002/02121
(22)	Inng.dag	2003.12.22	(85)	Videreføringsdag	2003.12.22
(24)	Løpedag	2002.06.07	(30)	Prioritet	2001.07.02, US, 302636
(41)	Alm.tilgj	2004.02.02			
(45)	Meddelt	2018.06.25			
(73)	Innehaver	Zoetis Services LLC, 10 Sylvan Way, US-NJ07054 PARSIPPANY, USA			
(72)	Oppfinner	Robin Lee Keich, c/o Pfizer Global Research and Development, Groton, CT 06340, US-, USA Lisa Grace Sabbadini, c/o Pfizer Global Research and Development, Groton, CT 06340, US-, USA			
(74)	Fullmektig	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Anvendelse av en <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> bakterin for fremstilling av en vaksine for behandling eller forebygging hos griser seronegative for <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>.			
(56)	Anførte publikasjoner	Proceedings of the 2000 AASP conference, held in the Westin Hotel, Indianapolis USA, March 11-14 2000, page 125, LLOYD L. C. ET AL. "Protection against enzootic pneumonia of pigs: intraperitoneal inoculation with live LKR strain of <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> ", Australian Veterinary Journal, vol. 66, no. 1, 1989, side 9-12, WO 9118627 A1, NO 20030423 A			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse angår fremgangsmåter for å behandle eller forebygge en sykdom eller lidelse i et dyr forårsaket av infeksjon med *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) ved å administrere til dyret ved ca. tre (3) til ti (10) dagers alder en enkel dose av en effektiv mengde av en *M. hyo*-vaksine. *M. hyo*-vaksinen kan være en inaktivert eller modifisert levende fremstilling av hel eller del av en celle, en subenhetsvaksine eller en nukleinsyre eller DNA-vaksine. *M. hyo*-vaksinen administrert ifølge foreliggende oppfinnelse kan syntetiseres eller produseres rekombinant.

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer anvendelse av en *Mycoplasma hyopneumoniae* bakterin for fremstilling av en vaksine for behandling eller forebygging hos griser seronegative for *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Bakgrunn for oppfinnelsen

M. hyo er et bakterielt patogen som forårsaker enzootisk pneumoni i gris. Enzootisk pneumoni er en kronisk sykdom som resulterer i dårlig omdannelse av mat, hemmet vekst og predisposisjon for sekundære lungeinfeksjoner. *M. hyo* blir lett overført gjennom luftveissekresjoner og ved purke-til-grisunge-overføring og er svært alminnelig på grisefarmer. Omtrent 99 % av amerikanske grisebestander er infisert, hvilket koster svineindustrien ca. 300 millioner dollar årlig.

Majoriteten av kjente vaksiner mot *M. hyo* er basert på inaktiverte helcellefremstillinger av *M. hyo* med adjuvans. I tillegg kan vaksiner basert på immunogene polypeptider eller proteiner syntetiseres eller fremstilles ved kloning og rekombinant ekspresjon av *M. hyo*-gener. *M. hyo*-gener som kan uttrykke slike polypeptider eller proteiner *in vivo* kan også anvendes som vaksiner.

Eksempler på helcelle, inaktiverte *M. hyo*-vaksiner omfatter RESPISURE og STELLAMUNE, kommersielt tilgjengelig fra Pfizer Inc., USA.

I tillegg er flere rekombinant fremstilte immunogene polypeptider og proteiner av *M. hyo* som kan være anvendelig som subenhetsvaksiner beskrevet. Internasjonal patentpublikasjon WO 96/28472 beskriver seks proteinantigentyper av *M. hyo* ved molekylvekter på 46-48, 52-54, 60-64, 72-75, 90-94 og 110-114 kilodalton og beskriver proteindelsekvenser av antigenene på 52-54, 60-64 og 72-75 kilodalton og fullengde nukleotid- og aminosyresekvenser til antigenet på 46-48 kilodalton.

Kloningen av genet som koder for *M. hyo*-proteinet P46, dvs. p46, ble også

beskrevet av Futo et al. (1995; J. Bacteriol. 177:1915-1917). Den samme gruppen viste at det *in vitro*-uttrykte genproduktet var anvendelig i diagnostisering av antistoffresponser til *M. hyo*-infeksjoner uten kryssreaktivitet til andre *Mycoplasma*-arter (Futo et al., 1995, J. Clin. Microbiol. 33:680-683). Sekvensene og diagnostiske anvendelser av p46-genet beskrevet av Futo et al. er videre beskrevet i europeisk patentpublikasjon nr. 0 475 185 A1.

Wise og Kim (1987, J. Bacteriol., 169:5546-5555) rapporterer at det er fire integrerte membranproteintyper i *M. hyo*, kalt p70, p65 (P65, *supra*), p50 og p44, og at de siste tre er modifisert ved kovalente lipidbindinger og induserer en sterk humoral immunrespons. De protektive effektene av immunresponsen ble ikke undersøkt. Genet som koder for P65-proteinet er klonet, og dets sekvenser og anvendelser i vaksiner og diagnostikk er beskrevet i U.S. patent nr. 5.788.962.

Internasjonal patentpublikasjon WO 91/15593 beskriver fem proteiner av *M. hyo* med tilsynelatende molekylvekter på 105, 90, 85, 70 og 43 kilodalton. En fullengdesekvens av genet som koder for 85 kilodalton protein (protein C) ble fremskaffet, hvilket var tilfelle for nukleotiddelsekvenser som koder for de andre fire proteinene.

U.S. patent nr. 5.252.328 til Faulds beskriver aminoterminalsekvenser til immunreaktive *M. hyo*-proteiner, der molekylvektene til disse er 36, 41, 44, 48, 64, 68, 74,5, 79, 88,5, 96 og 121 kilodalton. Andre proteiner identifisert basert på de elektroforetiske mobilitetene, men som ingen proteinsekvenser var beskrevet for, hadde tilsynelatende molekylvekter på 22,5, 34 og 52 kilodalton. Selv om U.S. patent nr. 5.252.328 foreslo anvendelse av disse proteinene i vaksineformuleringer, ble ingen resultater av vaksinestudier rapportert.

Internasjonal patentpublikasjon WO 95/09870 beskriver biokjemiske fremgangsmåter for rensing av *M. hyo*-adhesiner, de

mykoplasmaintegreerte membranproteinene ansvarlig for adhesjon til ciliene i vertens øvre respiratoriske epitel. WO 95/09870 foreslår også tester og anvendelser for disse proteinene for eksempel i vaksiner og diagnostikk.

Lisa Truchan et al i "Proceedings of the 2000 AASP conference", holdt i Westin Hotel, Indianapolis USA, 11-14. mars 2000, s.125 beskriver en varighet av immunitetsstudie i griser av en *M. hyopneumoniae* bakterin vaksine som demonstrerer at enkeltdose administrert ved både 3 uker og 8 uker beskyttet grisene mot eksperimentell utfordring som blir gitt 18 uker senere.

Lloyd L. C. et al sammenligner en enkeltdose med en dobbeltdose av en levende eksperimentell vaksine av *M. hyopneumoniae*. Den gjennomsnittlige alderen til grisene ved første inokulasjon var 75.6 og 50.6 dager.

WO 91/18627 beskriver en inaktivert *M. hyopneumoniae* vaksine som skal bli administrert i to doser, den første ved omtrent 1 uke alder og den andre 2 uker senere ved alder på 21 dager.

NO20030423A beskriver en levende temperatursensitiv *M. hyopneumoniae* vaksine som kan bli administrert i en eller flere doser.

En forskningsartikkel ved King et al. (1997; Vaccine 15:25 -35) beskrev Mhp1, et 124 kilodalton adhesin som er en stammevariant av P97.

En 94 kilodalton variant av P97 ble identifisert av Wilton et al. (1998, Microbiology 144:1931-1943). I tillegg ble p97-genet vist å være del av et operon som også koder for et annet protein, betegnet P102, med en antatt molekylvekt på ca. 102 kilodalton (Hsu et al., 1998, Gene 214:13-23). Minion og Hsu foreslår anvendelse av P102 i vaksiner i internasjonal patentpublikasjon WO 99/26664, men rapporterer ikke

vaksinestudier.

Ingen av de kjente *M. hyo*-vaksinene er beskrevet som effektive i en en-dose- behandling av ca. 3 til 10 dager gamle gris. En slik vaksine vil eliminere behovet for multipl dosering og dermed signifikant redusere kostnadene og arbeidet forbundet med den verdensomfattende massive vaksinasjonen av grisebestanden.

Derfor er det et behov for en effektiv *M. hyo*-vaksine som kan administreres i en en-dose-vaksinasjon til ca. 3 til ca. 10 dager gamle gris for å beskytte og forebygge sykdommer eller lidelser forårsaket av *M. hyo*.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer anvendelse av en *Mycoplasma hyopneumoniae* bakterin for fremstilling av en vaksine for behandling eller forebygging hos griser seronegative for *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig anvendelse av en *Mycoplasma hyopneumoniae* bakterin for fremstilling av en vaksine for behandling eller forebygging hos griser seronegative for *Mycoplasma hyopneumoniae*, en sykdom eller lidelse forårsaket av infeksjon med *Mycoplasma hyopneumoniae* for administrasjon til grisene fra 3 til 10 dager gamle, en effektiv mengde av en enkelt dose av *Mycoplasma hyopneumoniae* vaksine.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse som angitt ovenfor idet enkeltdosen av *M. hyopneumoniae* vaksinen inneholder fra 1×10^6 til 5×10^{10} fargeskiftende enheter (CCU) per dose.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse som angitt ovenfor idet mengden av den administrerte vaksinen er fra 0,5 til 3,0 ml.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse som angitt ovenfor idet *Mycoplasma hyopneumoniae* bakterien inneholder stamme P-55722-3.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse som angitt ovenfor idet *Mycoplasma hyopneumoniae* vaksinen omfatter videre et viralt eller bakterielt antigen annet enn *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse som angitt ovenfor idet nevnte virus- eller bakterieantigener er valgt fra svine influensavirus (SIV), svineinfeksjons- og respiratorisk sykdomsvirus (PRRS eller mystisk svinsykdom), diaré etter avvenning (PWD) og griseproliferativ enteritt (PPE) .

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse som angitt ovenfor idet nevnte *Mycoplasma hyopneumoniae* preparering er beregnet til intramuskulær administrering.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse som angitt ovenfor idet grisene er beskyttet opptil 25 uker etter vaksinerings.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse som angitt ovenfor idet *Mycoplasma hyopneumoniae* vaksinen omfatter videre en adjuvans.

Metodene beskrevet eliminerer nødvendigheten av ytterligere doser for å generere og/eller opprettholde immunitet mot *M. hyo*. Metoden for enkel (en) dose-vaksinasjon gir beskyttelse hos både seronegative og seropositive griser mot eksponering for virulent *M. hyo*. Metoden er effektiv i behandling eller forebyggelse av symptomene forårsaket av infeksjon med *M. hyo*, som for eksempel omfatter å forebygge og redusere lungelesjoner i gris.

Det er beskrevet administrering til gris av en effektiv mengde av en enkel dose av en *M. hyo*-vaksine, der *M. hyo*-vaksinen omfatter en fremstilling av hel eller del av en celle, slik som et bakterin eller modifisert levende fremstilling, en subenhetsvaksine, slik som en subenhetsvaksine omfattende ett eller flere *M. hyo*-avledede polypeptider eller proteiner, immunogene fragmenter av slike polypeptider eller proteiner eller ett eller flere *M. hyo*-gener som koder

for slike proteiner, polypeptider eller immunogene fragmenter, der genene eller nukleinsyrene kan bli uttrykt *in vivo*. *M. hyo*-polypeptidene, proteinene, immunogene fragmenter derav og gener eller nukleinsyrer fremskaffet i *M. hyo*-vaksinen kan syntetiseres eller produseres rekombinant ved anvendelse av teknikker kjent på området.

M. hyo-vaksinen administrert heri kan omfatte ytterligere komponenter, slik som et adjuvans. Ulike adjuvantia som kan anvendes omfatter de beskrevet heri og de kjent på området.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer anvendelse av en *Mycoplasma hyopneumoniae* bakterin for fremstilling av en vaksine for behandling eller forebygging hos griser seronegative for *Mycoplasma hyopneumoniae*.

En-dose-vaksinasjonsfremgangsmåten heri eliminerer nødvendigheten ved administrering av ytterligere doser til gris for å generere og/eller opprettholde immunitet mot *M. hyo*.

For å gjøre beskrivelsen tydeligere er den detaljerte beskrivelsen av oppfinnelsen delt inn i de følgende underavsnittene som beskriver eller illustrerer visse egenskaper, utførelsesformer eller applikasjoner av oppfinnelsen.

I visse utførelsesformer omfatter vaksinene anvendt heri en inaktivert fremstilling av en del av eller hel *M. hyo*- celle (bakterin) eller modifisert levende vaksine og en farmasøytisk akseptabel bærer eller inaktivert fremstilling av en del av eller hel *M. hyo*-celle (bakterin) eller modifisert levende vaksine og et adjuvans.

I andre spesifikke utførelsesformer omfatter vaksinene anvendt heri et immunogent protein eller polypeptid eller fragment derav og en

farmasøytisk akseptabel bærer, eller et immunogent protein eller polypeptid eller fragment derav og et adjuvans.

Definisjoner og forkortelser

Betegnelsen "behandle eller forebygge" med hensyn til en *M. hyopneumoniae*-infeksjon, slik den er anvendt heri, betyr å hemme replikasjon av *M. hyopneumoniae*-bakterier, å hemme *M. hyopneumoniae*-overføring eller å hindre *M. hyopneumoniae* i å etablere seg i verten sin og lindre symptomene for sykdommen eller lidelsen forårsaket av *M. hyopneumoniae*-infeksjon. Behandlingen er terapeutisk hvis det er en reduksjon i bakterieantall, reduksjon i lungeinfeksjoner og/eller økning i matopptak og/eller vekst. Metodene er for eksempel effektiv til å forebygge eller redusere lungelesjoner.

Betegnelsen "*M. hyo*-vaksine", slik den er anvendt heri, henviser til en vaksine anvendelig i forebyggelse eller behandling av en lidelse eller sykdom forårsaket av infeksjon med *M. hyo*. *M. hyo*-vaksinen kan omfatte hvilken som helst vaksine effektiv i behandling eller forebyggelse av infeksjon i gris med *M. hyo*. *M. hyo*-vaksinen som kan anvendes kan for eksempel omfatte en fremstilling av hel eller del av en *M. hyo*-celle, inaktiverte eller modifiserte levende vaksiner, en subenhetsvaksine som har ett eller flere *M. hyo*-avledede polypeptider eller proteiner, eller immunogene fragmenter av slike proteiner eller polypeptider, eller ett eller flere *M. hyo*-gener eller nukleinsyrer som koder for ett eller flere *M. hyo*-avledede polypeptider eller proteiner, eller immunogene fragmenter derav, og der genene eller nukleinsyrene kan bli uttrykt *in vivo* i gris.

M. hyo-polypeptider, proteiner, immunogene fragmenter av slike polypeptider og proteiner eller *M. hyo*-gener eller nukleinsyrer kan syntetiseres eller produseres rekombinant ved anvendelse av teknikker kjent på området. Fortrinnsvis er *M. hyo*-vaksinen anvendt et bakterin.

Betegnelsen "dyr", slik den er anvendt heri, henviser til alle ikke-humane dyr, omfattende pattedyr.

Betegnelsen "gris", slik den er anvendt heri, henviser til grisunger, svin, griser, porcin, purker, galter, kastrede galter, villsvin og medlemmer av Suidae-familien.

Fortrinnsvis blir metodene anvendt for et dyr som er et ikke-humant pattedyr; mest foretrukket en gris.

Betegnelsen "bakterin", slik den er anvendt heri, henviser til en fremstilling av inaktiverte hele eller deler av *M. hyo*-celler egnet for anvendelse som en vaksine.

Betegnelsen "effektiv mengde" henviser til en mengde av *M. hyo*-vaksine som er tilstrekkelig til å fremkalle en immunrespons i individet som den blir administrert til. Immunresponsen kan omfatte, uten begrensning, induksjon av medfødt, cellulær og/eller humoral immunitet.

Inaktiverte (del av eller hel celle) og modifiserte levende vaksiner

Fremgangsmåter for å fremstille konvensjonelle inaktiverte eller modifiserte levende vaksiner for anvendelse heri er kjent på området.

M. hyo-bakteriner som kan anvendes i den foreliggende en-dose-vaksinasjonsfremgangsmåten kan fremskaffes fra ulike offentlig tilgjengelige kilder.

For eksempel kan *M. hyo*-bakteriner fremstilles fra *M. hyo*-isolater. Utallige *M. hyo*-isolater er kjent for fagfolk og er tilgjengelige fra f.eks. American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Disse omfatter for eksempel: ATTC nr. 25095, 25617, 25934, 27714 og 27715.

M. hyo-isolater kan også fremskaffes direkte fra naturlig eller eksperimentelt infiserte griselungelesjoner ved anvendelse av kjente teknikker.

M. hyo-isolater kan inaktiveres ved anvendelse av mange kjente fremgangsmåter, f.eks. ved behandling av det bakterielle isolatet med binært etylenimin (BEi) som beskrevet i U.S. patent nr. 5.565.205 eller inaktivering med for eksempel formalin, varme, BPL, stråling eller glutaraldehyd.

M. hyo-bakteriner egnet for anvendelse heri kan også fremskaffes gjennom ulike kommersielle kilder. Slike kilder omfatter, men er ikke begrenset til: RESPIFEND (Fort Dodge, American Home Products), HYORESP (Merial Ltd), M + PAC (Schering Plough), PROSYSTEM M (Intervet), INGLEVAC M (Boehringer), RESPISURE (Pfizer Inc.) og STELLAMUNE MYCOPLASMA (Pfizer Inc.).

En foretrukket kilde for *M. hyo*-bakterin for anvendelse heri er RESPISURE og STELLAMUNE MYCOPLASMA.

En spesielt foretrukket kilde for *M. hyo*-bakterin for anvendelse heri er RESPISURE - 1 (Pfizer Inc.), inneholdende stamme P-5722-3 (NL1042), fremskaffet fra Purdue University, USA

Fortrinnsvis blir stamme P-5722-3 inaktivert med BEi og tilsatt et kommersielt tilgjengelig adjuvans, fortrinnsvis AMPHIGEN (Hydronics, USA). En foretrukket dose er ca. 2,0 ml. Konserveringsmidler tradisjonelt anvendt omfatter mertiolat/EDTA. En bærer, fortrinnsvis PBS, kan tilsettes. Fremstilling av modifiserte levende vaksiner, slik som ved attenuasjon av virulente stammer ved dyrking i kultur, er kjent på området.

Subenhetsvaksiner

Metoder kan utføres ved anvendelse av subenhetsvaksiner som har rensede *M. hyo*-immunogene proteiner, polypeptider og immunogene fragmenter av slike proteiner og polypeptider. Slike proteiner og polypeptider kan fremstilles ved anvendelse av teknikker kjent på området. Videre kan fremgangsmåter som er velkjent for fagfolk anvendes for å bestemme proteinrenhet eller -homogenitet, slik som polyakrylamidgelelektroforese av en prøve, etterfulgt av visualisering av et enkelt polypeptidbånd på en farget gel. Høyere oppløsning kan bestemmes ved anvendelse av HPLC eller andre lignende fremgangsmåter velkjent på området.

I en spesifikk utførelsesform omfatter vaksinen anvendt heri minst ett protein av *M. hyo* slik som, men ikke begrenset til, P46, P65, P97, P102, P70, P50 og P44.

I andre utførelsesformer omfatter vaksinen anvendt heri et *M. hyo*-bakterin (inaktivert hel eller del av celle eller modifisert levende) eller et *M. hyo*-protein eller polypeptid eller immunogent fragment derav og minst ett annet immunogen (inaktivert hel eller del av celle eller modifisert levende) eller et immunogent eller antigen protein, polypeptid eller immunogent fragment derav, og er fortrinnsvis et viralt, bakterielt eller parasittisk polypeptid. Eksempler på andre patogener og proteiner, polypeptider eller immunogene fragmenter derav omfatter, men er ikke begrenset til, svineinfluensavirus (SIV), grisereproduktivt og respiratorisk sykdomsvirus (PRRS eller "mystery swine disease"), diare etter avvenning (PWD) og griseproliferativ enteritt (PPE). En slik sammensetning er fordelaktig som en kombinasjonsvaksine.

I en videre spesifikk utførelsesform har de immunogene fragmentene av slike proteiner eller polypeptider en sekvens omfattende minst 10, minst 20, minst 30, minst 40, minst 50 eller minst 100 påfølgende aminosyrer av de

immunogene proteinene og polypeptidene anvendt heri som omfatter, men ikke er begrenset til, P46, P65, P97, P102, P70, P50 og P44.

Videre er *M. hyo*-proteinene for anvendelse i vaksiner hovedsakelig rene eller homogene. Det anvendes proteiner eller polypeptider som typisk blir rensset fra vertsceller som uttrykker rekombinante nukleotidsekvenser som koder for disse proteinene. Slik proteinrensing kan utføres med mange fremgangsmåter velkjent på området. Se for eksempel teknikkene beskrevet i "Methods In Enzymology", 1990, Academic Press, Inc., San Diego, "Protein Purification: Principles and Practice", 1982, Springer-Verlag, New York.

Rensede *M. hyo*-polypeptider og -proteiner og immunogene fragmenter derav kan også fremstilles ved anvendelse av kjente syntetiske fremgangsmåter.

Vaksineformuleringer

Egnede fremstillinger av vaksinene anvendt heri omfatter injeksjonsløsninger, enten som væskeløsninger eller suspensjoner; fast stoff egnet for å løses eller suspenderes i væske før injeksjon kan også fremstilles. Fremstillingen kan også emulgeres. De aktive immunogene bestanddelene blir ofte blandet med adjuvantia som er farmasøytisk akseptable og kompatible med den aktive bestanddelen.

Polypeptidene kan formuleres i vaksinen som nøytrale former eller saltformer. Farmasøytisk akseptable salter omfatter syretilsetningssaltene (dannet med frie aminogrupeer til peptidet) og som dannes med uorganiske syrer, slik som for eksempel saltsyre eller fosforsyre, eller organiske syrer, slik som eddiksyre, oksalsyre, vinsyre, maleinsyre og lignende. Salter dannet med frie karboksylgrupper kan også avledes fra uorganiske baser, slik som for

eksempel natrium, kalium, ammonium, kalsium eller jern(III) hydroksyder og slike organiske baser som isopropylamin, trimetylamin, 2-etylaminoglyserol, histidin, prokain og lignende.

Vaksineformuleringene anvendt heri omfatter en effektiv immuniserende mengde av *M. hyo*-immunogenet og en farmasøytisk akseptabel bærer. Vaksinefremstillinger omfatter en effektiv immuniserende mengde av ett eller flere antigener og en farmasøytisk akseptabel bærer. Farmasøytisk akseptable bærere er velkjent på området og omfatter, men er ikke begrenset til, saltvann, bufret saltvann, dekstrose, vann, glyserol, steril isoton vandig buffer og kombinasjoner derav. Ett eksempel på en slik akseptabel bærer er et fysiologisk balansert dyrkningsmedium inneholdende ett eller flere stabiliseringsmidler, slik som stabiliserte, hydrolyserte proteiner, laktose, osv. Bæreren er fortrinnsvis steril. Formuleringen skal passe administreringsmåten.

Anvendelse av rensede antigener som vaksinefremstillinger kan utføres ved standard fremgangsmåter. For eksempel skal det rensede proteinet (proteinene) justeres til en passende konsentrasjon, formuleres med hvilket som helst egnet vaksineadjuvans og pakkes for anvendelse. Egnede adjuvantia kan omfatte, men er ikke begrenset til: mineralgeler, f.eks. aluminiumhydroksyd; overflateaktive substanser slik som lysolecitin; glykosider, f.eks. saponin og saponinderivater slik som Quil A eller GPI-0100; kationiske overflateaktive midler, f.eks. DOA (kvaternære hydrokarbonammoniumhalogenider, pluroniske polyoler; polyanioner og polyatomiske ioner; polyakrylsyre, ikke-ioniske blokkpolymerer, f.eks. Pluronisk F-127 (B.A.S.F., USA); Avridine og Rantidine; peptider; rekombinante mutante labile toksiner, f.eks. leukotoksin (rmIT) eller koleratoksin (CT); kjemisk bundet eller nærliggende molekyllære transportører; mineraloljer, f.eks. Montanide ISA-50 (Seppic, Paris, Frankrike), carbopol, Amphigen (Hydronics, USA), Omaha, NE. USA,

Alhydrogel, (Superfos Bisector, Frederikssund, Danmark)
 oljeemulsjoner, f.eks. en emulsjon av mineralolje slik som BayolF/Arlacel A og vann, eller en emulsjon av vegetabilsk olje, vann og en emulgator slik som lecitin; alun, MDP, N- acetyl-muramyl-L-treonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl- D-isoglutamin, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminy-L-alanin-2-(1'-2'- dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroksyfosforyloksy)-etylamin; kolesterol cytokiner og kombinasjoner av adjuvantia. Polyatomiske ioner kan også fungere som dispergerings-, tyknings- og antiklumpingsmidler som lar vaksinen være resuspendert som en monodispers suspensjon etter en forlenget periode med stillstand der materialet har kunnet synke ned. Adjuvanskombinasjonene kan presenteres i vandig, innkapslet (kontrollert eller forsinket frigjøring) eller mikroinnkapslet form.

Immunogenet kan også inntas i liposomer eller konjugeres til polysakkarider og/eller andre polymerer for anvendelse i en vaksineformulering. I tilfeller der det rekombinante antigenet er et haptent, dvs. et molekyl som er antigen ved at det kan reagere selektivt med beslektede antistoffer, men ikke immunogent ved at det ikke kan fremkalle en immunrespons, kan haptentet bindes kovalent til en bærer eller immunogent molekyl; for eksempel vil et stort protein slik som serumalbumin gi immunogenitet til haptentet koblet til det. Haptent-bærer kan formuleres for anvendelse som en vaksine.

Gen- og nukleinsyrevaksiner

Metodene heri kan utføres ved anvendelse av *M. hyo-gener* eller -nukleinsyrer som koder for immunogene proteiner, polypeptider og immunogene fragmenter av slike proteiner og polypeptider. Slike gener og nukleinsyrer kan uttrykkes *in vivo* og fremstilles ved anvendelse av teknikker kjent på området.

I en spesifikk utførelsesform omfatter vaksinen anvendt heri minst ett gen eller nukleinsyre som koder for et protein av *M. hyo* slik som, men ikke begrenset til, P46, P65, P97, P102, P70, P50 og P44.

I en videre spesifikk utførelsesform koder genene eller nukleinsyrene anvendt heri for de immunogene fragmentene av *M. hyo*-proteinene eller polypeptider har en sekvens omfattende minst 10, minst 20, minst 30, minst 40, minst 50 eller minst 100 påfølgende aminosyrer av de immunogene proteinene og polypeptidene anvendt heri som omfatter, men ikke er begrenset til, P46, P65, P97, P102, P70, P50 og P44.

De anvendte genene eller nukleinsyrene kan administreres ved kjente fremgangsmåter, slik som for eksempel ved anvendelse av en genpistol.

I ytterligere andre utførelsesformer heri er de anvendte genene eller nukleinsyrene DNA-vaksiner. Videre kan nukleinsyrene eller genene foreligge i assosiering med liposomer eller andre transfeksjonslettende midler som er kjent på området.

Fremgangsmåter for fremstilling og levering av DNA-vaksiner er kjent på området. Se for eksempel Krishnan, B. R, "Current Status of DNA vaccines in veterinary medicine", Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier Science (2000).

Ekspresjonssystemer

En rekke vertekspresjonsvektorsystemer kan anvendes for å uttrykke de antigene proteinsekvensene heri. Slike vertekspresjonssystemer representerer måter som de kodende sekvensene av interesse kan dannes og deretter renses ved hjelp av, men representerer også celler som kan oppvise, når transformert eller transfektert med de passende nukleotidkodende sekvensene, *M. hyo*-genproduktene anvendt heri *in situ*.

Disse omfatter, men er ikke begrenset til, mikroorganismer slik som bakterier (f.eks. *E. coli*, *B. subtilis*) transformert med rekombinante bakteriofag-DNA, plasmid-DNA eller cosmid-DNA ekspresjonsvektorer inneholdende *mhp3*-kodende sekvenser; gjær (f.eks. *Saccharomyces*, *Pichia*) transformert med rekombinante gjærekspresjonsvektorer inneholdende de *M. hyo*-genproduktkodende sekvensene; insektcellesystemer infisert med rekombinante virusekspresjonsvektorer (f.eks. baculovirus) inneholdende de *M. hyo*-kodende sekvensene; plantecellesystemer infisert med rekombinante virusekspresjonsvektorer (f.eks. blomkålmosaikkvirus, CaMV; tobakkmosaikkvirus, TMV) eller transformert med rekombinante plasmidekspresjonsvektorer (f.eks. Ti-plasmid) inneholdende *M. hyo*-kodende sekvenser; eller pattedyrcellesystemer (f.eks. COS, CHO, BHK, 293, 3T3) som har rekombinante ekspresjonskonstruksjoner inneholdende promotere avledet fra genomet til pattedyrceller (f.eks. metallotioneinpromoter) eller fra pattedyrvirus (f.eks. den sene adenoviruspromoter; vacciniavirus 7,5 K-promoter). I en foretrukket utførelsesform er ekspresjonssystemet et bakterielt system.

M. hyopneumoniae-polypeptider og -proteiner og immunogene fragmenter derav kan også uttrykkes og leveres ved anvendelse av levende rekombinante virale og bakterielle vektorer slik som adenovirus eller *Salmonella*. De aktuelle vektorene er også kjent og lett tilgjengelig i faget eller kan konstrueres av en fagperson ved anvendelse av velkjent metodologi.

Dosering og administreringsmåter

En enkel dose av en effektiv mengde av en *M. hyo*-vaksine administrert til ca. 3 til 10 dager gamle gris gir effektiv immunitet mot en senere eksponering for *M. hyo*. Fortrinnsvis blir *M. hyo*-vaksinen administrert ved ca. seks til ca. åtte dagers alder. Mest foretrukket blir *M. hyo*-vaksinen administrert ved ca. sju dagers alder.

Mengden av en *M. hyo*-bakterinvaksine effektiv i en-dose-administrering inneholder ca. 1×10^6 til ca. 5×10^{10} fargeforandringseenheter (CCU) per dose. Fortrinnsvis inneholder en *M. hyo*-bakterinvaksine som tilveiebringer effektiv immunitet i en enkel dose ca. 1×10^8 til 5×10^{10} CCU/dose og mer foretrukket ca. 5×10^8 til 5×10^{10} CCU/dose.

Når det foretrukne bakterinproduktet RESPISURE - 1 blir administrert, er mengden av RESPISURE - 1 for en-dose-administrering ca. 0,5 til ca. 3,0 ml, fortrinnsvis ca. 1,5 ml til ca. 2,5 ml og mer foretrukket ca. 2 ml.

Mengden av en *M. hyo*-vaksine som er en subenhetsvaksine omfattende ett eller flere proteiner eller polypeptider eller immunogene fragmenter av slike proteiner eller polypeptider effektiv heri er fra ca. 0,01 µg til ca. 200 µg.

Mengden av en *M. hyo*-vaksine som er en vaksine omfattende ett eller flere *M. hyo*-gener eller nukleinsyrer (fortrinnsvis DNA) som koder for immunogene proteiner eller polypeptider eller immunogene fragmenter av slike proteiner eller polypeptider effektiv i fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse er fra ca. 0,1 µg til ca. 200 mg.

Administreringen heri kan oppnås ved kjente veier, omfattende den orale, intranasale, mukosale, topiske, transdermale og parenterale veien (f.eks. intravenøst, intraperitonealt, intradermalt, subkuttant eller intramuskulært). Administrering kan også oppnås ved anvendelse av nålfrie leveringsanordninger. Administrering kan oppnås ved anvendelse av en kombinasjon av veier, f.eks. først administrering ved anvendelse av en parenteral vei og deretter administrering ved anvendelse av en mukosal vei. En foretrukket administreringsvei er intramuskulær administrering.

Effektive doser (immuniserende mengder) av vaksinene heri kan også bli ekstrapolert fra doseresponskurver avledet fra modelltestsystemer.

Foreliggende vaksinasjonsfremgangsmåter gir protektiv immunitet for både seropositive og seronegative grisunger for *M. hyo*. Seropositive grisunger angir de grisunger som har antistoffer mot *M. hyo* i serumet. Seronegative grisunger angir de grisunger som ikke har detekterbare nivåer av antistoffer mot *M. hyo* i serumet.

Foreliggende oppfinnelse er videre illustrert, av de følgende eksemplene.

Eksempel 1

Fremstilling av et *M. hyo*-bakterin

Binært etylenimin (BEi) blir anvendt for inaktivering av *M. hyo*-stamme NL1042.

På slutten av vekstperioden ble pH i kulturen økt til $7,8 \pm 0,2$, og pH ble opprettholdt innenfor dette området i minst en time. Ved dette tidspunktet ble en sterilfiltrert vandig løsning av 2-

Brometylaminhydrobromid (BEA) satt til en endelig konsentrasjon på ca.

4,0 mM. I nærvær av det økte pH-nivået blir BEA kjemisk

forandret til BEi. Kulturen ble inkubert ved $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ med konstant agitasjon i minst 24 timer.

Etter den 24 timer lange inkubasjonen ble en sterilfiltrert vandig

løsning av natriumtiosulfat satt til en endelig konsentrasjon på

ca. 4 med mer, for å nøytralisere overskudd av BEi. Kulturen

ble inkubert ved $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ med konstant agitasjon for ytterligere

24 timer.

Etter inaktivering, men før nøytralisering med natriumtiosulfat, ble en representativ prøve tatt og testet for fullføring av inaktivering. Ferskt

medium inneholdende 0,0026 % fenolrød ble inokulert med et 5-20 % inokulat og inkubert ved $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i minst en uke før undersøkelse for en fargeforandring, som er tegn på mangel på inaktivering. Bulkprøver ble testet for sterilitet i tioglykollatnæringsmedium ved $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ og tryptikasesoyanæringsmedium ved romtemperatur. Den inaktiverte kulturen kan overføres til sterile lagringsbeholdere og lagres ved $2-8^{\circ}\text{C}$ inntil bruk.

Styrke ble bestemt ved en serologisk test *in vitro* for å kvantifisere antigen i den endelige beholderen. Styrken til vaksinene anvendt i effektivitetsstudien avgjør minimumstyrken som må foreligge i vaksinen på utløpsdatoen.

Bulk- eller endelige beholderprøver av ferdig produkt av hver serie eller første underserie ble testet for *M. hyo* som følger.

Bakterinet ble lagret ved -50°C i 100 ml rør. Rørene ble tint og delmengder på 15 ml blir lagret ved $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ inntil anvendelse.

For å teste styrken til en ferdig serie, ble en prøve av serien sammenlignet med en referanse og RP-enheter blir bestemt for serien. En serie eller underserie bør fortrinnsvis inneholde minst 6,33 RP ved startdatoen og minst 5,06 RP i løpet av bruksperioden.

RP henviser til relativ styrke. RP-verdiene kan bestemmes ved en relativ antigenkvantifisering sammenlignet med en referansevaksine. I dette tilfellet har referansen en RP ved definisjon = 1,0. Enkeldoseproduktet ifølge foreliggende oppfinnelse har fortrinnsvis en RP på 6,33, dvs. 6,33 ganger referansen.

Mertiolat blir tilsatt som et konserveringsmiddel i en endelig konsentrasjon som ikke overgår 0,01 % (vekt/volum).

10 % etylendiamintetraeddiksyre (EDTA, dinatrium eller

tetranatriumsalt) løsning blir tilsatt som konserveringsmiddel i en endelig konsentrasjon på ca. 0,07 % (vekt/volum).

Eksempel 2

Dyr

Bortimot en uke gamle griser ble selektert for vaksinasjon. Serologisk status til *M. hyo* ble vurdert i en ELISA-test. Griser med en ELISA-verdi $\leq 0,50$ ble betraktet som *M. hyo*-negative. Griser med en større ELISA-verdi enn 0,50 ble betraktet som serologisk positive for *M. hyo*.

Vaksiner

M. hyo-bakterin RESPISURE - 1 (Pfizer Inc.) ble anvendt til å vaksinere griser. Styrken til vaksinen ble bestemt før anvendelse ved relativ antigenkvantifisering sammenlignet med et *M. hyo*-referansebakterin. Referansevaksinen (RP = 1,0) inneholdt ca. 8000 enheter av antigen (ca. 1 til 2×10^8 CCU av levende celler høstet før inaktivering) per dose, bestemt ved en fastfaseimmuntest som målte mengden av *M. hyo*-antigen i vaksinen.

Det samme flytende adjuvanset (AMPHIGEN) anvendt i formulering av RESPISURE - 1 ble anvendt som placebo (dvs. uten bakterieceller).

Eksponeringsinokulat

Eksponeringsinokulatet ble fremskaffet som 10 ml delmengder av lungehomogenat, frosset ved $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, og ble identifisert som et derivat av *M. hyo*-stamme 11 (L1 36). Inokulatet ble tint og deretter fortynnet i Friis mykoplasmanæringsmedium for å oppnå en 1:25 fortynning og holdt på is inntil administrering. Hver gris mottok en 5 ml intranasal dose (2,5 ml per nesebor) av 1:25 suspensjonen på dager spesifisert i hvert av de følgende eksemplene. På hver dag med eksponering ble en delmengde av lungeinokulatet dyrket for å bekrefte fravær av bakteriell kontaminasjon. En andre delmengde ble titrert tilbake på

hver av de tre dagene, og resultatene indikerte at inokulatet inneholdt ca. 10^6 10^7 fargeforandringseenheter (CCU)/ml av *M. hyo*.

Eksperimentell prosedyre

Griser ble identifisert med øremarkører mens de fortsatt var med purken [Dag (- 1)]. Grisene ble fordelt i avlukker og behandlingsgrupper i henhold til et generalisert random blokkdesign. Griser ble blokkert basert på kull og postavvenningsavlukke.

På dag 0 ble griser vaksinert med enten en 2 ml intramuskulær dose av *M. hyo*- bakterin RESPISURE - 1 (Pfizer Inc.) eller en 2 ml intramuskulær dose av placebo. Hver gris mottok en 5 ml intranasal dose av 1:25 suspensjonen av eksponeringsinokulatet på dager spesifisert i hvert av de følgende eksemplene.

Alle grisene ble daglig overvåket og kontrollert for tegn på klinisk sykdom.

Ved et spesifisert tidspunkt etter den første dagen med eksponering ble alle grisene gitt en lett og mild død og nekropsi utført. Lungene ble fjernet og evaluert. Post mortem-undersøkelsen omfattet et estimat av omfanget av patologi forbundet med mykoplasmarespiratorisk sykdom. Hver lungelapp ble undersøkt, og lesjoner ble skissert for å estimere prosent involvering av hver lapp. Graden av foreliggende store lesjoner ble registrert.

Dataanalyse

Effektivitet ble evaluert basert på prosent av lungelesjoner typisk for en *M. hyo*- infeksjon. Griser i en behandlingsgruppe (vaksinerte dyr) ble bestemt å ha en prosentdel av total lunge med lesjoner som var signifikant ($P \leq 0,05$) mindre enn griser i placebogruppen.

Prosentdel av total lunge med lesjoner

Prosent total involvering for hver lungelapp ble estimert ved anvendelse av

de følgende forholdene mellom individuelle lungelapper og total lungemasse: venstre kranial 10 %, venstre midtre 10 %, venstre caudal 25 %, høyre kranial; 10 %, høyre midtre 10 %, høyre caudal 25 % og aksessorisk 10 %. Lungelappverdiene ble deretter summert på tvers av lapper for å tilveiebringe prosentdelen av total lunge med lesjoner (Pointon et al., 1992).

Eksempel 3

Beskyttelse mot eksponering for virulent *M. hyo* ble evaluert i griser som var serologisk positive for *M. hyo* ved anvendelse av en enkel dose av *M. hyo*-bakterin RESPISURE - 1 (Pfizer Inc.) administrert til 3 til 8 dager gamle griser.

Fem parallelle styrketester for RESPISURE - 1 ble utført på eller ved tidspunktet for vaksinasjon. Den relative styrken (RP) ble bestemt ved relativ antigenkvantifisering sammenlignet med en referansevaksine. Referansevaksinen, som har en RP = 1,0, inneholdt ca. 8000 enheter av *M. hyo*-25 antigen. RP-verdiene fra disse fem testene var henholdsvis 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 og 4,36.

På dag 0 ble griser i behandlingsgruppe T02 (se Tabell 1 nedenfor) vaksinert med en 2 ml intramuskulær dose av *M. hyo*-bakterin RESPISURE - 1 (Pfizer Inc.).

Griser i Gruppe T01 ble vaksinert intramuskulært med 2 ml av en placebo. Hver gris mottok en 5 ml intranasal dose av 1:25 suspensjonen av eksponeringsinokulatet på dag 178, 179 og 180. På hver av de tre dagene ble en delmengde av eksponeringsmaterialet dyrket på inokulasjonstidspunktet for å bekrefte fravær av bakteriell kontaminasjon. En andre delmengde ble tilbaketitret for å bekrefte at eksponeringslagerløsningen inneholdt ca. 10^7 CCU/ml av *M. hyo*. Alle griser ble daglig overvåket og kontrollert for tegn på klinisk sykdom.

Tretti dager etter den første dagen med eksponering ble alle grisene

gitt en lett og mild død og nekropsi utført. Lungene ble fjernet og evaluert. Post mortem- undersøkelsen omfattet et estimat av omfanget av patologi forbundet med mykoplasmarespiratorisk sykdom. Hver lungelapp ble undersøkt, og lesjoner ble skissert for å estimere prosent involvering av hver lapp. Graden av foreliggende store lesjoner ble registrert.

Tabell 1

Behandlings- gruppe	Vaksinasjons- forbindelse	Antall	Vaksinert dag 0	Eksponering dag 178 ¹	Eksponering dag 179 ¹	Eksponering dag 180 ¹
T01	Placebo	26	26	26	26	26
T02	Vaksine	26	26	24 ²	22 ³	22 ³

¹ Virulent *M. hyo*-inokulat

² Gris 71 og 73 ble fjernet fra studien før eksponering fordi begge dyrene mistet alle øremarkører og derfor kunne ikke identiteten til hvert dyr bli bestemt.

³ Gris 36 funnet død på dag 178 pga. anestetiske komplikasjoner. Gris 31 ble funnet død på dag 179 pga. anestetiske komplikasjoner.

Lungelesjonsresultater er oppsummert i Tabell 2. Resultatene indikerte at vaksinerte griser (T02) hadde signifikant ($P=0,0385$) lavere minste kvadraters gjennomsnittsprosentdel av pneumoniske lungelesjoner enn placebogriser (T01) (2,0 vs. 4,5 %).

Tabell 2. Oppsummering av prosentdel av totale lungelesjoner

Behandling	Forbindelse	Antall griser	LS gjennomsnitt	Område
T01	Placebo	26	4,5 ^a	0 til 36,75
T02	Vaksine	22	2,0 ^b	0 til 13,75

^{a,b} Verdier med en forskjellig hevet tekst er statistisk signifikant ($P=0,0385$)

Resultatene indikerer at enkel vaksinasjon av ca. en uke gamle griser med *M. hyo*-bakterin RESPISURE - 1 induerte beskyttelse mot en senere eksponering med virulent *M. hyo*.

Eksempel 4

Beskyttelse mot eksponering med virulent *M. hyo* ble evaluert i griser som er serologisk negative for *M. hyo* ved anvendelse av en enkel dose av *M. hyo*- bakterin RESPISURE - 1 administrert til 3 til 8 dager gamle griser.

Fem parallelle styrketester for vaksinen ble utført på eller ved tidspunktet for vaksinasjon. RP-verdien ble bestemt ved en relativ antigenkvantifisering sammenlignet med en referansevaksine.

Referansevaksinen, som har en RP = 1,0, inneholdt ca. 8000 enheter av *M. hyo*-antigen. RP-verdiene fra disse fem testene var henholdsvis 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 og 4,36.

På dag 0 ble griser i behandlingsgruppe T02 vaksinert med en 2 ml intramuskulær dose av *M. hyo*-bakterin RESPISURE - 1. Griser i Gruppe T01 ble vaksinert intramuskulært med 2 ml av en placebo. Hver gris mottok en 5 ml intranasal dose av 1:25 suspensjonen av eksponeringsinokulatet på dag 173, 174 og 175. På hver av de tre dagene ble en delmengde av eksponeringsmaterialet dyrket på inokulasjonstidspunktet for å bekrefte fravær av bakteriell kontaminasjon. En andre delmengde ble tilbaketitret for å bekrefte at eksponeringslagerløsningen inneholdt ca. 10^6 CCU/ml av *M. hyo*. Alle grisene ble daglig overvåket og kontrollert for tegn på klinisk sykdom.

Tjueni dager etter den første dagen med eksponering ble alle grisene gitt en lett og mild død og nekropsi utført. Lungene ble fjernet og evaluert. Post mortem- undersøkelsen omfattet et estimat av omfanget av patologi forbundet med *M. hyo*-indusert respiratorisk sykdom. Hver lungelapp ble undersøkt og lesjoner skissert for å estimere prosent konsolidering i hver lapp. Graden av foreliggende store lesjoner ble registrert.

Tabell 3 oppsummerer den eksperimentelle utformingen.

Tabell 3

Behandlings gruppe	Vaksinasjons- forbindelse	Ant.	Vaksinert	Ekspon- ering	Ekspon- ering	Ekspon- ering
			Dag 0	dag 173 ¹	dag 174 ¹	dag 175 ¹
T01	Placebo	26	26	25 ²	24 ⁴	24
T02	Vaksine	26	26	23 ³	20 ⁵	20

¹ Virulent *M. hyo*.

² Gris 123 ble gitt en lett og mild død på dag 19 pga. kronisk septisk polyartritt.

³ Gris 222 ble funnet død på dag 40. Nekropsi avslørte en stor mengde perikardialvæske og hemoragi på epikard. Gris 102 ble gitt en lett og mild død på dag 95 pga. en rektal prolaps. Gris 204 ble funnet død på dag 145. Ingen nekropsi ble utført pga. fremskreden kadaverdekomposisjon.

⁴ Gris 244 ble funnet død på dag 174 etter den første dagen med eksponering pga. anestetiske komplikasjoner.

⁵ NEEA gjør rede for 3 griser

Lungelesjonsresultater er oppsummert i Tabell 4. Total analyse indikerte at vaksinerte griser (T02) hadde en signifikant ($P=0,0001$) lavere minste kvadraters gjennomsnittsprosentdel av pneumoniske lungelesjoner enn placebogriser (T01) (0,3 vs. 5,9 %).

Tabell 4. Oppsummering av prosentdel av totale lungelesjoner
Prosent av lunge med lesjon

Behandling	Forbindelse	Antall griser	LSgjennomsnitt	Område
T01	Placebo	24	5,9 ^a	0 til 36
T02	Vaksine	20	0,3 ^b	0 til 6

^{a,b} verdier med forskjellige hevede tekster er statistisk ulike ($P=0,0001$).

Resultatene av denne studien indikerer at enkel vaksinasjon av griser med *M.hyo*-bakterin RESIPURE ONE induserte beskyttelse mot en senere eksperimentell eksponering med virulent *M. hyo*.

Eksempel 5

Beskyttelse mot eksponering for virulent *M. hyo* ble evaluert i griser som var serologisk negative for *M. hyo* ved anvendelse av en enkel dose av *M. hyo*- bakterin RESIPURE - 1 administrert til 3 til 8 dager gamle griser.

Fem parallelle styrketester for bakterinet ble utført på eller ved tidspunktet for vaksinasjon. RP-verdien ble bestemt ved en relativ antigenkvantifisering sammenlignet med en referansevaksine.

Referansevaksinen, som har en RP= 1,0, inneholdt ca. 8000 enheter av *M. hyo*-antigen. RP-verdiene fra disse fem testene var henholdsvis 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 og 4,36.

På dag 0 ble griser i behandlingsgruppe T02 vaksinert med en 2 ml intramuskulær dose av *M. hyo*-bakterin. Griser i Gruppe T01 ble vaksinert intramuskulært med 2 ml av en placebo. Hver gris mottok en 5 ml intranasal dose (2,5 ml per nesebor) av 1:25 suspensjonen av eksponeringsinokulatet på dag 76, 77 og 78. På hver av de tre dagene ble en delmengde av eksponeringsmaterialet dyrket på inokulasjonstidspunktet for å bekrefte fravær av bakteriell kontaminasjon. En andre delmengde ble tilbaketitrert for å bekrefte at eksponeringslagerløsningen inneholdt ca. 10^6 CCU/ml av *M. hyo*. Alle grisene ble daglig overvåket og kontrollert for tegn på klinisk sykdom.

Tjueni dager etter den første dagen med eksponering ble alle grisene gitt en lett og mild død og nekropsi utført. Lungene ble fjernet og evaluert. Post mortem- undersøkelsen omfattet et estimat av omfanget

av patologi forbundet med *M. hyo*-indusert respiratorisk sykdom. Hver lungelapp ble undersøkt og lesjoner skissert for å estimere prosent involvering i hver lapp. Graden av foreliggende konsolidering ble registrert.

Tabell 5 oppsummerer den eksperimentelle utformingen.

Tabell 5

Behandlings- Vaksinasjons-Antall Vaksinert		Eksponering				
Eksponering Eksponering						
gruppe	forbindelse		dag	dag	dag	dag
			0	176 ¹	177 ¹	178 ¹
T01	Placebo	2	26	23 ²	23	23
T02	Vaksine	2	26	21 ³	21	21

¹ Virulent *M. hyo*-inokulat

² Gris 237 og 239 testet positivt på dag -1 for *M. hyo pneumoniae*. Disse grisungene ble fjernet fra studien på dag 14 og gitt en lett og mild død. Gris 220 ble funnet død på dag 3 pga. å ha blitt knust av purken.

³ Gris 238, 240 og 277 testet positivt på dag -1 for *M. hyo pneumoniae*. Disse grisungene ble fjernet fra studien på dag 14 og gitt en lett og mild død. Gris 280 ble gitt en lett og mild død på dag 7 etter å ha vært anorektisk og svekket. Gris 177 ble gitt en lett og mild død på dag 40 pga. kronisk "wasting syndrome").

Lungelesjonsresultater er oppsummert i Tabell 6. Den totale analysen indikerte at vaksinerte griser (T02) hadde en signifikant ($P=0,0001$) lavere minste kvadraters gjennomsnittsprosentdel av pneumoniske lungelesjoner enn placebogriser (T01) (0,5 vs. 9,9 %).

**Tabell 6. Oppsummering av prosentdel av totale
lungelesjoner Prosent av lunge med lesjon**

Behandling	Forbindelse	Antall griser	LS gjennomsnitt	Område
T01	Placebo	23	9,9 ^a	0 til 40,5
T02	Vaksine	21	0,5 ^b	0 til 5

^{a,b} verdier med forskjellige hevede tekster er statistisk ulike (P=0,0001).

Patentkrav

1. Anvendelse av en *Mycoplasma hyopneumoniae* bakterin for fremstilling av en vaksine for behandling eller forebygging hos griser seronegative for *Mycoplasma hyopneumoniae*, en sykdom eller lidelse forårsaket av infeksjon med *Mycoplasma hyopneumoniae* for administrasjon til grisene fra 3 til 10 dager gamle, en effektiv mengde av en enkelt dose av *Mycoplasma hyopneumoniae* vaksine.
2. Anvendelse ifølge krav 1, hvor enkeltdosen av *M. hyopneumoniae* vaksinen inneholder fra 1×10^6 til 5×10^{10} fargeskiftende enheter (CCU) per dose.
3. Anvendelse ifølge krav 1, hvor mengden av den administrerte vaksinen er fra 0,5 til 3,0 ml.
4. Anvendelse ifølge krav 1, idet *Mycoplasma hyopneumoniae* bakterien inneholder stamme P-55722-3.
5. Anvendelse ifølge krav 1, idet *Mycoplasma hyopneumoniae* vaksinen omfatter videre et viralt eller bakterielt antigen annet enn *Mycoplasma hyopneumoniae*.
6. Anvendelse ifølge krav 5, idet nevnte virus- eller bakterieantigener er valgt fra svine influensavirus (SIV), svineinfeksjons- og respiratorisk sykdomsvirus (PRRS eller mystisk svinsykdom), diaré etter avvenning (PWD) og griseproliferativ enteritt (PPE) .
7. Anvendelse ifølge krav 1, idet nevnte *Mycoplasma hyopneumoniae* preparering er beregnet til intramuskulær administrering.
8. Anvendelse ifølge krav 1, idet grisene er beskyttet opptil 25 uker etter vaksinerings.
9. Anvendelse ifølge krav 1, idet *Mycoplasma hyopneumoniae* vaksinen omfatter videre en adjuvans.