

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

33 420

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/102 (2006.01)
C12Q 1/30 (2006.01)
C12Q 1/689 (2018.01)
C07K 14/285 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36782**
(22) Přihlášeno: **21.10.2019**
(47) Zapsáno: **26.11.2019**

(73) Majitel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ

(72) Původce:
Mgr. Lenka Kavanová, Ph.D., Brno, Komín, CZ
MVDr. Katarína Matiašková, Brno, Lesná, CZ
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D., Tišnov, CZ
RNDr. Jiří Salát, Ph.D., Brno, Kohoutovice, CZ
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D., Velešovice, CZ
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D., Opava, Kateřinky, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitného vzoru:
**Vakcína proti bakterii *Haemophilus*
(*Glaesserella*) *parasuis*, a rekombinantní
antigen pro tuto vakcínu**

CZ 33420 U1

Vakcína proti bakterii *Haemophilus (Glaesserella) parasuis*, a rekombinantní antigen pro tuto vakcínu

5 Oblast techniky

Předmětem předkládaného technického řešení je veterinární vakcína ke zvýšení specifické odolnosti prasat proti infekci bakterií *Haemophilus parasuis*, a rekombinantní antigen pro tuto vakcínu.

10

Dosavadní stav techniky

Haemophilus (Glaesserella) parasuis je gramnegativní bakterie z čeledi *Pasteurallaceae*, která je často komenzálem horních cest dýchacích u prasat. Za jistých okolností však může způsobovat respirační onemocnění, akutní septikémie či systémové onemocnění (Glässerova choroba) charakterizované polyserositidami, polyartritidou a meningitidou (Amano a kol., 1994: Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. Journal of Veterinary Medical Science 56, 639-644; Peet a kol., 1983: *Haemophilus parasuis* septicemia in pigs. Australian Veterinary Journal 60, 187). Z důvodu nákladné antibiotické léčby a úhynu zvířat při akutním průběhu infekce je příčinou velkých ekonomických ztrát v chovech prasat po celém světě (Oliveira a kol., 2001: Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 13, 495-501).

25

Jedním z nejúčinnějších prostředků kontroly infekčních onemocnění je vakcinace. V současnosti používané vakcíny proti *H. parasuis* jsou inaktivované vakcíny obsahující celobuněčné bakteriny. Tyto vakcíny ovšem neposkytují ochranu proti více sérovarům vyskytujícím se v chovu a v dostatečné míře chrání zvířata pouze proti homolognímu kmeni (Smart a Miniats, 1989: Preliminary assessment of a *Haemophilus parasuis* bacterin for use in specific pathogen free swine. Canadian Journal of Veterinary Research 53, 390-393; Martin a kol., 2009: Effect of different valine formulations on the development of Glasser's disease induced in pigs by experimental *Haemophilus parasuis* infection. Journal of comparative pathology 140, 169-176). Z tohoto důvodu jsou hledány vhodné antigeny, které jsou dobře definované, a které jsou schopné vyvolat protektivní imunitní odpověď (Li a kol., 2015: Identification of secreted proteins as novel antigenic vaccine candidates of *Haemophilus parasuis* serovar 5. Vaccine 33, 1695-1701). Subjednotkové vakcíny mířené proti bakteriálním patogenům jako je *H. parasuis* se často zaměřují na faktory virulence, které souvisí se schopností bakterie vyvolat onemocnění (Li a kol., 2017: Identification of novel *Haemophilus parasuis* serovar 5 vaccine candidates using an immunoproteomic approach. Journal of Proteomics 163, 111-117).

40

Enzym kataláza je antioxidant sloužící jako obrana proti respiračnímu vzplanutí fagocytujících buněk. Již dříve bylo zjištěno, že protein kataláza by mohl být jedním z virulentních faktorů, které bakterii *H. parasuis* napomáhají v boji proti imunitním mechanismům hostitele (Matiaszkova a kol., 2019: A crude capsular polysaccharide extract as a potential novel subunit vaccine with cross-protection against the most prevalent serovars of *Glaesserella (Haemophilus) parasuis* in the Czech Republic. Veterinarni Medicina 64, 392-399; Li a kol., 2015: Identification of secreted proteins as novel antigenic vaccine candidates of *Haemophilus parasuis* serovar 5. Vaccine 33, 1695-1701). Navíc, tento antigen má pravděpodobně imunogenní vlastnosti (Matiaszkova a kol., 2019: A crude capsular polysaccharide extract as a potential novel subunit vaccine with cross-protection against the most prevalent serovars of *Glaesserella (Haemophilus) parasuis* in the Czech Republic. Veterinarni Medicina 64, 392-399).

55

Podstata technického řešení

Úkolem předkládaného technického řešení je zlepšit imunoprotektivitu veterinárních vakcín proti bakterii *Haemophilus (Glaesserella) parasuis*, a tím účinně zabránit rozšiřování této bakteriální infekce v chovech prasat.

Předmětem předkládaného technického řešení je vakcína proti bakterii *Haemophilus (Glaesserella) parasuis*, která obsahuje rekombinantní protein katalázu (rHktE) bakterie *Haemophilus parasuis*, a také tento rekombinantní protein (antigen).

Vakcína podle tohoto technického řešení obsahuje rekombinantní protein rHktE se sekvencí aminokyselin:

```
SGGMYKCPFDHGSKTLTTAAGAPVVDNDNTMSAGPRGPLLLQDVWFQEKLAHFARERI
PERVVHAKGSAA YGTFTVTADITKYTKAAVFKPGAQTEVLLRFSTVAGERGAADAERD
VRGFSLFKYTEQGNWDLVGNNTPVFFIRDPLKFPDFIHTQKRNPQTNLRDANAAWDFWS
RHPESMHQIMTLFSDRGIPATLRHMNGYGSHTYSFVNANNERFWVKFHFKTQQGHKFF
TNEEAAKVVGEDRESSQKDLYEAIERGEFPRWTVQVQIMPEADAHKHNYAFDLTKVWP
HADYPVIEVGVLELNRNPQNYFAEVEQAAFAPSNIVPGIGFSPDRMLQGRLFSYQDAQR
YRLGVNHHQIPVNAPKCSYHTTTHRDGAMRVDANGGNHPNYAPNRFDTYVPTHDQLPL
QIEREAAHFNFREYDEDYYSQPAALYNLFTAEEKDRLAGNFAAGLSGVTIPEIVERQMA
HFEKVSPELANAIRQKLA (SEQ ID NO. 1)
```

Rekombinantní kataláza používaná ve vakcíně podle tohoto technického řešení má kódující nukleotidovou sekvenci:

```
ATGTATAAATGTCCATTTGATCACGGATCAAAAACCTTAACAACAGCAGCAGGGGCC
CCTGTTGTTGATAATGACAACACAATGTCTGCTGGCCACGTGGTCCACTTCTTTTAC
AAGATGTATGGTTTCAAGAGAAATTAGCACACTTTGCTCGTGAGCGTATTCTTGAGC
GTGTGGTTCACGCTAAAGGTTACGACGCTTACGGTACATTCACTGTCACTGCAGATA
TTACCAAATACACAAAAGCTGCAGTATTTAAACCGGGAGCACAACTGAAGTATTAT
TACGTTTCTCAACTGTTGCTGGTGAGCGTGGGGCTGCCGATGCAGAGCGTGACGTGC
GTGGTTTTTTCATTAATAATTCTATACAGAACAAGGTAACCTGGGACTTAGTGGGTAACA
ATACACCCGATTTTTTATCCGTGATCCATTAATAATCCAGATTTTATCCATACACA
AAAACGTAATCCACAACTAACTTGCGTGACGCGAATGCAGCGTGGGATTTCTGGTC
ACGTCACCCTGAATCAATGCACCAAATTATGACATTGTTCTCAGATCGTGGTATTCTT
GCGACTTTACGTCATATGAACGGTTACGGTAGCCACACTTATAGCTTTGTAAACGCA
ACAACGAGCGTTTCTGGGTGAAATTCCACTTCAAAAACACAACAAGGTCACAAATTC
TTCCTAACGAAGAAGCGGCTAAAGTTGTAGGTGAAGATCGTGAATCTAGCCAAAA
AGATTTATATGAAGCGATTGAGCGTGGTGAATTCCTCGCGTTGGACTGTTCAAGTGCA
GATTATGCCAGAAGCAGATGCTCACAAACATAACTATGCCTTTGACTTAACTAAAGT
ATGGCCACACGCAGATTACCCTGTGATCGAAGTGGGTGTATTAGAGTTAAACCGCAA
TCCACAAAATACTTTCGCAGAAGTAGAGCAAGCAGCGTTTGCACCATCTAACATCGT
TCCGGGAATCGGCTTCTCACCAGACCGTATGTTACAAGGTCGTCTGTTCTCTTACCAA
GATGCACAGCGTTACCGTTTGGTGTAAACCACCACCAAATCCCTGTAAATGCACCA
AAATGCTCATAACCACACGACTACCGTGATGGTGCAATGCGTGTAGATGCAAACGGT
GGTAACCACCCTAACTACGCTCCGAACCGTTTTGATACTTATGTGCCAACCCACGAT
CAATTACCATTACAAATTGAGCGTGAAGCTGCACACTTTAACTTCCGTGAGTACGAT
GAAGATTACTACTACAACCGGCAGCACTTTATAACTTGTTTACAGCGGAAGAAAAA
GATCGCTTAGCAGGTAACCTTGCTGCAGGTTTATCAGGTGTGACTATCCCTGAAATC
GTAGAAAGACAAATGGCTCACTTTGAAAAAGTTAGCCCGGAATTAGCAAATGCGAT
TCGTCAAAAATTAGCAAATAA (SEQ ID NO. 2)
```

Vakcína podle tohoto technického řešení dále obsahuje alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku, s výhodou vybranou ze skupiny zahrnující rozpouštědla, stabilizátory,

imunogenní adjuvanty, inaktivační činidla. Imunogenním adjuvancem je s výhodou hydroxid hlinitý.

5 Vakcína podle tohoto technického řešení může být zejména ve formě pro subkutánní, intramuskulární nebo intradermální podání.

Dalším předmětem předkládaného technického řešení je sada primerů pro amplifikaci genu katalázy bakterie *Haemophilus parasuis*, sestávající z:

10 forward primeru o sekvenci: ATGTATAAATGTCCATTTGATCACGG (SEQ ID NO. 3), a
reverse primeru o sekvenci: TTATTTTGCTAATTTTGACGAATCGC (SEQ ID NO. 4).

15 Místa pro nasedání primerů jsou v kódující sekvenci SEQ ID NO. 2 vyznačena podtržením.

Gen katalázy HktE amplifikovaný s pomocí této sady je vhodný pro rekombinantní přípravu katalázy pro vakcínu podle předkládaného technického řešení.

20 Objasnění výkresů

Obr. 1: Purifikace rekombinantního proteinu katalázy. (1) purifikovaná kataláza. (2) kataláza po štěpení pomocí TEV proteázy a odštěpení ubikvitinu. (3) Sražená TEV proteáza odstraněna ze vzorku po odštěpení ubikvitinu. (4) Před purifikací na GPC. (5) Po purifikaci na GPC.

25 Obr. 2: Produkce specifických protilátek proti rekombinantnímu proteinu katalázy *H. parasuis* u imunizovaných a neimunizovaných myší.

30 Obr. 3: Hodnocení experimentální vakcíny založené na rekombinantním proteinu kataláza.

Příklad uskutečnění technického řešení

35 Příklad 1: Příprava antigenu a složení vakcíny

Příprava antigenu

40 Gen pro katalázu byl amplifikován z genomické DNA bakterie *H. parasuis* terénního kmene CAMP 6475 (Sbírka zoonozních mikroorganismů, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno) izolovaného z mozku uhynulého prasete (sérovár 5) pomocí PCR. Primery použité pro amplifikaci genu HktE (gen pro katalázu) jsou uvedeny v tabulce. K primerům byly přidány 15bázové přesahy homologní k použitému vektoru, které dále slouží pro napojení sekvence na vektor.

	5' → 3'
F:	ATGTATAAATGTCCATTTGATCACGG (26 bází, SEQ ID NO. 3)
R:	TTATTTTGCTAATTTTGACGAATCGC (27 bází, SEQ ID NO. 4)

45 PCR produkty byly klonovány do vektoru pomocí GeneArt Seamless Cloning and Assembly Kit (ThermoFischer Scientific) za použití buněk *E. coli* DH10B. Plazmid byl dále v těchto buňkách amplifikován a izolován pomocí EZNA Plazmid DNA Mini kit I (Omega). Plazmid byl transformován do bakteriální kultury *E. coli* BL21 (DE3), která byla kultivována v LB médiu (Sigma-Aldrich). Přítomnost plazmidu byla ověřena pomocí PCR amplifikace a následné DNA
50 sekvenace. Expresce proteinu v klonu *E. coli* BL21 (DE3) byla indukována přidáním 1 mmol/l

IPTG (izopropyl- β -D-galaktopyranozidu). Rekombinantní protein byl separován pomocí fúzní značky HisTag na Ni-chelatační chromatografii (HisTrapTM FF kolona; GE Healthcare). Po separaci byla přidána rekombinantní TEV proteáza pro odštěpení ubikvitinu a His-tagu, který byl následně odstraněn pomocí gelové chromatografie (GPC) (Superose 6; GE Healthcare). V rámci tohoto kroku byl protein převeden do DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; Lonza). Koncentrace získaného proteinu byla 0,5 mg/ml.

Purifikovaný protein byl pro kontrolu separován na 12,5% SDS-PAGE gelu a vizualizován pomocí Coomassie brilliant blue (Sigma-Aldrich) (Obr. 1).

Složení vakcíny

Jedna dávka vakcíny obsahovala 10 μ g rekombinantního proteinu katalázy. K tomuto antigenu bylo přidáno 50 μ l adjuvans (hydroxid hlinitý ve formě 2% Alhydrogelu; InvivoGen) a dále 80 μ l DPBS. Celkový objem jedné dávky vakcíny byl 150 μ l.

Příklad 2: Ověření imunogenity vakcíny na myším modelu

Samice myši BALB/c staré 6 týdnů byly náhodně rozděleny do 9 skupin po 6 myších. Pět skupin bylo imunizováno 150 μ l připravené vakcíny s připraveným rekombinantním proteinem a čtyřem skupinám byla podána suspenze Alhydrogel[®] adjuvant 2% (50 μ l) s DPBS (100 μ l). Vakcinace byla provedena subkutánně. Myši byly imunizovány celkem třikrát ve čtrnáctidenních intervalech. Týden po poslední imunizaci byla myším odebrána krev pro detekci specifických protilátek (Tab. 1). Množství protilátek bylo stanovené metodou ELISA, ve které byl jako antigen použit rekombinantní protein katalázy *H. parasuis* (viz kap. Příprava antigenu).

Postup při detekci specifických protilátek metodou ELISA

Na 96jamkovou mikrotitrační destičku MaxiSorp (NuncTM; Schoeller Pharma) bylo naneseno 100 μ l antigenu (rekombinantní protein kataláza *H. parasuis*) o koncentraci 1 μ g/ml, který byl naředěn v uhličitan-bikarbonátovém pufru (pH 9,6) a inkubován přes noc při 4 °C. Druhý den byly jamky promyty 4 \times 300 μ l promývacího roztoku (PBS, 0,05% Tween-20). Nеспецифická vazebná místa byla blokována pomocí 200 μ l blokovacího roztoku (PBS; 0,5% kasein; 10% sacharóza) po dobu 30 minut při 37 °C. Po odstranění blokovacího roztoku bylo na desku naneseno 100 μ l vzorku o ředění 1:100. Vzorky byly ředěny ředícím roztokem (PBS; 0,5% kaseinový hydrolyzát; 0,05% Tween-20). Vzorky byly na destičce inkubovány při 37 °C po dobu 1 hodiny. Následně byly jamky promyty 4 \times 300 μ l promývacího roztoku a poté bylo přidáno 100 μ l konjugátu Goat anti Mouse IgG-Fc Fragment (Bethyl; LuBioScience GmbH) ředěný v poměru 1:10 000 v ředícím roztoku. Destička byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Jamky byly následně promyty 4 \times 300 μ l promývacího roztoku a bylo přidáno 100 μ l substrátu TMB-Complete 2 solution (TestLine). Reakce byla zastavena přibližně po 10 minutách 50 μ l 1M kyseliny sírové. Absorbance byla odečítána při 450 nm za použití přístroje Synergy H1 (BioTek).

Z výsledků vyplývá (Obr. 2), že připravený rekombinantní protein je velmi silně imunogenní a tvoří se proti němu velké množství specifických protilátek.

Příprava a aplikace infekční dávky

Dva týdny po poslední imunizaci byly myši intraperitoneálně (IP) infikovány dvěma různými sérovary bakterie *H. parasuis* o stejné infekční dávce (v objemu 250 μ l) (Tab. 1). Pro infekci byl použit homologní sérovar 5 (HP5) kmene CAMP 6475 (Sbírka zoopatogenních mikroorganismů, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno) izolovaného z mozku uhynulého prasete a heterologní sérovar 1 (HP1) referenčního kmene č. 4 získaného od dr. K. R. Mittala (Fakulta veterinární medicíny, Univerzita Montreal, Kanada). Bakterie byly kultivovány při 37 °C 18 hodin na čokoládovém agaru (LabMediaServis). Po uplynutí inkubační doby byly bakterie

sklizeny za pomoci DPBS a jejich množství bylo stanoveno na základě měření jejich optické denzity pomocí Densi-La-Metru II (Erba Lachema). Bakterie byly promyty od agaru při $4211 \times g$ po dobu 10 min při $10^\circ C$ a naředěny dle zvolené infekční dávky v DPBS (Tab. 2).

5 Tab.1: Skupiny zařazené v experimentu.

Číslo skupiny	Počet myší	Imunizace	Infekce	Infekční dávka
1	6	Ano	HP1	5×10^9
2	6	Ne	HP1	5×10^9
3	6	Ano	HP5	5×10^9
4	6	Ne	HP5	5×10^9
5	6	Ano	DBPS	-

10 Klinický stav myší byl kontrolován jedenkrát denně a hodnoceny byly následující parametry: konjunktivitida, naježená srst, apatie, případně úhyn (Tab. 2). Pět dní po infekci byly myši utraceny a byla provedena pitva. Z patologických nálezů byla sledována a hodnocena hlavně splenomegalie. Podle celkového hodnocení klinického stavu a pitvy bylo vytvořeno celkové skóre pro každou jednotlivou myš a z těchto bylo poté vytvořeno průměrné skóre pro danou skupinu.

15 Tab. 2: Bodové hodnocení.

Parametr	Upřesnění parametru	Bodové ohodnocení
Konjunktivitida	jedno oko	1 bod
	obě oči	2 body
Naježená srst	-	1 bod
Apatie	apatie - reaguje na pobídnutí	1 bod
	apatie - nereaguje na pobídnutí	2 body
Úhyn	-	3 body
Splenomegalie	podle velikosti sleziny	1-2 body

20 Průměrné skóre u skupin imunizovaných rekombinantním proteinem kataláza bylo vždy nižší než průměrné skóre u neimunizovaných myší odpovídající infekční dávky (Obr. 3).

Z výsledků vyplývá, že imunizace rekombinantním proteinem kataláza vede k tvorbě specifických protilátek, které se podílí na ochraně před infekcí homologním i heterologním sérovarem bakterie *H. parasuis*.

25

NÁROKY NA OCHRANU

30 1. Vakcína proti bakteriální infekci *H. parasuis*, **vyznačující se tím**, že obsahuje rekombinantní protein katalázu *Haemophilus parasuis* mající aminokyselinovou sekvenci:

35 SGGMYKCPFDHGSKTLTTAAGAPVVDNDNTMSAGPRGPLLLQDVWFQEKLAHFARERI
 PERVVHAKGSAAAYGTFTVTADITKYTKAAVFKPGAQTEVLLRFSTVAGERGAADAERD
 VRGFSCLKFYTEQGNWDLVGNNTPVFFIRDPLKFPDFIHTQKRNPQTNLRDANAAWDFWS
 RHPESMHQIMTLFSDRGIPATLRHMNGYGSHTYSFVNANNERFWVKFHFKTQQGHKFF

TNEEAAKVVGEDRESSQKDLYEAIERGEFPRWTVQVQIMPEADAHKHNYAFDLTKVWP
 HADYPVIEVGVLELNRNPQNYFAEVEQAAFAPSNIVPGIGFSPDRMLQGRLFSYQDAQR
 YRLGVNHHQIPVNAPKCSYHTTHRDGAMRVDANGGNHPNYAPNRFDTYVPTHDLPL
 QIEREAAHFNFREYDEDYYSQPAALYNLFTAEEKDRLAGNFAAGLSGVTIPEIVERQMA
 HFEKVSPELANAIRQKLAK (SEQ ID NO. 1),

A alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.

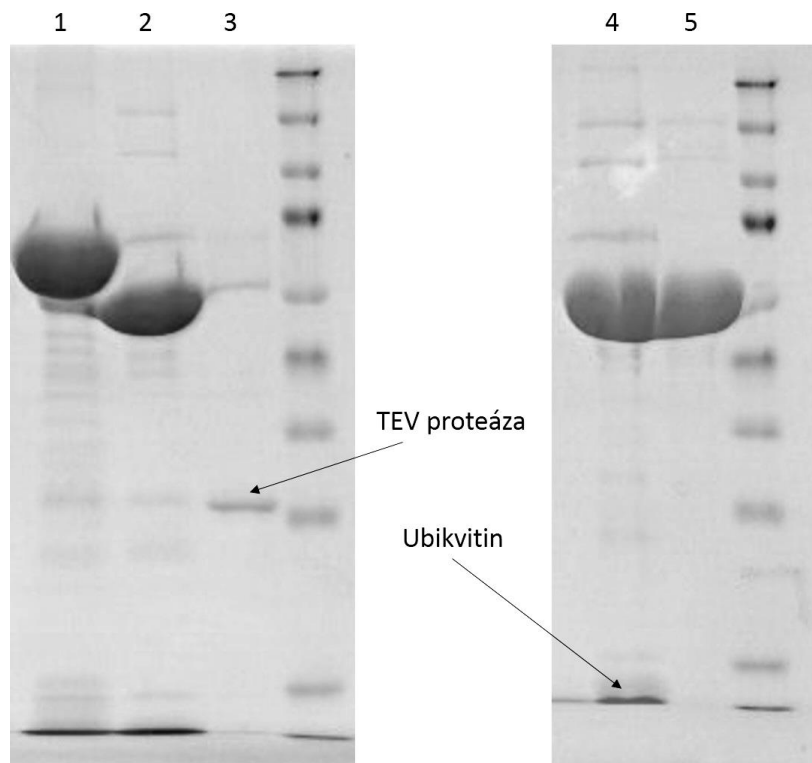
2. Vakcína podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že farmaceuticky přijatelná pomocná látka je vybrána ze skupiny zahrnující rozpouštědla, stabilizátory, imunogenní adjuvanty, inaktivační činidla.
3. Vakcína podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že farmaceuticky přijatelná pomocná látka je hydroxid hlinitý.
4. Vakcína podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že je ve formě pro subkutánní, intramuskulární nebo intradermální podání.
5. Rekombinantní antigen kataláza *Haemophilus parasuis* pro indukci protilátek proti bakteriální infekci *H. parasuis*, **vyznačující se tím**, že má aminokyselinovou sekvenci:

SGGMYKCPFDHGSKTLTTAAGAPVVDNDNTMSAGPRGPLLLQDVWFQEKLAHFARERI
 PERVVHAKGSAAYGTFTVTADITKYTKAAVFKPGAQTEVLLRFSTVAGERGAADAERD
 VRGFSLFYTEQGNWDLVGNNTPVFFIRDPLKFPDFIHTQKRNPQTNLRDANAAWDFWS
 RHPESMHQIMTLFSDRGIPATLRHMNGYGSHTYSFVNANNERFWVKFHFKTQQGHKFF
 TNEEAAKVVGEDRESSQKDLYEAIERGEFPRWTVQVQIMPEADAHKHNYAFDLTKVWP
 HADYPVIEVGVLELNRNPQNYFAEVEQAAFAPSNIVPGIGFSPDRMLQGRLFSYQDAQR
 YRLGVNHHQIPVNAPKCSYHTTHRDGAMRVDANGGNHPNYAPNRFDTYVPTHDLPL
 QIEREAAHFNFREYDEDYYSQPAALYNLFTAEEKDRLAGNFAAGLSGVTIPEIVERQMA
 HFEKVSPELANAIRQKLAK (SEQ ID NO. 1).

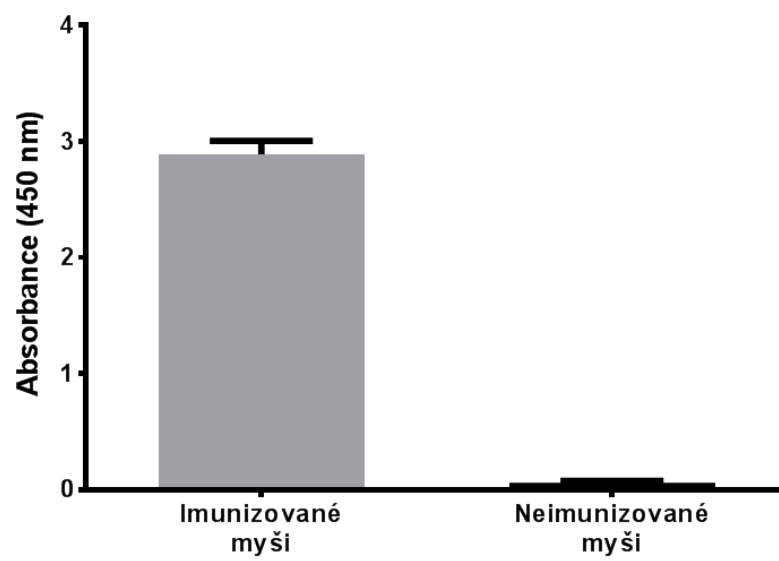
6. Sada primerů pro amplifikaci genu katalázy bakterie *Haemophilus parasuis*, **vyznačená tím**, že sestává z:

- forward primeru o sekvenci: ATGTATAAATGTCCATTTGATCACGG (SEQ ID NO. 3), a
 reverse primeru o sekvenci: TTATTTTGCTAATTTTGGACGAATCGC (SEQ ID NO. 4).

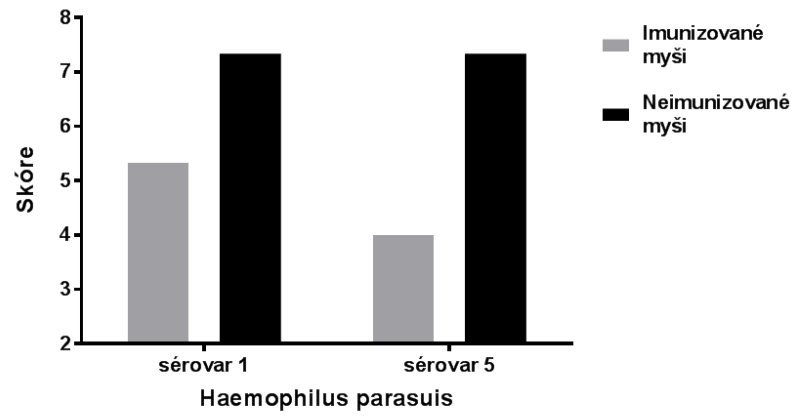
2 výkresy
 +
 4 strany sekvencí



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

SEQUENCE LISTING

<110> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.
 <120> Vakcína proti bakterii Haemophilus (Glaesserella) parasuis, a rekombinantní antigen pro tuto vakcínu
 <130> P
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> rekombinantní kataláza z Haemophilus parasuis
 <400> 1

Ser Gly Gly Met Tyr Lys Cys Pro Phe Asp His Gly Ser Lys Thr Leu
 1 5 10 15

Thr Thr Ala Ala Gly Ala Pro Val Val Asp Asn Asp Asn Thr Met Ser
 20 25 30

Ala Gly Pro Arg Gly Pro Leu Leu Leu Gln Asp Val Trp Phe Gln Glu
 35 40 45

Lys Leu Ala His Phe Ala Arg Glu Arg Ile Pro Glu Arg Val Val His
 50 55 60

Ala Lys Gly Ser Ala Ala Tyr Gly Thr Phe Thr Val Thr Ala Asp Ile
 65 70 75 80

Thr Lys Tyr Thr Lys Ala Ala Val Phe Lys Pro Gly Ala Gln Thr Glu
 85 90 95

Val Leu Leu Arg Phe Ser Thr Val Ala Gly Glu Arg Gly Ala Ala Asp
 100 105 110

Ala Glu Arg Asp Val Arg Gly Phe Ser Leu Lys Phe Tyr Thr Glu Gln
 115 120 125

Gly Asn Trp Asp Leu Val Gly Asn Asn Thr Pro Val Phe Phe Ile Arg
 130 135 140

Asp Pro Leu Lys Phe Pro Asp Phe Ile His Thr Gln Lys Arg Asn Pro
 145 150 155 160

Gln Thr Asn Leu Arg Asp Ala Asn Ala Ala Trp Asp Phe Trp Ser Arg
 165 170 175

His Pro Glu Ser Met His Gln Ile Met Thr Leu Phe Ser Asp Arg Gly
 180 185 190

Ile Pro Ala Thr Leu Arg His Met Asn Gly Tyr Gly Ser His Thr Tyr
 195 200 205

Ser Phe Val Asn Ala Asn Asn Glu Arg Phe Trp Val Lys Phe His Phe
 210 215 220

Lys Thr Gln Gln Gly His Lys Phe Phe Thr Asn Glu Glu Ala Ala Lys
 225 230 235 240

Val Val Gly Glu Asp Arg Glu Ser Ser Gln Lys Asp Leu Tyr Glu Ala
 245 250 255

Ile Glu Arg Gly Glu Phe Pro Arg Trp Thr Val Gln Val Gln Ile Met
 260 265 270

Pro Glu Ala Asp Ala His Lys His Asn Tyr Ala Phe Asp Leu Thr Lys
 275 280 285

Val Trp Pro His Ala Asp Tyr Pro Val Ile Glu Val Gly Val Leu Glu
 290 295 300

Leu Asn Arg Asn Pro Gln Asn Tyr Phe Ala Glu Val Glu Gln Ala Ala
 305 310 315 320

Phe Ala Pro Ser Asn Ile Val Pro Gly Ile Gly Phe Ser Pro Asp Arg
 325 330 335

Met Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ser Tyr Gln Asp Ala Gln Arg Tyr Arg
 340 345 350

Leu Gly Val Asn His His Gln Ile Pro Val Asn Ala Pro Lys Cys Ser
 355 360 365

Tyr His Thr Thr His Arg Asp Gly Ala Met Arg Val Asp Ala Asn Gly
 370 375 380

Gly Asn His Pro Asn Tyr Ala Pro Asn Arg Phe Asp Thr Tyr Val Pro
 385 390 395 400

Thr His Asp Gln Leu Pro Leu Gln Ile Glu Arg Glu Ala Ala His Phe
 405 410 415

Asn Phe Arg Glu Tyr Asp Glu Asp Tyr Tyr Ser Gln Pro Ala Ala Leu
 420 425 430

Tyr Asn Leu Phe Thr Ala Glu Glu Lys Asp Arg Leu Ala Gly Asn Phe
 435 440 445

Ala Ala Gly Leu Ser Gly Val Thr Ile Pro Glu Ile Val Glu Arg Gln
 450 455 460

Met Ala His Phe Glu Lys Val Ser Pro Glu Leu Ala Asn Ala Ile Arg
 465 470 475 480

Gln Lys Leu Ala Lys
 485

<210> 2
 <211> 1449
 <212> DNA
 <213> Haemophilus parasuis

<400> 2
 atgtataaat gtccatttga tcacggatca aaaaccttaa caacagcagc aggcgcccct 60
 gttgttgata atgacaacac aatgtctgct ggcccacgtg gtccacttct tttacaagat 120
 gtatggtttc aagagaaatt agcacacttt gctogtgagc gtattcctga gcgtgtgggt 180
 cacgctaaag gttcagcagc ttacggtaca ttcactgtca ctgcagatat taccaaatac 240
 aaaaagctg cagtatttaa accgggagca caaactgaag tattattacg tttctcaact 300
 gttgctgggtg agcgtggggc tgccgatgca gagcgtgacg tgcgtgggtt ttcattaaaa 360
 ttctatacag aacaaggtaa ctgggactta gtgggtaaca atacaccogt attttttattc 420
 cgtgatccat taaaattccc agattttatc catacacaaa aacgtaatcc acaaactaac 480
 ttgctgacg cgaatgcagc gtgggatttc tggtcacgtc acctgaatc aatgcaccaa 540
 attatgacat tgttctcaga tcgtggtatt cctgcgactt tacgtcatat gaacggttac 600
 ggtagccaca cttatagctt tgtaaagca aacaacgagc gtttctgggt gaaattccac 660
 ttcaaacac aacaaggta caaattcttc actaacgaag aagcggctaa agttgtaggt 720
 gaagatcgtg aatctagcca aaaagattta tatgaagcga ttgagcgtgg tgaattcccg 780
 cgttgactg tcaagtgc gattatgcca gaagcagatg ctcaaaaaca taactatgcc 840
 tttgacttaa ctaaagtatg gccacacgca gattaccctg tgatcgaagt ggggtgatta 900
 gagttaaacc gcaatccaca aaactacttc gcagaagtag agcaagcagc gtttgacca 960
 tctaacatcg ttcgggaat cggcttctca ccagaccgta tgttacaagg tcgtctgttc 1020
 tcttaccag atgcacagcg ttaccgttta ggtgtaaacc accaccaaat ccctgtaaat 1080
 gcacaaaat gctcatacca cagactcac cgtgatgggt caatgcgtgt agatgcaaac 1140

ggtggtaacc accctaacta cgctccgaac cgttttgata cttatgtgcc aacccacgat 1200
 caattacat tacaaattga gcgtgaagct gcacacttta acttccgtga gtacgatgaa 1260
 gattactact cacaaaccgc agcactttat aacttgttta cagcgggaaga aaaagatcgc 1320
 ttagcaggtg actttgctgc aggtttatca ggtgtgacta tccttgaaat cgtagaaaga 1380
 caaatggctc actttgaaaa agttagcccg gaattagcaa atgcgattcg tcaaaaatta 1440
 gcaaaataa 1449

<210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> forward primer

<400> 3
 atgtataaat gtccatttga tcacgg 26

<210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> reverse primer

<400> 4
 ttattttgct aatttttgac gaatcgc 27