

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

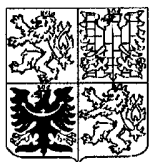
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

106-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **16. 07. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.07.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/9609402**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 04. 99**
(Věstník č. 4/99)

(86) PCT číslo: **PCT/FR97/01322**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/03196**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 39/155
A 61 K 39/265
A 61 D 7/00

(71) Přihlášovatel:

MERIAL, Lyon, FR;
ID-DLO INSTITUTE OF ANIMAL SCIENCE
AND HEALTH, Lelystad, NL;

(72) Původce:

Rijsewijk Franciscus Antonius Maria,
Amsterdam, NL;
Schrijver Remco Siebren, Bilthoven, NL;
van Oirschot Johannes Theodorus,
Lelystad, NL;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Polynukleotidová hovězí vakcína
pro intradermální podávání**

(57) Anotace:

Formulovaná polynukleotidová vakcína skotu, obsahující účinné množství plasmidu, jímž je kombinace sekvence DNA, kódující pathogenní imunogen skotu a promotor, umožňující expresi uvedeného imunogenu do kožních buněk je popisována v tom smyslu, že uvedené formulování vakcíny je vhodné pro intradermální podávání použitím přístrojku pro vytrysknutí kapaliny. Přenosné vacinační zařízení pro skot obsahuje přístroj pro vytrysknutí kapaliny a zásobník, vhodný pro obsahování většího počtu dávek takto formulované vakcíny, jakož i přístroj, určený k intradermálnímu podávání určené dávky formulované vakcíny.

CZ 106-99 A3

Polynukleotidová hovězí vakcína pro intra- dermální podávání

Oblast techniky

Tento vynález se týká zdokonalení se zřetelem na vakcinování hovězího dobytka.

Dosavadní stav techniky

Imunizování a vakcinování přímým podáváním nukleotidových sekvencí, zakodovávajících proteinový imunogen (tzv. polynukleotidové vakcinování nebo vakcinování pomocí ADN) bylo popsáno v přihlášce WO-A-90 11092. Protein, zakodovaný vsunutou nukleotidovou sekvencí je schopný exprese do buněk a vyvolat imunitní odezvu. Tato přihláška uvažuje použití ADN jako takové, jakož i ADN, obsažené v liposomech. S výhodou se ADN zavádí do svalstva. ADN je možno také zavést do kůže, některých orgánů nebo do krve. Injikování může být provedeno různými způsoby, jako je cestou intradermální, transkutánní, intravenosní atd.

Práce, které sledovaly první popisy těchto způsobů, přivodily zájem použít pro injikování ADN buď cestu intramuskulární, nebo postup označovaný jako "genové dělo", což záleží v přímém zanesení mikročástiček kovu, jako jsou mikročástičky zlata, obložené ADN, přímo^{do} buněčných povrchových vrstev kůže.

Ulmer J.B. a spol., Science 259, 1745-1749 (1993), Cox G.J.M. a spol., J. of Virology 67, 5664-5667 (1993), a Xiang Z.Q., Virology 199, 132-140 (1994) popsali způsoby vakcinování použitím ADN a intramuskulárního způsobu.

Právě tak bylo jasně dokázáno, že výsledky intramuskulární cesty jsou lepší ve srovnání s cestou intradermální, ale že, vezme-li se v úvahu "genové dělo", je tato cesta nejslibnější, protože dávky, podávané tímto způsobem, jsou mnohem nižší, než jak je tomu při cestě intramuskulární.

Lze se odvolat na Fynan F. a spol. v P.N.A.S. USA 90, 11478-11482 (1993); WO-A-95/20660.

Právě tak Tang D. a spol., Nature 356, 152-154 (1992) poukázali na nepřítomnost imunitní odezvy po podání růstového lidského hormonu cestou intradermální za pomoci hypodermální jehličky. Autoři naopak poukázali na průkaz imunitní odezvy použitím postupu "genové dělo".

Pouze Raz a spol., P.N.A.S. USA 90, 9519-9523 (1994) oznámili, že intradermální podávání může být spojeno se zvýšenými ~~tětr~~ antilátek.

Postup za použití "genového děla" je jako takový nevhodný z hlediska obtížnosti provedení, i jest nákladný, protože vyžaduje přípravu a použití částeczek zla~~ža~~, potažených použitím ADN a další podávání pomocí speciálního závitového zařízení.

Autoři nyní vyvinuli jinou techniku, předpokládající použití přístroje kapaliny tryskou. Lze citovat Firth-e P.A. a spol., Analytical Biochemistry 205, 365-368 (1992), kteří popsali přístrojek, nazvaný "Pe~~d~~-o-jet", což je druh injekční stříkačky používané pro podávání lidských vakcín do svalových tkání, tedy i pro podávání vakciny s ADN. Autoři sdělují, že injekční stříkačka umožní průchod ADN kůži a dosáhnout k svalstvu, tukové tkáni i tkáním prsním žijících tvorů.

Mahlsing a spol., Journal of Immunological Methods 75, 11-22 (1994) popsali použití přístroje, pojmenovaného "Me~~d~~-E-Jet" pro podávání jak transkutánní tak i intramuskulární.

Ještě lze citovat Jenkins-e a spol., Vaccine 13, 1658-1664 (1995), kteří popsali použití vakcinování stříkačkou do svalu.

Syncytiální dýchací hovězí virus BRSV je přítomný na celém světě a může způsobit těžká onemocnění dolních částí dýchacího traktu hovězího dobytka, přičemž tato nemoc je podobná onemocnění virem dýchacím syncytiálním HRSV u dětí.

V průběhu jedné studie bylo nalezeno, že více než 95% telat stáří dvou roků je infikováno virem BRSV, viz Van der Poel a spol., Archives of Virology 133, 309-321 (1993).

Potřeba vakcíny proti viru BRSV je silně pociťována, ale zatím se nedostává výsledků při vyvíjení účinných vakcin. Prvé pokusy vakcinování dětí vedly ke zjištění snazšího onemocnění po přírodní infekci, což vedlo k názoru, že vakcinování by mohlo být nebezpečné, viz Anderson a spol., Journal of Infectious Diseases, 171, 1-7 (1995). Mezitím se dospělo ke zjištění, že antilátky proti dvěma glykoproteinům se hromadí u povrchu s tím, že protein F (protein pevně vázaný) a protein G (napojený) by mohly hrát ochrannou úlohu, viz Kimman a Westenbrink, Archives of Virology 112, 1-25 (1990). Mnoho prací bylo rovněž řízeno na zvířecí typy, jako jsou myši, psi a fretky. Naopak testy vakcinování na hovězím dobytku za použití čistěného proteinu F nevedly k výsledkům s uzávěrem, že situace, jak se vyvine u dětí vakcinovaných použitím BRSV, by mohla vést k vývoji antilátek neutralizujících a antilátek neneutralizujících, které by mohly rušit imunitní odezvu po následném infikování virem, viz Nelson L.D. a spol., Am.J.Vet. Res., 53, 1315-1321 (1992).

Podstata vynálezu

Cílem tohoto vynálezu je zdokohalení vakcíny pro skot podáváním ADN, což by dovolovalo vakcinování při nejmenším tak účinné, jako je vakcinování cestkou intramuskulární nebo použitím postupu "genové dělo", ale aby tento postup byl podstatně jednodušší a méně nákladný.

Dalším předmětem tohoto vynálezu je zdokonalení v tom smyslu, aby se tím dosáhlo zvýšené neškodnosti, zvláště pokud se to týká zbytků po vakcinování, přítomných v tkáních.

Dalším předmětem tohoto vynálezu, který se týká vakcinování zvířat, určených ke konzumování, je zajistit

takovou neškodnost, aby vakcinování se neprojevalo nežádoucími účinky na úseku předkládání masa.

Dalším předmětem vynálezu je nalézt prostředek pro hromadné vakcinování.

Specifickým předmětem tohoto vynálezu je pořídit takovou vakcinu, jež by zajišťovala ochranu skotu proti virům BRSV, IBR, BVD nebo PI-3.

Zjistili jsme, že je možné splnit tyto předměty podáváním vakciny intradermální cestou za pomoci injektoru kapalin bez jehly, zajišťujícím na pěti místech rozdělení vakciny hlavně epidermicky, dermicky a hypodermicky. Testy provedené námi na úseku vakcinování skotu proti syncytiálnímu dýchacímu viru skotu (Bovine Respiratory Syncytial Virus, BRSV) umožnily docílení imunizačních výsledků vyšších tímto způsobem, než jak se to docílí cestou intramuskulární.

Tento vynález navrhuje poprvé vakcinování skotu polynukleotidickými vakcinami (nebo vakcinami ADN nebo dokonce plasmidickými vakcinami) k tomu určenými, a podávány intradermální cestou použitím injektoru bez jehly pro vytrysknutí kapaliny.

Předmětem tohoto vynálezu je tedy formulování polynukleotidické vakciny, obsahující účinné množství (intradermálním postupem) plasmidu asociujícího sekvenci ADN kodující imunogen a promotor, umožňující expresi tohoto imunogenu in vivo do buněk kůže s tím, že zmíněné formulování je uzpůsobeno pro intradermální podávání (zvláště se zřetelem na buňky epidermální, dermální a hypodermální); podávání předpokládá zvláště přítomnost antigenů, exprimovaných do Langerhans-ových dendritických buněk kůže, které se lokalizují v podstatě převážně v epidermu, použitím přístroje pro intradermální podávání vytrysknutím kapaliny, zvláště pak použitím přístroje pojmenovaného Pigjet (výroba a distribuce: Endoscopic, Laons,

Francie) nebo rovnocenného jiného přístroje, který vyskládá vakcinu zhlavím s pěti tryskami za podmínek rovných jako Pigjet. Obecně formulované přípravky vakciny dle tohoto vynálezu jsou vhodné pro podávání přístrojem s tryskáním kapaliny, která má 1 až 10 trysek, s výhodou 4 až 6, nejvýhodněji však 5 až 6. Provádí se to za použití vhodného vehikula, určeného pro intredermální podávání, jako je voda, některý pufr, fyziologický roztok, liposomy, kationtové kapaliny a obecně vehikula s malou viskozitou, obvykle rovnou či blízkou viskozitě vody a za použití dávkového objemu, který je užitečný a vhodný pro tuto cestu podávání.

Zvláště pak, ale nikoli výlučně se to provádí použitím přístroje s pěti nebo 6 tryskami a za vstřiku pěti nebo šesti totožných objemů s tím, že dávka výhodného objemu může činit od 0,1 ml do 0,9 ml, s výhodou mezi 0,2 až 0,6 ml, nejvýhodněji mezi 0,4 až 0,6 ml.

Formulace vakciny obsahuje účinné množství intra-dermálního plasmidu, což odpovídá obecně 10 ng až 1 mg, s výhodou 100 ng až 500 µg, nejvýhodněji od 0,5 µg až do 50 µg plasmidu.

Typicky se dle tohoto vynálezu podává farmulování vakciny na více místech se zřetelem na optimalizování transfekce buněk plasmidy. To se děje s výhodou použitím ejekčního zhlaví s více otvory. To lze také prokombinovat pro multi-aplikování přístroje, to jest rozdělení vakcinované dávky na více než jedno využití přístroje v dávkách rozdílných. Podle zvláště výhodného postupu lze přístroj použít s pěti až šesti otvory při jedné či více aplikacích, s výhodou při dvou.

Typickým případem vynálezu je sekvence ADN, kodující imunogenní viru BRSV, zvláště gén G a/nebo F tohoto (na příklad kmen 391-2, viz Lerch R. a spol., Virology 181 119-131 (1991)).

Jiným typickým příkladem dle tohoto vynálezu je sekvence ADN, kodující imunogen viru Rhinotracheitidis skotu (infekční, tzv. IBR) a herpesviru skotu (BHV, zvláště pak kodující gen gB a/nebo gen gD, viz například gen ST, viz Leung-Tack P. a spol., Virology 199, 409-421 (1994).

Dalším typickým příkladem dle tohoto vynálezu je sekvence ADN, kodující imunogen viru onemocnění sliznice (BVD), zvláště pak gen E2 a/nebo gen E1, viz například kmen Osloss, Dr. Moerlooze L. a spol., J.Gen.Virol. 74, 1433-1438 (1993). Rovněž lze připojit geny různých podtypů BVD, například severoamerický a evropský, viz Dekker A. a spol., Veterinary Microbiol. 47, 317-329 (1995).

Ještě jiným typem dle tohoto vynálezu je sekvence ADN, kodující imunogén viru parachřipky typu 3 (PI-3), zvláště pak gen HN a/nebo F, s výhodou HN (sekvence genu F a HN deponoval Shiguta H, 1987_ GenBank Y00115).

V případě kombinování dvou genů, například F a G z BRSV, HN a F z PI-3 nebo gD a GB z OBR lze odpovídající sekvence vsunout do téhož plasmidu nebo do plasmidů různých.

V případě genu pathogenního činidla se zahrnuje nejen kompletní gen, ale také jeho lísící se nukleotidové sekvence, čítaje v to fragmenty, zachovávající si schopnost indukovat ochrannou odezvu. Poznámka o génech se týká nukleotidových sekvencí rovnocenných těm, které byly přesně popsány v příkladech, tedy i sekvencí lísících se, ale kodujících stejný protein. Týká se rovněž nukleotidových sekvencí jiných kmenů uvažovaného pathogenu, zajišťujícího kombinovanou ochranu nebo specifickou ochranu s přihlédnutím ke kmenu nebo skupině kmenů. Týká se také ještě nukleotidových sekvencí, které byly modifikovány, aby se usnadnila exprese in vivo živočicha jako hostitele, ale kodující

tentýž protein.

Rozumí se samozřejmě, že vynález je založen na adaptaci vakcin ADB předchozích typů pro intradermální podávání přístrojem pro tryskové vstřikování kapalin. A pokud zahrnuje modifikace na úrovni vakciny a zvláště její viskozity, množství ADN a objemu dávky, který se má podat, je samozřejmé, že se vynálezu týká všech konstrukcí vakcin ADN popsaných na tomto úseku již dříve. Odborník je tedy odkazován na situaci na úseku vakcinování ADN, zvláště pak s odvoláním na zde již dříve uvedené podklady.

Přesněji dále řečeno, jednotky transkripce, použité při formulování vakciny dle tohoto vynálezu, zahrnují silný eukaryotický promotor, jako je promotor hCMV IE.

Formulování vakciny dle tohoto vynálezu lze provést použitím zásobníku pro větší počet dávek, například 10 až 100 dávek, který je upraven k napojení na přístroj pro intradermální podávání použitím tryskající kapaliny, například jako je s výhodou Pigjet.

Předmětem vynálezu je rovněž i instalování přenosného zařízení pro vakcinování skotu, jež obsahuje přístroj pro podávání s využitím tryskající kapaliny, a zásobníčku, uzpůsobeného tak, aby obsahoval více dávek formulované vakciny, jak zde byla popsána s tím, že přístroj pro podávání je uzpůsoben pro podání dávky vakciny takto formulované intradermálně.

S výhodou obsahuje přístroj k podávání ejekční zhlaví vybavené jednou až deseti tryskami, zvláště čtyřmi až šesti, s výhodou pěti nebo šesti.

Přístroj, určený k podávání, může mít své různé charakteristické vlastnosti a typy, přesněji uvedené v popisu dále. Výhodnými přístroji pro podávání jsou ty, které zahrnují přístroj Pigjet.

Předmětem tohoto vynálezu je rovněž plasmid, spojující sekvenci ADN, kodující imunogén pathogénu skotu a promotor, umožňující expresi tohoto typu imunogénu, to pro přípravu formulování polynukleotidové vakciny dle různých uzpůsobení, zde výše popisovaných, vhodné k intradermálnímu podávání přístrojkem pro tryskovou aplikaci kapaliny.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob vakcinování, při kterém se podává intradermální cestou za použití přístroje pro tryskové podávání kapaliny formulování polynukleotidové vakciny, jak zde byla výše popsána. Podávání vakciny se může provádět jedním vypuštěním, nebo vícekrát opakovaným stanoveného objemu formulované dávky. Právě tak jest možné předem upravit podání jedné či více vakcinové formulace ve stanovených dávkách, časově rozložených.

Způsob vakcinování dle tohoto vynálezu může využít všech údajů, jak jsou zmiňovány zde výše, zvláště pokud se to týká využití přístroje, určeného k podávání.

Podstata a podrobný popis vynálezu

Vynález bude nyní detailněji popsán použitím realizačních způsobů využití bez jakéhokoli omezování s odkazem na zde připojená vyobrazení.

Vyobr. 1 popisuje plasmid, obsahující gen G viru BRSV pod kontrolou promotoru hCMV pro vakcinování skotu proti tomuto viru.

Vyobr. 2 je grafickým vyjádřením účinnosti vakcinování proti viru BRSV intramuskulárně (IM, označení skotu 1349) a intradermálně (ID, označení skotu 1352 a 1353) s počtem dnů na úsečce a infekčním titrem na přádnici.

Příprava syntetického genu G BRSC

Syncyriální virus dýchacího ústrojí skotu je Pneumovirus čeledi Paramyxovirus. Je to virus v obalu, který se replikuje v cytoplasmě a má ARN genomický jednoduchý řetěz v negativní orientaci. Genom BRSV koduje dva hlavní trans-

membránové glykoproteiny, pevně napojený protein F a napojený protein G.

Syntetická verze genu G byla realizována odtržením všech možných signálů propletení, viz Keil G., Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals, Friedrich Löffler Institute, D-17498, ostrov Riems, Německo).

Oblast kodující gen G byla stanovena, viz Lerch a spol., Journal of Virology 64, 5559-5569 (1990). Kodující oblast odpovídá počtu 257 aminokyselin a charakteristice transmembránového glykoproteinu typu II. Má cytoplasmovou N-koncovou oblast o 40 aminokyselinách následovanou oblastí transmembránovou o 25 aminokyselinách. Zbytek, tedy 192 koncových aminokyselin, tvoří extracelulární oblast proteinu G. Byla syntetizována sekvence ADN s jedním vazebným rámem otevřeným s kodováním pro přesně těchže 257 aminokyselin, které zjistil Lerch a spol., ale bez potenciálních episázních signálů. Byl realizován přenos inverzní sekvence 257 aminokyselin na všechny sekvence ADN s možným kodováním takové sekvence aminokyselin. Bylo to uskutečněno použitím inverzního přenosového programu sekvence proteinu RTRANS PCGene od Bairoch A., Univ., Ženeva, Švýcarsko (IntelliGenetics Inc). Byla stanovena potenciální episázní místa za použití analýzy nukleových kyselin "Signal". Tento program se zakládá na způsobu rovnovážné matrice (viz Staden, Nucleic Acids Research 12, 505-519, 1984). Tento program identifikuje místa potenciálních episázních dárců (vazby intron/exon) a místa potenciálního příjmu episáže (vazby exon/intron). Na základě těchto sekvencních údajů lze mněnit celek episázních signálů silných, aniž by se modifikovala kapacita pro protein. Zvláště pak dinukleotidy GT, které mohou mít extrémní 5' intronu a dinukleotidy AG, které mohou mít extrémní 3' intronu byly odstraněny, seč to bylo možno,

Pro syntetizování nukleotidové sekvence schopné kodo-

vat G byly syntetizovány oligonukleotidy asi 100 zbytků, kryjící oba dva provazce kompletní sekvence. Za použití syntetizování ADN (např. syntetizování ADN, Perkin, Elmer/Applied Biosystems 381A) lze právě tak využít obchodně dostupné oligonukleotidy. Komplementární oligonukleotidy se hybridizují za vzniku fragmentu se dvěma řetízky a jsou klonovány do prokaryotických vektorů, jako jsou pUC18 nebo pUC19. Za použití enzymově vhodných restričních míst se naváže celek klonovaných fragmentů ADN v dobrém pořadí za použití klonovacího postupu, viz Sambrook a spol., Molekular Cloning: A laboratory Manual, 2.vyd., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1989). Nukleotidová sekvence fragmentu ADN, která je výsledkem této činnosti, byla stanovena použitím standartních sekvencovacích postupů (Sambrook a spol.) pro kontrolu, zda sekvence je správná.

Konstruování eukaryotického expresního vektoru obsahujícího gén G za promotorem hCMV

Pro zajištění jeho exprese byl klonován syntetický gén G do jednoho vektoru. Při tomto předběžném pokusu byl použit připravený vektor bezprostředně v laboratoři, tedy přesně řečeno expresní eukaryotický vektor 175hCMV. Tento plasmidový vektor obsahuje dva fragmenty z viru BHVI, které jsou bočně na základu glykoproteinu E kmene BHV1 (holandský), nazývaný Lam, viz Van Engelenburg a spol. Journal of General Virology 75, 2311-2318 (1994). Boční fragment vlevo (Cterm GI) počíná v místě PstI, umístěném v otevřeném vazebném rámu glykoproteinu gI a končí v místě BstBI (nebo AsuII). 17 nukleotidů nad začátkem rámu je otevřeno pro vazbu genu gE. Tento fragment je označován jako Cterm gI. Fragment bočně vpravo začíná v místě EcoNI, situovaném na výšce konce otevřeného rámu vazby gE a končí se na výšce prvního místa SmaI před opakujícím se koncovým fragmentem (TR). Tento fragment koduje gén US9. Je označován jako US9 a TR. Tyto dva fragmenty byly klonovány do místa PstI a místa EcoRI (oba volně) na pUC18. Mezi místem BstBI a místem EcoNI byl klonován

fragment AsaI (konec volný) o 720 pb, obsahující největší část promotoru Immediate Early lidského cytomegaloviru (hCMV-P) s polyvazebnou oblastí a končící polyadenylačním signálem (Poly A). Syntetický gén G byl klonován v označené orientaci na vnitřek místa SmaI této polyvazebné oblasti. Získaný plasmid byl pojmenován PR608, viz vyobr.1.

Kontrola exprese in vitro se zřetelem na G za vycházení z plasmidu PR608.

Byl proveden pokus přechodné exprese, aby se zjistilo, zda plasmid PR608 může exprimovat protein G. K tomuto účelu byl 1,5 µg čisté ADN plasmidu PR608 transfikován do monovrstvy embryonální průdušnice skotu (EBTr) v kultuře. Tyto buňky EBTr byly kultivovány na minimálním esenčním prostředí Earle s 10% foetálního séra skotu (Integro) a s antibiotiky: 125 jedn. penicilinu (Gist-Brocades) a 125 µg streptomycinu (Biochemie) 37,5 jedn. nystatinu (Sigma), 37,5 µg kanamycinu (Sigma) na 1 ml. Transfikování bylo provedeno ve shodě se standardizovaným postupem srážení fosforečnanu vápenatého dle Graham-a F.L. a ven der Eb-a A.J., Virology 32, 456-467 (1973). Po transfikování byla přenesena plasmidická ADN do prostředí transfikovaných buněk a kodované proteiny byly exprimovány díky mechanismu hostitelské buňky. Normálně pouze 0,01% až 0,1% buněk z transfikované monovrstvy by zjistilo ADN a exprimovalo kodované gény.

Příprava ADN pro polynukleotidickou vakcinaci.

ADN plasmidu PR608 byla připravena přidáním 100 µl ze zásoby E.coli K12 v glycerolu, buněk DHSaplha F s obsahem plasmidu PR608 do 2 litrů prostředí LB, což je standardizované prostředí pro růst bakterií. Tato kultura objemu dvou litrů byla inkubována 20 hodin při 37° C a amplifikované buňky byly sebrány za použití nádobek po 250 ml a odstředivky IEC Centra-8R o nejvyšší rychlosti.

ADM plasmidu PR608 byla izolována z buněk sraženiny za použití postupu alkalického lyzování, standardizovaného de Birnboim-em a Doly, jak to popsal Sambrook a spol., Molecular Cloning, a Press Laboratory Manual, 2.vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Z plasmidu izolovaná ADN byla pak rozpuštěna v 20 ml TE (10 mM Tris a 1 mM kyseliny ethylendiamintetraoctové, pH 7,4) a použitím elektroforesy byla stanovena koncentrace ADN, jakož i její kvalita. Při použití normální kultury objemu 2 litry lze izolovat 40 mg plasmidu; asi 60% plasmidu PR608 se nachází ve stavu uzavřeném nahoře a asi 30% je ve stavu cirkulárně uvolněném.

Přípravek plasmidů byl uskladněn za -20°C . Před použitím ADN z plasmidu PR608 byl roztok ADN zředěn na 0,5 mg/ml v 1 x PBS a TE. Tento pufovaný roztok ADN byl pipetován do nádobek 10 ml, uzpůsobených pro přístroj Pigjet za uskladnění při 4°C pro použití za hodinu až dvě.

Přístroj Pigjet pro podávání

Přístroj pro administrování, tedy podávání, přenosného typu, a to typu Pigjet, obsahuje v pouzdru, vybaveném držadlem, zásobník kalibrováný po 0,2 ml a píst, který je normálně v postavení vzdáleném v pouzdru, a to pod kontrolou pružiny uvedeného pístu.

Přístroj je vybaven vně zhlavím s pěti tryskami či dýznami, určenými ke kalibrování vstříku, i když tam může být vsunuta jedna tryska a filtrační zařízení, aby nedošlo ke znečištění injekce případnými nečistotami. Trysky jsou od sebe mírně vzdáleny. Tlak výtrysku z vývodu trysky může být stanoven na 100 bar pro Pigjet s jednou tryskou.

Působením vhodného zařízení dojde ke stlačení pružiny, tím se vyvolá pohyb pístu a důsledkem je nasátí vhodné dávky vakciny ze zásobníčku nebo lahvičky, připojené na pouzdro.

Uvolnění pružiny vyprovokuje vyprázdnění pístu a
ejekci dávky otvorem či otvory pro trysknutí.

Testy vakcinování a další pokusy

4 telata bez specifických pathogenních organizmů byla
pořízena císařským řezem, zbavena kollostra a uchovávána
v žloutci. Telata byla vakcinována šestkrát v intervalu
jednoho týdne, a to od stáří 6 týdnů. Ze zvířátek byla
dvě vakcinována intradermálně použitím Pigjet s jednou
tryskou (Endoscopic, Laons, Francie), 2 ze zvířátek byla
vakcinována intramuskulárně jehlou velikosti 25. Pigjet
byl aplikován tak, že jeho zhlaví bylo v kontaktu s kůží
kolmé na ni tak, aby tryska vakciny měla kolmý směr vůči
kůži. Každé vakcinování sestávalo z 500 µg Adn Plasmidu
v 1 ml fosfátového pufru PBS. Intradermálními vakcinami
bylo 5 injekcí po 0,2 ml do kůže zadní tlapky a vakcinace-
mi intramuskulárními byla 1 injekce do gluteu svalu. Před
vakcinováním byla kůže oholena.

Byly získány tyto titry antilátek, jak je to patrné
z tabulky I zde dále:

vakcinování v týdnech: 0, 1, 2, 3, 4, 5,

zkouška v týdnu šestém

sledování titru antilátek v týdnech 0 až 8.

		0	1	2	3	4	5	6	7	8
tele 1352	Pigjet	<5	<5	<5	80	640	1280	640	1280	>1280
tele 1453	Pigjet	<5	<5	<5	40	1280	640	640	640	a
tele 1349	IM	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
tele 1350	IM	<5	<5	<5	a					

a: tato telátka byla usmrcena v důsledku problémů v souvis-
losti se zdravím, nikoli ve spojitosti s vakcinováním.

Jako důsledek injekcí ADN lze pozorovat projev antilátka na konci 3 týdnů u zvířat vakcinovaných intradermálně a vysoké titry od čtvrtého týdne se projeví na hladině.

Telata byla potom testována pomocí viru infekčního BRSV. Inokulování viru bylo provedeno 6 týdnů po prvním vakcinování intranasálním nakapáním 1 ml viru kmene Odijk ($10^{3,8}$ TCDI₅₀/ml) do každého z chřípí.

Pro zjištění účinnosti vakcinování byla sledována exkrece viru titrováním infekčního TCDI₅₀ ml až po 12 dnů po infikování, a to na výtěrech z nosu (sw) a v kapalině po promytí plic (Lav), viz vyobr.2.

Bylo možno dokázat, že plasmid, kodující protein G z BRSV, podávaný intradermálně trysknutím kapaliny chrání proti virulujícímu vývoji tohoto viru. Intradermální vakcinování použitím přístrojku pro podávání, majícího zhlaví s jednou tryskou způsobí rychle zvýšení titrů antilátka proti proteinu G, což nebylo pozorováno při intramuskulárním vakcinování. I jinak titry infekčního viru BRSV v kapalinách po vymytí plic a na nosních výtěrech byly vyšší v případě telat vakcinovaných intramuskulárně a ve skutečnosti nestávaly u telat vakcinovaných intradermálně. Klinické signály byly lehké a nelíšily se podstatněji mezi zvířaty.

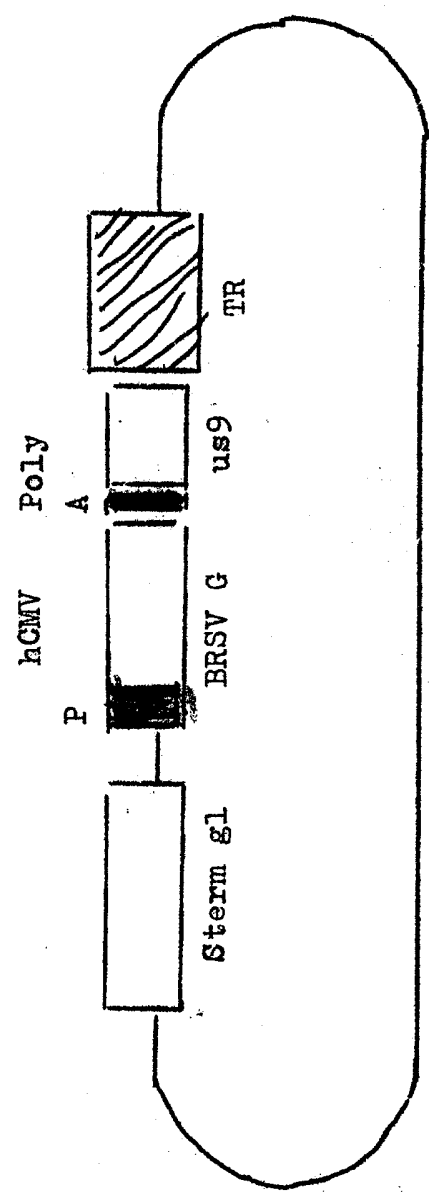
Byla rovněž pozorována velmi dobrá inokulace při použití aparátu Pigjet, přičemž tento postup v žádném případě nevyžaduje předchozí zanícení kůže, jako je tomu v případě částeček zlata.

Kromě toho, a to je pozoruhodné, je současně dosaženo ochrany proti proteinu G, který zpravidla není příliš imunogenní, viz Collins P.L., The Paramyxoviruses, 1991, vyd. Kingsbury D.E., New York, Plenum Press a zvýšený titr antilátky, dosažený po intradermálním vakcinování, je porovnatelný s tím, jehož se dosáhne po přírodním infikování nebo vakcinováním živou vakcinou, testovanou jinými.

Vynález se rovněž týká způsobu přípravy formulování vakciny, jak je to patrné z tohoto popisu.



Vyobr.1

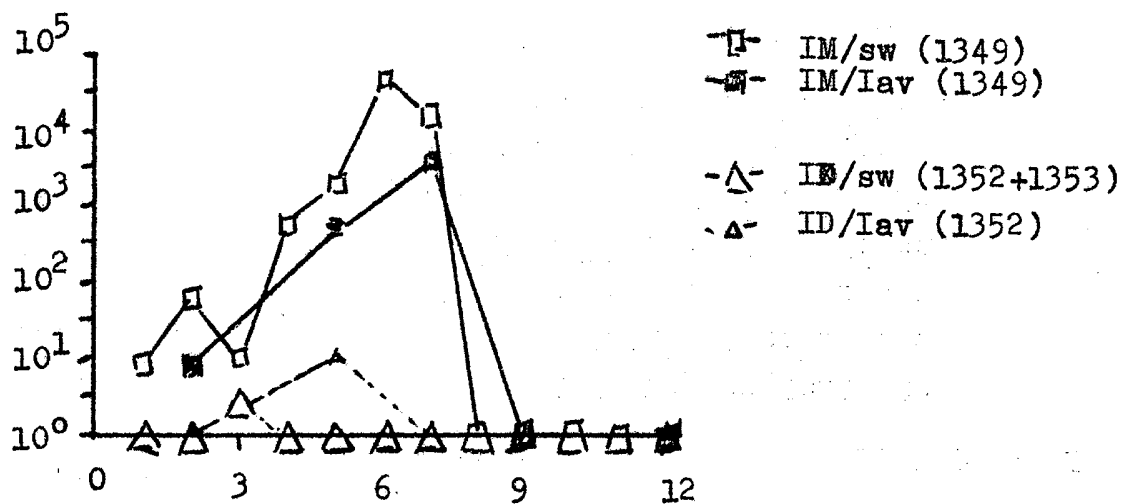


pUC 18

[Handwritten signature]

Vyobr.2

TCID₅₀/ml



[Handwritten signature]

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Formulování polynukleotidické vakcíny, určené pro skot, obsahující účinné množství (při podávání intradermálním) plasmidu, spojujícího sekvenci ADN, kodující imunogén pathogenního činitele skotu, a promotor, dovolující expresi tohoto imunogénu in vivo do buněk kůže, vyznačující se tím, že toto formulování je upraveno pro intradermální podávání pomocí přístroje pro tryskové vstříknutí kapaliny.

2. Formulování vakcíny podle nároku 1, vyznačující se tím, že plasmid je přítomný ve vehikulu vhodném pro intradermální podávání objemu dávky mezi 0,1 a 0,9 ml, s výhodou mezi 0,2 a 0,6 ml, nejvýhodněji mezi 0,4 až 0,5 ml, to za podávání tryskovým vstříknutím kapaliny do intradermální vrstvy.

3. Formulování vakcíny podle nároků 1 nebo 2, vyznačující se tím, že plasmid je obsažen ve formulování vakcíny v intradermálním účinném množství od 10 ng do 1 mg, s výhodou od 100 ng do 500 µg, nejvýhodněji od 0,5 µg do 50 µg.

4. Formulování vakcíny podle nároku 3, vyznačující se tím, že sekvence ADN, kodující imunogen pathogenního činitele je zvolena ze skupiny, kterou tvoří vir BRSV, vir IBR, vir BVD a vir PI3.

5. Formulování vakcíny podle nároku 4, vyznačující se tím, že sekvence ADN koduje gén gB a/nebo gén gD viru IBR.

6. Formulování vakcíny podle nároku 4, vyznačující se tím, že sekvence ADN koduje gén G a/nebo gén F viru BRSV.

7. Formulování vakcíny podle nároku 4, vyznačující se tím, že sekvence ADN koduje E2 a/nebo E1 viru BVD,

8. Formulování vakcíny podle nároku 4, vyznačující se tím, že sekvence ADN koduje HN a/nebo F viru PI 3,

9. Formulování vakcíny podle kteréhokoli z nároků 1 až 8, vyznačující se tím, že promotorem jest eukaryotický silný promotor, jako je promotor hCMV IE.

10. Formulování vakcíny podle kteréhokoli z nároků 1 až 9, vyznačující se tím, že je vneseno do nádoby pro větší počet dávek, vybavené přístrojkem pro intradermální podávání tryskovým vstříknutím kapaliny, s výhodou přístrojkem Pigjet.

11. Přenosné zařízení pro vakcinování skotu, obsahující přístroj pro podávání tryskovým vstřikováním kapaliny a nádobku, uzpůsobenou k obsahu většího počtu dávek formulování vakcíny podle kteréhokoli z nároků 1 až 10.

12. Zařízení podle nároku 11, vyznačující se tím, že přístroj obsahuje ejekční zhlaví s jednou až deseti tryskami, zvláště čtyřmi až šesti, obzvláště pěti nebo šesti.

13. Použití plasmidu, spojujícího sekvenci ADN, kodující imunogen skotu a promotor dovolující expresi tohoto imunogénu, to pro přípravu formulování polynukleotidové vakcíny upravené pro intradermální podávání přístrojkem pro tryskový vstřík kapaliny.

14. Použití plasmidu podle nároku 13, vyznačující se tím, že obsahuje mezi 10 ng až 1 mg ADN, s výhodou mezi 100 ng a 500 µg, ještě výhodněji mezi 0,5 µg a 50 µg v objemu dávky mezi 0,1 až 0,9 ml s výhodou mezi 0,2 až 0,6 ml nejvýhodněji mezi 0,4 až 0,5 ml.

15. Použití plasmidu podle nároku 12, vyznačující se tím, že sekvence ADN koduje imunogén pathogenního činitele ze skupiny: vir BRSV, IBR, BVD a PI 3.