

Mycoplasma bovis vakcina és állatokban tüdőgyulladás csökkentésére szolgáló eljárások.

5

Kivonat

- 10 A találmány tárgyát Mycoplasma bovis vakcina készítmények és állatokban Mycoplasma bovis fertőzés okozta betegség vagy rendellenesség kezelését vagy megelőzését célzó alkalmazások képezik. A találmány szerinti Mycoplasma bovis vakcina lehet teljes vagy részleges inaktivált sejt vagy módosított élő készítmény, lehet alegység vakcina illetve lehet nukleinsav vagy DNS vakcina. A találmány szerinti, beadásra kerülő Mycoplasma bovis vakcina lehet szintetikusan vagy rekombináns módon előállított vakcina.

Orakos Exter
2006. január 18.

jellemző ábra: Ø

Mycoplasma bovis vakcina és állatokban tüdőgyulladás csökkentésére szolgáló eljárások.

A találmány tárgyát Mycoplasma bovis vakcina készítmények és állatokban Mycoplasma bovis fertőzés okozta betegség vagy rendellenesség kezelését vagy megelőzését célzó alkalmazások képezik. A találmány szerinti Mycoplasma bovis vakcina lehet teljes vagy részleges inaktivált sejt vagy módosított élő készítmény, lehet alegység vakcina illetve lehet nukleinsav vagy DNS vakcina. A találmány szerinti, beadásra kerülő Mycoplasma bovis vakcina lehet szintetikus vagy rekombináns módon előállított vakcina.

A Mycoplasma bovis egy fontos globálisan elterjedt szarvasmarha patogén istállóban tartott vagy intenzív körülmények között tenyésztett húsmarhák és tejtermelő szarvasmarhák között. Ennek leggyakrabban bejelentett klinikai megjelenése a borjakban előforduló tüdőgyulladás, amelyhez gyakran társul arthritisz, amely úgy is ismert, mint a tüdőgyulladás-arthritisz szindróma. Ennek etiológiai szerepéhez gyakran társul masztitisz, otitisz valamint a tehenek és bikák reprodukív betegségei vagy rendellenességei. Jelentős mértékű gazdasági veszteségek kapcsolódnak a M. bovis indukálta légzőszervi betegségekhez, mivel a M. bovis felelős a szarvasmarha légzőszervi betegség ("bovine respiratory disease", BRD) mortalitásának 36 százalékáért. Annak érdekében, hogy csökkentsük a mortalitást, gyakran alkalmazunk antibiotikum kezelést, mivel jelenleg nem állnak rendelkezésre teljes mértékben engedélyezett vakcinák. A M. bovis betegség megelőzése ugyanakkor csökkentheti az állat fogékonyságát más légzőszervi betegségekkel szemben. Ezért tehát egy M. bovis bakterin - amely nagymértékben hatékony és biztonságos fiatal borjak számára - nagyon értékes lenne a szarvasmarha tenyésztés számára.

A találmány tárgyát Mycoplasma bovis vakcinák és a Mycoplasma bovis fertőzés okozta betegségek vagy rendellenességek kezelésére illetve megelőzésére szolgáló eljárások képezik, amely eljárások során egy állatnak Mycoplasma bovis vakcina hatékony mennyiségét és gyógyszerészetileg elfogadható hordozót adunk be. A találmány szerinti vakcinákat olyan mennyiségben biztosítjuk, amely elégséges Mycoplasma bovis specifikus sejtes vagy humorális primer és szekunder immunválaszok kiváltására vagy az immunválasz növelésére. A találmány egy aspektusa szerint az állat egy borjú. A találmány szerinti vakcinálási módszer védelmet biztosít borjak számára a M. bovis baktériummal történő érintkezéssel szemben. Továbbá a találmány szerinti vakcinálási módszer Mycoplasma bovis vakcina alkalmazásával megnövekedett immunkompetenciát biztosít a borjak számára és ennek következtében meg-

növekedett ellenálló-képességet biztosít más BRD patogénekkel szemben, azaz lecsökken az alábbi - nem korlátozó értelemben felsorolt - mikroorganizmusok okozta fertőzésre és betegségre való fogékonyság: szarvasmarha herpeszvírus, 1. típus (BHV-1); szarvasmarha vírusos hasmenés vírus (BVDV); szarvasmarha légzőszervi szincitiális vírus (BRSV); parainfluenza vírus (PI3); Pasteurella multocida; Haemophilus somnus; Mycoplasma mycoides; Mycoplasma agalactiae; Mycoplasma californicum; Mycoplasma bovirhinis; Mycoplasma dispar; Mycoplasma canis és Mannheimia haemolytica. A találmány tárgyát képezik továbbá Mycoplasma bovis vakcinák és eljárások Mycoplasma bovis eltávolítására fertőzött csordákból, amelynek során egy állatnak Mycoplasma bovis vakcina hatékony mennyiségét és gyógyszerészetileg elfogadható hordozót adunk be.

A találmány szerint bejuttatott Mycoplasma bovis vakcina tartalmazhat további komponenseket is, mint például adjuvánst és kívánt esetben egy második vagy további antigéneket kombinációs vakcina formájában történő alkalmazásra. A második antigén - nem korlátozó értelemben - az alább felsoroltak bármelyike lehet: szarvasmarha herpeszvírus, 1. típus (BHV-1); szarvasmarha vírusos hasmenés vírus (BVDV); szarvasmarha légzőszervi szincitiális vírus (BRSV); parainfluenza vírus (PI3); Pasteurella multocida; Haemophilus somnus; Mycoplasma mycoides; Mycoplasma agalactiae; Mycoplasma californicum; Mycoplasma bovirhinis; Mycoplasma dispar; Mycoplasma canis és Mannheimia haemolytica.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás Mycoplasma bovis vakcina előállítására, amelynek során Mycoplasma bovis izolátumot növesztünk sejtenyészetben megfelelő táptalajon; a Mycoplasma bovis tenyészetet binér etiléniminnel kezeljük a Mycoplasma bovis inaktiválására és az inaktivált Mycoplasma bovis sejteket megfelelő gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval keverjük össze, hogy így bakterin készítményt hozzunk létre.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan reagens készletek, amelyek Mycoplasma bovis-t és adjuvánst tartalmaznak, továbbá kívánt esetben az alább felsorolt - nem korlátozó értelemben vett - antigének bármelyikét tartalmazzák: szarvasmarha herpeszvírus, 1. típus (BHV-1); szarvasmarha vírusos hasmenés vírus (BVDV); szarvasmarha légzőszervi szincitiális vírus (BRSV); parainfluenza vírus (PI3); Pasteurella multocida; Haemophilus somnus; Mycoplasma mycoides; Mycoplasma agalactiae; Mycoplasma californicum; Mycoplasma bovirhinis; Mycoplasma dispar; Mycoplasma canis és Mannheimia haemolytica.

Az 1. ábra egy grafikon, ahol bemutatjuk a csoportok átlagos testhőmérsékletét közvetlenül a kezelés előtt és a kísérleti M. bovis érintkeztetés után. A két dózis M. bovis bakterinnel vakcinált borjak (csoport A) jelentősen alacsonyabb átlagos testhőmérsékletet mutatott a

4-8. napokon, a 10-18. napokon és a 20. napon, mint a placebóval vakcinált állatok esetében (csoport B).

A 2. ábra egy grafikon, ahol bemutatjuk a csoportok átlagos testhőmérsékletét közvetlenül a kezelés előtt és a kísérleti *M. bovis* érintkeztetés után. A két dózis *M. bovis* bakterinnel vakcinált borjak (csoport A, B és C) jelentősen alacsonyabb átlagos testhőmérsékletet mutattak a 7-17. napokon, mint a placebóval vakcinált állatok esetében (csoport D).

A 3. ábra egy grafikon, ahol bemutatjuk a csoportok átlagos testhőmérsékletét közvetlenül a kezelés előtt és a kísérleti *M. bovis* érintkeztetés után. A két dózis *M. bovis* bakterinnel vakcinált borjak (2. 3. 4. és 5. kezelési csoport) jelentősen alacsonyabb átlagos testhőmérsékletet mutatott az 5-20. napokon, mint a placebóval vakcinált állatok esetében (1. kezelési csoport).

A találmány tárgyát egy vakcina, továbbá *Mycoplasma bovis* fertőzés okozta betegség vagy rendellenesség kezelésére illetve megelőzésére szolgáló eljárás képezi, amely eljárás során az állatnak inaktivált *Mycoplasma bovis* vakcina hatékony mennyiségét és egy gyógyszereszetileg elfogadható hordozót adunk be. A találmány tárgyát képezik eljárások *M. bovis* vakcinák és *M. bovis* vakcina reagenskészletek előállítására. *Mycoplasma bovis* törzsek például szolgálhatnak a következők: ATCC 25025 (letétbe helyezte R.G. Wittler 1968. október 8-án), 25523 (letétbe helyezte R.G. Wittler 1969. október 22-én) és 27368 (letétbe helyezte R.G. Wittler 1972. július 5-én), az összes letétbe helyezésre az Amerikai Típustenyészet Gyűjteménynél került sor (American Type Culture Collection, 1801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209). A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva a bakterin *Mycoplasma bovis* izolátuma a következő törzsek közül egyet vagy többet tartalmaz: 2300, 3625, 16150, 20518 vagy 5063.

A találmány szerint bármilyen inaktivált *Mycoplasma bovis* izolátum hatékony bakterinné formulázható. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva a binér etiléniminnel (BEI) inaktivált *Mycoplasma bovis* izolátumok hatékony bakterinné formulázhatóak. Letétbe helyeztük a 2300., 3625., 16150., 20518. illetve 5063. azonosítószámú *Mycoplasma bovis* izolátum törzseket a Mikroorganizmusok szabadalmi eljárások céljára szolgáló letétbe helyezésének nemzetközi elismeréséről szóló Budapesti Egyezmény előírásai szerint az Amerikai Típustenyészet Gyűjteménynél (American Type Culture Collection, 1801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209) és a törzsek - sorrendben megfeleltetve - a PTA-3558, -3559, -3560, -3561 és -3685 katalógus számot kapták.

A találmány egyes megvalósítási módjai szerint eljárva a találmány szerinti eljárásban alkalmazott vakcinák részleges vagy teljes sejtes *M. bovis* inaktivált készítményt (bakterint)

tartalmaznak vagy módosított élő vakcinát és gyógyszerészetileg elfogadható hordozót tartalmaznak; illetve részleges vagy teljes sejtes *M. bovis* inaktivált készítményt (bakterint) vagy módosított élő vakcinát és adjuvánst tartalmaznak.

A találmányi leírás jobb megértése céljából - nem korlátozó értelemben - a találmány részletes leírását a következő alrészekre bontjuk, amelyek a találmány egyes tulajdonságait, megvalósítási módjait vagy alkalmazásait ismertetik vagy mutatják be.

Meghatározások és rövidítések:

Az *M.* rövidítés - ha egy faj nevét előzi meg - a *Mycoplasma* nemzetséget jelenti.

A „kezelés vagy megelőzés” kifejezés a *Mycoplasma bovis* fertőzésre vonatkoztatva a leírás szerint a következőket jelenti: *Mycoplasma bovis* baktérium replikációjának gátlását, *Mycoplasma bovis* szóródásának vagy átvitelének gátlását vagy annak megakadályozását, hogy a *Mycoplasma bovis* a gazdaszervezetben megtelepedjen illetve a *Mycoplasma bovis* fertőzés okozta betegségek vagy rendellenességek tüneteinek enyhítését vagy állatból az *M. bovis* kiürítésének meggyorsítását. A kezelés terápiásnak tekinthető, ha csökkenés mutatható ki a baktérium terhelésben, a tüdő fertőzésekben, a tüdő léziókban, végbélben mért hőmérsékletben és/vagy növekedés tapasztalható a súlygyarapodásban és/vagy növekedésben. A találmány szerinti eljárás például hatékony tüdőgyulladás, légúti fertőzések és tüdő léziók megelőzésében vagy csökkentésében állatokban, különösen szarvasmarhákban, a tüdőben található *M. bovis* szint csökkentésében, hőmérséklet csökkentésben és a súlygyarapodás növelésében.

Az „*M. bovis* vakcina” kifejezés alatt a leírás szerint olyan vakcinát értünk, amely alkalmazható *M. bovis* fertőzés által okozott rendellenesség vagy betegség megelőzésében vagy kezelésében. *M. bovis* vakcina magába foglalhat bármilyen vakcinát, amely hatékony a szarvasmarhákban virulens *M. bovis* által történő fertőzés kezelésében vagy megelőzésében. A találmány szerint alkalmazható *M. bovis* vakcina tartalmazhat például teljes vagy részleges *M. bovis* sejtpreparátumot, inaktivált vagy módosított élő vakcinát, alegység vakcinát, amely egy vagy több *M. bovis*-ból származó polipeptidet vagy fehérjét tartalmaz illetve ilyen fehérjék vagy polipeptidek immunogén fragmenseit tartalmazza, illetve egy vagy több *M. bovis* gént vagy nukleinsavat tartalmaz, amelyek egy vagy több *M. bovis*-ból származó polipeptidet vagy fehérjét, illetve azok immunogén fragmenseit kódolják és amely gének vagy nukleinsavak marhában *in vivo* expresszálhatóak. Az *M. bovis* polipeptidek, fehérjék, az ilyen polipeptidek és fehérjék immunogén fragmensei illetve az *M. bovis* génjei vagy nukleinsavai a technika állása szerint ismert eljárások alkalmazásával szintetizálhatóak vagy rekombinánsan előállíthatóak. Előnyösen a találmány szerinti eljárásban alkalmazott *M. bovis* vakcina egy bakterin.

Az „immunogén fragmens” kifejezés leírás szerint olyan M. bovis-ból származó fehérje fragmensét jelenti, amely gazdaállatban képes immunválaszt indukálni. Az immunválasz magába foglalhatja – nem korlátozó értelemben – a sejtes és/vagy humorális immunitás indukálását.

5 Az „állat” kifejezés a leírás szerint szerint bármilyen nem emberi állatra vonatkozik, beleértve az emlősöket.

A „szarvasmarha” kifejezés a leírás szerint minden marhaszerű állatra vonatkozik, magába foglalva – nem korlátozó értelemben – a következőket: ökrök, bikák, tehenek és borjak. Előnyösen a találmány szerinti eljárást nem-emberi emlős állatra alkalmazzuk, legelőnyösebben borjúra.

A „bakterin” kifejezés a leírás szerint inaktivált egész vagy részleges M. bovis sejtek vakcinaként alkalmazható készítményét jelenti.

Az „immunológiailag hatékony mennyiség” kifejezés az M. bovis vakcina olyan mennyiségét jelenti, amely elégséges immunválasz kiváltására az egyedben amelynek beadták. Az immunválasz magába foglalhatja – nem korlátozó értelemben – a sejtes és/vagy humorális immunitás indukálását. Az M. bovis vakcina hatékony mennyisége például jelentheti azt, hogy a bakterin a mikoplazma okozta tüdőgyulladást megelőzi vagy csökkenti annak súlyosságát.

Az „adjuváns” kifejezés alatt a leírás szerint az immunválasz erősítését szolgáló készítményt értünk.

20 A „gyógyszerészetileg elfogadható hordozó” kifejezés alatt a leírás szerint olyan hordozó közeget értünk, amely nem zavarja az aktív összetevő biológiai aktivitásának hatékonyságát, kémiaiilag inert és nem toxikus az egyedre nézve, amelynek beadják.

Inaktivált (részleges vagy egész sejt) és módosított élő vakcinák:

A találmány tárgyát Mycoplasma bovis vakcina képezi, továbbá Mycoplasma bovis vakcina előállítására szolgáló eljárás képezi, amely eljárás során Mycoplasma bovis izolátumot növesztünk tenyészetben megfelelő táptalajon; a Mycoplasma bovis-t binér etiléniminnel kezeljük a Mycoplasma bovis inaktiválására és az inaktivált Mycoplasma bovis-t megfelelő gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval keverjük össze bakterin formulázásához. A találmány egy megvalósítási módja szerint eljárva a Mycoplasma bovis-t tüdőszövetből izoláljuk.

30 A találmány egy másik megvalósítási módja szerint eljárva a Mycoplasma bovis-t nyirokcsomó szövetből izoláljuk. A technika állása szerint számos ilyen hordozó ismert, ezek magukba foglalják a következőket: desztillált vagy deionizált víz, fiziológiás sóoldat vagy ásványi olaj. Az inaktivált bakteriális izolátumok mellett a bakterin termék tartalmazhat még megfelelő mennyiséget egy vagy több gyakran alkalmazott adjuvánsból. A megfelelő adjuvánsok nem

korlátozó értelemben magukba foglalják a következőket: ásványi gélek, mint például alumínium-hidroxid; felszín aktív anyagokat mint például lizolecitin; glikozidok, mint például szaponin és szaponin származékok mint például Quil A vagy GPI-0100; kationos felületaktív anyagokat, mint például DDA (kvarterner hidrokarbon ammónium halogenidek, pluronikus poliolok; polianionok és poliatomos ionok; poliakrilsavak, nem-ionos blokk polimerek, mint például Pluronic F-127 (B.A.S.F., USA); Avridin és Rantidine; peptidek; rekombináns mutáns labilis toxinok, mint például leukotoxin (LT) vagy kolera toxin (CT); kémiailag kötött vagy közeli szomszédos molekuláris transzporterek; ásványi olajok, mint például Montanide ISA-50 (Seppic, Párizs, Franciaország), karbopol, Amphigen (Hydronics, USA), Omaha, NE, Egyesült Államok, Alhydrogel, (Superfos Biosector, Frederikssund, Dánia) olaj emulziók, például ásványi olaj emulziók, mint például BayolF/Arlacel A és víz emulziója, vagy növényi olaj, víz és emulgeálószer, mint például lecitin emulziója; alum, koleszterin, citokinek és adjuván-sok kombinációja. Poliatomos ionok funkcionálhatnak még mint diszpergáló, sűrítő és összeállás elleni ágensek, amelyek lehetővé teszik a vakcina újrassuszpendálását mondiszperz szuszpenzióként hosszabb ülepedési idő után. Az adjuváns kombinációk előállíthatóak vizes oldatban, kapszulázottan (irányított vagy késleltetett felszabadulású) vagy mikrokapszulázott formákban. Az immunogén beépíthető liposzómákba vagy poliszacharidokhoz és/vagy más polimerekhez konjugálható vakcina készítményben történő alkalmazásra. A találmány szerinti eljárásokban alkalmazható bakterin termékben alkalmazható további anyagok magukba foglalják például a következőket: egy vagy több tartósítószer, mint például etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) dinátrium vagy tetranátrium sói, mertiolát és más hasonlóak. A vakcinákat folyékony dózis formájában formulázzuk vagy szilárd dózis formájában formulázzuk, amely oldható komponensből vagy mikrorészecskés komponensből áll, amelyet alkalmazás előtt újra-suszpendálunk gyógyszerészetileg elfogadható oldószerben. Az oldható komponensek vagy mikrorészecskés komponensek előállítására szolgáló eljárások nem korlátozó értelemben magukba foglalják a következőket: biacerválás, géldermetés, porlasztásos szárítás, buborékos szárítás, kicsapás, szuperkritikus szovláció/kapszulázás és liofilizálás. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva a 2300. katalógusszámot kapott Mycoplasma bovis izolátumot alkalmazzuk a bakterin formulálására. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint eljárva a Quil A, Amphigen és koleszterin adjuváns kombinációt alkalmazzuk a bakterin formulálására.

A pontos körülmények amelyek alatt az izolátumot növesztjük, változnak a táptalaj pontos összetételével és a növesztett specifikus izolátumtól függően. Azonban az izolátumot általában mintegy 24–72 órás időtartamban növesztjük, az inkubálás idejétől a begyűjtés idejéig

számítva. Az így növesztett virulens *Mycoplasma bovis* izolátumot ezután binér etiléniminnel (BEI) kezeljük a *Mycoplasma bovis* inaktiválására, amint ezt az 5,565,205 lajstromszámú US szabadalomban ismertetik, vagy inaktiválhatjuk formalinnal, glutáraldehiddel, hőkezeléssel, besugárzással, BPL-lel vagy a technika állása szerint ismert más inaktiváló szerrel. Például ahol az izolátumot BEI-vel kezeljük, az izolátum tenyészetét érintkezésbe hozzuk BEI-vel, amelynek koncentrációja mintegy 2 és mintegy 10 mM között van. Ezt követően a tenyészetet olyan körülmények között inkubáljuk, amelyek hatékonyak a *Mycoplasma bovis* inaktiválására, mint például legalább mintegy 24 órás időtartamban 37 °C-on. Ezután a BEI tenyészetet semlegesítjük nátrium-tioszulfát hozzáadásával hatékony semlegesítő koncentrációban, mint például 2-10 mM tartományban.

Az eredményül kapott, inaktivált *Mycoplasma bovis* bekonzentrálható. A technika állása szerint számos eljárás ismert ilyen élő szervezetek koncentrálására. Például az élő szervezetek koncentrállhatóak centrifugálással - mint például ultracentrifugálással - vagy szűréssel, mint például ultraszűréssel.

Ezután a koncentrált, inaktivált *Mycoplasma bovis*-t visszanyerjük a technika állása szerint jól ismert eljárások alkalmazásával. Végül az eredményül kapott így visszanyert koncentrált, inaktivált *Mycoplasma bovis*-t összekeverjük megfelelő gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval, bakterint formulázva. A bakterin előállítható még az előbb ismertetett eljárás számos módosításának bármelyikével, amelyek a szakember számára jól ismertnek tételezhetők fel.

M. bovis izolátumok úgyszintén kinyerhetők közvetlenül a fertőzött szarvasmarha tüdőléziókból a technika állása szerint ismert eljárások segítségével. *M. bovis* izolátumok úgyszintén kinyerhetők közvetlenül a fertőzött szarvasmarha nyirokcsomó szövetből a technika állása szerint ismert eljárásokkal. *M. bovis* izolátumok szintén kinyerhetők közvetlenül a fertőzött szarvasmarha nyirokcsomó szövetből a technika állása szerint ismert eljárásokkal. A találmány tárgyát képezi továbbá módosított élő *M. bovis* vakcinák előállítására szolgáló eljárás is, mint például a virulens törzsek legyengítése passzálás segítségével, amely eljárás a technika állása szerint jól ismertnek tételezhető fel.

A találmány szerinti vakcinák megfelelő készítményei magukba foglalják az injektálható készítményeket, akár folyékony oldatok vagy szuszpenziók alakjában; szintén előállíthatóak szilárd formák is, amelyek megfelelőek injektálás előtt folyadékban történő feloldásra vagy szuszpendálásra. A készítmény ugyanakkor emulgeálható is.

Az inaktivált *Mycoplasma bovis* izolátumok úgyszintén kombinálhatóak – nem korlátozó értelemben - a következő baktériumokkal és vírusokkal is: 1. típusú szarvasmarha herpesz-

vírus (BHV-1), szarvasmarha vírusos hasmenés vírus (BVDV), szarvasmarha légzőszervi szincitiális vírus (BRSV), parainfluenza vírus (PI3), *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canis* vagy *Manheimia haemolytica*.

5 Alegység vakcinák:

A találmány szerinti eljárás megvalósítható alegység vakcinák alkalmazásával is, amelyek tisztított *M. bovis* immunogén fehérjéket, polipeptideket és az ilyen fehérjék és polipeptid immunogén fragmenseit tartalmazzák. Az ilyen fehérjék és polipeptid a technika állása szerint jól ismert eljárásokkal előállíthatóak, például felületaktív ágensek alkalmazásával elő-

10 állított kivonatok, vagy termális, kémiai és mechanikai kivonatok. Továbbá alkalmazhatóak a szakember számára jól ismert eljárások a fehérje tisztaság vagy homogenitás meghatározására, mint például a minta poliakrilamid gélelektroforézise, amely után festőgélben láthatóvá tesszünk egyetlen polipeptid sávot. Nagyobb felbontást meghatározhatunk HPLC vagy más hasonló, a technika állása szerint ismert eljárás alkalmazásával.

15 A találmány egy speciális megvalósítási módja szerint eljárva a találmány szerint alkalmazható vakcina magába foglalja a *M. bovis* legalább egy fehérjéjét, amely például - nem korlátozó értelemben - az alábbiak bármelyike lehet: P13, P18, P21, P25-26, P33-34, P39-40, P45-46, P50, P54-58, P77, P82, P87-89, P97 és P175.

A találmány további megvalósítási módjai szerint eljárva a találmány szerinti alegység

20 vakcina magába foglal legalább egy másik immunogén vagy antigén molekulát, amely nem *M. bovis* fehérje, polipeptid vagy ezek immunogén fragmense és amely előnyösen vírus eredetű vagy bakteriális antigén. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva az antigén 1. típusú szarvasmarha herpeszvírus (BHV-1), szarvasmarha vírusos hasmenés vírus (BVDV), szarvasmarha légzőszervi szincitiális vírus (BRSV), parainfluenza vírus (PI3),

25 *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canis* vagy *Manheimia haemolytica*. Az ilyen készítmény előnyösen alkalmazható, mint kombinációs vakcina. A találmány szerinti alegység vakcinák és kombinációs vakcinák jól alkalmazhatóak a találmány szerinti eljárásokban *M. bovis* fertőzés okozta betegségek vagy rendellenes-

30 ségek kezelésére vagy megelőzésére.

A találmány egy további specifikus megvalósítási módja szerint eljárva az ilyen fehérjék vagy polipeptid immunogén fragmensei olyan szekvenciával rendelkeznek, amelyek legalább 10, legalább 20, legalább 30, legalább 40, legalább 50 vagy legalább 100 folytonosan illeszkedő aminosavat tartalmaznak a találmány szerinti eljárásban alkalmazható immunogén

fehérjékből és polipeptidekből, ez nem korlátozó értelemben az alábbiak bármelyike lehet: P13, P18, P21, P25-26, P33-34, P39-40, P45-46, P50, P54-58, P77, P82, P87-89, P97 és P175.

5 Továbbá, a vakcinákban alkalmazott *M. bovis* fehérjék lényegében tiszták vagy homogének. A találmány szerinti eljárásban olyan fehérjéket vagy polipeptideket alkalmazunk, amelyeket általában az ezeket a fehérjéket kódoló rekombináns nukleotid szekvenciákat expresszáló gazdasejtekből tisztítottuk ki. Az ilyen fehérje tisztítás a technika állása szerint ismert számos eljárással elvégezhető. Lásd például a *Methods in Enzymology* vagy a *Protein Purification: Principles and practice* című könyvekben leírt eljárásokat [Methods in Enzymology, Academic Press Inc., San Diego (1990); Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)].

Tisztított *M. bovis* polipeptidok és fehérjék, valamint ezek immunogén fragmensei szintén előállíthatóak ismert szintetikus eljárásokkal.

15 A *M. bovis* polipeptidok és fehérjék, valamint ezek immunogén fragmensei úgyszintén expresszálhatók és bejuttathatók élő rekombináns vírus vagy baktérium vektorok alkalmazásával, mint például az adenovírus vagy *Salmonella*. Maguk az aktuális vektorok a technika állása szerint ismertek és egyszerűen beszerezhetőek vagy a szakember előállíthatja őket jól ismert eljárások segítségével.

Gén és nukleinsav vakcinák:

20 A találmány szerinti eljárások megvalósíthatók *M. bovis* gének vagy nukleinsavak alkalmazásával, amelyek immunogén fehérjéket, polipeptideket és az ilyen fehérjék és polipeptidok immunogén fragmenseit kódolják. Az ilyen gének és nukleinsavak expresszálhatóak *in vivo* és a technika állása szerint ismert eljárások alkalmazásával előállíthatóak.

25 A találmány egy specifikus megvalósítási módja szerint eljárva a találmány szerint alkalmazható vakcina magába foglal legalább egy gént vagy nukleinsavat, amely az *M. bovis* egy fehérjéjét kódolja, ahol a kódolt fehérje az alábbiak bármelyike lehet: P13, P18, P21, P25-26, P33-34, P39-40, P45-46, P50, P54-58, P77, P82, P87-89, P97 és P175.

30 A találmány egy további specifikus megvalósítási módja szerint eljárva a találmány szerinti eljárásban alkalmazott gének vagy nukleinsavak az *M. bovis* fehérjék vagy polipeptidok immunogén fragmenseit kódolják és olyan szekvenciával rendelkeznek, amelyek legalább 10, legalább 20, legalább 30, legalább 40, legalább 50 vagy legalább 100 folytonosan illeszkedő aminosavat tartalmaznak a találmány szerinti eljárásban alkalmazható immunogén fehérjékből és polipeptidekből, ez nem korlátozó értelemben az alább következők bármelyike lehet: P13, P18, P21, P25-26, P33-34, P39-40, P45-46, P50, P54-58, P77, P82, P87-89, P97 és P175.

A találmány szerinti módszer más megvalósítási módjai szerint eljárva az alkalmazott gént vagy nukleinsavat ismert eljárásokkal adjuk be, például génagyú vagy más tümentes bejuttatási eszközök alkalmazásával.

5 A találmány egy ismét további megvalósítási módja szerint eljárva az alkalmazott gének vagy nukleinsavak DNS vakcinát alkotnak. Továbbá a nukleinsavak vagy gének jelen lehetnek liposzómákkal vagy más transzfekciót megkönnyítő ágenssel asszociáltan, amint az a technika állása szerint ismertnek tételezhető fel.

10 A DNS vakcinák előállítására és bejuttatására szolgáló eljárások a technika állása szerint ismertnek tételezhetők fel. Lásd például a következő referenciát: Krishnan: Current Status of DNA Vaccines in Veterinary Medicine, Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier Science (2000).

Dózisok, beadási módok és kezelés

15 A találmány szerint eljárva a M. bovis vakcinának legalább egy hatásos mennyiségű dózisa egy állatnak - előnyösen borjúnak - beadva mintegy egy- és tízhetes kor között, hatásos immunitást biztosít későbbi M. bovis érintkezéssel szemben. Előnyösen az M. bovis vakcinát mintegy 7-28 napos korban adjuk be, majd ismét mintegy 28-48 napos korban. Az M. bovis bakterin vakcina hatásos mennyisége mintegy 1×10^6 és mintegy 5×10^{10} közötti telepformáló egységet (colony forming units, CFU) tartalmaz dózisonként. Előnyösen a hatásos immunitást biztosító M. bovis bakterin vakcina mintegy 1×10^8 és mintegy 5×10^{10} CFU/dózis koncentráció között van és még előnyösebben mintegy 5×10^8 és mintegy 5×10^{10} CFU/dózis koncentráció között van.

A találmány szerinti M. bovis bakterin vakcina hatásos mennyisége mintegy 0,5 és mintegy 5,0 ml között van, előnyösen mintegy 1,5 ml és mintegy 2,5 ml között van, még előnyösebben mintegy 2 ml.

25 Azon M. bovis vakcina mennyisége, amely egy vagy több fehérjét vagy polipeptidet, illetve ilyen fehérjék vagy polipeptidek immunogén fragmenseit tartalmazó alegység vakcina, a találmány szerint eljárásban a hatásos mennyisége mintegy $0,01 \mu\text{g}$ és mintegy $200 \mu\text{g}$ között van.

30 Azon M. bovis vakcina mennyisége, amely immunogén fehérjéket vagy polipeptideket illetve ilyen fehérjék vagy polipeptidek immunogén fragmenseit kódoló egy vagy több M. bovis gént vagy nukleinsavat (előnyösen DNS-t) tartalmaz, a találmány szerint eljárásban a hatásos mennyisége mintegy $0,01 \mu\text{g}$ és mintegy 200 mg között van. A találmány szerinti bejuttatás elérhető az ismert módokon beleértve az orális, intranazális, mukozális topikus, transzdermális és parenterális (például intravénás, intraperitoneális, intradermális, szubkután

vagy intramuszkuláris) módokat. A beadás elvégezhető tűmentes bejuttatási eszközökkel is. A bejuttatás elvégezhető módszerek kombinációjával is, például az első beadást parenterális úton végezzük, és a további beadást nyálkahártyán keresztül végezzük. Előnyösen alkalmazható bejuttatási útnak tekintendő a szubkután vagy intramuszkuláris beadás.

5 A találmány tárgyát képezi továbbá egyetlen dózisból álló vakcinálási eljárás is, amely megszünteti a további dózisok beadásának igényét a borjaknak az *M. bovis* elleni immunitás kiváltása és/vagy fenntartása céljából.

10 A találmány szerint eljárva a hatásos mennyiségű *Mycoplasma bovis* bakterin beadása a borjaknak mintegy három és hat hetes korukban hatásos immunitást biztosít a légúti fertőzések ellen, beleértve a tüdőgyulladást, csökkenti a tüdőléziókat, csökkenti az *M. bovis* szintjét a tüdőben, csökkenti a testhőmérsékletet és növeli a súlygyarapodást.

15 A találmány tárgyát képezi egy eljárás borjú immunizálására *Mycoplasma bovis* fertőzés ellen, amely eljárás során a borjúnak legalább egy, előnyösen két bakterin dózist adunk be, így immunizálva a borjút *Mycoplasma bovis* fertőzés ellen. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva a bakterint szubkután adjuk be. Továbbá, előnyösen a bakterin dózis mintegy 2 ml bakterint tartalmaz, ahol mindegyik ml mintegy $2,5 \times 10^8$ *Mycoplasma bovis* telep kialakító egységet tartalmaz. A bakterint előnyösen kétszer adjuk be a borjúnak, egyszer mintegy három héttel és egyszer mintegy hat héttel a borjú születése után.

20 A találmány tárgyát képezi a *Mycoplasma bovis* bakterin hatásos mennyiségének beadása állatoknak, előnyösen szarvasmarháknak rendellenességek kezelése vagy megelőzése céljából, amely rendellenességek magukba foglalják a következőket: tüdőgyulladás, arthritisz, masztitisz, otitisz és az ilyen állatok reprodukív rendellenességei.

Vakcina reagenskészletek:

25 A találmány tárgyát képezik farmakológiai reagenskészletek, amelyek magukba foglalnak egy vagy több tárolóedényt, amelyek a találmány szerinti vakcina készítmények összetevőiből egyet vagy többet tartalmaznak. A találmány tárgyát képezi egy eljárás állat immunizálására vagy különböző betegségek illetve rendellenességek kezelésére vagy megelőzésére, amely eljárás során az állatnak a találmány szerinti vakcinából hatásos immunizáló dózist adunk be. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva a reagenskészlet - egy 30 tárolóedényben - *Mycoplasma bovis* izolátumot tartalmaz, továbbá az alábbiak bármelyike szerinti adjuvánst vagy adjuvánssok keverékét tartalmazza: Quil A vagy GPI-0100, DDA, saponin, koleszterin, alumínium gél, carbopol, Amphigen, Alhydrogel, olaj vízben emulzió, víz olajban emulzió illetve citokinek. A találmány egy másik megvalósítási módja szerint eljárva a találmány szerinti reagenskészlet tartalmazhat - ugyanabban a tárolóedényben vagy egy má-

sodik tárolóedényben - antigént, amely nem korlátozó értelemben a következők bármelyike lehet: 1. típusú szarvasmarha herpeszvírus (BHV-1), szarvasmarha vírusos hasmenés vírus (BVDV), szarvasmarha légzőszervi szincitiális vírus (BRSV), parainfluenza vírus (PI3), Pasteurella multocida, Haemophilus somnus, Mycoplasma mycoides, Mycoplasma agalactiae, 5 Mycoplasma californicum, Mycoplasma bovirhinis, Mycoplasma dispar, Mycoplasma canis vagy Mannheimia haemolytica.

Csomagolás:

Kívánt esetben a vakcina készítmények biztosíthatók csomagban vagy adagoló szerkezetben, amelyek tartalmazhatnak az aktív összetevőt magukba foglaló egy vagy több egység 10 dózis formát. A csomag például tartalmazhat fém vagy műanyag fóliát, mint például egy buborék csomagolásban. A csomag vagy az adagolószerkezet mellé adhatunk használati utasításokat is a beadáshoz. A kompatibilis farmakológiai hordozóban formulázott találmány szerinti vegyületet tartalmazó készítmények szintén előállíthatóak, megfelelő tárolóedénybe helyezhetőek és jelölhetjük ezeket egy adott eset kezelésére.

15 A találmányt a továbbiakban az alábbi példák segítségével illusztráljuk.

1. példa

Anyagok és módszerek

Állatok:

20 Egészséges, hibrid, mintegy 14 napos tejtermelő szarvasmarha borjakat szereztünk be a vakcinálásra. A vizsgálatok elkezdése előtt a borjakat hét napig hagytuk akklimatizálódni. Mindegyik borjú koncentrált, nem gyógyszerezett táplálékot kapott naponta, amely minden ismert szennyeződéstől és rovarirtótól mentes volt, a vízhez szabad hozzáférésük volt.

Vakcinák:

25 A bakterinek BEI inaktivált teljes sejt *M. bovis* baktériumokat tartalmaztak a megfelelő dózisonkénti koncentrációban. Továbbá mindegyik vakcina készítmény tartalmazott foszfát pufferolt fiziológiás sóoldatot ("phosphate buffered saline", PBS) és megfelelő adjuvánst. A placebo vagy PBS-t vagy PBS-t és olaj a vízben adjuvánst tartalmazott.

Érintkeztetési módszer:

30 Mindegyik borjú 10 vagy 12 ml friss *M. bovis* tenyészetet (mintegy 1×10^8 – 1×10^{10} telep kialakító egység (colony forming units, CFU/ml)) kapott intranazálisan három egymást követő napon. Az érintkeztetési oltóanyag esetében életképességi értéket határoztunk meg (CFU/ml) rövid idővel a kísérleti érintkeztetés befejezését követően.

Kísérleti módszer:

Egyedi fülbiléta szám azonosította mindegyik borjút. Az állatokat kor alapján véletlenszerűen osztottuk karámokba és kezelési csoportokba.

Az állatokat a megfelelő vakcina vagy placebo 2 ml mennyiségével szubkután oltottuk be a 0. napon (bal nyak) és a 21. napon (jobb nyak).

Az összes állatot lemértük 1 nappal az érintkeztetés előtt, 7 nappal az érintkeztetést követően, 14 nappal az érintkeztetést követően és mintegy 3 héttel az érintkeztetést követően.

A végbélben mért testhőmérsékletet minden reggel meghatároztuk egy nappal az érintkeztetést megelőzően, közvetlenül az érintkeztetés előtt és 20 napig folyamatosan az érintkeztetést követően.

Mindegyik borjú juguláris vénájából vérmintát vettünk. A borjaktól vért vettünk mintegy 1 nappal az első vakcináció előtt, 1 nappal a második vakcináció előtt, 1 nappal az érintkeztetés előtt (mintegy három héttel a második vakcináció után), 7 nappal az érintkeztetés után, 14 nappal az érintkeztetés után és a boncolás előtt (mintegy három héttel az érintkeztetés után). Mindegyik vérminta szérumát -20 °C-on tartottuk míg ki nem értékeltük M. bovis ELISA reagenskészlettel (Chekit M. bovis Sero), amelyet a Bommeli AG-től (Hoechst Roussel Vet Diagnostics, Liebefeld-Bern, Switzerland) szereztünk be. Az ELISA lemezeket Multiscan olvasó segítségével olvastuk, 405 nm hullámhosszon. Az optikai sűrűség (optical density, OD) értékeket százalékokká alakítottuk a pozitív kontroll szérum OD értékéhez viszonyítva, a következő képlet alkalmazásával:

$$\text{százalék} = (\text{minta OD} - \text{Negatív szérum OD}) / (\text{pozitív szérum OD} - \text{Negatív szérum OD}) \cdot 100$$

A 60% alatti értékeket negatívnak tekintettük. A 60% és 80% közötti értékű szérumokat gyanúsaknak tekintettük, míg a 80% feletti OD-t mutató szérumokat pozitívnak fogadtuk el.

Mindegyik állatot felboncoltuk mintegy három héttel a kísérleti M. bovis érintkeztetést követően. A borjakat elaltattuk és az összes főbb szervet, kivéve a központi idegrendszert makroszkópiusan megvizsgáltuk.

Eltávolítottuk a tüdőket és makroszkópiusan megvizsgáltuk ezeket az M. bovis fertőzés jellegzetes léziói jelenlétére. A léziókat standard tüdőábrán tüntettük fel. Mindegyik tüdőlebeny bruttó részvételét súlyoztuk a következő, az egyedi tüdőlebenyeknek a teljes tüdő súlyához viszonyított arányaival:

tüdőlebeny	tüdő százaléka
bal apikális	5
jobb apikális	6
középső	5
bal kardiális	6
jobb kardiális	7
kiegészítő	4
bal rekeszizom melletti	32
jobb rekeszizom melletti	35

A lemért tüdőlebeny értékeket ezután összegeztük annak érdekében, hogy meghatározzuk a nagyfokú lézió által érintett teljes tüdő százalékot [Pointon és mtsai., 1992]. Ezek mellett a következő képletet használtuk a százalékos csökkenés kiszámítására.

100 mínusz az Átlagos Tüdőkárosodás Százalékosan a kezelt csoport esetében elosztva
5 a kontroll csoport esetében az Átlagos Tüdőkárosodás Százalékával egyenlő a Százalékos
Csökkenéssel

Továbbá mindegyik tüdőt mostuk (lavage) 50 ml PBS-sel. Megpróbálkoztunk azzal, hogy izoláljuk és meghatározzuk az életképes *M. bovis* számot a bronchiális lavage folyadékból. Az életképes *M. bovis* szám (CFU/ml) meghatározásához megfelelő hígítási sorozatot készítettünk a bronchiális lavage folyadékból és mintákat szélesztettünk megfelelő agar táptalajra.
10

2. példa

Ebben a példában egy *M. bovis* bakterin hatékonyságának értékelését írjuk le fiatal borjak esetében. Huszonnégy egészséges hibrid borjút osztottunk be csoportokba véletlenszerűen, az életkor alapján.
15

Az állatokat a megfelelő vakcina vagy placebo 2 ml mennyiségével szubkután oltottuk be a 0. napon (bal nyak) és a 21. napon (jobb nyak). A kísérleti kezelési csoportokat és az alkalmazott vakcinákat az 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat

Kísérleti kezelési csoportok

kezelési csoport	kísérleti vakcinák (2 ml dózis)	állatok száma
A	M. bovis (5 x 10 ⁸ CFU) + Amphigen	11
B	placebo (PBS + Amphigen)	13

A borjakat a fentebb leírtak szerint érintkeztettük 3 héttel a második vakcinálást követően. Mindegyik borjú 10 ml friss M. bovis tenyészetet kapott intranazálisan három egymást követő napon.

Mindegyik érintkeztetési oltóanyag esetében életképességi értéket határoztunk meg (CFU/ml) egy órán belül a M. bovis kísérletes érintkeztetés befejezését követően. Az eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat

A Mycoplasma bovis érintkeztetésre felhasznált oltóanyag életképesség értéke (CFU/ml).

érintkeztetési tenyészet	CFU/ml
1. nap	5,0 x 10 ⁹
2. nap	1,0 x 10 ⁹
3. nap	1,2 x 10 ⁹

Az össze állatot lemértük 1 nappal az érintkeztetés előtt, 7 nappal az érintkeztetést követően, 14 nappal az érintkeztetést követően és mintegy 3 héttel a M. bovis kísérletes érintkeztetést követően. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaljuk össze. Azon borjak esetében, amelyek megkapták a kísérleti M. bovis bakterint (kezelési csoport A) megnövekedett súlygyarapodást tapasztaltunk, a placebo vakcinált csoporttal összevetve (kezelési csoport B).

3. táblázat

A testsúly értékek összesítése a kísérletes Mycoplasma bovis érintkeztetést követően (testsúly átlag (kg) ± standard eltérés).

kezelési csoport	érintkeztetés előtt	1 héttel érintkeztetés után	2 héttel érintkeztetés után	3 héttel érintkeztetés után	testsúly növekedés
A	94,8 ± 12,9	98,7 ± 13,9	107,3 ± 13,6	114,6 ± 12,9	19,8
B	104,0 ± 15,6	106,8 ± 14,7	109,9 ± 14,1	113,0 ± 14,7	9,0

A végbélben mért testhőmérsékletet minden reggel meghatároztuk egy nappal az érintkeztetést megelőzően, közvetlenül az érintkeztetés után és 20 napig folyamatosan a M. bovis kísérletes érintkeztetést követően. Az eredményeket az 1. ábrán foglaljuk össze. A M. bovis bakterinnel vakcinált borjak esetében (kezelési csoport A) alacsonyabb átlag testhőmérsékletet mértünk a 4-8. napokon, a 10-18. napokon és a 20. napon, a placebo vakcinált állatokkal összehasonlítva (kezelési csoport B).

A M. bovis specifikus szérumszint válaszokat (IgG) a 4. táblázatban foglaltuk össze. Azokat a szérumszint mintákat tekintettük pozitívnak M. bovis-ra nézve, amelyek átlagos százalékos optikai sűrűség értékei (OD) nagyobbak voltak, mint a pozitív kontroll szérumszint érték 80 százaléka. Az összes borjú M. bovis negatív volt a vakcinálást megelőzően. Azok a borjak, amelyek megkapták a kísérleti M. bovis bakterint (kezelési csoport A) szérumszint pozitívak voltak a M. bovis-ra nézve a második vakcinálást megelőzően és szérumszint pozitívak maradtak a vizsgálatok során. A B kezelési csoportba tartozó állatok (placebo vakcinált állatok) szérumszint negatívnak bizonyultak a kísérleti M. bovis érintkeztetést követően két hétig.

4. táblázat

A Mycoplasma bovis szérumszint antitest (IgG) adatok összefoglalása (átlagos százalékos optikai sűrűség értékek a pozitív kontroll szérumszinttal összehasonlítva $\pm$ standard eltérés).

kezelési csoport	vakcinálás előtt	második vakcinálás előtt	érintkeztetés előtt	1 héttel érintkeztetés után	2 héttel érintkeztetés után	3 héttel érintkeztetés után
A	26,4 $\pm$ 29,1	210,2 $\pm$ 79,5	94,6	342,6 $\pm$ 12,6	392,5 $\pm$ 11,3	385,4 $\pm$ 13,2
B	29,9 $\pm$ 39,5	71,4 $\pm$ 64,8	24,9 $\pm$ 42,2	77,5 $\pm$ 55,5	250,7 $\pm$ 79,7	326,6 $\pm$ 50,0

Az összes állaton boncolást végeztünk mintegy 3 héttel a kísérleti M. bovis érintkeztetést követően. A tüdőt eltávolítottuk és makroszkópiusan értékeltük a M. bovis fertőzésnek betudható jellegzetes léziókra. A százalékos tüdő károsodási értékeket és a tüdő léziókban mutatózó százalékos csökkenést az 5. táblázatban foglaljuk össze. Azon borjak esetében, amelyeknek beadtuk a kísérleti M. bovis bakterint (kezelési csoport A) 71,2 százalék csökkenést tapasztaltunk a tüdő károsodási értékekben, amikor a placebo vakcinált állatokkal hasonlítottuk össze (kezelési csoport B). Ezek az eredmények az bizonyítják, hogy a kísérleti M.

bovis bakterin két dózisa képes volt védelmet indukálni a borjakban a kísérleti érintkeztetést követően.

5. táblázat

5 Százalékos tüdőkárosodási értékek összefoglalása
(százalékos érték súlyozott átlaga $\pm$ standard eltérés)

kezelési csoport	tüdőkárosodás százalékos mértéke	csökkenés százalékban
A	$1,80 \pm 3,04$	71,2
B	$6,25 \pm 6,73$	---

Minden egyes tüdőt 50 ml PBS-sel mostuk (lavage). A kísérleti M. bovis érintkeztetést követően mintegy huszonegy nappal végzett bronchiális mosás mintákból történő M. bovis izolálás eredményeit a 6. táblázatban foglaljuk össze. Azon borjak esetében, amelyeknek beadtuk a kísérleti M. bovis bakterint (kezelési csoport A) lecsökkent előfordulást és csökkent életképes M. bovis szintet tapasztaltunk a tüdő mosási mintákban, amikor a placebo vakcinált borjakkal hasonlítottuk össze (kezelési csoport B).

6. táblázat

Tüdő mosófolyadékból (lavage) történő Mycoplasma bovis izolálások összefoglalása.

kezelési csoport	M. bovis pozitív állatok száma	CFU/ml
A	3/11	$3,27 \times 10^2$
B	13/13	$2,41 \times 10^5$

Összefoglalva, a kísérleti M. bovis bakterint kapott borjak (kezelési csoport A) esetében kevesebb tüdő lézió fejlődött ki, lecsökkent a végbélben mért testhőmérséklet, megnövekedett a súlygyarapodás és mintegy 4 nagyságrendű csökkenést tapasztaltunk a tüdő mosási mintákból izolált életképes M. bovis szintekben, a placebót kapott állatokkal összehasonlítva (kezelési csoport B). Az eredmények azt mutatják, hogy a M. bovis bakterin két dózisa képes volt szerológiai választ indukálni és védelmet nyújtani M. bovis kísérleti érintkeztetéssel szemben.

3. példa

Ebben a példában megvizsgáljuk különböző *M. bovis* bakterinek hatékonyságát fiatal borjakban. Ötvennyolc egészséges hibrid borjút osztottuk véletlenszerűen csoportokba életkor alapján.

- 5 Az állatokat a megfelelő vakcina vagy placebo 2 ml mennyiségével szubkután oltottuk be a 0. napon (bal nyak) és a 21. napon (jobb nyak). A kísérleti kezelési csoportokat és az alkalmazott vakcinákat az 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat

Kísérleti kezelési csoportok

Kezelési csoport	Kísérleti vakcinák (2 ml-es dózis)	Állatok száma
A	<i>M. bovis</i> (5 x 10 ⁸ CFU) + Amphigen + Alhydrogel	14
B	<i>M. bovis</i> (5 x 10 ⁸ CFU) + Aphigen + QuilA/koleszterin	14
C	<i>M. bovis</i> (5 x 10 ⁸ CFU) + Amphigen	15
D	placebo (PBS)	15

A borjakat a fentebb leírtak szerint érintkeztettük 3 héttel a második vakcinálást követően. Mindegyik borjú 12 ml friss *M. bovis* tenyészetet kapott intranazálisan három egymást követő napon.

- 15 Mindegyik érintkeztetési oltóanyag esetében életképességi értéket határoztunk meg (CFU/ml) egy órán belül a *M. bovis* kísérletes érintkeztetés befejezését követően. Az eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat

A *Mycoplasma bovis* érintkeztetésre felhasznált oltóanyag életképesség értéke (CFU/ml).

érintkeztetési tenyészet	CFU/ml
1. nap	2,2 x 10 ⁹
2. nap	3,2 x 10 ⁹
3. nap	1,7 x 10 ⁹

Az össze állatot lemértük 1 nappal az érintkeztetés előtt, 7 nappal az érintkeztetést követően, 14 nappal az érintkeztetést követően és mintegy 3 héttel a M. bovis kísérletes érintkeztetést követően. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaljuk össze. Azon borjak esetében, amelyek megkapták a kísérleti M. bovis bakterineket (kezelési csoportok A, B és C) megnövekedett súlygyarapodást tapasztaltunk, a placebo vakcinált csoporttal összevetve (kezelési csoport D).

3. táblázat

A testsúly értékek összesítése a kísérletes Mycoplasma bovis érintkeztetést követően (testsúly átlag (kg) $\pm$ standard eltérés).

kezelési csoport	érintkeztetés előtt	1 héttel érintkeztetés után	2 héttel érintkeztetés után	3 héttel érintkeztetés után	testsúly növekedés
A	79,79 $\pm$ 12,29	88,00 $\pm$ 13,86	98,43 $\pm$ 12,35	103,71 $\pm$ 10,76	23,92 $\pm$ 5,99
B	78,21 $\pm$ 9,50	86,93 $\pm$ 9,90	98,29 $\pm$ 8,47	105,21 $\pm$ 9,32	27,00 $\pm$ 5,23
C	78,07 $\pm$ 16,78	86,60 $\pm$ 17,11	98,00 $\pm$ 20,92	104,00 $\pm$ 21,56	25,93 $\pm$ 8,80
D	78,93 $\pm$ 19,16	88,60 $\pm$ 20,44	94,43 $\pm$ 20,01	96,93 $\pm$ 20,89	18,00

A végbélben mért testhőmérsékletet minden reggel meghatároztuk egy nappal az érintkeztetést megelőzően, közvetlenül az érintkeztetés után és 20 napig folyamatosan a M. bovis kísérletes érintkeztetést követően. Az eredményeket a 2. ábrán foglaljuk össze. Azon borjak esetében, amelyek két dózis kaptak M. bovis vakcinákból (kezelési csoportok A, B és C) alacsonyabb átlag testhőmérsékletet mértünk a 7-17. napokon a placebo vakcinált állatokkal összehasonlítva (kezelési csoport D).

A M. bovis specifikus szérum antitest válaszokat (IgG) a 4. táblázatban foglaltuk össze. Azokat a szérum mintákat tekintettük pozitívnak M. bovis-ra nézve, amelyek átlagos százalékos optikai sűrűség értékei (OD) nagyobbak voltak, mint a pozitív kontroll szérum érték 80 százaléka. Az összes borjú M. bovis negatív volt a vakcinálást megelőzően. Azok a borjak, amelyek megkapták a kísérleti M. bovis bakterineket (kezelési csoportok A, B és C) szérum pozitívak voltak a M. bovis-ra nézve a második vakcinálást megelőzően és szérum pozitívak

maradtak a vizsgálatok során. A D kezelési csoportba tartozó állatok (placebo vakcinált állatok) szérum negatívnak bizonyultak a kísérleti M. bovis érintkeztetést követően három hétig.

4. táblázat

5 A Mycoplasma bovis szérum antitest (IgG) adatok összefoglalása (átlagos százalékos optikai sűrűség értékek a pozitív kontroll szérummal összehasonlítva $\pm$ standard eltérés).

kezelési csoport	vakcinálás előtt	második vakcinálás előtt	érintkeztetés előtt	1 héttel érintkeztetés után	2 héttel érintkeztetés után	3 héttel érintkeztetés után
A	Negatív	244,3 $\pm$ 66,0	314,7 $\pm$ 10,5	134,9 $\pm$ 7,4	115,5 $\pm$ 8,0	142,5 $\pm$ 6,9
B	Negatív	262,1 $\pm$ 86,9	309,9 $\pm$ 33,6	139,5 $\pm$ 7,5	114,9 $\pm$ 7,5	145,0 $\pm$ 4,1
C	Negatív	184,5 $\pm$ 60,6	292,2 $\pm$ 93,7	141,1 $\pm$ 9,1	118,9 $\pm$ 7,5	140,4 $\pm$ 7,7
D	Negatív	36,9 $\pm$ 70,6	37,2 $\pm$ 81,0	37,4 $\pm$ 27,9	53,2 $\pm$ 39,4	100,5 $\pm$ 99,6

10 Az összes állaton boncolást végeztünk mintegy 3 héttel a kísérleti M. bovis érintkeztetést követően. A tüdőket eltávolítottuk és makroszkópiusan értékeltük a M. bovis fertőzésnek betudható jellegzetes léziókra. A százalékos tüdő károsodási értékeket és a tüdő léziókban mutatkozó százalékos csökkenést az 5. táblázatban foglaljuk össze. Azon borjak esetében, amelyeknek beadtuk a kísérleti M. bovis bakterineket (kezelési csoportok A, B és C) alacsonyabb százaléku tüdő károsodási értéket tapasztaltunk, amikor a placebo vakcinált állatokkal hasonlítottuk össze (kezelési csoport D). Ezek az eredmények az bizonyítják, hogy a kísérleti
15 M. bovis bakterinek két dózisa képes volt védelmet indukálni a borjakban a kísérleti érintkeztetést követően.

5. táblázat

Százalékos tüdőkárosodási értékek összefoglalása
(százalékos érték súlyozott átlaga $\pm$ standard eltérés)

kezelési csoport	tüdőkárosodás százalékos mértéke	csökkenés százalékban
A	$1,71 \pm 3,03$	77,5
B	$1,49 \pm 3,23$	80,4
C	$3,61 \pm 6,17$	52,5
D	$7,60 \pm 15,93$	---

- 5 Minden egyes tüdőt 50 ml PBS-sel mostuk (lavage). A kísérleti *M. bovis* érintkeztetést követően mintegy huszonegy nappal végzett bronchiális mosás mintákból történő *M. bovis* izolálás eredményeit a 6. táblázatban foglaljuk össze. Azon borjak esetében, amelyeknek beadtuk a kísérleti *M. bovis* bakterineket (kezelési csoportok A, B és C) lecsökkent előfordulást és csökkent életképes *M. bovis* szintet tapasztaltunk a tüdő mosási mintákban, amikor a placebo vakcinált borjakkal hasonlítottuk össze (kezelési csoport D).
- 10

6. táblázat

Tüdő mosófolyadékából (lavage) történő *Mycoplasma bovis* izolálások összefoglalása.

kezelési csoport	<i>M. bovis</i> pozitív állatok száma	CFU/ml
A	5/14	$1,93 \times 10^2$
B	1/14	42,9
C	9/15	$1,34 \times 10^6$
D	12/14	$4,50 \times 10^6$

- 15 Összefoglalva, a kísérleti *M. bovis* bakterineket kapott borjak (kezelési csoportok A, B és C) esetében kevesebb tüdő lézió fejlődött ki, lecsökkent a végbélben mért testhőmérséklet, megnövekedett a súlygyarapodás és mintegy csökkenést tapasztaltunk a tüdő mosási mintákból izolált életképes *M. bovis* szintekben, a placebót kapott állatokkal összehasonlítva (kezelési csoport D). Az eredmények azt mutatják, hogy a *M. bovis* bakterinek két dózisa képes volt szerológiai választ indukálni és védelmet nyújtani *M. bovis* kísérleti érintkeztetéssel szemben.
- 20

4. példa

Ebben a példában megvizsgáljuk különböző *M. bovis* bakterin formulázások hatékonyságát fiatal borjakban homogén vagy heterogén érintkeztetést követően. Nyolcvanhárom egészséges hibrid borjút osztottuk véletlenszerűen csoportokba életkor alapján.

- 5 Az állatokat a megfelelő vakcina vagy placebo 2 ml-ével szubkután oltottuk be a 0. napon (bal nyak) és a 21. napon (jobb nyak). A kísérleti kezelési csoportokat és az alkalmazott vakcinákat az 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat

Kísérleti kezelési csoportok

10

kezelési csoport	kísérleti vakcinák (2 ml dózis)	állatok száma
1	Placebo (PBS)	16
2	2300-as <i>M. bovis</i> törzs (5 x 10 ⁸ CFU) + Amphigen + QuilA/Kloreszterin	17
3	3625-as <i>M. bovis</i> törzs (5 x 10 ⁸ CFU) + Amphigen + GPI-0100/Kloreszterin	16
4	3625-as <i>M. bovis</i> törzs (5 x 10 ⁸ CFU) + Amphigen + QuilA/Kloreszterin	17
5	5063-as <i>M. bovis</i> törzs (5 x 10 ⁸ CFU) + Amphigen + QuilA/Kloreszterin	17

A borjakat a fentebb leírtak szerint érintkeztettük 3 héttel a második vakcinálást követően. Mindegyik borjú 12 ml (6 ml-t orrlyukanként) friss 5063-as *M. bovis* törzs tenyészetet kapott intranazálisan három egymást követő napon.

- 15 Mindegyik érintkeztetési oltóanyag esetében életképességi értéket határoztunk meg (CFU/ml) egy órán belül a *M. bovis* kísérletes érintkeztetés befejezését követően.

- 20 Az össze állatot lemértük 1 nappal az érintkeztetés előtt és mintegy 3 héttel a *M. bovis* kísérletes érintkeztetést követően. Az átlagos napi súlygyarapodás eredményeit a 2. táblázatban foglaltuk össze. Azon borjak esetében, amelyek megkapták a kísérleti *M. bovis* bakterinét (kezelési csoportok 2, 3, 4 és 5) megnövekedett átlagos napi súlygyarapodást tapasztaltunk, a placebo vakcinált csoporttal összevetve (kezelési csoport 1).

2. táblázat

Átlagos napi súlygyarapodás összesítése a kísérletes *Mycoplasma bovis* érintkeztetést követően (Átlagos napi súlygyarapodás (Kg)).

kezelési csoport	Átlagos napi súlygyarapodás
1	0,3
2	0,5
3	0,7
4	0,6
5	0,9

A végbélben mért testhőmérsékletet minden reggel meghatároztuk közvetlenül az érintkeztetést megelőzőig (47. nap) és 20 napig folyamatosan a *M. bovis* kísérletes érintkeztetést követően. Az eredményeket az 3. ábrán foglaljuk össze. Azon borjak esetében, amelyek két dózis kaptak *M. bovis* vakcinákból (kezelési csoportok 2, 3, 4 és 5) alacsonyabb átlag testhőmérsékletet mértünk a 52-67. napokon a placebo vakcinált állatokkal összehasonlítva (kezelési csoport 1).

A *M. bovis* specifikus szérum antitest válaszokat (IgG) a 3. táblázatban foglaltuk össze. Azokat a szérum mintákat tekintettük pozitívnak *M. bovis*-ra nézve, amelyek átlagos százalékos optikai sűrűség értékei (OD) nagyobbak voltak, mint a pozitív kontroll szérum érték 0,8080 százaléka. Az összes borjú *M. bovis* negatív volt a vakcinálást megelőzően. Azok a borjak, amelyek megkapták a kísérleti *M. bovis* bakterineket (kezelési csoportok 2, 3, 4, és 5) antitest választ mutattak a vakcinálást követően. Az 1 kezelési csoportba tartozó állatok (placebo vakcinált állatok) szérum negatívnak bizonyultak a kísérleti *M. bovis* érintkeztetést követően három hétig.

3. táblázat

A *Mycoplasma bovis* szérum antitest (IgG) adatok összefoglalása (átlagos százalékos optikai sűrűség értékek a pozitív kontroll szérummal összehasonlítva $\pm$ standard eltérés).

kezelési csoport	vakcinálás előtt	második vakcinálás előtt	érintkeztetés előtt	3 héttel érintkeztetés után
1	7,04 $\pm$ 13,69	28,14 $\pm$ 31,58	5,33 $\pm$ 52,24	186,67 $\pm$ 51,32
2	2,77 $\pm$ 10,47	79,59 $\pm$ 71,35	49,78 $\pm$ 34,91	294,75 $\pm$ 29,32
3	7,40 $\pm$ 13,20	98,21 $\pm$ 102,30	69,77 $\pm$ 27,44	298,29 $\pm$ 21,13
4	8,34 $\pm$ 14,00	87,15 $\pm$ 56,79	65,43 $\pm$ 40,81	295,47 $\pm$ 26,59
5	5,54 $\pm$ 10,02	62,40 $\pm$ 72,18	68,31 $\pm$ 20,88	300,13 $\pm$ 22,91

Az összes állaton boncolást végeztünk mintegy 3 héttel a kísérleti *M. bovis* érintkeztetést követően. A tüdőket eltávolítottuk és makroszkópiusan értékeltük a *M. bovis* fertőzésnek betudható jellegzetes léziókra. A legkisebb négyzetátlag (Least square mean, LSM) százalékos tüdő károsodási értékeket és a tüdő léziókban mutatkozó százalékos csökkenést a 4. táblázatban foglaljuk össze. Azon borjak esetében, amelyeknek beadtuk a kísérleti *M. bovis* bakterineket (kezelési csoportok 2, 3, 4, és 5) alacsonyabb LSM százalékos tüdő károsodási értékeket tapasztaltunk, amikor a placebo vakcinált állatokkal hasonlítottuk össze (kezelési csoport 1). Ezek az eredmények az bizonyítják, hogy a kísérleti *M. bovis* bakterinek két dózisa képes volt védelmet indukálni a borjakban a kísérleti érintkeztetést követően.

4. táblázat

LSM százalékos tüdőkárosodási értékek összefoglalása (százalékos érték súlyozott átlaga)

kezelési csoport	tüdőkárosodás LSM százalékos mértéke	csökkenés százalékban
1	6,5	---
2	0,7	89,23
3	0,9	86,15
4	2,8	56,92
5	2,9	55,38

Minden egyes tüdőt 50 ml PBS-sel mostuk (lavage). A kísérleti *M. bovis* érintkeztetést követően mintegy huszonegy nappal végzett bronchiális mosás mintákban az *M. bovis* előfordulásának PCR reakció segítségével kapott eredményeit az 5. táblázatban foglaljuk össze. Azon borjak esetében, amelyeknek beadtuk a kísérleti *M. bovis* bakterineket (kezelési csoportok 2, 3, 4 és 5) lecsökkent *M. bovis* előfordulást tapasztaltunk a tüdő mosási mintákban PCR reakció segítségével, amikor a placebo vakcinált borjakkal hasonlítottuk össze (kezelési csoport 1).

5. táblázat

Tüdő mosófolyadékban (lavage) a *Mycoplasma bovis* előfordulásának PCR reakció segítségével végzett összefoglalása.

kezelési csoport	M. bovis pozitív állatok száma	Pozitív állatok százaléka
1	14/16	87,5
2	0/17	0
3	4/12	25,0
4	2/15	11,8
5	1/16	5,9

- 5 Összefoglalva, a kísérleti *M. bovis* bakterineket kapott borjak (kezelési csoportok 2, 3, 4 és 5) esetében kevesebb tüdő lézió fejlődött ki, lecsökkent a végbélben mért testhőmérséklet, megnövekedett az átlagos napi súlygyarapodás és csökkenést tapasztaltunk a tüdő mosási mintákban az *M. bovis* előfordulásában, a placebót kapott állatokkal összehasonlítva (kezelési csoport 1). Az eredmények azt mutatják, hogy a *M. bovis* bakterinek két dózisa képes volt
- 10 szerológiai választ indukálni és védelmet nyújtani *M. bovis* kísérleti érintkeztetéssel szemben. Továbbá, az eredmények az mutatják, hogy egyetlen *M. bovis* törzset tartalmazó vakcina képes a borjak számára védelmet nyújtani másik, jelentősen különböző törzsszel végzett kísérleti érintkeztetés után.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Vakcina készítmény állat immunizálására, amely vakcina készítmény inaktivált, egész vagy részleges *Mycoplasma bovis* sejtek immunológiailag hatékony mennyiségét és gyógyszerészetileg elfogadható hordozót tartalmaz.
- 5 2. Az 1. igénypont szerinti vakcina készítmény, amely adjuvánst is tartalmaz.
3. Az 1. igénypont szerinti vakcina készítmény, amelyben a *M. bovis* vakcina hatékony mennyisége mintegy 1×10^6 és mintegy 5×10^{10} közötti számú telepet létrehozó egységet ("colony forming unit", CFU) tartalmaz dózisonként.
- 10 4. Az 1. igénypont szerinti vakcina készítmény, amelyben a *Mycoplasma bovis* vakcina tartalmaz légzőszervi, gyomor- és bélrendszeri illetve reprodukzív virális vagy bakteriális patogén antigént is.
5. Eljárás *Mycoplasma bovis* fertőzés okozta betegség vagy rendellenesség kezelésére vagy megelőzésére állatban, azzal jellemezve, hogy az állatnak *Mycoplasma bovis* vakcina hatékony mennyiségét adjuk be.
- 15 6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a *M. bovis* vakcina hatékony mennyisége mintegy 1×10^6 és mintegy 5×10^{10} közötti számú, telepet létrehozó egységet (CFU) tartalmaz dózisonként.
7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a beadásra kerülő vakcina mennyisége mintegy 0,5 ml és mintegy 5,0 ml között van.
- 20 8. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a beadásra kerülő vakcina mennyisége mintegy 1,5 ml és mintegy 2,5 ml között van.
9. A 27. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a borjúnak mintegy 2 milliliter vakcinát adunk be két alkalommal.
10. Eljárás *Mycoplasma bovis* vakcina előállítására, azzal jellemezve, hogy *Mycoplasma bovis* izolátumot növesztünk tenyészetben megfelelő táptalajon; a *Mycoplasma bovis* sejteket binér etiléniminnel kezeljük a *Mycoplasma bovis* inaktiválására; és az inaktivált *Mycoplasma bovis* sejteket megfelelő gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval keverjük össze.
- 25 11. Reagenskészlet, amely legalább egy tartóedényében *Mycoplasma bovis* bakterint és adjuvánst tartalmaz.
- 30 12. Bakterin, amely inaktivált *Mycoplasma bovis* izolátumot tartalmaz mintegy 5×10^8 telepet létrehozó egység mennyiségben bakterin dózisonként, gyógyszerészetileg elfogadható hordozóban.
13. A 12. igénypont szerinti bakterin, amely továbbá adjuvánst is tartalmaz.

14. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Mycoplasma bovis vakcina hatékony mennyiségét egyetlen dózisként adjuk be.

15. Vakcina készítmény állat immunizálására, amely vakcina készítmény inaktivált, egész vagy részleges Mycoplasma bovis sejtek immunológiailag hatékony mennyiségét, továbbá QuilA-t, Amphigen-t és koleszterint tartalmaz.

5

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

10



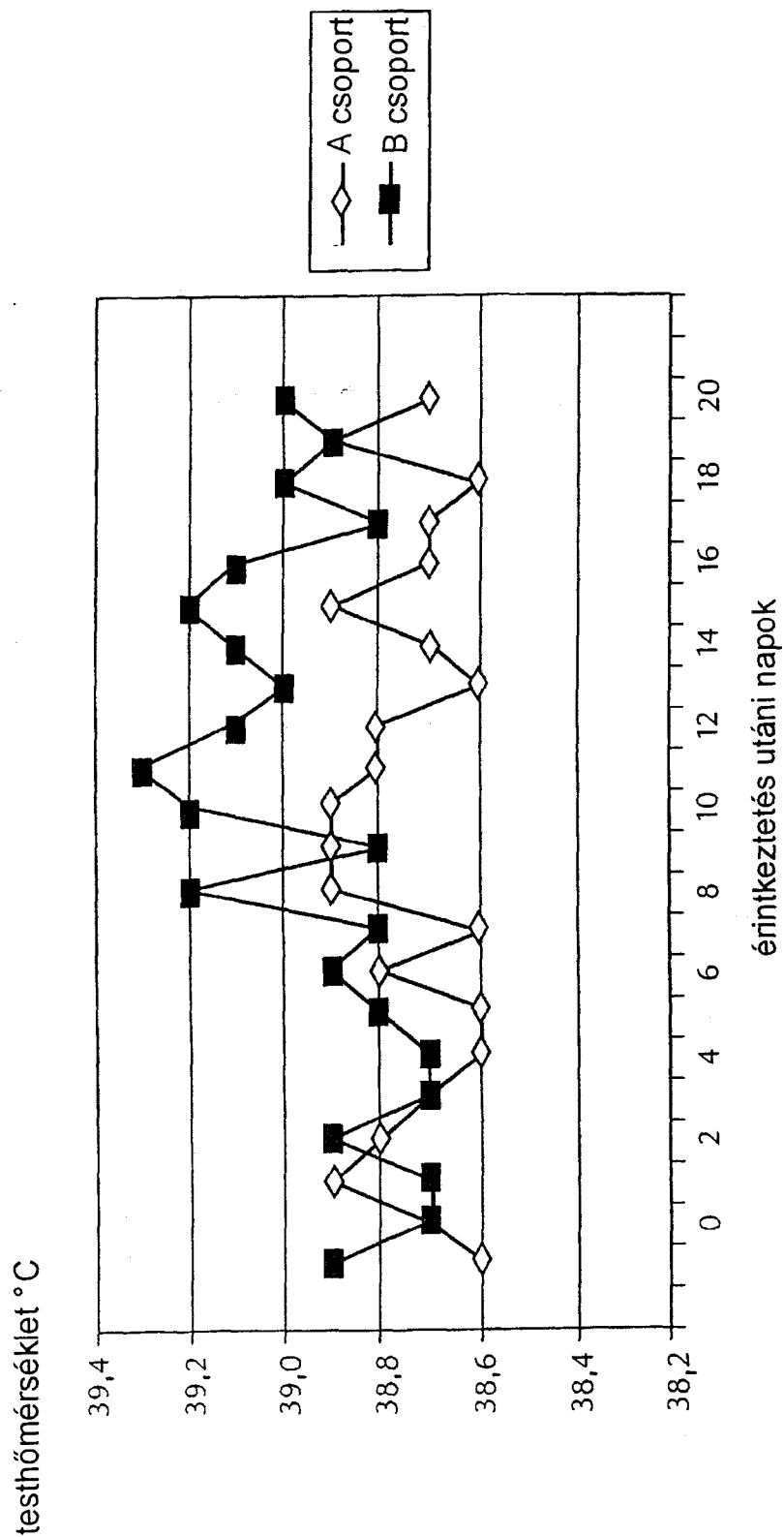
dr. Pető Árpád

szabadalmi ügyvivő

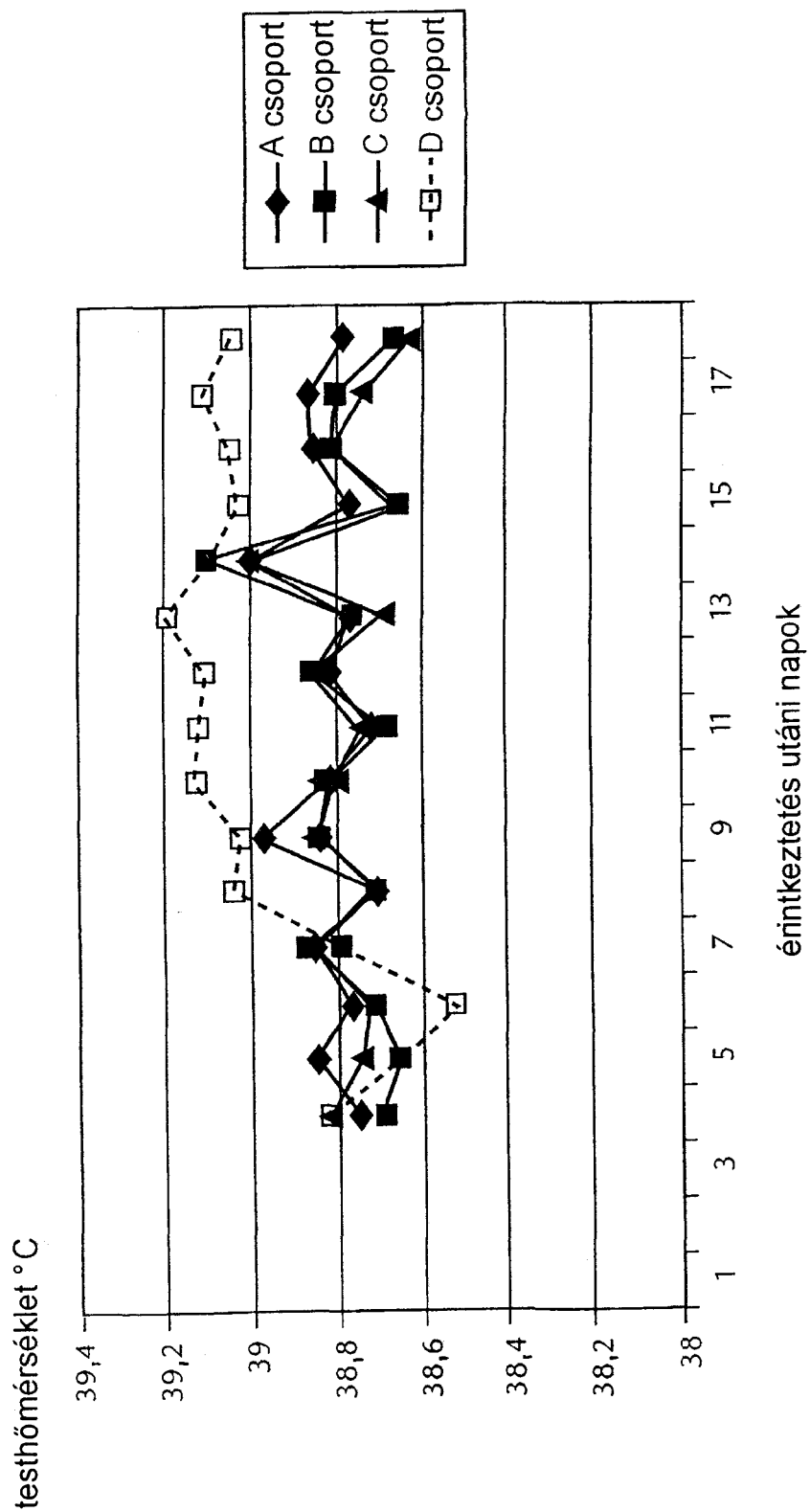
Drahos Eszter

2006. január 13

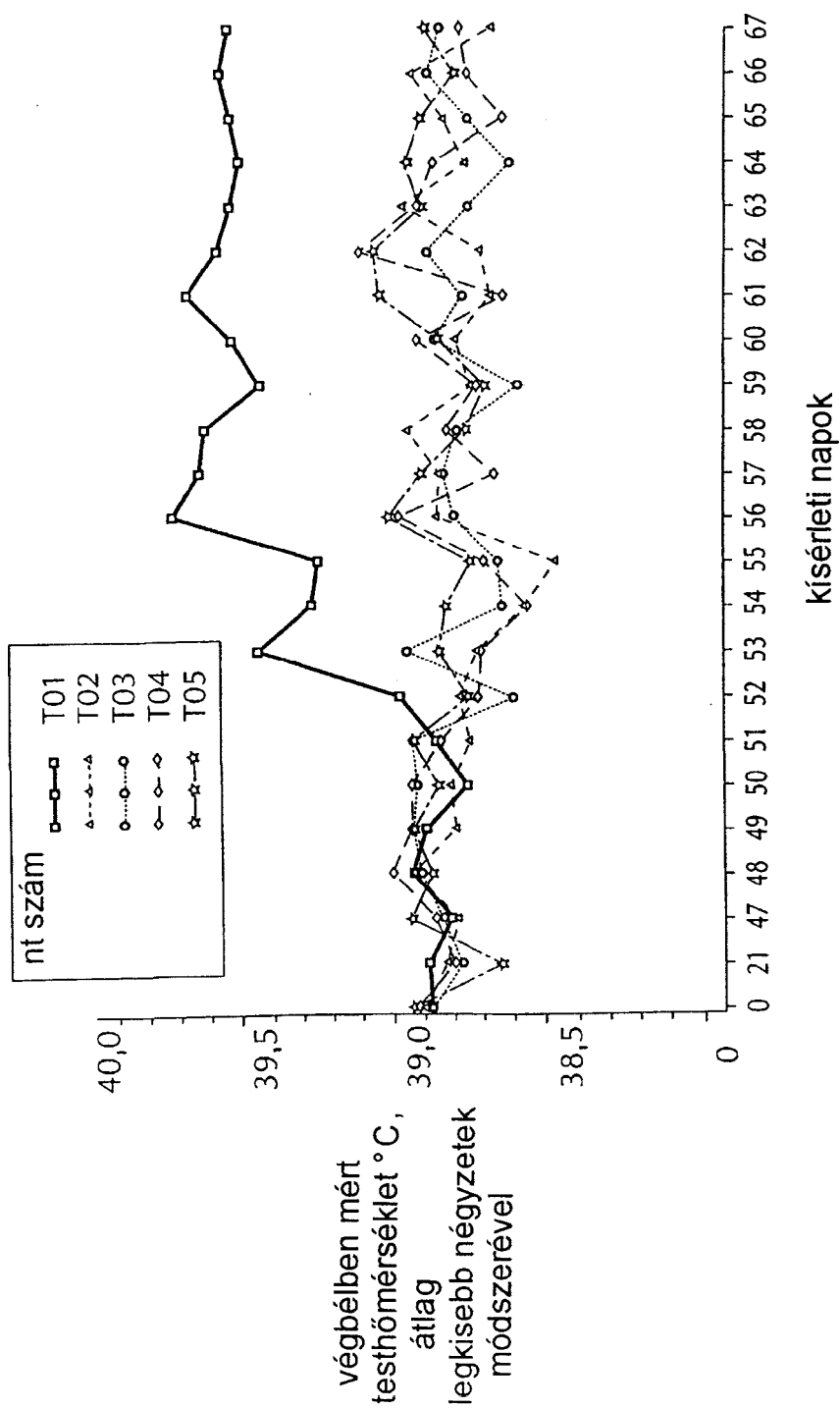
27 oldal leírás + 3 oldal rajz = 30 oldal



1. ábra



2. ábra



3. ábra