

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 307 299

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*A61K 39/112* (2006.01)  
*C12N 1/36* (2006.01)  
*C12N 1/21* (2006.01)  
*C12R 1/42* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011-887**  
(22) Přihlášeno: **27.12.2011**  
(40) Zveřejněno: **10.07.2013**  
**(Věstník č. 28/2013)**  
(47) Uděleno: **11.04.2018**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **23.05.2018**  
**(Věstník č. 21/2018)**

(56) Relevantní dokumenty:

MATSUI HIDENORI ET AL: "Oral immunization with ATP-dependent protease-deficient mutants protects mice against subsequent oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MACROBIOLOGY, USA, 71, 2003, 30-39, XP002408911; RYCHLIK IVAN ET AL: "Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens", BMC MICROBIOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD, GB, 9, 2009, 268, XP021066329; KARASOVA DANIELA ET AL: "Influence of 5 major *Salmonella* pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis", BMC MICROBIOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD, GB, 10, 2010, 75, XP021066329.

(73) Majitel patentu:

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.,  
Brno, CZ

(72) Původce:

Ing. Daniela Karasová, Ph.D., Brno, CZ  
Mgr. Alena Šebková, Brno, CZ  
Ing. Hana Havlíčková, Brno, CZ  
Mgr. Marta Matulová, Sobůlky, CZ  
Mgr. Magdaléna Crhánová, Brno, CZ  
MVDr. Jirí Volf, Ph.D., Brno, CZ  
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D., Velešovice, CZ  
MVDr. František Šišák, CSc., Brno, CZ  
doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D., Velešovice, CZ

(74) Zástupce:

PATENTOVÁ KANCELÁŘ, Mgr. Hana Jirkalová,  
Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4

(54) Název vynálezu:

**Živý oslabený kmen *Salmonella enterica* pro  
orální vakcinaci hospodářských zvířat**

(57) Anotace:

Živý oslabený kmen zoopatogenního mikroorganismu *Salmonella enterica* CAPM 6449, který je oslabený dvěma nezávislými modifikacemi, je určený pro orální vakcinaci kuřat, a je uložený ve Sběrce zoopatogenních mikroorganismů v Brně, CZ. Tento kmen mikroorganismu *Salmonella enterica* nesoucí zároveň mutaci SPI-1 inaktivující funkci sekrečního systému typu III kódovaného ostrovem patogenity SPI-1 a mutaci lon inaktivující funkci Lon proteázy je vhodný pro výrobu živé oslabené vakcíny na ochranu chovů zejména kuřat.

## **Živý oslabený kmen *Salmonella enterica* pro orální vakcinaci hospodářských zvířat**

### Oblast techniky

5

Řešení se týká živého oslabeného kmene *Salmonella enterica* pro orální použití na ochranu hospodářských zvířat před infekcí salmonelami formou atenuované vakcíny.

### Dosavadní stav techniky

Vakcinace hospodářských zvířat proti infekci salmonelami lze provádět dvěma typy vakcín – inaktivovanými anebo živými oslabenými. Vzhledem k patogenezi onemocnění však oslabené živé vakcíny poskytují výrazně vyšší ochranu před infekcí než vakcíny inaktivované (Papezova aj. 2008, Vet. Med. Czech 53, 315; Robertsson aj. 1983, Infect. Immun. 41, 742; Silva aj., 1981, Avian Dis. 25, 38-52).

První oslabené živé salmonelové vakcíny byly získány dlouhodobým pasážováním v laboratoři nebo náhodnou mutagenezí indukovanou mutageny fyzikální (různé typy záření) nebo chemické povahy (např. působení nitrosoguanidinem). Tyto postupy umožnily selekci kmenů, u kterých byla následně prokázána snížená virulence, avšak se zachovanou imunogenitou. Přestože jsou tyto vakcíny funkční a jsou relativně extenzivně charakterizovány, skutečná příčina jejich oslabení není známa (Guzman aj., 2006, Vaccine 24, 3804-11; Smith 1956, J Hyg.(Lond);54, 419-32).

25

Proto se od poloviny 80. let dvacátého století testují geneticky modifikované vakcíny, tedy s přesně definovaným způsobem oslabení. U salmonel byly takto připraveny oslabené kmeny s inaktivovanými geny *aroA*, *aroD* nebo *phoP* (Cooper aj. 1990, Microb. Pathog. 9, 255; Hormaeche aj. 1996, Vaccine 14, 251; Groisman aj. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11939). Asi o 10 let později s nárůstem poznatků týkajících se virulence salmonel byly charakterizovány geny přímo se podílející na virulenci. Některé z těchto mutací, např. inaktivace genů lokalizovaných na ostrovu patogenity 2 (SPI-2), vede ke značnému oslabení až hraničící se ztrátou imunogenity, a naopak inaktivace genů lokalizovaných na ostrovu patogenity 3 (SPI-3) vede jen k mírnému oslabení virulence, které nemusí být dostatečné např. pro imunooslabené jedince. Proto se stále hledají nové možnosti, jak připravit vhodné oslabené kmeny salmonel pro orální užití.

Jak pro žádoucí úroveň oslabení, tak pro zvýšení bezpečnosti se proto testují i vakcíny, které jsou oslabeny dvěma mutacemi zároveň. Proto se takto testovala vakcína s inaktivovanými geny *htrA* a *aroA* (Tacket a Levine 2007, Clin. Infect. Dis. 45, S20) nebo geny *phoP* a *rpoS* (Methner aj. 2004, Vet. Microbiol. 98, 37-43).

### Podstata vynálezu

45

Uvedené nedostatky odstraňuje živý oslabený kmen zoopatogenního mikroorganismu *Salmonella enterica* CAPM 6449, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že tento kmen je oslabený dvěma nezávislými modifikacemi (vyjmutí genetického materiálu), je určený pro orální vakcinaci kuřat a je uložený ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů v Brně, CZ.

50

Podstatou vynálezu je také použití mikroorganismu *Salmonella enterica* CAPM 6449 nesoucího zároveň mutaci SPI-1 inaktivující funkci sekrečního systému typu III kódovaného ostrovem patogenity SPI-1 a mutaci lon inaktivující funkci Lon proteázy pro výrobu živé oslabené vakcíny na ochranu chovů kuřat.

55

Za účelem zvýšení bezpečnosti živé atenuované vakcíny pro orální užití u hospodářských zvířat byl tedy připraven kmen *Salmonella enterica*, u kterého původci vyjmuli z genomu celý ostrov patogenity SPI-1 a zároveň gen kódující Lon proteázu. Atenuace pomocí inaktivace funkcí kódovaných na SPI-1 byly původně opomíjeny, protože pro infekci Balb/C myši jsou tyto funkce postradatelné a SPI-1 mutant *Salmonella enterica* u Balb/C myši způsobuje letální infekci (Karasova aj. 2010, BMC Microbiology 10, 75). Avšak pro drůbež a prasata vede inaktivace SPI-1 ke snížení virulence (Rychlík aj. 2009, BMC Microbiology 9, 268). Gen *lon* kóduje proteázu, jejichž inaktivace vede k mírnému oslabení virulence jak u myši (Karasova aj. 2009, Vaccine 27, 5265), tak u drůbeže. Zároveň *lon* mutant zůstává imunogenní, a to jak u drůbeže, tak u myši. A v principu stejný postup, tedy dva nezávislé způsoby oslabení, uplatnili původci i při vývoji vakcíny, která je předmětem tohoto vynálezu.

Vzájemná kombinace mutací SPI-1 a *lon* pak vede k ideálnímu vakcinačnímu kmeni podle vynálezu, který

- i) je oslaben dvěma nezávislými mutacemi (zvýšená bezpečnost),
- ii) je velmi imunogenní (mutace v genu *lon* vede k nadprodukci kapsulárních polysacharidů, SPI-1 mutanti neindukují buněčnou smrt u makrofágů)
- iii) je snadno odlišitelný (nadprodukce kapsulárních polysacharidů vede k tvorbě mukoidních kolonií na běžných agarech a snadnému vizuálnímu odlišení vakcinačního kmene od libovolného terénního kmene *Salmonella enterica*).

Podstatou vynálezu je tedy současné užití kombinace dvou mutací, SPI-1 a *lon*, za účelem oslabení *Salmonella enterica* pro využití jako živé oslabené vakcíny na ochranu chovů hospodářských zvířat. Mutací SPI-1 se rozumí jakékoli inaktivace funkce sekrečního systému typu III kódovaného ostrovem patogenity SPI-1 (*Salmonella Pathogenicity Island 1*) a mutací *lon* se rozumí jakákoli inaktivace funkce Lon proteázy. Kmen mikroorganismu podle vynálezu byl ověřen původci v praxi ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v.v.i., Brno, CZ.

Následující příklady provedení kmene mikroorganismu podle vynálezu pouze dokládají, ale neomezuji.

#### Příklady uskutečnění vynálezu

##### Příklad 1

Oslabený kmen *Salmonella enterica* CAPM 6449 byl připraven pomocí lambda red rekombinace. Nejprve byly paralelně připraveny jednotlivé mutace, tedy delece SPI1 a delece genu *lon*. Po náhradě SPI1 za gen kódující rezistenci k chloramfenikolu byla tato modifikace přenesena do nového kmene *Salmonella enterica* transdukci P22 fágem. Následně byl gen kódující rezistenci k chloramfenikolu odstraněn pomocí flipázy kódované plazmidem pCP20. Do kmene s úplnou delecí SPI1 byla pomocí transdukce následně vnesena mutace *lon*::Cm a takto vytvořený kmen ( $\Delta$ SPI1 *lon*::Cm) byl využit pro testování imunogenity. Při vakcinačních pokusech byla kmenem *Salmonella enterica* CAPM 6449 ( $\Delta$ SPI1 *lon*::Cm) orálně vakcinována jednodenní kuřata linie ISA Brown. Kuřata byla orálně revakcinována o 3 týdny později a čelenžována divokým kmenem *Salmonella enterica* serovar Enteritidis o další 3 týdny později, tedy ve věku 42 dní. Čelenž byla prováděna jak orálně, tak intravenózně. Kuřata byla utrácena 4 a 14 dní po čelenži a výsledky jsou shrnuty v tabulce 1. Z tabulky vyplývá, že vakcinace chránila kuřata před infekcí divokou *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, protože počty salmonel ve tkáních vakcinovaných kuřat byly 10 až 100x nižší než u nevakcinovaných kontrol. I v případech, kdy

byla přítomnost salmonel prokázána pouze kvalitativně, byly ve skupinách vakcinovaných zvířat vždy nižší počty salmonella pozitivních než ve skupině nevakcinovaných zvířat.

5 Tabulka 1

10 Detekce salmonel v orgánech vakcinovaných a nevakcinovaných kuřat 4 (den 46) a 14 (den 56) dní po orální nebo intravenózní čelenži. Údaje v tabulce ukazují buď skutečné počty salmonel na gram tkáně (log CFU/g), anebo počet pozitivní z celkového počtu zvířat.

		játra		slezina		slepé střevo	
		den	den	den	den	den	den
		46	56	46	56	46	56
Bez vakcinace	p.o.	2 z 6	4 z 6	2 z 6	4 z 6	6 z 6	6 z 6
SPI1 lon vakcinace	p.o.	1 z 6	1 z 6	2 z 6	0 z 6	5 z 6	3 z 6
Bez vakcinace	i.v.	4,71	5 z 5	6,68	4,16	6 z 6	5 z 5
SPI1 lon vakcinace	i.v.	3,94	3 z 6	5,20	2,40	6 z 6	2 z 6

p.o. – orální čelenž, i.v. - intravenózní čelenž

15 Průmyslová využitelnost

Nový kmen mikroorganismu *Salmonella enterica* CAPM 6449, ve kterém byla připravena konkrétní kombinace mutací vedoucí k jeho žádoucímu oslabení se zachováním imunogenity po orální aplikaci. Tento kmen je vhodný jako orální živá vakcína hospodářských zvířat před salmonelovými infekcemi a to zejména u kuřat.

25 **PATENTOVÉ NÁROKY**

1. Živý oslabený kmen zoopatogenního mikroorganismu *Salmonella enterica* CAPM 6449, který je oslabený dvěma nezávislými modifikacemi, je určený pro orální vakcinaci kuřat a je uložený ve Sběrce zoopatogenních mikroorganismů v Brně, CZ.

2. Použití mikroorganismu *Salmonella enterica* CAPM 6449 podle nároku 1, nesoucího zároveň mutaci SPI-1 inaktivující funkci sekrečního systému typu III kódovaného ostrovem patogenity SPI-1 a mutaci lon inaktivující funkci Lon proteázy pro výrobu živé oslabené vakcíny na ochranu chovů kuřat.

40

---

Konec dokumentu

---