

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 672

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2012-361**
(22) Přihlášeno: **30.05.2012**
(40) Zveřejněno: **11.12.2013**
(Věstník č. 50/2013)
(47) Uděleno: **02.01.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **13.02.2019**
(Věstník č. 7/2019)

(56) Relevantní dokumenty:

KARASOVA D. et al.: „Comparative analysis of Salmonella enterica serovar Enteritidis mutants with a vaccine potential,“ Vaccine, vol. 27, no. 38, 2009, str. 5265 - 5270, ISSN 0264-410X; MATULOVA M. et al.: „Vaccination of chickens with Salmonella Pathogenicity Islands (SPI) 1 and SPI 2 defective mutants of Salmonella enterica serovar Enteritidis,“ Vaccine, vol. 30, no. 12, březen 2012, str. 2090 - 2097, ISSN 0264-410X; PATHANGHEY L. et al.: „Effect of expression level on immune responses to recombinant oral Salmonella enterica serovar Typhimurium vaccines,“ Vaccine, vol. 27, no. 20, 2009, str. 2707 - 2711, ISSN 0264-410X; PARK S-I. et al.: „Immune response induced by ppGpp-defective Salmonella enterica serovar Gallinarum in chickens,“ Journal of Microbiology, vol. 48, no. 5, 2010, str. 674 - 681, ISSN 1225-8873; CURTISS III R. et al.: „Salmonella enterica serovar Typhimurium strains with regulated delayed attenuation in vivo,“ Infection and Immunity, vol. 77, no. 3, 2009, str. 1071 - 1082, ISSN 0019-9567.

WO 2007 112 518; WO 2011 092 185; WO 2007 106 956.

(73) Majitel patentu:

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

(72) Původce:

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

(74) Zástupce:

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

(54) Název vynálezu:

**Vakcína pro orální podání hospodářským
zvířatům**

(57) Anotace:

Řešení se týká vakcíny pro orální podání hospodářským
zvířatům, která je charakterizována tím, že obsahuje živý
oslabený kmen zoopatogenního mikroorganismu
Salmonella enterica CAPM 6474, přičemž tento kmen je
oslabený třemi nezávislými modifikacemi založenými na
vyjmutí genetického materiálu, a je uložený ve Sbírcce
zoopatogenních mikroorganismů v Brně, CZ.

CZ 307672 B6

Vakcína pro orální podání hospodářským zvířatům

Oblast techniky

5

Řešení se týká vakcíny pro orální podání hospodářským zvířatům, která obsahuje živý oslabený kmen *Salmonella enterica* CAPM 6474 na ochranu hospodářských zvířat před infekcí salmonelami atenuovanou vakcínou s možností serologické diferenciací vakcinovaných a přirozeně infikovaných hejn.

10

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 mutagenézou 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). Proto se od poloviny 80. let dvacátého století testují geneticky modifikované vakcíny, tedy s přesně definovaným způsobem oslabení. Při přípravě definovaných mutantních kmenů lze navíc cíleně připravit kmeny, kterým chybí specifické antigeny, které stimulují u infikovaných zvířat produkci protilátek. Absence takového genu a jím kódovaného proteinu pak vede k absenci protilátek v séru vakcinovaných zvířat a vytvoření negativní markerové vakcíny.

Podstata vynálezu

Uvedené nedostatky odstraňuje vakcína pro orální podání hospodářským zvířatům podle vynálezu, jejíž podstata spočívá v tom, že vakcína obsahuje živý oslabený kmen zoopatogenního mikroorganismu *Salmonella enterica* CAPM 6474, přičemž tento kmen je modifikován třemi nezávislými vyjmutími genetického materiálu, a je uložený ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů v Brně, CZ.

40

Za účelem zvýšení bezpečnosti živé atenuované vakcíny pro orální užití u hospodářských zvířat původci dále modifikovali atenuovaný kmen, který je předmětem jejich přihlášky vynálezu PV 2011-887. Z kmene *Salmonella Enteritidis* SPI1 lon vyjmuli gen kódující hlavní strukturální protein bičíku. Po vakcinaci tímto kmenem byla zachována atenuace i imunogenita původního kmene *Salmonella Enteritidis* SPI1 lon, ale po vakcinaci kmenem SPI1 lon *fliC* nedocházelo k tvorbě anti-FliC protilátek, a to ani po intravenózní aplikaci vakcinačního kmene, která vede k masivní produkci protilátek proti LPS.

Vzájemná kombinace mutací SPI-1, lon a *fliC* tak vede k ideálnímu novému vakcinačnímu kmeni, který

50

- i) je oslaben dvěma nezávislými mutacemi (zvýšená bezpečnost),
- ii) je velmi imunogenní (mutace v genu *lon* vede k nadprodukcí 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*.
- iv) umožňuje serologickou diferenciaci vakcinovaných a přirozeně infikovaných hejn *Gallus gallus* na základě absence anti-FliC protilátek v séru vakcinovaných kuřat.

Podstatou vynálezu je tedy užití kombinace dvou mutací, SPI-1 a *lon*, za účelem oslabení *Salmonella enterica* pro využití jako živé oslabené vakcíny na ochranu chovů hospodářských zvířat a současně vyjmutí genu *fliC* umožňující serologickou diferenciaci vakcinovaných kuřat od kuřat přirozeně infikovaných *Salmonella Enteritidis* komerčně dostupnými ELISA soupravami. Připravený konstrukt je vhodný jako orální živá markerová vakcína hospodářských zvířat před salmonelovými infekcemi. Vakcína podle vynálezu byla ověřena původci v praxi ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v.v.i., Brno, CZ.

Následující příklady provedení vakcíny podle vynálezu pouze dokládají, ale neomezují.

Příklady uskutečnění vynálezu

20

Příklad 1

Vakcína pro orální podání hospodářským zvířatům podle vynálezu obsahuje živý oslabený kmen *Salmonella enterica* CAPM 6474, který byl připraven pomocí lambda red rekombinace. Nejprve byly paralelně připraveny jednotlivé mutace, tedy delece SPI1, delece genu *lon* a delece genu *fliC*. Po náhradě SPI1 za gen kódující rezistenci k chloramfenikolu byla tato modifikace přenesena do nového kmene *Salmonella enterica* transdukcí 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*. Gen kódující rezistenci k chloramfenikolu byl opět odstraněn pomocí flipázy kódované plazmidem pCP20 a do takto vytvořeného kmene (Δ SPI1 Δ *lon*) byla transdukcí vnesena mutace *fliC::Cm*. Kmen *Salmonella enterica* Δ SPI1 Δ *lon* *fliC::Cm* byl využit pro testování imunogenity. Při vakcinačních pokusech byla kmenem *Salmonella enterica* CAPM 6474 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. Vyplývá z ní, že vakcinace chránila kuřata před infekcí divokým kmenem *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, protože počty salmonel ve tkáních vakcinovaných kuřat byly 10x 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 salmonela-pozitivních kuřat než ve skupině nevakcinovaných kuřat. Absence serologické odpovědi na vakcinaci *Salmonella enterica* Δ SPI1 Δ *lon* *fliC::Cm* tvorbou anti-FliC protilátek je doložena na Grafu 1.

Tabulka 1

Imunizace kuřat *Salmonella Enteritidis* SPI1-*lon*-*fliC*

Vakcinace	den 42			4 DPI			14 DPI		
	čelenž	játra	slezina	sl. střevo	játra	slezina	sl. střevo		
SPI1- <i>lon</i> - <i>fliC</i>	p.o.	1/6	0/6	0/6*	0/6	1/6	2/6		
bez vakcinace		2/6	2/6	6/6	4/6	4/6	6/6		
SPI1- <i>lon</i> - <i>fliC</i>	i.v.	2,92±1,37 ^{&}	4,89±0,72 ^{&}	6/6	5/6	3,29±1,07	2/6		
bez vakcinace		4,71±0,39	6,68±0,42	6/6	5/5	4,16±0,38	5/5		

5

[&] signifikantně odlišné od skupiny bez vakcinace (t-test, $P < 0.05$)

* signifikantně odlišné od skupiny bez vakcinace (χ^2 test, $P < 0.05$)

p.o. – orální čelenž

i.v. – intravenózní čelenž

10

V Tabulce 1 jsou shrnuty výsledky detekce salmonel v orgánech vakcinovaných a nevakcinovaných kuřat 4 (den 46) a 14 (den 56) dní po orální nebo intravenózní infekci (DPI). Údaje ukazují buď skutečné počty salmonel na gram tkáně (log CFU/g) anebo počet pozitivních z celkového počtu zvířat.

15

Tvorba protilátek proti LPS a bičíkovému antigenu FliC po vakcinaci a infekci je znázorněna v Grafu 1.

20

Panel A, anti-LPS protilátky po orální vakcinaci (den 1 s revakcinací v den 21) a orální infekci v den 42 života kuřat.

Panel B, stejné jako na panelu A, ale pouze s tím rozdílem, že byly detekovány protilátky proti bičíkovému antigenu FliC.

25

Panel C, anti-LPS protilátky po orální a intravenózní vakcinaci (orální vakcinace v den 1, orální revakcinace v den 21, intravenózní revakcinace v den 42 života) a orální infekci v den 63 života kuřat.

30

Panel D, stejné jako na panelu C, ale pouze s tím rozdílem, že byly detekovány protilátky proti bičíkovému antigenu FliC. Protože při průkazu anti-FliC protilátek byla použita kompetitivní ELISA, nárůst anti-FliC protilátek je charakterizován poklesem v absorbanci.

Vysvětlivky ke Grafu 1:

kosočtverce, SPI1-*lon* vakcinovaná kuřata

35

čtverce, SPI1-*lon*-*fliC* vakcinovaná kuřata

kolečka, nevakcinovaná kuřata

* - signifikantně odlišné od neinfikovaných kontrol utracených v den 42 (panely A a B) nebo den 46 (panely C a D)

40

& - signifikantně odlišné od stejně starých nevakcinovaných, ale infikovaných kontrol. (vše t-test, $P < 0.05$)

Celkové složení vakcíny podle vynálezu a její dávkování

45

Vakcína podle vynálezu obsahuje pouze živý atenuovaný kmen *Salmonella enterica* CAPM 6474. Imunizační dávka byla 10^7 CFU vakcinačního kmene v 0,1 ml inokula na jedno kuře a jednu imunizaci. Při široké aplikaci se ale předpokládá imunizace orálně podáním v pitné vodě, přičemž dávka 10^7 CFU na kuře a dávku bude zachována. Kuřata jsou imunizována co nejdříve po vylíhnutí kuřat, ideálně v den 1 života s orální revakcinací 3 týdny po první vakcinaci.

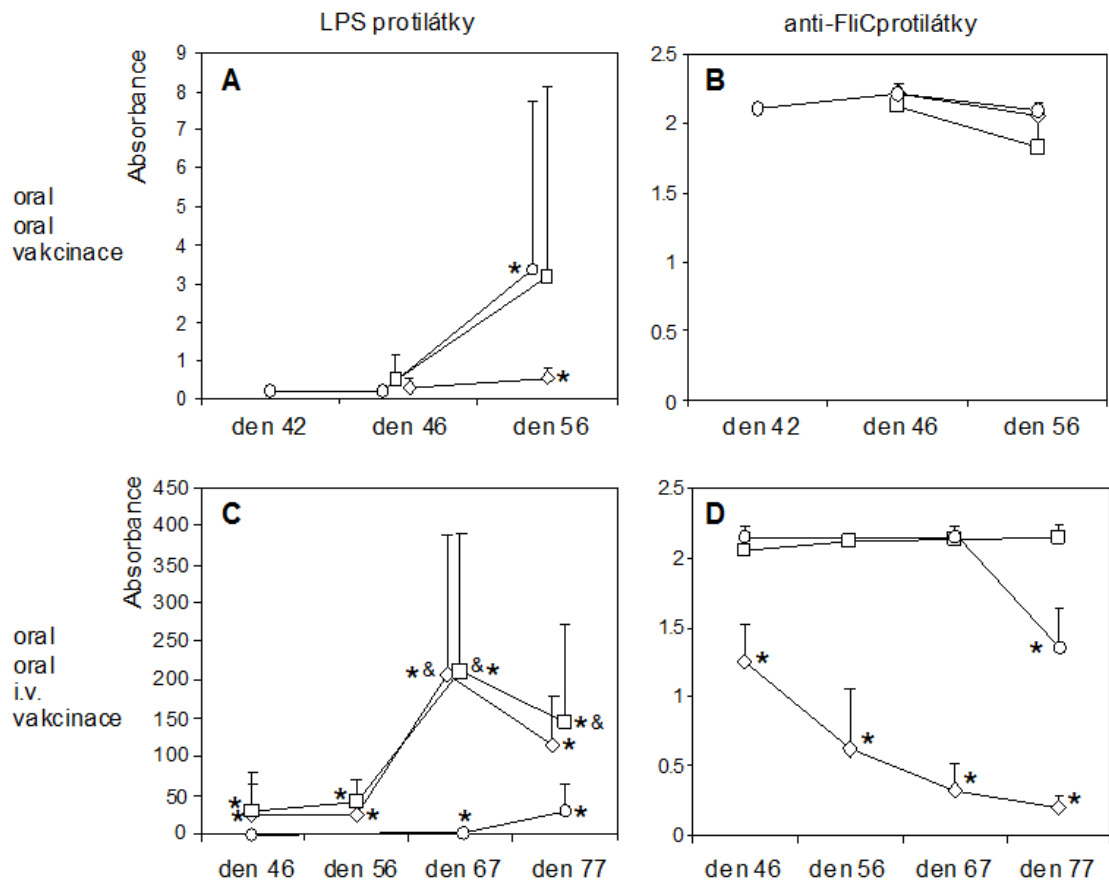
Průmyslová využitelnost

5 Nová vakcína pro orální podání hospodářským zvířatům obsahuje kmen mikroorganismu
Salmonella enterica CAPM 6474, ve kterém byla připravena konkrétní kombinace mutací
vedoucí k jeho žádoucímu oslabení se zachováním imunogenity a možností serologické
diferenciace po orální aplikaci. Serologická diferenciace umožňuje odlišení vakcinovaných hejn
od hejn přirozeně infikovaných divokými kmeny *Salmonella enterica*. Je proto vhodná jako
10 orální živá markerová vakcína na ochranu hospodářských zvířat před salmonelovými infekcemi.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 15 **1.** Vakcína pro orální podání hospodářským zvířatům, **vyznačující se tím**, že obsahuje živý
oslabený kmen zoopatogenního mikroorganismu *Salmonella enterica* CAPM 6474,
příčemž tento kmen je oslabený třemi nezávislými modifikacemi založenými na vyjmutí
genetického materiálu, a je uložený ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů v Brně,
20 CZ.

1 výkres



Graf 1