

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

289 743

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1995 - 2031

(22) Přihlášeno: 26.01.1994

(40) Zveřejněno: 13.12.1995
(Věstník č. 12/1995)

(47) Uděleno: 25.01.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 13.03.2002
(Věstník č. 3/2002)

(86) PCT číslo: PCT/US94/00951

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 94/18311

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

C 12 N 7/00

A 61 K 39/12

(73) Majitel patentu:

BAYER CORPORATION, Pittsburgh, PA, US;
IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION INC., Ames, IA, US;

antigenní hmoty pro modifikovaný živý (zeslabený),
inaktivní, podjednotkový nebo rekombinantní přípravek.

(72) Původce vynálezu:

Sanderson Thomas, Skokie, IL, US;
McGinley Michael J., Lenexa, KS, US;
Zimmerman Jeffrey J., Ames, IA, US;
Hill Howard T., Cambridge, IA, US;
Meetz Michael C., Nevada, IA, US;
Pirtle Eugene C., Ames, IA, US;
Swenson Sabrina L., Madrid, IA, US;
Shibley George P., Leawood, KS, US;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš dr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název vynálezu:

**Izolát viru vepřového reprodukčního a
respiračního syndromu PRRSV, způsob
kultivace PRRSV, tkáňová kultura, způsob
přípravy vakcíny a vakcína obsahující PRRSV
izolát**

(57) Anotace:

Izolát viru vepřového reprodukčního a respiračního syndromu (PRRSV) označený jako ISU-P a uložený pod přístupovým číslem ATCC VR 2402. Způsob kultivace tohoto PRRSV izolátu ve tkáňové kultuře, která je citlivá na infekci pro replikaci viru na množství dostatečné k ochraně živočichů před PRRS nebo identifikaci molekulové struktury PRRSV pro vývoj rekombinantních produktů, který zahrnuje inokulaci tkáňové kultury virem a získání replikovaného viru. Do rozsahu řešení náleží rovněž tkáňová kultura obsahující PRRSV výše uvedený izolát a způsob přípravy vakcíny účinné při ochraně vepřů před PRRS, spočívající v tom, že se připraví izolát PRRSV, uvolní se virus do tkáňové kultury a upraví se antigenní hmota zředěním, zkoncentrováním nebo extrakcí, přičemž se získá imunologicky účinné množství

CZ 289743 B6

Izolát viru vepřového reprodukčního a respiračního syndromu PRRSV, způsob kultivace PRRSV, tkáňová kultura, způsob přípravy vakcíny a vakcína obsahující PRRSV izolát

5 Oblast techniky

Vynález se týká izolátu viru vepřového reprodukčního a respiračního syndromu („porcine reproductive and respiratory syndrom virus“ – PRRSV) označený jako ISU-P. Rovněž se
10 předmětý vynález týká způsobu kultivace PRRSV izolátu ve tkáňové kultuře, která je citlivá na infekci, tkáňové kultury obsahující PRRSV izolát a způsobu přípravy vakcíny účinné při ochraně vepřů před PRRSV. Obecně se předložený vynález týká diagnostických a ochranných antigenů a vakcín pro reprodukční a respirační chorobu selat a způsobů jeho výroby a použití.

15 Dosavadní stav techniky

Reprodukční a respirační syndrom vepřů je rychle se rozmáhajícím ekonomicky devastujícím problémem v USA a rovněž tak i v evropské produkci vepřů. Tento syndrom byl nejprve popsán
20 v USA v roce 1987, přičemž o dva roky později byly tyto závěry potvrzeny podobnými výzkumy v Evropě a Kanadě. Syndrom choroby byl označován mnoha různými názvy, zahrnujícími záhadnou chorobu prasnic, abortus blau, choroba selat s modrými ušima, epidemický abortus u vepřů a respirační syndrom (PEARS), syndrom neplodnosti a respirační syndrom u prasnic (SIRS – swine infertility and respiratory syndrome). Název reprodukční a respirační syndrom u vepřů (PRRS) byl používán až později.

25 Etiologické činidlo schopné reprodukovat syndrom choroby bylo identifikováno jako malý obalový sférický RNA virus, s průměrným průměrem virionu 62 nm a 25 – 30 nm velkým jádrem obklopeným obalem. Virus byl předběžně zařazen jako člen rodu Arterivirus v rodině Togaviridae. Zde popsáný izolát viru vepřového reprodukčního a respiračního syndromu (PRRSV) naplňuje tuto předběžnou klasifikaci a byl shledán reprodukcí chorobný syndrom.
30

Chorobný syndrom spojený s PRRSV je charakterizován akutním a chronickým selháním schopnosti reprodukce u dospělých prasnic a obtížnou až střední respirační chorobou u mladých podsvinčat. Reprodukční selhání je charakterizováno pozdním potratem, což vede ke zvýšenému
35 výskytu mumifikovaných, mrtvě narozených a oslabených narozených selat s výrazně sníženými šancemi na přežití. Rovněž byly popsány chronické problémy s opožděným navrácením dělohy u infikovaných prasnic. Následující respirační choroba zahrnuje stavy od horečky a intersticiální pneumonitis až znaky střední choroby horních cest dýchacích (tj. kýchání, kašláni a nasální nebo oční potíže) u malých podsvinčat. V poslední době (1990) sérologické a chovné studie indikují,
40 že alespoň 50 % chovu vepřů v USA bylo vystaveno PRRSV nebo prošlo chorobou reprodukčního selhání a respirační chorobou indikovanou u PRRSV infekce.

Vzhledem k nebezpečnosti tohoto chorobného syndromu byly v poslední době studie patogeneze, epidemiologie a kontroly choroby omezeny. Je třeba chápat, že účinný vývoj a propagace
45 antigenů, obsahujících PRRSV, bude usnadňovat vývoj PRRSV vakcíny za účelem prevence a kontroly reprodukčního a respiračního syndromu u vepřů.

Podstata vynálezu

50 Podstatou předmětného vynálezu je izolát viru vepřového reprodukčního a respiračního syndromu (PRRSV) označený jako ISU-P a uložený pod přístupovým číslem ATCC VR 2402.

Do rozsahu vynálezu rovněž náleží způsob kultivace výše uvedeného PRRSV izolátu ve tkáňové kultuře, která je citlivá na infekci, pro replikaci viru na množství dostatečné k ochraně živočichů
55

před PRRS nebo identifikaci molekulové struktury PRRSV pro vývoj rekombinantních produktů, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje inokulaci tkáňové kultury virem a získání replikovaného viru.

- 5 Ve výhodném provedení tohoto postupu tkáňová kultura obsahuje buněčnou linii, a podle nejvýhodnějšího provedení je tkáňovou kulturou buněčná linie „African Green Monkey Kidney“.

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží tkáňová kultura obsahující výše definovaný PRRSV izolát.

10

Ve výhodném provedení je tato tkáňová kultura v průmyslovém měřítku nad 25 litrů při fluorescenční protilátkové infekční dávce 50 na ml, FAID₅₀ titru větším než 10^{5,0}/ml.

15

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží způsob přípravy vakcíny účinné při ochraně vepřů před PRRS, jehož podstata spočívá v tom, že se připraví výše definovaný izolát PRRSV, uvolní se virus do tkáňové kultury a upraví se antigenní hmota zředěním, zkoncentrováním nebo extrakcí, přičemž se získá imunologicky účinné množství antigenní hmoty pro modifikovaný živý (zeslabený), inaktivní, podjednotkový nebo rekombinantní přípravek.

20

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží vakcína obsahující výše definovaný PRRSV izolát.

Ve výhodném provedení je tato vakcína připravená výše definovaným postupem, ke PRRSV je modifikovaný živý (zeslabený), a je v kapalném, zmrazeném nebo vysušeném formě.

25

Výhodná je podle předmětného vynálezu vakcína, ve které PRRSV je inaktivován a smísen s adjuvans a případně obsahuje vhodnou konzervační přísadu. Výhodně je adjuvans buďto na bázi oleje nebo na bázi vody. Podle ještě výhodnějšího provedení je adjuvans vybráno ze skupiny zahrnující Freundovo kompletní adjuvans a Freundovo nekompletní adjuvans.

30

V případě vakcíny podle vynálezu je výhodně uvedeným inaktivovaným činidlem binární ethylenimin, beta propiolakton nebo formalin.

35

Výhodná je podle předmětného vynálezu rovněž vakcína, kde tkáňovou kulturou je buněčná linie „African Green Monkey Kidney“.

Předmětem vynálezu je tedy virový izolát, označený jako ISU-P, který je použitelný při přípravě antigenů pro diagnostiku reprodukčního a respiračního syndromu u vepřů a vyvolání ochranné imunitní odezvy na virus reprodukčního a respiračního syndromu vepřů (PRRSV).

40

V předloženém provedení podle vynálezu může být PRRSV izolát získán způsobem zahrnujícím izolaci PRRSV ko-kultivací 10 % hmotn./obj. plicních homogenátů z virem infikovaných podsvinčat s primární alveolární makrofágovou nebo kontinuální buněčnou kulturou při teplotě 35 °C.

45

Předložený vynález dále zahrnuje rozmnožování viru na vysoký titr v určitých buněčných liniích jako je „African Green Monkey Kidney“ kontinuální buněčná linie (MA 104) a její unikátní klonovaný derivát (9009B).

50

V rozsahu řešení jsou rovněž způsoby přípravy a použití živých virových nebo usmrcených virových antigenů (běžných nebo rekombinantních) a vakcíny, které se z nich získají kombinací imunologicky účinného množství viru s ředidlem a/nebo přísadou.

Podle vynálezu bylo zjištěno, že přímá experimentální imunizace prasnic živým virem nebo kontaktem s prasnicemi imunizovanými živým virem, brání reprodukčnímu selhání po intranasálním podnětu virulentním PRRSV.

- 5 Podle vynálezu bylo rovněž zjištěno, že inaktivované PRRSV vakcíny s přísadami chrání podsvinčata před PRRS infekcí po podnětu měřeno ztrátou replikace viru ve vakcínatech ve srovnání a nevakcinovanými kontrolními podsvinčaty.

10 Jak je uvedeno výše, je předložený vynález zaměřen na izolaci PRRSV virového izolátu ISU-P za účelem získání virových antigenů pro použití ve vakcínách a diagnostických studiích. ISU-P izolát byl získán z plicní tkáně oslabených narozených selat. Ilustrativně je možno uvést, že se získá tkáňový homogenát z plic, slinivky a lymfatických žláz o koncentraci 10 % hmotn./obj. v minimálním základním médiu (Minimal Essential Media) doplněném antibiotiky (MEM+A) pro minimalizaci potenciální kontaminace. Surový homogenát se vyčeří a odstředí při teplotě 15 4 °C po dobu 15 minut při 1500 × g. Čirý supernatant se zředí 1 : 5 v MEM+A a 1,0 ml se potom adsorbuje na 48 hodin starou konfluentní monovrstvu MA 104 buněk nebo primárních alveolárních makrofágů v nádobkách s plochou 25 cm². Po 2 hodinách adsorpční periody při 35 °C se monovrstvy promyjí dvakrát s MEM+A a 5,0 ml MEM+A doplněných 5,0 % gamma-ozářeného fetálního telecího séra. Virové izolační lahvičky se potom inkubují při teplotě 35 °C 20 v 5% CO₂ atmosféře a denně se pozorují na výskyt cytopatických účinků (CPE). PRRSV ISU-P cytopatický účinek začne obklopením malého místa 5 až 10 buněk a pokračuje až do stavu, kdy je mnoho buněk pyknotických a oddělí se od substrátu během průběhu 4 až 7 dnů po infekci.

25 ISU-P izolát byl potvrzen jako PRRSV izolát fluorescenčním vybarvením protilátky s PRRSV skupinou specifické monoklonální protilátky, označení publikované domény SDOW17. Navíc byly negativně vybarvené virem infikované buňky zkoušeny transmisí elektronovou mikroskopii na přítomnost virových částic. Pozorované virové částice byly sférické a obalené virionem s průměrným průměrem 65 nm a průměrem jádra 27 nm. Tkáňová virová kultura charakterizovaná tímto způsobem byla použita pro pokusnou reprodukci pozdního potratu a reprodukčního selhání u březích prasnic (tabulka 1). Tabulka 1 ukazuje, že březí mladé prasnice vystavené buď 30 ISU-P infikovaným plicním homogenátům (PRRS-hm) nebo ISU-P pěstovanému v buněčné kultuře (PRRS-tc) demonstrují typické znaky reprodukčního a respiračního syndromu vepřů (PRRS). V PRRS-hm skupinách nebyla nalezena žádná normální vržená selata. V PRRS-tc skupinách byla pouze 4 ze 33 selat vržena normálně. Ve srovnání bylo 29 ze 30 (96,7 %) 35 nevystavených selat při vrhu normálních. Skutečnost, že ISU-P i po purifikaci tkáňové kultury může reprodukovat PRRS, potvrzuje, že izolát je správně klasifikován jako rod Arterivirus v rodině Togaviridae. Tento izolát byl také shledán jako produkující mírnou intersticiální pneumonii u pokusně infikovaných selat.

40 Charakteristickým znakem předloženého vynálezu je to, že PRRSV podle vynálezu může růst v určitých buňkách tkáňové kultury, které účinně replikují virus na hladinu dostačující k poskytnutí antigenní hmoty nezbytné k inkorporování do vakcín, které mohou chránit selata a/nebo březí mladé prasnice nebo prasnice před PRRS podnětem. Pro ilustraci je možno uvést, že PRRSV může být pěstován na tkáňové buněčné kultuře označené MA104 od Whittaker 45 BioProducts. Pokusy s množením viru používající stejné kultivační podmínky, s MA104 buňkami získanými ze tří různých zdrojů naznačují, že existuje vysoký stupeň variability mezi MA104 buňkami, pokud jde o schopnost podporovat PRRSV replikaci na vysoký titr. Jedna MA104 buněčná kultura označená MA104(M) od *Miles Inc., Agriculture Division, Animal Health Products Group*, a použitá ve výše popsáních studiích, konzistentně podporuje PRRSV replikaci 50 na vysoký titr. Dále klon buněčné linie, vyvinutý v *Miles Inc., Agriculture Division, Animal Health Products Group*, který je odvozen od MA104(M), označený 9009B, podporuje replikaci PRRSV na titry vyšší než rodičovská buněčná linie. Preferovanou tkáňovou buněčnou kulturou pro růst ISU-P je 9009B. Dále je podrobnější popis propagace buněčné kultury PRRSV ISU-P.

Buňky tkáňové kultury (MA104(M) a 9009B) byly kultivovány a udržovány v Dulbeccově modifikovaném minimálním základním médiu, s vysokým obsahem glukózy (DMEM/HG), doplněném 5 % fetálního telecího séra a pufovaném 1,3 g/l hydrogenuhličitanu sodného. Buněčné pasáže byly provedeny s dostatečným počtem buněk pro udržení konfluentní monovrstvy po dobu 48 hodin. PRRSV ISU-P virové základy byly zředěny v DMEM/HG + 5 % fetálního séra pufovaného na pH 6,8 s PIPES. Vir byl inokulován na buněčnou vrstvu při malé multiplicitě infekce (MOI) a inkubován při teplotě 36 °C. Infikované kultury byly pozorovány denně na CPE po dobu 4 až 7 dnů. Infikované kultury byly sklizeny, když byl evidentní 90 až 100% CPE. Maximální virová antigenní hmota byla získána po jednom cyklu zmrazení na -70 °C/roztátí. Průměrný virový titr získaný z propagace v MA104(M) buňkách se pohybuje od $10^{3,0}$ až $10^{4,5}$ fluorescentní protilátkové infekční dávky/ml (FAID₅₀/ml). Virové titry dosažené propagací v 9009B buněčném klonu se pohybují od $10^{5,5}$ do $10^{6,5}$ FAID₅₀/ml. Titry v tomto rozsahu umožňují, aby byla inkorporována dostatečná antigenní hmota do komerčních PRRSV vakcínových přípravků většího objemu než 50 l.

Pro odborníky pracující v daném oboru je zřejmé, že vzhledem k tomu, že PRRSV může být rozmnožován na vysoké hladiny antigenní hmoty, deriváty viru, zahrnující jeho podjednotky, které jsou účinné podle vynálezu, mohou být získány prostředky běžně známými v tomto oboru, jako je například extrakce z viru. Dále mohou být ochranné antigeny identifikovány v molekulové úrovni a reprodukovány a exprimovány za použití rekombinantní technologie.

Virální kapaliny pro vakcínové přípravky byly inaktivovány dvěma metodami. Zvolenými inaktivanty byly formalin a binární ethylenimin (BEI). Inaktivace byla provedena standardními metodami zde podrobněji popsány. Formalinová inaktivace byla provedena smísením virálních kapalin se zásobním 37% formaldehydem na konečnou koncentraci formalinu 0,05 %. Směs formalin-virus byla udržována při teplotě místnosti (přibližně 25 °C) za nepřetržitého míchání po dobu 24 hodin. Vzorky byly odebrány v čase 0, 8, 12 a 24 hodin a zkoušeny na živý virus v 9009B buňkách. Cytopatický efekt a fluorescenční vybarvení se skupinou specifické monoklonální protilátky detekující živý PRRSV se projeví pouze v době = 0 hodin.

Inaktivace s BEI byla provedena spojením zásobního 0,1 M BEI (20,5 g/l 2-brom-ethylaminu HBR v 0,175 N NaOH) s virálními kapalinami na konečnou koncentraci 1,0 mM BEI. Inaktivace byla provedena udržováním směsi BEI-virus při teplotě místnosti za konstantního míchání po dobu 48 hodin. Virová inaktivace byla ukončena přidáním 1,0 M thiosíranu sodného na konečnou koncentraci 0,1 mM za míchání po 2 hodiny. Vzorky byly odebrány v časech 0, 2, 4, 8, 12, 24 a 48 hodin a zkoumány na živý virus jak je popsáno výše. Živé PRRSV byly detekovány pouze v časech = 0, 2 a 4 hodiny.

Při přípravě modifikované živé nebo zeslabené vakcíny podle vynálezu je PRRSV změněn tak, že ještě může infikovat hostitele omezeným způsobem, ale nemůže působit znaky choroby u hostitele. Normálně se taková změna viru provádí jeho pasážováním v nehostitelské buňce, jako jsou buňky „African Green Monkey“ ledvin. Na počátku virus neroste dobře nebo neroste vůbec. V tomto případě může být nezbytné zesílit virus tak, aby se adaptoval na růst v buněčné kultuře. Toho může být dosaženo přidáním viru k buněčné kultuře při vysoké nebo nízké multiplicitě infekce (MOI). Alternativně může být virus posílen pasážováním nebo slepým pasážováním samotným s buňkami, až je pozorován cytopatický efekt, což indikuje, že virus byl adaptován. Jakmile bylo dosaženo adaptace, zvyšuje se titr viru, což je možno pozorovat když je PRRSV izolát ISU-P pasážován z MA104(M) buněčné linie do 9009B buněčné linie. Tabulka 1 ukazuje, že tkáňovou kulturou pasážovaný PRRSV ISU-P (PRRS-tc) může být méně virulentní než ten, který byl izolován z plicního homogenátu, jako typický výsledek adaptace. Hodnoty popsané v tabulce 2 indikují, že způsob výroby vakcín podle předloženého vynálezu poskytuje vakcíny, které jsou zejména účinné při dosažení ochrany proti PRRS.

Inaktivovaný PRRSV ISU-P byl zpracován s přísadami následovně. K inaktivovaným kapalinám byly přidány přísady vybrané ze skupiny, zahrnující Freundovo kompletní adjuvans (FCA),

Freundovo nekompletní adjuvans (FIA), adjuvans na bázi carbopolu a Diamond Scientific Adjuvans B (adj B). Tato adjuvans představují hlavní typy používané při výrobě vakcín. Adjuvans na bázi oleje představují FCA, FIA a ADJ B. Adjuvans na bázi vody jsou představována carbopolem. Inaktivovaný PRRSV ISU-P může popřípadě obsahovat vhodnou chránicí látku.

Vakcínové přípravky s FCA a FIA byly připraveny emulgací inaktivovaného viru, obvykle ve stejných objemech inaktivované virové kapaliny a adjuvans za použití 18 guage dvojitého luer uzavíracího zařízení a dvou stříkaček. Kapaliny byly stlačovány opakovaně sestavou mezi stříkačkami až do vytvoření husté polopevné emulze. Emulze byly plněny přímo do stříkaček pro podávání.

Vakcínové přípravky s Adj B byly připraveny smísením zásobního Adj B se stejným objemem inaktivované PRRSV ISU-P virové kapaliny. Adjuvans a virus byly míseny za míchání při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny. Vakcína s adjuvans byla asepticky přenesena do sterilních multidávkových lahvíček a skladována při teplotě 4 °C před podáním.

Vakcíny na bázi carbopolu byly připraveny smísením zásobního carbopolového adjuvans s inaktivovanými virovými kapalinami na konečnou koncentraci adjuvans 10 % obj./obj. Adjuvans a virus byly smíseny mícháním při teplotě místnosti po dobu 4 hodin. Vakcína s adjuvans byla asepticky přenesena do sterilních multidávkových lahvíček a skladována při teplotě 4 °C před podáním.

PRRSV ISU-P virus v preinaktivačním titru nízkém až $10^{5,0}$ FAID₅₀/ml byl použit v různých vakcínových přípravcích, jak je popsáno v tomto textu.

Za účelem prokázání, že PRRSV izolát ISU-P by mohl chránit proti reprodukčnímu a respiračnímu syndromu vepřů, byly provedeny dvě studie vakcinace/podnět. V první studii byly 4 mladé prasnice imunizovány živým PRRSV ISU-P oronasálním vystavením viru buď přímou cestou nebo kontaktem s nemocnými selaty. Dvě mladé prasnice stejného stáří byly ponechány neimunizované (nevystavené) a byly ustájeny odděleně a sloužily jako kontrola. Přímou vystavené vakcináty (č. 57 a č. 58) dostaly 3,0 ml virového inokula intranasálně. Tyto prasnice serokonvertovaly 14 dnů po vystavení podle Indirect Fluorescent Antibody Test. Kontaktů vystavené mladé prasnice (č. 476 a č. 480) byly imunizovány orální cestou po umístění do těsného kontaktu s nemocnými selaty. Tato selata serokonvertovala 90 dnů po expozici. Serokonverze je indikována IFA titrem vyšším než 1 : 20.

Poté co imunizované mladé prasnice serokonvertovaly, byl jejich estrus synchronizován a byly březí. Březost byla potvrzena ultrazvukem. 90. den březosti dostaly vakcinované a kontrolní březí mladé prasnice 3,0 ml PRRS virového podnětu intranasálně při titru 1×10^4 FAID₅₀.

Kontrolní mladé prasnice č. 52 a č. 477 demonstrují časné znaky choroby tím, že mají sníženou chuť ke krmení a zvýšené tělesné teploty (39,4–39,9 °C) dva až tři dny po podnětu. Žádné klinické znaky nebyly zaznamenány u ISU-P vystavených (vakcinovaných) mladých prasnic. Tyto výsledky demonstrují ochranu před klinickým syndromem respirační choroby.

Všechny mladé prasnice byly chovány až do odstavení mládřat (4 týdny po vrhu). Tabulka 2 ukazuje výsledky z tohoto pokusu.

Výsledky jsou u vrhu zaznamenány jako délka březosti (délka březosti je normálně zkrácena PRRS infekcí), mrtvě narozenými nebo mrtvými plody, oslabenými selaty a mumiemi. Tyto obtíže při vrhu jsou všechny indikací pro PRRS infekci u březích mladých prasnic nebo prasnic. Navíc byl zaznamenán počet normálních selat.

Žádná z kontrolních mladých prasnic nevrhla normální selata (0 až 22 selat je normální). Sedm (7) ze 22 selat se narodilo mrtvých a 15 až 22 selat bylo oslabených. Délka březosti u kontrolních mladých prasnic byla zkrácena o 2,5 dne, což je typické pro PRRS u březích prasnic. V imunizované skupině ($n = 50$) 40 selat nebo 80 % bylo narozeno normálně. Šest (6) z 50 selat bylo narozeno mrtvých a 4 z 50 plodů sejevily při vrhu jako mumifikované. Ve vakcinované skupině nebyla žádná oslabená selata. Je zřejmé, že mladé prasnice předem vystavené živému PRRSV ISU-P, které byly zabřeznuty a pak jim byl podán podnět, jsou chráněny před podnětem, jak je demonstrováno ztrátou přímých klinických znaků choroby u mladých prasnic a ochranou plodů, které nesou.

Je zřejmé, že protože IFA testovací činidla, která byla použita pro stanovení serostatusu mladých prasnic v této studii, byla odvozena od PRRSV ISU-P a protože je zde přímý vztah mezi stavem séra mladých prasnic a ochranou před PRRS, PRRSV ISU-P izolát by mohl být použitelný v diagnostických testech, jako jsou Indirect Fluorescent Antibody testy, jak je zde demonstrováno, ELISA-testech, zkouškách sérové neutralizace, Direct Fluorescent Antibody zkouškách a jiných diagnostických zkouškách. Proto mohou být podle vynálezu připraveny a použity diagnostické zkoušky odvozené od antigenu získaného z PSSSV ISU-P.

Ve druhé studii vakcinace/podnět, byla mladá selata (4 až 6 týdnů stará) vakcinována několika inaktivovanými, adjuvans obsahujícími PRRSV ISU-P vakcínami. Vakcínový antigenový pool byl připraven inaktivací PRRSV ISU-P s BEI jak bylo dříve uvedeno a zpracován s přísadou buď Carbopol, FCA/FIA nebo Adj B. Druhý vakcínový pool byl připraven inaktivací PRRSV ISU-P s formalinem jak již bylo popsáno a zpracován se stejnými uvedenými 3 přísadami. Byly připraveny tři imitované vakcíny za účelem potvrzení toho, že přísady a buňky by neměly stimulovat falešnou imunologickou odpověď. Imitované vakcíny byly připraveny přidáním neinfikovaných buněk tkáňové kultury. Každou vakcínou byla infikována dvě selata. Vakcíny byly podávány subkutánně ve dnech 0, 21, 42 a 64. Sedm dní po poslední vakcinaci byl selatům podán podnět intranasálně $10^{3.5}$ FAID₅₀ virulentního živého PRRSV. Všechna selata byla po podnětu denně sledována na klinické znaky choroby. Navíc byly odebrány vzorky krve a zpracovány pro získání viru ve tkáňové kultuře. Živý virus nalezený v krevním proudu po podnětu znamená, že se objevila viremie.

Sérové neutralizační titry byly hodnoceny na počátku studie, v den podnětu a 19 dnů po podnětu. Je třeba poznamenat, že test sérové neutralizace je méně citlivý než IFA test použitý v předchozí studii. Proto nebylo možno porovnat tyto titrové výsledky s předcházejícími titrovými výsledky.

Tabulka 3 uvádí výsledky podnětu. Nebyly pozorovány žádné klinické znaky choroby u vakcinovaných nebo kontrolních selat. Dále ani vakcináty ani kontroly nevyvinuly titry sérové neutralizace během vakcinační periody. Toto indikuje, že nebyly vystaveny živému viru během této časové periody (kontroly zůstaly negativní) a také to indikuje, že vakcíny nestimulovaly humorální odezvu dosti vysokou k tomu, aby byla měřena sérovým neutralizačním testem. Skutečnost, že sérová neutralizace titrové odezvy po podnětu byla významná indikuje, že všechna selata byla účinně podnícena živým PRRS virem. Ověřením tohoto vystavení podnětu jsou procenta kontrolních selat demonstrujících viremii. Všechna kontrolní selata bez jednoho (87,5 %) byla infikována. Imunitní odpověď u vakcinovaných selat byla tak silná, že byla schopna blokovat viremii. Pouze 1 ze 12 vakcinovaných selat (8,3 %) demonstrovalo viremii. Vakcína tak chrání 91,7 % selat.

Aniž by následující skutečnosti byly omezovány nebo vázány na nějakou teorii, předpokládá se, že zesilující pasážování původního PRRSV izolátu přes specificky upraveny klon MA104(M) African Green Monkey Cells (9009B) mohlo úspěšně změnit jeden nebo více epitopů viru, což vede ke zvýšené imunogenicitě tohoto viru a je tak umožněna výroba vakcíny v oblasti, kde dosud vědci nebyl úspěšní.

Tabulka 1: Reprodukce pozdního abortu a reprodukčního selhání u prasnic vystavených PRRSV izolátu ISU-P ve srovnání s nevystavenými kontrolními prasnicemi

I. PRRS vystavená skupina

prasnice č. (a)	doba březosti	příprava viru	mrtvě nar.	oslabená	mumie	normální
57	112 dnů	PRRS-hm ^b	6	8	0	0
54	108 dnů	PRRS-hm	6	1	0	0
649	112 dnů	PRRS-hm	3	7	0	0
58	112 dnů	PRRS-hm	4	4	3	0
166	112 dny	PRRS-tc ^c _d	0	2	6	1
164	113 dnů	PRRS-tc	2	2	5	1
80	110 dnů	PRRS-tc ^e	2	2	2	2
celkem			23	26	16	4

5 a = normální doba březosti prasnic je 114

b = PRRSV pozitivní gnotobiotický plicní homogenát selat jako inokulum

c = tkáňová kultura získaná z PRRSV, 10^{3,0} fluorescentní protilátková infekční dávka 50 na ml (FAID₅₀/ml)

d = tkáňová kultura odvozená od PRRSV, 10^{4,0} FAID₅₀/ml

10 e = tkáňová kultura odvozená od PRRSV, 10^{5,0} FAID₅₀/ml

II. Nevystavená kontrolní skupina

prasnice č.	délka březosti	příprava viru	mrtvě nar.	oslabená	mumie	normální
52	114 dnů	na	0	0	0	11
56	115 dnů	na	0	0	0	12
163	116 dnů	na	1	0	0	7
celkem			1	0	0	30

15

Tabulka 2: Výsledky vrhu ISU-P imunizovaných a neimunizovaných mladých prasnic

prasnice č.	IFA titr	délka březosti	mrtvě narozená nebo mrtvá	oslabená selata	mumie	normální
57V	+	113 dnů	2 ^x	0	0	7
58V	+	114 dnů	4	0	3	11
476V	+	113 dnů	0	0	1	10
480V	+	114 dnů	0	0	0	12
52C	-	111 dnů	5	7	0	0
477	-	112 dnů	2	8	0	0
celkem			6 vakc. 7 kont.	0 vakc. 15 kont.	4 vakc. 0 kont.	40 vakc. 0 kont.

+ označuje IFA titr nad 20

20 - označuje IFA titr pod 20

V označuje vakcináty

C označuje kontroly

Tabulka 3: Souhrn pokusů s PRRSV inaktivovanou vakcínou

Vakcínová skupina	průměrná SN každého podnětu	průměrná SN každého podnětu ^a	virová izolace
BEI, PRRS–Carbopol n=2	<1:2	1:82	neg/neg.
BEI, PRRS–FCA/FIA n=2	<1:2	1:4	neg/neg.
BEI, PRRS–Adj B n=2	<1:2	1:5	neg/neg.
Form., PRRS–Carbopol n=2	<1:2	1:23	neg/poz.
Form., PRRS–FCA/FIA n=2	<1:2	1:2	neg/neg.
Form., PRRS–AdjB n=2	<1:3	1:8	neg/neg.
imitovaná vakcínová skupina			
imitace AG–carbopol n=2	<1:2	<1:2	poz/poz.
imitace AG–FCA/FIA n=2	<1:2	<1:2	poz/poz.
imitace AG–AdjB n=2	<1:2	<1:2	poz/poz.

a = SN odezva 19. den po podnětu, ukončení pokusu

- 5 b = virová izolace z plazmy v jakoukoliv dobu během 19. dne po podnětu periody testu
virová izolace detekována CPE v 9009B buňkách a potvrzená FA vybarvením stejného PRRSV skupinou specifické monoklonální protilátky SDOW17

- 10 I když byl vynález podrobně popsán za účelem ilustrace, je třeba chápat, že to bylo provedeno pro účely ilustrace a že je možno učinit různé variace, což bude zřejmé odborníkům v oboru, aniž by byl porušen rozsah a myšlenka vynálezu, který je omezen pouze předloženými nároky.

15

PATENTOVÉ NÁROKY

- 20 1. Izolát viru vepřového reprodukčního a respiračního syndromu (RRSV) označený jako ISU–P a uložený pod přístupovým číslem ATCC VR 2402.

- 25 2. Způsob kultivace PRRSV izolátu podle nároku 1 ve tkáňové kultuře, která je citlivá na infekci, pro replikaci viru na množství dostatečné k ochraně živočichů před PRRS nebo identifikaci molekulové struktury PRRSV pro vývoj rekombinantních produktů, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že zahrnuje inokulaci tkáňové kultury virem a získání replikovaného viru.

3. Způsob podle nároku 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že tkáňová kultura obsahuje buněčnou linii.

- 30 4. Způsob podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že tkáňovou kulturou je buněčná linie „African Green Monkey Kidney“.

5. Tkáňová kultura obsahující PRRSV izolát podle nároku 1.

- 35 6. Tkáňová kultura podle nároku 5 v průmyslovém měřítku nad 25 litrů při fluorescenční protilátkové infekční dávce 50 na ml, FAID₅₀ titru větším než 10^{5,0}/ml.

- 40 7. Způsob přípravy vakcíny účinné při ochraně vepřů před PRRS, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se připraví izolát PRRSV podle nároku 1, uvolní se virus do tkáňové kultury a upraví se antigenní hmotou zředěním, zkoncentrováním nebo extrakcí, přičemž se získá imunologicky účinné množství antigenní hmoty pro modifikovaný živý zeslabený, inaktivní, podjednotkový nebo rekombinantní přípravek.

8. Vakcína obsahující PRRSV izolát podle nároku 1.
- 5 9. Vakcína připravená postupem podle nároku 7, kde PRRSV je modifikovaný živý zeslabený, a je v kapalně, zmrazené nebo vysušené formě.
- 10 10. Vakcína podle nároku 8 nebo 9, kde PRRSV je inaktivován a smísen s adjuvans a případně obsahuje vhodnou konzervační přísadu.
11. Vakcína podle nároku 10, kde adjuvans je buďto na bázi oleje nebo na bázi vody.
12. Vakcína podle nároku 11, kde adjuvans je vybráno ze skupiny zahrnující Freundovo kompletní adjuvans a Freundovo nekompletní adjuvans.
- 15 13. Vakcína podle nároku 11, kde inaktivovaným činidlem je binární ethylenimin, beta propiolakton nebo formalin.
- 20 14. Vakcína podle nároku 9, kde tkáňovou kulturou je buněčná linie „African Green Monkey Kidney“.

Konec dokumentu
