

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2012-361**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30.05.2012**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.12.2013**  
(Věstník č. 50/2013)

(51) Int. Cl.:  
**A61K 39/112** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)

(71) Přihlašovatel:  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno, CZ

(72) Původce:  
Rychlík Ivan Doc. RNDr. Ph.D., Velešovice, CZ  
Karasová Daniela Ing. Ph.D, Brno, CZ  
Šebková Alena Mgr., Brno, CZ  
Havlíčková Hana Ing., Brno, CZ  
Matulová Marta Mgr., Sobůlky, CZ  
Šišák František MVDr. CSc., Brno, CZ

(74) Zástupce:  
PATENTOVÁ KANCELÁŘ, Mgr. Hana Jirkalová,  
Michelská 18/12a, Praha 4, 14000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Vakcína pro orální podání hospodářským  
zvířatům**

(57) Anotace:

Řešení se týká vakcíny pro orální podání hospodářským zvířatům, která obsahuje živý oslabený kmen zoopatogenního mikroorganismu *Salmonella enterica* CAPM 6474. Tento kmen je oslabený třemi nezávislými mutacemi a je uložený ve Sbírci zoopatogenních mikroorganismů v Brně, CZ.

**CZ 2012 - 361 A3**



## Vakcína pro orální podání hospodářským zvířatům

### Oblast techniky

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 formou atenuovanou vakcínou s možností serologické diferenciaci vakcinovaných a přirozeně infikovaných hejn.

### 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). 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.

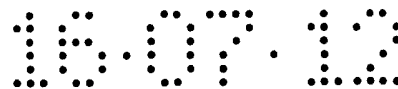
### Podstata vynálezu

Uvedené nedostatky odstraňuje vakcína pro orální podání hospodářským zvířatům podle vynálezu, jehož 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.

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 strukturní 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

- 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 agaroch 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 současné 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 provedení

#### 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 ( $\Delta$ SPI1  $\Delta$ *lon*) byla transdukcí vnesena mutace *fliC*::Cm. Kmen *Salmonella enterica*  $\Delta$ SPI1  $\Delta$ *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 divokou *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-positivních kuřat než ve skupině nevakcinovaných kuřat. Absence serologické odpovědi na vakcinaci *Salmonella enterica*  $\Delta$ SPI1  $\Delta$ 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-lon-fliC	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-lon-fliC	i.v.	2,92±1,37 <sup>&amp;</sup>	4,89±0,72 <sup>&amp;</sup>	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

<sup>&</sup> signifikantně odlišné od skupiny bez vakcinace (t-test,  $P < 0.05$ )

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

p.o. – orální čelenž

i.v. – intravenózní čelenž

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.

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

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.

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.

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

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)

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

### Celkové složení vakcíny podle vynálezu a její dávkování

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

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 diferenciaci po orální aplikaci. Serologická diferenciaci umožňuje odlišení vakcinovaných hejn od hejn přirozeně infikovaných divokými kmeny *Salmonella enterica*. Je proto vhodná jako orální živá markerová vakcína na ochranu hospodářských zvířat před salmonelovými infekcemi.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Vakcína pro orální podání hospodářským zvířatům **se vyznačuje 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 Sbírce zoopatogenních mikroorganismů v Brně, CZ.

8

15.07.12

Graf 1

