PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19) ČESKÁ REPUBLIKA



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07.06.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **02.07.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/302636**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.06.2005**
(Věstník č. 6/2005)
(86) PCT číslo: **PCT/IB2002/002121**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2003/003941**

(21) Číslo dokumentu:
2003-3466
(13) Druh dokumentu: **A3**
(51) Int. Cl.[7] :
A 61 K 39/00
A 61 K 39/02
A 61 K 49/00
A 01 N 63/00
C 12 N 1/00
C 12 N 1/20

(71) Přihlašovatel:
PFIZER PRODUCTS INC., Groton, CT, US

(72) Původce:
Keich Robin Lee, Groton, CT, US
Sabbadini Lisa Grace, Groton, CT, US

(74) Zástupce:
JUDr. Jan Matějka, Národní 32, Praha, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:
Vakcína pro léčení nebo prevenci choroby nebo poruchy u zvířete, která je vyvolána infekcí Mycoplasma hyopneumoniae

(57) Anotace:
Použití Mycoplasma hyopneumoniae pro výrobu vakcíny pro léčení nebo prevenci choroby nebo poruchy u zvířete, která je vyvolána infekcí Mycoplasma hyopneumoniae, přičemž vakcína se podává zvířeti jednorázově. Vakcína se zpravidla podává zvířeti o stáří asi tří až deseti dnů. Vakcínou Mycoplasma hyopneumoniae může být inaktivovaná nebo modifikovaná živá vakcína obsahující celé buňky nebo jejich části, podjednotková vakcína nebo NA nebo DNA vakcína. Vakcína může být připravená synteticky nebo rekombinantně.

CZ 2003 - 3466 A3

30.03.05

PV 2003-3466

01-2744-03-Ma

22319

Vakcína pro léčení nebo prevenci choroby nebo poruchy u zvířete, která je vyvolána infekcí *Mycoplasma hyopneumoniae*

Oblast techniky

Vynález se týká vakcína pro léčení nebo prevenci choroby nebo poruchy u zvířete, která je vyvolána infekcí *Mycoplasma hyopneumoniae*

Dosavadní stav techniky

M. hyopneumoniae je bakteriální patogen, který vyvolává enzootickou pneumonii u prasat. Enzootická pneumonie je chronická choroba, která vede ke špatné konverzi krmiva, zakrnělému růstu a predispozici ke druhotným plicním infekcím. *M. hyopneumoniae* se snadno přenáší sekrety respiračního traktu a z prasnic na selata, a v chovech prasat má vysokou prevalenci. V USA je infikováno přibližně 99 % chovů prasat, což v odvětví produkce vepřového vyvolává roční náklady asi 300 milionů dolarů.

Většina známých vakcín proti *M. hyopneumoniae* je založena na přípravcích obsahujících inaktivované celé buňky *M. hyopneumoniae* a adjuvant. Kromě toho lze synteticky nebo klonováním a rekombinantní expresí genů *M. hyopneumoniae* připravit vakcíny založené na imunogenních polypeptidech nebo proteinech. Jako vakcín lze také použít geny *M. hyopneumoniae*, které jsou chopny exprimovat takové polypeptidy nebo proteiny in vivo.

15.09.04
61260

Jako příklady celobuněčných inaktivovaných vakcín *M. hyopneumoniae* lze uvést RESPISURE a STELLAMUNE, které jsou dostupné na trhu od firmy Pfizer Inc., USA.

Kromě toho bylo popsáno několik rekombinantně získaných imunogenních polypeptidů a proteinů *M. hyopneumoniae*, které mohou být užitečné jako podjednotkové vakcíny. V mezinárodní patentové přihlášce zveřejněné jako WO 96/28472 je popsáno šest proteinových antigenů proti *M. hyopneumoniae* o molekulárních hmotnostech 46 až 48, 52 až 54, 60 až 64, 72 až 75, 90 až 94 a 110 až 114 kilodaltonů a dále částečná proteinová sekvence antigenů o molekulové hmotnosti 52 až 54, 60 až 64 a 72 až 75 kilodaltonů a celá nukleotidová a aminokyselinová sekvence antigenu o molekulové hmotnosti 46 až 48 kilodaltonů.

V publikaci Futo et al. (1995; J. Bacteriol 177: 1915 až 1917) také bylo popsáno klonování genu pro protein *M. hyopneumoniae* P46, tj. p46. Stejná skupina autorů prokázala, že tento in vitro exprimovaný genový produkt je užitečný při stanovování protilátkových odpovědí na infekce *M. hyopneumoniae* bez zkřížené reaktivity s jinými druhy Mycoplasma (Futo et al., 1995, J. Clin. Microbiol. 33: 680 až 683). Sekvence a diagnostické použití genu p46 popsané v publikaci Futo et al. je dále popsáno v evropské patentové přihlášce č. 0 475 185 A1.

V publikaci Wise a Kim (1987, J. Bacteriol., 169: 5546 až 5555) se uvádí, že v *M. hyopneumoniae* se vyskytují čtyři integrální membránové proteiny označené jako p70, p65 (výše uvedený P46), p50 a P44 a že tři posledně uvedené proteiny jsou modifikovány kovalentními lipidovými vazbami a indukují silnou humorální imunitní odezvu. Ochranné účinky této imunitní odpovědi nebyly zkoumány. Gen pro protein P65 byl

klonován a jeho sekvence a použití ve vakcínách a diagnostice jsou popsány v US patentu č. 5 788 962.

V mezinárodní patentové přihlášce zveřejněné jako WO 91/15593 je popsáno pět proteinů *M. hyopneumoniae* o zdánlivé molekulové hmotnosti 105, 90, 85, 70 a 43 kilodalton. V této publikaci je uvedena úplná sekvence genu pro 85kDa protein (protein C), jakož i částečné nukleotidové sekvence pro zbývající čtyři proteiny.

V US patentu č. 5 252 328 (Faulds) jsou popsány amino-terminální sekvence imunoreaktivních proteinů *M. hyopneumoniae*, jejichž molekulární hmotnost je 34, 41, 44, 48, 64, 68, 74,5, 79, 88,5, 96 a 121 kDa. V tomto patentu jsou také popsány jiné proteiny identifikované na základě elektroforetické pohyblivosti o zdánlivé molekulární hmotnosti 22,5, 34 a 52 kDa; v jejich případě není uvedena proteinová sekvence. Ačkoliv se v US patentu 5 252 328 uvažuje o použití těchto proteinů ve vakcínových formulacích, nejsou v něm uvedeny žádné vakcinační pokusy.

V mezinárodní patentové přihlášce zveřejněné jako WO 95/09870 jsou popsány biochemické způsoby purifikace adhesinů *M. hyopneumoniae*, mykoplasmových integrálníchb membránových proteinů, které jsou zodpovědné za adhezi k řasinkám epithelu horních cest dýchacích hostitele. Ve WO 95/09870 jsou také navržena stanovení a použití těchto proteinů například ve vakcínách a diagnostických přípravcích.

Ve výzkumné zprávě King et al. (1997; Vaccine 15: 25 až 35) je popsán Mhp1, 124kDa adhesin, který je kmenovou variantou P97.

30.03.05

22319

96kDa varianta P97 byla identifikována skupinou Wilton et al. (1998, Microbiology 144: 1931 až 1943). Kromě toho se ukázalo, že gen p97 je součástí operonu, který také kóduje druhý protein označený jako P102 o předpokládané molekulární hmotnosti asi 102 kDa (Hsu et al., 1998, Gene 214: 13 až 23). V mezinárodní patentové přihlášce zveřejněné jako WO 99/26664 Minion a Hsu navrhují použití P102 ve vakcínách, ale neuvádějí žádné vakcinační zkoušky.

O žádné z popsaných vakcín *M. hyopneumoniae* se neuvádí, že by byla účinná při jednorázovém ošetření prasat o stáří asi 3 až 10 dnů. Taková vakcína by umožňovala vyloučit potřebu vícenásobné aplikace, a tudíž by výrazně snižovala náklady a pracnost související s masivní vakcinací chovů prasat na celém světě. Existuje tudíž potřeba vyvinout účinnou vakcínu *M. hyopneumoniae*, kterou by prasatům bylo možno podávat jednorázovou vakcinací ve věku asi 3 až asi 10 dnů za účelem ochrany před chorobami nebo poruchami vyvolanými *M. hyopneumoniae* a jejich prevence.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je použití *Mycoplasma hyopneumoniae* pro výrobu vakcíny pro léčení nebo prevenci choroby nebo poruchy u zvířete, která je vyvolána infekcí *Mycoplasma hyopneumoniae*, přičemž vakcína se podává zvířeti jednorázově. Vakcína se zpravidla podává zvířeti o stáří asi 3 až asi 10 dnů.

Vakcína podle vynálezu eliminuje nutnost podávat další dávky, aby se vytvořila a/nebo udržela imunita proti *M. hyopneumoniae*. Způsobem jednorázové vakcinace za použití vakcíny vyrobené podle vynálezu se dosáhne ochrany séronegativních i séropozitivních prasat proti infekci virulentní *M. hyopneumoniae*. Vakcinace je účinná při léčení nebo prevenci

30.03.05

symptomů vyvolaných infekcí *M. hyopneumoniae*, jako je například prevence a zmenšování plicních lézí u prasat.

Vakcína *M. hyopneumoniae* může obsahovat přípravek z celých buněk *M. hyopneumoniae* nebo jejich částí, jako bakterin, nebo modifikovaný živý přípravek, podjednotkovou vakcínu, jako podjednotkovou vakcínu, která obsahuje jeden nebo více polypeptidů nebo proteinů pocházejících z *M. hyopneumoniae* nebo imunogenních fragmentů takových proteinů nebo polypeptidů nebo jeden nebo více genů pro takové proteiny, polypeptidy nebo imunogenní fragmenty, přičemž tyto geny nebo nukleové kyseliny jsou schopné exprese in vivo. Polypeptidy a proteiny pocházející z *M. hyopneumoniae* a imunogenní fragmenty takových polypeptidů a proteinů nebo geny nebo nukleové kyseliny *M. hyopneumoniae*, které lze použít ve vakcíně, je možno syntetizovat nebo získat metodami genového inženýrství, které jsou známy.

Vakcína *M. hyopneumoniae* může obsahovat další složky, jako adjuvant. Lze použít různých adjuvantů, jako jsou adjuvanty popsané v tomto textu a známé v tomto oboru.

Následuje podrobnější popis vynálezu.

Za účelem zpřehlednění je popis dále členěm na podkapitoly, ve kterých jsou popsány nebo ilustrovány některé znaky, provedení nebo použití tohoto vynálezu, na něž se však vynález neomezuje.

V některých provedeních vakcína, které se používá při způsobu podle tohoto vynálezu, obsahuje inaktivovaný přípravek z celých buněk *M. hyopneumoniae* nebo jejich částí (bakterin),

30.03.05

nebo modifikovanou živou vakcínu a farmaceuticky vhodný nosič nebo inaktivovaný přípravek z celých buněk *M. hyopneumoniae* nebo jejich částí (bakterin) a adjuvant.

V jiných konkrétních provedeních vakcína, které se používá při způsobu podle vynálezu obsahuje imunogenní protein nebo polypeptid nebo jejich fragment a farmaceuticky vhodný nosič, nebo imunogenní protein nebo polypeptid nebo jejich fragment a adjuvant.

Definice a zkratky

Pod pojmem "léčení nebo prevence" se v tomto textu v souvislosti s infekcí *Mycoplasma hyopneumoniae* rozumí inhibice replikace baktérie *Mycoplasma hyopneumoniae*, inhibice přenosu *Mycoplasma hyopneumoniae*, nebo zabránění *Mycoplasma hyopneumoniae* v kolonizaci hostitele, a zmírnění symptomů choroby nebo poruchy vyvolané infekcí *Mycoplasma hyopneumoniae*. Léčení je považováno za terapeutické, pokud dochází ke snížení bakteriální nálože, poklesu bakteriálních infekcí a/nebo vzestupu hmotnosti a/nebo růstu. Způsob podle vynálezu je například účinný při prevenci nebo redukci plicních lézí.

Pod pojmem "vakcína *M. hyopneumoniae*" se v tomto textu rozumí vakcína, která je užitečná při prevenci nebo léčení poruchy nebo choroby vyvolané infekcí *M. hyopneumoniae*. Do rozsahu tohoto pojmu spadá jakákoliv vakcína, která je účinná při léčení nebo prevenci *M. hyopneumoniae* u prasat. Jako vakcínu *M. hyopneumoniae*, kterou je možno použít, lze například uvést přípravky z celých buněk *M. hyopneumoniae* nebo jejich částí, inaktivované nebo modifikované živé vakcíny, podjednotkové vakcíny obsahující jeden nebo více polypeptidů nebo proteinů pocházejících z *M. hyopneumoniae* nebo imunogenních fragmentů takových proteinů nebo polypeptidů nebo jeden

30.03.05

nebo více genů nebo nukleových kyselin pro jeden nebo více polypeptidů nebo proteinů pocházejících z *M. hyopneumoniae* nebo jejich imumogenních fragmentů, přičemž tyto geny nebo nukleové kyseliny mohou být u prasat exprimovány in vivo. Polypeptidy a proteiny pocházející z *M. hyopneumoniae*, imunogenní fragmenty takových polypeptidů a proteinů, nebo geny nebo nukleové kyseliny *M. hyopneumoniae* je možno syntetizovat nebo získat metodami genového inženýrství, které jsou známé. Při způsobu podle tohoto vynálezu se jako vakcíny *M. hyopneumoniae* přednostně používá bakterinu.

Pod pojmem "zvíře" se rozumí živočich, jako savec, přednostně prase, nikoliv však člověk.

Pod pojmem "prase" se rozumí selata, vepři, prasnice, mladé prasnice, kastrovaní kanci, kanci a příslušníci čeledi *Suidae*.

Pod pojmem "bakterin" se rozumí přípravek z inaktivovaných buněk *M. hyopneumoniae* nebo jejich částí vhodný pro použití jako vakcína.

Pod pojmem "účinné množství" se rozumí takové množství vacíny *M. hyopneumoniae*, které je dostatečné pro vyvolání imunitní odezvy u subjektu, kterému je podáno. Jako neomezující příklady imunitní odezvy lze uvést vyvolání přirozené buněčné a/nebo humorální imunity.

Vakcína obsahující inaktivované buňky (celé buňky nebo jejich části) a modifikovaná živá vakcína

Způsoby výroby obvyklých inaktivovaných nebo živých vakcín pro použití při způsobu podle tohoto vynálezu jsou známé.

Bakteriny, kterých lze použít při způsobu jednorázové vakcinace podle vynálezu, lze získat z veřejně dostupných zdrojů. Například bakteriny *M. hyopneumoniae* lze připravovat z izolátů *M. hyopneumoniae*. Odborníkům v tomto oboru je známa řada izolátů *M. hyopneumoniae*, které jsou například dostupné ze sbírky American Type Culture Collection, 1801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA. Jako příklady takových izolátů lze uvést ATCC č. 25095, 25617, 25934, 27714 a 27715.

Izoláty *M. hyopneumoniae* je také možno známými způsoby získat přímo z přirozeně nebo experimentálně infikovaných prasečích plic.

Izoláty *M. hyopneumoniae* lze inaktivovat různými známými způsoby, například tak, že se na bakteriální izolát působí binárním ethyleniminem (BEI), jak je popsáno v US patentu č.

5 565 205, nebo například vodným roztokem formaldehydu, teplem, BPL, zářením nebo glutaraldehydem.

Bakteriny *M. hyopneumoniae* vhodné pro použití při způsobu podle tohoto vynálezu je také možno získat z různých zdrojů na trhu. Jako neomezující příklady takových zdrojů lze uvést RESPIFEND (Fort Dodge, American Home Products), HYORESP (Merial Ltd.), M + PAC (Shering Plough), PROSYSTEM M (Intervet), INGLEVAC M (Boehringer), RESPISURE (Pfizer Inc.) a STELLAMUNE MYCOPLASMA (Pfizer Inc.).

Jako zdroji bakterinu *M. hyopneumoniae* pro použití při způsobu podle tohoto vynálezu se dává přednost přípravkům RESPISURE a STELLAMUNE MYCOPLASMA.

Zvláště přednostním zdrojem bakterinu *M. hyopneumoniae* pro použití při způsobu podle vynálezu je RESPISURE-1 (Pfizer Inc.), který obsahuje kmen P-5722-3 (NL1042), získaný od Purdue University, USA.

V přednostním provedení se kmen P-5722-3 inaktivuje působením BEI a smísí s adjuvantem dostupným na trhu, přednostně látkou AMPHIGEN (Hydronics, USA). Přednostní dávka je asi 2,0 ml. Jako obvyklou konzervační přísadu lze uvést merthiolát/ EDTA. Je možno přidat nosič, přednostně PBS. Příprava modifikovaných živých vakcín, jako příprava atenuací virulentních kmenů pasážováním v kultuře, je v tomto oboru známa.

Podjednotkové vakcíny

Způsob podle vynálezu je také možno provádět za použití podjednotkových vakcín, které obsahují purifikované imunogenní proteiny a polypeptidy *M. hyopneumoniae* a imunogenní fragmenty takových proteinů a polypeptidů. Takové proteiny a polypeptidy

15.09.04

je možno připravovat za použití známých způsobů. Způsobů, které jsou odborníkům v tomto oboru dobře známy, se dále může použít při stanovování čistoty nebo homogenity proteinů, jako je elektroforéza vzorku na polyakrylamidovém gelu a následná vizualizace jediného pásu polypeptidu na barvicím gelu. Vysoké rozlišení je možno stanovit za použití HPLC nebo jiných podobných způsobů, které jsou odborníkům v tomto oboru známy.

V konkrétním provedení vakcína, které se používá podle tohoto vynálezu, obsahuje alespoň jeden protein *M. hyopneumoniae*, jehož neomezujícím příkladem je P46, P65, P97, P102, P70, P50 a P44.

V jiných provedeních vakcína, které se používá při způsobu podle tohoto vynálezu, obsahuje bakterin *M. hyopneumoniae* (inaktivované buňky nebo jejich části nebo modifikované živé buňky) nebo protein nebo polypeptid *M. hyopneumoniae* nebo fragment takového proteinu nebo polypeptidu a alespoň jeden další imunogen (z inaktivovaných buněk nebo jejich částí nebo modifikovaných živých buněk) nebo imunogenní nebo antigenní protein nebo polypeptid nebo imunogenní fragment takového proteinu nebo polypeptidu, přednostně virový, bakteriální nebo parazitární polypeptid. Jako neomezující příklady takových dalších patogenů a proteinů a polypeptidů a jejich fragmentů je možno uvést virus prasečí chřipky (SIV), virus reprodukční a respirační choroby prasat (PRRS či záhadné choroby prasat), diareu po odstavení (PWD) a proliferační enteritis u prasat (PPE). Takové kompozice jsou užitečné jako kombinované vakcíny.

V dalším konkrétním provedení imunogenní fragmenty takových proteinů nebo polypeptidů mají sekvenci, která obsahuje alespoň 10, alespoň 20, alespoň 30, alespoň 40, alespoň 50 nebo alespoň 100 po sobě jdoucích aminokyselin

15.09.04

imunogenních proteinů a polypeptidů, kterých se používá při způsobu podle vynálezu, jejichž neomezujícími příklady jsou P46, P65, P97, P102, P70, P50 a P44.

Proteiny *M. hyopneumoniae* k použití ve vakcínách jsou v podstatě čisté nebo homogenní. Při způsobu podle vynálezu se používá proteinů nebo polypeptidů, které jsou typicky purifikací zbaveny hostitelských buněk, které exprimují rekombinantní nukleotidové sekvence kódující tyto proteiny. Takovou purifikaci proteinů je možno provádět řadou dobře známých způsobů (například viz "Methods In Enzymology"; 1990, Academic Press, Inc., San Diego, "Protein Purification: Principles and practice", 1982, Springer-Verlag, New York, USA).

Purifikované polypeptidy a proteiny *M. hyopneumoniae* a jejich imunogenní fragmenty lze také připravovat známými syntetickými způsoby.

Vakcínové přípravky

Jako vhodné přípravky vakcín podle vynálezu je možno uvést přípravky pro injekční podávání, jako kapalné roztoky nebo suspenze; také lze připravovat pevné formy vhodné pro přípravu kapalného roztoku nebo kapalné suspenze před aplikací. Přípravek také může být emulgován. Aktivní imunogenní složky se často mísí s adjuvanty, které jsou farmaceuticky vhodné a kompatibilní s aktivní složkou.

Polypeptidy lze formulovat na vakcíny v neutrálních nebo solných formách. Jako farmaceuticky vhodné soli lze uvést adiční soli s kyselinami (vznikající na volných aminoskupinách peptidů) a soli s anorganickými kyselinami, jako kyselinou chlorovodíkovou nebo fosforečnou, nebo organickými kyselinami, jako kyselinou octovou, šťavelovou, vinnou, maleinovou apod.

15.09.04

Soli vznikající na volných karboxyskupinách mohou být odvozeny od anorganických bází, jako jsou například hydroxidy draselný, amonný, vápenatý a železitý, a takových organických bází, jako je isopropylamin, trimethylamin, 2-ethylaminoethanol, histidin, prokain apod.

Vakcínové přípravky, kterých se používá při způsobu podle tohoto vynálezu, obsahují účinné imunizační množství imunogenu *M. hyopneumoniae* a farmaceuticky vhodný nosič. Vakcínové přípravky obsahují účinné imunizační množství jednoho nebo více antigenů a farmaceuticky vhodný nosič. Farmaceuticky vhodné nosiče jsou v tomto oboru dobře známy a jako jejich neomezující příklady lze uvést solný roztok, pufrovaný solný roztok, dextrosu, vodu, glycerol, sterilní isotonický vodný pufr a jejich směsi. Jako příklad takového vhodného nosiče je možno jmenovat fyziologicky vyvážené kultivační médium, které obsahuje jedno nebo více stabilizačních činidel, jako jsou stabilizované, hydrolyzované, proteiny, laktosa atd. Nosič je přednostně sterilní. Formulace by měla být přizpůsobena způsobu podávání.

Použití purifikovaných antigenů jako vacínových přípravků se provádí standardními způsoby. Purifikovaný protein (nebo proteiny) by například měl být upraven na vhodnou koncentraci, formulován s jakýmkoliv adjuvantem vhodným pro vakcíny a balen pro použití. Jako neomezující příklady vhodných adjuvantů lze uvést minerální gely, například hydroxid hlinitý; povrchově aktivní látky, jako lysolecithin; glykosidy, například saponin a deriváty saponinu, jako Quil A nebo GPI-0100; kationtové povrchově aktivní látky, například DDA (kvarterní hydrokarbylamoniumhalonigenidy, polyoly typu Pluronic; polyanionty a víceatomové ionty; polyakrylové kyseliny, neiontové blokové polymery, například Pluronic F-125 (B.A.S.F., USA); Avridine a Rantidine; peptidy; rekombinantní mutantní labilní toxiny,

15.09.04

například leukotoxin (rmLT) nebo cholerový toxin (CT); chemicky vázané nebo "close proximity" molekulární přenašeče; minerální oleje, například Montanide ISA-50 (Seppic, Paříž, Francie), karbopol, Amphigen (Hydronics, USA, Omaha, NE, USA), Alhydrogel (Superfos Biosector, Frederikssund, Dánsko), olejové emulze, například emulze minerálních olejů, jako BayolF/Arlacel A, a vody, nebo emulze rostlinných olejů, vody a emulgátoru, jako lecithinu; kamenec, MDP, N-acetylmuramyl-L--threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-acetyl-nor-muramyl-L--alanyl-D-isoglutamin, N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyfosforyloxy)ethylamin; cholesterol cytokiny a kombinace adjuvantů. Víceatomové ionty také mohou fungovat jako dispergační, zahušťovací a protispékavá činidla, které umožňují vakcínu resuspendovat po delší době usazování jako monodispersní suspenzi. Kombinace adjuvantů mohou být ve vodné, zapouzdřené (řízené nebo odložené uvolňování) nebo mikrozapouzdřené formě.

Imunogen také může být začleněm do liposomů nebo konjugován s polysacharidy a/nebo jinými polymery k použití v očkovací formulaci. V případě, že je rekombinantním antigenem hapten, tj. molekula, jejíž antigenicita spočívá v tom, že může selektivně reagovat s rozpoznávanými protilátkami, ale není imunogenní, jelikož nevyvolává imunitní odezvu, hapten může být kovalentně vázán k nosiči nebo imunogenní molekule; například velký protein, jako sérový albumin, haptenu, který je k němu kopulován, dodá imunogenicitu. Haptenové nosiče mohou být formulovány pro použití jako vakcína.

Genové vakcíny a NA vakcíny

Způsob podle vynálezu lze také provádět za použití genů nebo nukleových kyselin *M. hyopneumoniae* , které kódují imunogenní proteiny, polypeptidy a imunogenní fragmenty

15.09.04

takových proteinů a polypeptidů. Takové geny a nukleové kyseliny mohou být exprimovány in vivo a lze je připravovat známými způsoby.

V konkrétním provedení vakcína, které se používá při tomto vynálezu, obsahuje alespoň jeden gen nebo nukleovou kyselinu kódující protein *M. hyopneumoniae* , jehož neomezujícími příklady jsou P46, P65, P997, P102, P70, P50 a P44.

V dalším konkrétním provedení geny nebo nukleové kyseliny, kterých se používá při způsobu podle vynálezu, kódují imunogenní fragmenty proteinů nebo polypeptidů *M. hyopneumoniae* a mají sekvenci, která obsahuje alespoň 10, alespoň 20, alespoň 30, alespoň 40, alespoň 50 nebo alespoň 100 po sobě jdoucích aminokyselin imunogenních proteinů a polypeptidů, kterých se používá při způsobu podle vynálezu, jejichž neomezujícími příklady jsou P46, P65, P997, P102, P70, P50 a P44.

V jiných provedeních způsobu podle tohoto vynálezu se použité geny nebo nukleové kyseliny podávají známými způsoby, jako je například technika vstřelování "gene gun".

V ještě dalších provedeních způsobu podle tohoto vynálezu je genovou nebo NA vakcínou DNA vakcína. Nukleová kyselina nebo geny mohou být přítomny spolu s liposomy nebo jinými činidly usnadňujícími transfekci, která jsou v tomto oboru známa.

Způsoby přípravy a dodávky DNA vakcín jsou známé (viz například Krishnan, B. R., "Current Status of DNA vaccines in veterinary medicine", Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier Science (2000)).

Expresní systémy

15.09.04

Při expresi antigenových proteinových sekvencí podle vynálezu je možno použít různých systémů hostitel-expresní vektor. Takové hostitelské expresní systémy představují vektory, jejichž prostřednictvím je možno produkovat a následně čistit kódující sekvence, které jsou předmětem zájmu, ale také buňky, které po transformaci nebo transfekci vhodnými nukleotidovými kódujícími sekvencemi, vykazují genové produkty *M. hyopneumoniae,* kterých se používá při způsobu podle vynálezu, in situ. Jako neomezující příklady takových mikroorganismů je možno uvést bakterie (například *E. coli, B. subtilis*) transformované rekombinantní bakteriofágovou DNA, plasmidovými DNA nebo kosmidovými DNA expresními vektory, které obsahují kódující sekvence mhp3; kvasinky (například *Saccharomyces, Pichia*) transformované rekombinantními kvasinkovými expresními vektory, které obsahují sekvence kódující genové produkty *M. hyopneumoniae;* systémy založené na hmyzích buňkách infikovaných rekombinantními virovými expresními vektory (například baculovirovými) obsahujícími kódující sekvence *M. hyopneumoniae;* systémy založené na rostlinných buňkách infikovaných rekombinantními virovými expresními vektory (jako je například virus mozaiky květáku, CaMV; virus tabákové mozaiky, TMV) nebo transformované rekombinantními plasmidovými expresními vektory (jako je například Ti plasmid) obsahujícími kódující sekvence *M. hyopneumoniae;* nebo systémy založené na savčích buňkách (například buňkách COS, CHO, BHK, 293, 3T3), které obsahují rekombinantní expresní konstrukty s promotory odvozenými od genomu savčích buněk (jako je například metalothioneinový promotor) nebo savčích virů (jako je například adenovirový pozdní promotor; vakciniový virový 7,5K promotor). V přednostním provedení je expresním systémem bakteriální systém.

15.09.04

Polypeptidy a proteiny *M. hyopneumoniae* a jejich imunogenní fragmenty je také možno exprimovat a dodávat za použití živých rekombinantních a bakteriálních vektorů, jako je adenovirus nebo *Salmonella*. Příslušné vektory jsou v tomto oboru také známy a jsou dostupné, nebo je lze připravit známými způsoby.

Dávkování, způsoby podávání a léčení

Podle tohoto vynálezu jednorázová dávka účinného množství vakcíny *M. hyopneumoniae* podaná praseti o stáří asi 3 až 10 dnů poskytuje efektivní imunitu vůči pozdější expozici *M. hyopneumoniae*. Vakcína *M. hyopneumoniae* se přednostně podává ve věku asi 6 až asi 8 dnů, nejvýhodněji ve věku asi 7 dnů.

Množství bakterinové vakciny *M. hyopneumoniae*, které je účinné při jednorázovém podání obsahuje asi $1x10^6$ až asi $5x10^{10}$ jednotek měnících barvu (CCU) na dávku. V přednostním provedení bakterinová vakcína, která poskytuje efektivní imunitu při jednorázovém podání, obsahuje asi $1x10^8$ až asi $5x10^{10}$ CCU na dávku, výhodněji asi $5x10^8$ až asi $5x10^{10}$ CCU na dávku.

Podle tohoto vynálezu, v případě, že se podává bakterinový produkt RESPISURE-1, je množství RESPISURE-1 na jednorázové podání dávky asi 0,5 až asi 3,0 ml, přednostně asi 1,5 ml až asi 2,5 ml, výhodněji asi 2 ml.

Množství vakcíny *M. hyopneumoniae*, která je podjednotkovou vakcínou obsahující jeden nebo více proteinů nebo polypeptidů nebo imunogenních fragmentů takových proteinů nebo polypeptidů, účinné při způsobu podle vynálezu je asi 0,01 μg až asi 200 μg.

15.09.04

Množství vakcíny *M. hyopneumoniae*, která je vakcínou obsahující jeden nebo více genů nebo nukleových kyselin (přednostně DNA) kódujících imunogenní proteiny nebo polypeptidy nebo imunogenní fragmenty takových proteinů nebo polypeptidů *M. hyopneumoniae*, které je účinné při způsobu podle vynálezu je asi 0,1 μg až asi 200 mg.

Podle tohoto vynálezu je podávání možno provádět známými způsoby, jako je podávání perorální, intranasální, mukosální, topické, transdermální a parenterální (například intravenosní, intraperitoneální, intradermální, subkutánní nebo intramuskulární). Podávání lze také provádět za použití bezjehlových aplikačních zařízení. Možné je také kombinované podávání, při němž se například použije nejprve parenterálního způsobu a poté mukosálního způsobu. Přednost se dává podávání intramuskulárnímu.

Účinné dávky (imunizační množství) vakcín podle vynálezu lze také extrapolovat z křivek závislosti odpovědi na dávce odvozených z modelových zkušebních systémů.

Způsoby podle tohoto vynálezu se dosahuje ochranné imunity u prasat, která jsou séropozitivní i u prasat, která jsou séronegativní na *M. hyopneumoniae*. Přívlastek "séropozitivní" se vztahuje k prasatům, v jejichž séru jsou přítomny protilátky proti *M. hyopneumoniae*. Přívlastek "séronegativní" se vztahuje k prasatům, v jejichž séru nejsou dekovatelné hladiny protilátek proti *M. hyopneumoniae*.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezují.

15.09.04

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Příprava bakterinu *M. hyopneumoniae*

Kmen *M. hyopneumoniae* NL1042 se inaktivuje binárním ethyleniminem (BEI).

Na konci kultivačního období se pH kultury zvýší na hodnotu 7,8±2,0, která se v tomto rozmezí udržuje po dobu alespoň jedné hodiny. Poté se přidá vodný roztok hydrobromidu 2-bromethylaminu (BEA) sterilizovaný filtrací (konečná koncentrace asi 4,0mM). Při zvýšeném pH se BEA chemicky změní na BEI. Kultura se alespoň 24 hodin za konstantního míchání inkubuje při teplotě 37 ± 2°C.

Po inaktivaci, ale před neutralizací thiosíranem sodným se odeberou reprezentativní vzorky, které se zkoušejí na úplnost inaktivace. Čerstvé médium obsahující 0,0026% fenolovou červeň se zaočkuje 5 až 20% inokulem a alespoň jeden týden inkubuje při teplotě 37 ± 2°C. Poté se hodnotí změna barvy, která je indikátorem neúspěšné inaktivace. Volné vzorky se zkoušejí na sterilitu v thioglykolátové půdě při teplotě 37 ± 2°C a tryptikázové sojové půdě při teplotě místnosti. Inaktivovaná kultura se přemístí do sterilních zásobníků a až do stanovení uchovává pri 2 až 8°C.

Síla účinku (potency) se stanoví in vitro sérologickým stanovením za účelem kvantifikace antigenu v konečném obalu. Síla účinku vakcín použitých při hodnoceních účinnosti předurčuje minimální sílu účinku, která musí být přítomna ve vakcíně k datu exspirace.

Vzorky volného produktu nebo produktu v konečném obalu z každé série nebo první podsérie se zkouší na *M. hyopneumoniae* za použití následujícího postupu.

Bakterin se skladuje ve 100ml lahvičkách při -50°C. Obsah lahviček se nechá roztát a 15ml subalikvoty se až do použití skladují při teplotě 5 ± 2°C.

Za účelem hodnocení síly účinku sestavené série se vzorek série porovná s referenčním vzorkem a stanoví se RP jednotky pro sérii. Série nebo podsérie by přednostně měla obsahovat 6,33 RP na počátku a alespoň 5,06 RP v průběhu stárnutí.

RP označuje relativní sílu účinku. RP je možno stanovit relativní kvantifikací antigenu ve srovnání s referenční vakcínou. V tomto případě má referenční vakcína RP definovanou jako 1. Jednorázový produkt podle vynálezu má RP přednostně 6,33, což je 6,33násobek hodnoty referenčního produktu.

Jako konzervační činidlo se přidá merthiolát (konečná hustotní koncentrace není vyšší než 0,01 % (hmotnost/objem)).

Jako konzervační činidlo se přidá roztok ethylendiamin-tetraoctové kyseliny (EDTA, dvojsodné nebo čtyřsodné soli) v konečné hustotní koncentraci asi 0,07 % (hmotnost/objem).

P ř í k l a d 2

Zvířata

Pro vakcinaci se vyberou prasata o stáří asi jednoho týdne. Sérolotický status z hlediska *M. hyopneumoniae* se stanoví pomocí ELISA. Prasata, která mají hodnotu ELISA ≤ 0,50 jsou považována za negativní na *M. hyopneumoniae*. Prasata s

15.09.04

hodnotou ELISA vyšší než 0,50 jsou považována na sérologicky pozitivní na *M. hyopneumoniae* .

Vakcíny

Prasata se vakcinují bakterinem *M. hyopneumoniae* RESPISURE-1 (Pfizer Inc.). Před použitím se stanoví síla účinku vakcíny relativní kvantifikaci antigenu ve srovnání s referenčním bakterinem *M. hyopneumoniae*. Referenční vakcína (RP = 1,0) obsahuje asi 8000 jednotek antigenu (asi 1 až 2 x 10^8 CCU viditelných buněk sklizených před inaktivací) na dávku, podle imunostanovení v pevné fázi, kterým se měří množství antigenu proti *M. hyopneumoniae* ve vakcíně.

Stejný kapalný adjuvant (AMPHIGEN), kterého se používá při formulaci přípravku RESPISURE-1, slouží jako placebo (tj. bez bakteriálních buněk).

Expoziční inokulum

Expoziční vehikulum se připraví jako 10ml alikvoty plicního homogenátu, zmrazí a označí jako derivát kmene *M. hyopneumoniae* 11 (L1 36). Inokulum se nechá roztát a zředí půdou Friis Mycoplasma tak, aby se dosáhlo zředění 1:25 a až do podání uchovává na ledu. Každému praseti se ve dnech konkrétně uvedených v následujících příkladech podá 5ml intranasální dávka (2,5 ml na nozdru) suspenze 1:25. Každý den expozice se provádí kultivace alikvotu plicního inokula, aby se potvrdila nepřítomnost bakteriální kontaminace. Druhý alikvot se zpětně titruje každé tři dny; výsledky ukazují, že inokulum obsahuje asi 10^6 až 10^7 jednotek měnících barvu (CCU) *M. hyopneumoniae*/ml.

Zkušební postup

15.09.04

Prasata se označí ušními známkami ještě u prasnice [den (-1)]. Prasata se na základě generalizovaného blokového randomizačního schematu přidělí do ohrad a ošetřovaných skupin. Bloky se tvoří na základě vrhu a odstavovací ohrady.

V den 0 se prasata vakcinují 2ml intramuskulární dávkou bakterinu *M. hyopneumoniae* RESPISURE-1 (Pfizer Inc.) nebo 2ml intramuskulární dávkou placeba. Každému praseti se ve dnech uvedených v následujících příkladech podá 5ml intranasální dávka suspenze 1:25 expozičního inokula. Všechna prasata se sledují a denně se kontrolují příznaky klinického onemocnění.

Po uplynutí příslušné doby od prvního dne expozice se prasata ohleduplně usmrtí a podrobí pitvě. Plíce se vyjmou a hodnotí. Zkoumání post-mortem zahrnuje odhad rozsahu patologických změn, k nimž došlo v souvislosti s mykoplasmovou respirační chorobou. Zkoumá se každý plicní lalok a léze se zaznamenají, aby bylo možno odhadnout procentuální postižení každého laloku. Zaznamená se stupeň makroskopických lézí.

Analýza dat

Účinnost se hodnotí na základě procenta plicních lézí, které je typické pro infekci *M. hyopneumoniae*. Stanoví se, že prasata v ošetřovaných skupinách (vakcinovaná) mají procentuální podíl celých plic s lézemi, který je významně ($P \leq 0,05$) menší než u prasat ze skupiny ošetřené placebem.

Procentuální podíl celých plic s lézemi

Procentní podíl makroskopického postižení se váží za použití následujících podílů jednotlivých plicních laloků na celkové hmotnosti plic: levý kraniální - 10 %, levý střední -

15.09.04

10 %, levý kaudální - 25 %, pravý kraniální - 10 %, pravý střední - 10 %, pravý kaudální - 25 % a přídatný 10 %. Vážené hodnoty plidních laloků se sečtou za celá plíce, čímž se získá procentuální podíl celých plic s lézemi (Pointon et al., 1992).

P ř í k l a d 3

Ochrana proti infekci virulentní *M. hyopneumoniae* se hodnotí u prasat sérologicky pozitivních na *M. hyopneumoniae* za použití jednorázové dávky bakterinu *M. hyopneumoniae* RESPISURE-1 (Pfizer Inc.) podané prasatům o stáří 3 až 8 dnů.

V době vakcinace nebo v době jí blízké se provede pět opakovaných hodnocení RESPISURE-1. Relativní síla účinku (RP) se stanoví relativní kvantifikací antigenu ve srovnání s referenční vakcínou. Referenční vakcína s RP = 1,0 obsahuje asi 8000 jednotek antigenu *M. hyopneumoniae*. Hodnoty RP z těchto stanovení byly 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 a 4,36.

V den 0 se prasata v ošetřované skupině T02 (viz tabulka 1 dále) vakcinují 2ml intramuskulární dávkou bakterinu *M. hyopneumoniae* RESPISURE-1 (Pfizer Inc.). Prasata ve skupině T01 se vakcinují intramuskulárně 2 ml placeba. Každému praseti se ve dnech 178, 179 a 180 podá 5ml intranasální dávka suspenze 1 : 25 expozičního inokula. Každé tři dny se v době inokulace kultivuje alikvot expozičního materiálu, aby se potvrdila nepřítomnost bakteriální kontaminace. Druhý alikvot se zpětně titruje každé tři dny, aby se potvrdilo, že inokulum obsahuje asi 10^7 CCU *M. hyopneumoniae*/ml. Všechna prasata se sledují a denně kontrolují z hlediska příznaků klinického onemocnění.

15.09.04

Třicet dní po prvním dni expozice se všechna prasata ohleduplně usmrtí a podrobí pitvě. Plíce se vyjmou a hodnotí. Zkoumání post-mortem zahrnuje odhad rozsahu patologických změn, k nimž došlo v souvislosti s mykoplasmovou respirační chorobou. Zkoumá se každý plicní lalok a léze se zaznamenají, aby bylo možno odhadnout procentuální postižení každého laloku. Zaznamená se stupeň makroskopických lézí.

T a b u l k a 1

Ošetřovaná skupina	T01	T02
Vakcinace	placebo	vakcína
Počet	26	26
Vakcinovaná Den 0	26	26
Expozice Den 178[1]	26	24[2]
Expozice Den 179[1]	26	22[3]
Expozice Den 180[1]	26	22[3]

[1] Virulentní inokulum M. hyo

[2] Prasata 71 a 73 byla ze studie vyřazena před exozicí, jelikož obě ztratila všechny ušní známky, a nebylo možno je identifikovat.

[3] Prase 36 bylo v den 178 nalezeno mrtvé kvůli anestetickým komplikacím. Prase 31 bylo v den 179 nalezeno mrtvé kvůli anestetickým komplikacím.

Výsledky hodnocení plicních lézí jsou souhrnně uvedeny v tabulce 2. Výsledky ukazují, že vakcinovaná prasata (T02) mají významně (P = 0,0385) nižší střední procentní podíl, stanoveno

22.09.04

6792

metodou nejmenších čtverců, pneumonických plicních lézí než prasata, kterým bylo podáno placebo (T01) (2,0 proti 4,5 %).

T a b u l k a 2

Souhrnný přehled procenta celkových plicních lézí

Ošetřovaná skupina	Ošetření	Počet prasat	Střední hodnota [LS]	Rozmezí
T01	placebo	26	4,5[a]	0 až 36,75
T02	vakcína	22	2,0[b]	0 až 13,75

[LS] stanovená pomocí nejmenších čtverců

[a,b] Hodnoty označené různými indexy se statisticky liší (P = 0,0385).

Výsledky této studie ukazují, že jednorázová vakcinace prasat ve stáří asi 1 týdne bakterinem *M. hyopneumoniae* RESPISURE - 1 vyvolává ochranu při následné expozici virulentní *M. hyopneumoniae*.

P ř í k l a d 4

Ochrana proti infekci virulentní *M. hyopneumoniae* se hodnotí u prasat sérologicky negativních na *M. hyopneumoniae* za použití jednorázové dávky bakterinu *M. hyopneumoniae* RESPISURE-1 (Pfizer Inc.) podané prasatům o stáří 3 až 8 dnů.

V době vakcinace nebo v době jí blízké se provede pět opakovaných hodnocení RESPISURE-1. Relativní síla účinku (RP) se stanoví relativní kvantifikací antigenu ve srovnání s referenční vakcínou. Referenční vakcína s RP = 1,0 obsahuje asi 8000 jednotek antigenu *M. hyopneumoniae*. Hodnoty RP z těchto stanovení byly 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 a 4,36.

22.09.04

6479x

V den 0 se prasata v ošetřované skupině T02 vakcinují 2ml intramuskulární dávkou bakterinu *M. hyopneumoniae* RESPISURE-1. Prasata ve skupině T01 se vakcinují intramuskulárně 2 ml placeba. Každému praseti se ve dnech 173, 174 a 175 podá 5ml intranasální dávka suspenze 1 : 25 expozičního inokula. Každé tři dny se v době inokulace kultivuje alikvot expozičního materiálu, aby se potvrdila nepřítomnost bakteriální kontaminace. Druhý alikvot se zpětně titruje každé tři dny, aby se potvrdilo, že inokulum obsahuje asi 10^8 CCU *M. hyopneumoniae*/ml. Všechna prasata se sledují a denně kontrolují z hlediska příznaků klinického onemocnění.

Dvacet devět dní po prvním dni expozice se všechna prasata ohleduplně usmrtí a podrobí pitvě. Plíce se vyjmou a hodnotí. Zkoumání post-mortem zahrnuje odhad rozsahu patologických změn, k nimž došlo v souvislosti s mykoplasmovou respirační chorobou. Zkoumá se každý plicní lalok a léze se zaznamenají, aby bylo možno odhadnout procentuální postižení každého laloku. Zaznamená se stupeň makroskopických lézí.

Schema zkoušky souhrnně vyjadřuje tabulka 3.

T a b u l k a 3

Ošetřovaná skupina	T01	T02
Vakcinace	placebo	vakcína
Počet	26	26
Vakcinovaná Den 0	26	26
Expozice Den 173[1]	25[2]	23[3]

22.09.04

617gx

Expozice Den 174[1]	24[4]	20[5]
Expozice Den 175[1]	24	20

[1] Virulentní M. hyo

[2] Prase 123 bylo v den 19 ohleduplně usmrceno vzhledem k chronické septické polyarthritis.

[3]Prase 222 bylo v den 40 nalezeno mrtvé. Při pitvě bylo zjištěné velké množství perikardiální kapaliny a hemoragie na epikardiu. Prase 102 bylo ohleduplně usmrceno v den 95 kvůli prolapsu rekta. Prase 204 bylo v den 145 nalezeno mrtvé. Pitva nebyla provedena vzhledem k pokročilému rozkladu zdechliny.

[4]Prase 244 bylo v den 174, po prvním dnu po expozici, nalezeno mrtvé kvůli anestetickým komplikacím.

[5]NEEA počítáno na 3 prasata

Výsledky hodnocení plicních lézí jsou souhrnně uvedeny v tabulce 4. Celková analýza ukazuje, že vakcinovaná prasata (T02) mají významně (P = 0,0001) nižší střední procentní podíl, stanoveno metodou nejmenších čtverců, pneumonických plicních lézí než prasata, kterým bylo podáno placebo (T01) (0,3 proti 5,9 %).

T a b u l k a 4

Souhrnný přehled procenta celkových plicních lézí

Ošetřovaná skupina	Ošetření	Počet prasat	Střední hodnota [LS]	Rozmezí
T01	placebo	24	5,9[a]	0 až 36
T02	vakcína	20	0,3[b]	0 až 6

[LS] stanovená pomocí nejmenších čtverců

[a,b] Hodnoty označené různými indexy se statisticky liší (P = 0,0001).

22.09.04

6179c

Výsledky této studie ukazují, že jednorázová vakcinace prasat bakterinem *M. hyopneumoniae* RESIPURE ONE vyvolává ochranu proti následné experimentální expozici virulentní *M. hyopneumoniae*.

P ř í k l a d 5

Ochrana proti infekci virulentní *M. hyopneumoniae* se hodnotí u prasat sérologicky negativních na *M. hyopneumoniae* za použití jednorázové dávky bakterinu *M. hyopneumoniae* RESPISURE-1 podané prasatům o stáří 3 až 8 dnů.

V době vakcinace nebo v době jí blízké se provede pět opakovaných hodnocení RESPISURE-1. Relativní síla účinku (RP) se stanoví relativní kvantifikací antigenu ve srovnání s referenční vakcínou. Referenční vakcína s RP = 1,0 obsahuje asi 8000 jednotek antigenu *M. hyopneumoniae*. Hodnoty RP z těchto stanovení byly 5,42, 3,96, 4,71, 5,49 a 4,36.

V den 0 se prasata v ošetřované skupině T02 vakcinují 2ml intramuskulární dávkou bakterinu *M. hyopneumoniae*. Prasata ve skupině T01 se vakcinují intramuskulárně 2 ml placeba. Každému praseti se ve dnech 76, 77 a 78 podá 5ml (2,5 ml na nozdru) intranasální dávka suspenze 1 : 25 expozičního inokula. Každé tři dny se v době inokulace kultivuje alikvot expozičního materiálu, aby se potvrdila nepřítomnost bakteriální kontaminace. Druhý alikvot se zpětně titruje každé tři dny, aby se potvrdilo, že inokulum obsahuje asi 10^6 CCU *M. hyopneumoniae* /ml. Všechna prasata se sledují a denně kontrolují z hlediska příznaků klinického onemocnění.

Dvacet devět dní po prvním dni expozice se všechna prasata ohleduplně usmrtí a podrobí pitvě. Plíce se vyjmou a hodnotí.

22.09.04

6279x

Zkoumání post-mortem zahrnuje odhad rozsahu patologických změn, k nimž došlo v souvislosti s respirační chorobou vyvolanou *M. hyopneumoniae*. Zkoumá se každý plicní lalok a léze se zaznamenají, aby bylo možno odhadnout procentuální postižení každého laloku. Zaznamená se stupeň konsolidace.

Schema zkoušky souhrnně vyjadřuje tabulka 5.

T a b u l k a 5

Ošetřovaná skupina	T01	T02
Vakcinace	placebo	vakcína
Počet	26	26
Vakcinovaná Den 0	26	26
Expozice Den 176[1]	23[2]	21[3]
Expozice Den 177[1]	23	21
Expozice Den 178[1]	23	21

[1] Virulentní inokulum M. hyo

[2] Prasata 237 a 239 byla v den -1 určena jako pozitivní na pneumonii vyvolanou *M. hyopneumoniae*. Tato selata byla ze studie vyřazena v den 14 a ohleduplně usmrcena. Prase 220 bylo v den 3 nalezeno mrtvé, zalehnuto prasnicí.

[3]Prasata 238, 240 a 277 byla v den -1 stanovena jako pozitivní na pneumonii vyvolanou *M. hyopneumoniae*. Tato selata byla v den 14 vyřazena ze studie a ohleduplně usmrcena. Prase 280 bylo v den 7 ohleduplně usmrceno, jelikož bylo anorektické a nedužívé. Prase 177 bylo v den 40 ohleduplně usmrceno kvůli chronickému syndromu chřadnutí.

22.09.04

6179z

Výsledky hodnocení plicních lézí jsou souhrnně uvedeny v tabulce 6. Celková analýza ukazuje, že vakcinovaná prasata (T02) mají významně (P = 0,0001) nižší střední procentní podíl, stanoveno metodou nejmenších čtverců, pneumonických plicních lézí než prasata, kterým bylo podáno placebo (T01) (0,5 proti 9,9 %).

T a b u l k a 6

Souhrnný přehled procenta celkových plicních lézí

Ošetřovaná skupina	Ošetření	Počet prasat	Střední hodnota LS	Rozmezí
T01	placebo	23	9,9[a]	0 až 40,5
T02	vakcína	21	0,5[b]	0 až 5

LS stanovená pomocí nejmenších čtverců

[a,b] Hodnoty označené různými indexy se statisticky liší (P = 0,0001).

30.03.05

PATENTOVÉ NÁROKY PV 2003-3766

22319

1. Použití *Mycoplasma hyopneumoniae* pro výrobu vakcíny pro léčení nebo prevenci choroby nebo poruchy u zvířete, která je vyvolána infekcí *Mycoplasma hyopneumoniae*, přičemž vakcína se podává zvířeti jednorázově.

2. Použití podle nároku 1, kde vakcínová formulace *Mycoplasma hyopneumoniae* je inaktivovaným přípravkem, který obsahuje celé buňky *Mycoplasma hyopneumoniae* nebo jejich části.

3. Použití podle nároku 2, kde jednorázová dávka vakcíny *Mycoplasma hyopneumoniae* obsahuje asi $1x10^6$ až asi $5x10^{10}$ jednotek měnících barvu (CCU) na dávku.

4. Použití podle nároku 2, kde množství podané vakcíny je asi 0,5 až asi 3,0 ml.

5. Použití podle nároku 2, kde přípravkem, který obsahuje buňky *Mycoplasma hyopneumoniae* je RESPISURE-1.

6. Použití podle nároku 2, kde vakcína *Mycoplasma hyopneumoniae* dále obsahuje virový nebo bakteriální antigen odlišný od *Mycoplasma hyopneumoniae*.

7. Použití podle nároku 6, kde virové nebo bakteriální antigeny se volí z viru prasečí chřipky (SIV), viru reprodukční a respirační choroby prasat (PRRS či záhadné choroby prasat), diarey po odstavení (PWD) a proliferační enteritis u prasat (PPE).

8. Použití podle nároku 2, kde vakcína *Mycoplasma hyopneumoniae* se podává intramuskulárně.

30-03-05

9. Použití podle nároku 1, kde prase je chráněno až 25 týdnů po vakcinaci.

10. Použití podle nároku 1, kde vakcína *Mycoplasma hyopneumoniae* dále obsahuje adjuvant.

11. Použití podle nároku 1, kde vakcína *Mycoplasma hyopneumoniae* je podjednotkovou vakcínou.

12. Použití podle nároku 12, kde podjednotková vakcína obsahuje jeden nebo více imunogenních polypeptidů nebo proteinů nebo imunogenních fragmentů takových polypeptidů nebo proteinů.

13. Použití podle nároku 13, kde polypeptidy a proteiny se zvolí ze skupiny sestávající z P46, P65, P97, P102, P70, P50 a P44.

14. Použití podle nároku 1, kde vakcína *Mycoplasma hyopneumoniae* obsahuje jeden nebo více genů nebo nukleových kyselin, které kódují jeden nebo více imunogenních polypeptidů nebo proteinů nebo imunogenních fragmentů takových polypeptidů nebo proteinů, přičemž tyto geny nebo nukleové kyseliny mohou být exprimovány in vivo.

15. Použití podle nároku 15, kde geny nebo nukleové kyseliny jsou zvoleny ze souboru sestávajícího z p46, p65, p97, p102, p70, p50 a p44.