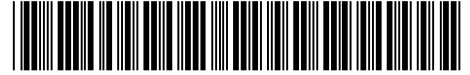


Οργανισμός
Βιομηχανικής
Ιδιοκτησίας (ΟΒΙ)



(21) Αριθμός αίτησης:

GR 20230100868

(12)

ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (B)

(47) Ημ/νία Δημοσίευσης: **19.02.2025**

(51) Διεθνής Ταξινόμηση (Int. Cl.):

(11) Αριθμός Χορήγησης: **1010885**

A61K 39/085 (2024.01)

(22) Ημ/νία Κατάθεσης: **19.10.2023**

(45) Ημ/νία Δημοσίευσης της Χορήγησης:
14.03.2025 ΕΔΒΙ 2/2025

(71) Αρχικός (οί) Καταθέτης (ες):
ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΔΗΜΗΤΡΑ;
Νιρβάνα 68 και Κουρτίδου 56-58, 11145 ΑΘΗΝΑ (ΑΤΤΙΚΗΣ) -
GR.

(72) Εφευρέτης (ες):
ΚΟΤΖΑΜΑΝΙΔΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ; , GR. ΖΔΡΑΓΚΑΣ
ΑΝΤΩΝΙΟΣ; , GR.

(73) Δικαιούχος (οί):
ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΔΗΜΗΤΡΑ;
Νιρβάνα 68 και Κουρτίδου 56-58, 11145 ΑΘΗΝΑ (ΑΤΤΙΚΗΣ) -
GR.

(74) Πληρεξούσιος:
ΠΕΡΙΒΟΛΑΡΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ; Φράγκων 13, 54626
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ (ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ).

(54) Τίτλος (Ελληνικά)
ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΕ ΜΙΚΡΑ ΚΑΙ ΜΕΓΑΛΑ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΑ ΖΩΑ ΕΚΤΡΟΦΗΣ ΜΕ
ΜΑΣΤΙΤΙΔΑ

(54) Τίτλος (Αγγλικά)
METHOD FOR THE TREATMENT OF MASTITIS OF SMALL AND LARGE RUMINANTS WITH USE OF A MULTIPOTENTIAL VACCINE

(57) Περίληψη

Η παρούσα εφεύρεση αφορά μέθοδο αντιμετώπισης της μαστίτιδας μηρυκαστικών ζώων εκτροφής. Τα βήματα της μεθόδου είναι τα εξής: Α) απομόνωση παθογόνων οργανισμών, Β) ταυτοποίηση/χαρακτηρισμός παθογόνων βακτηριακών στελεχών, Γ) επιδημιολογία S. aureus, Δ) καλλιέργεια μικροοργανισμών/παραγωγή βιομάζας, Ε) νέκρωση βακτηριακών κυττάρων/παραγωγή βακτηρίνης, Στ) παρασκευή τελικού προϊόντος/συντήρηση. Η παρασκευή του αυτεμβολίου πραγματοποιείται με τη χρήση νεκρών βακτηριακών κυττάρων των παθογόνων μικροοργανισμών που προκαλούν την ασθένεια σε μία συγκεκριμένη εκτροφή ή σε μία γεωγραφικά προσδιορισμένη περιοχή εκτροφής παραγωγικών ζώων, σε συνδυασμό με την παρουσία ανοσοενισχυτικού.

GR 20230100868

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μέθοδος παρασκευής πολυδύναμου εμβολίου για χρήση σε μικρά και μεγάλα
μηρυκαστικά ζώα εκτροφής με μαστίτιδα

- Η παρούσα εφεύρεση αφορά μέθοδο αντιμετώπισης της μαστίτιδας μηρυκαστικών ζώων εκτροφής. Τα βήματα της μεθόδου είναι τα εξής: Α) Απομόνωση παθογόνων οργανισμών, Β) Ταυτοποίηση/χαρακτηρισμός παθογόνων βακτηριακών στελεχών, Γ) Επιδημιολογία *S. aureus*, Δ) Καλλιέργεια μικροοργανισμών/Παραγωγή βιομάζας, Ε) Νέκρωση βακτηριακών κυττάρων/παραγωγή βακτηρίνης, ΣΤ) Παρασκευή τελικού προϊόντος/συντήρηση. Η παρασκευή του αυτεμβολίου πραγματοποιείται με τη χρήση νεκρών βακτηριακών κυττάρων των παθογόνων μικροοργανισμών που προκαλούν την ασθένεια σε μία συγκεκριμένη εκτροφή ή σε μία γεωγραφικά προσδιορισμένη περιοχή εκτροφής παραγωγικών ζώων, σε συνδυασμό με την παρουσία ανοσοενισχυτικού.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Μέθοδος παρασκευής πολυδύναμου εμβολίου για χρήση σε μικρά και μεγάλα μηρυκαστικά ζώα εκτροφής με μαστίτιδα

Τεχνικό πεδίο στο οποίο αναφέρεται η εφεύρεση

5 Η παρούσα εφεύρεση σχετίζεται με τη μεθοδολογία παραγωγής πολυδύναμου αυτεμβολίου για την αντιμετώπιση της μαστίτιδας μικρών και μεγάλων μηρυκαστικών ζώων εκτροφής. Η παρασκευή του αυτεμβολίου πραγματοποιείται με τη χρήση νεκρών βακτηριακών κυττάρων των παθογόνων μικροοργανισμών που προκαλούν την ασθένεια σε μία συγκεκριμένη εκτροφή ή σε μία γεωγραφικά προσδιορισμένη περιοχή εκτροφής παραγωγικών ζώων, σε συνδυασμό με την παρουσία ανοσοενισχυτικού.

10 Η εφεύρεση αντιμετωπίζει προληπτικά, μέσω εμβολιασμού, την κλινική και υποκλινική μαστίτιδα των παραγωγικών ζώων, η οποία μπορεί να προκληθεί από ένα μεγάλο αριθμό βακτηριακών στελεχών του είδους *Staphylococcus aureus*, στα οποία συμπεριλαμβάνονται και στελέχη αρνητικά στην πηκτάση (Colagulase Negative *S. aureus*-CNS), και εκδηλώνεται ως φλεγμονή του μαστικού αδένα, η οποία συνοδεύεται από κλινικά συμπτώματα και/ή μείωση της ποσότητας και
15 ποιότητας του γάλακτος

Στάθμη προηγούμενης τεχνικής και αξιολόγηση αυτής

Τα αυτεμβόλια δρουν παρόμοια με τα εμπορικά σκευάσματα των εμβολίων προκαλώντας την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος σε έναν ιό ή ένα
20 βακτήριο. Περιέχουν νεκρό νοσογόνο παράγοντα, ο οποίος διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού, ώστε να αποκτήσει ανοσία, δημιουργώντας τη «μνήμη» του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τα αυτεμβόλια χρησιμοποιούνται προληπτικά για τον έλεγχο των ασθενειών και τη διατήρηση της υγείας των ζώων και καλύπτονται επί του παρόντος από την εθνική νομοθεσία των κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η μεθοδολογία της
25 παρασκευής τους βασίζεται σε ευρέως χρησιμοποιημένες μικροβιολογικές τεχνικές. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των αυτεμβολίων για μια συγκεκριμένη ασθένεια εμπλέκει ως απαραίτητη προϋπόθεση την επιλογή των κατάλληλων μικροβιακών παθογόνων που προκαλούν την ασθένεια σε μία συγκεκριμένη εκτροφή ή σε εκτροφές που ανήκουν σε συγκεκριμένη, γεωγραφικά καθορισμένη, περιοχή. Με
30 τη σειρά της, η επιλογή αυτή προϋποθέτει την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των μικροβιακών στελεχών που εμφανίζουν κλωνική διασπορά σε μία περιοχή.

Σύντομη παρουσίαση της εφεύρεσης

Η εφεύρεση αφορά μια καινοτόμα μέθοδο/διάταξη για τον εμβολιασμό των μικρών και μεγάλων μηρυκαστικών ζώων παραγωγής ενάντια στην κλινική και υποκλινική

- μαστίτιδα. Ειδικότερα, η παρούσα εφεύρεση χαρακτηρίζεται από τη μελέτη της γενοτυπικής ποικιλότητας των στελεχών (διερεύνηση της κλωνικής διασποράς) του παθογόνου αιτίου (*Staphylococcus aureus*) σε μια εκτροφή ή σε εκτροφές ζώων μιας περιοχής με τη χρήση μοριακών τεχνικών (Ηλεκτροφόρηση γέλης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο-Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE). Η διαδικασία της ανάπτυξης της εφεύρεσης ξεκινάει με την απομόνωση και την ταυτοποίηση των μικροβιακών στελεχών/παθογόνου αιτίου και εξελίσσεται με τη μελέτη της επιδημιολογίας του *S. aureus*, την παραγωγή βιομάζας των μικροβιακών στελεχών, την παραγωγή βακτηρίνης και τέλος την παρασκευή του εμβολιακού παρασκευάσματος με τη χρήση ανοσοενισχυτικού. Το κύριο χαρακτηριστικό του του τελικού παρασκευάσματος είναι ότι περιέχει νεκρά βακτηριακά κύτταρα διαφορετικών στελεχών του είδους *Staphylococcus aureus* που έχουν απομονωθεί ως το παθογόνο αίτιο της μαστίτιδας και εμφανίζουν κλωνική διασπορά σε μία εκτροφή/περιοχή.
- 15 Τα βασικά χαρακτηριστικά της εφεύρεσης είναι τα εξής.
- Πρόκειται για μέθοδο αντιμετώπισης της μαστίτιδας μηρυκαστικών ζώων εκτροφής που αποτελείται από τα εξής βήματα:
- A) Απομόνωση παθογόνων οργανισμών,
- B) Ταυτοποίηση/χαρακτηρισμός παθογόνων βακτηριακών στελεχών,
- 20 Γ) Επιδημιολογία *S. aureus*,
- Δ) Καλλιέργεια μικροοργανισμών/Παραγωγή βιομάζας,
- Ε) Νέκρωση βακτηριακών κυττάρων/παραγωγή βακτηρίνης,
- Στ) Παρασκευή τελικού προϊόντος/συντήρηση.
- Η απομόνωση των παθογόνων οργανισμών γίνεται με λήψη δείγματος γάλακτος και χρήση θρεπτικών μέσων.
- 25 Όταν η ασθένεια που θέλουμε να καταπολεμήσουμε είναι σταφυλόκοκκος, για την απομόνωση του ακολουθούνται τα εξής βήματα:
- A) το δείγμα του γάλακτος ενοφθαλμίζεται σε άγαρ Baird-Parker συμπληρωμένο με τελλουρίτη και κρόκο αυγού (egg-yolk tellurite)
- 30 B) ακολουθεί αερόβια επώαση για 24-48 ώρες στους 35°C
- Γ) για κάθε δείγμα επιλέγονται έως και τέσσερις απομονωμένες αποικίες που παρουσιάζουν την τυπική μορφολογία του *S. aureus* (μαύρες με ή χωρίς αδιαφανές άλω)
- Δ) για τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση των μικροβιακών στελεχών πραγματοποιείται η ανακαλλιέργεια τους σε μη εκλεκτικό θρεπτικό μέσο.
- 35

Η ταυτοποίηση των μικροβιακών στελεχών γίνεται με μικροσκοπική παρατήρηση όσο και με βιοχημικές δοκιμές.

- 5 Τα απομονωμένα στελέχη *S. aureus* αποθηκεύονται σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης, σε ειδικά φιαλίδια με την μορφή εναιωρήματος των μικροβιακών κυττάρων σε διάλυμα γλυκερόλης.

Η καλλιέργεια μικροοργανισμών γίνεται με παραγωγή της βιομάζας των μικροοργανισμών σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soya Broth (TSB), σε καλλιέργειες κλιμακούμενου όγκου, σε συστήματα ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες των 500 ml, στους 37 °C, 150 rpm για 24 ώρες.

- 10 Η νέκρωση των μικροβιακών κυττάρων και η επακόλουθη παραγωγή των θραυσμάτων τους (βακτηρίνη-bacterin) γίνεται με

A) προσθήκη διαλύματος φορμαλδεύδης (1%w/w) στις κωνικές φιάλες καλλιέργειας των μικροοργανισμών οι οποίες παραμένουν στους 4°C για 16h,

- 15 B) φυγοκέντρηση των καλλιεργείων σε αποστειρωμένες φιάλες στα 4000 rpm για 10 min και συλλογή της βιομάζας,

Γ) επαναιώρηση των νεκρών βακτηριακών κυττάρων σε φυσιολογικό ορό,

Δ) προσθήκη ανοσοενισχυτικού,

Ε) ανάμιξη των καλλιεργείων των διαφορετικών στελεχών.

- 20 Με την ανωτέρω μέθοδο παράγεται αυτεμβόλιο που χαρακτηρίζεται από την εξής σύνθεση:

A) Μίγμα νεκρωμένων βακτηριακών κυττάρων (θραύσματα κυττάρων/βακτηρίνη) των διαφορετικών στελεχών (10^8 κύτταρα/ml από κάθε στέλεχος)

B) Υδροξείδιο του αργιλίου ως ανοσοενισχυτικό (1% w/w).

Πλεονεκτήματα της εφεύρεσης

- 25 Το πολυδύναμο αυτεμβόλιο συνδυάζει νεκρά κύτταρα στελεχών του είδους *Staphylococcus aureus* και των CNS που αναγνωρίζονται ως τα κύρια παθογόνα αίτια της μαστίτιδας και εμφανίζουν κλωνική διαφορά σε μία συγκεκριμένη εκτροφή ή σε μια συγκεκριμένη περιοχή εκτροφής μικρών και μεγάλων μυρηκαστικών ζώων παραγωγής.

- 30 A. Ο συνδυασμός των κατάλληλα επιλεγμένων μικροβιακών στελεχών του παθογόνου αιτίου της ασθένειας επιτυγχάνει κατάλληλη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, καθιστώντας τον εμβολιασμό των ζώων ως αποτελεσματικό μέτρο πρόληψης της εμφάνισης της ασθένειας της μαστίτιδας.

- 35 B. Περιέχει ανοσοενισχυτικό για την επαγωγή ισχυρότερης ανοσοαπόκρισης του ξενιστή

Γ. θεωρείται ασφαλές γιατί περιέχει νεκρούς νοσογόνους παράγοντες

Αποκάλυψη της εφεύρεσης

A) Απομόνωση παθογόνων μικροοργανισμών

- 5 Η διαδικασία της ανάπτυξης του εμβολίου ξεκινάει με την απομόνωση των μικροοργανισμών /παθογόνου αιτίου με συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους. Συγκεκριμένα, λαμβάνονται δείγματα γάλακτος από ζώα που εμφανίζουν κλινικά ή/και υποκλινικά συμπτώματα της μαστίτιδας και οι μικροοργανισμοί/παθογόνα αίτια απομονώνονται με τη χρήση κατάλληλων θρεπτικών μέσων, σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας.
- 10 Για την απομόνωση των σταφυλόκοκκων το δείγμα του γάλακτος (100 μl) ενοφθαλμίζεται σε άγαρ Baird-Parker συμπληρωμένο με τελλουρίτη και κρόκο αυγού (egg-yolk tellurite) και ακολουθεί αερόβια επώαση για 24-48 ώρες στους 35°C. Για κάθε δείγμα επιλέγονται έως και τέσσερις απομονωμένες αποικίες που παρουσιάζουν την τυπική μορφολογία του *S. aureus* (μαύρες με ή χωρίς
- 15 αδιαφανές άλω). Για τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση των μικροβιακών στελεχών πραγματοποιείται η ανακαλλιέργεια τους σε μη εκλεκτικό θρεπτικό μέσο (εκχύλισμα μαγιάς σε σόγια, Tryptone Soya Yeast Extract Agar-TSYEA).

B) Ταυτοποίηση/χαρακτηρισμός παθογόνων βακτηριακών στελεχών

- 20 Η ταυτοποίηση των μικροβιακών στελεχών βασίζεται τόσο στην μικροσκοπική τους παρατήρηση όσο και σε βιοχημικές δοκιμές (χρώση κατά Gram, αντίδραση καταλάσης, δοκιμή ζύμωσης μαννιτόλης, δοκιμή κοαγκουλάσης).

Γ) Αποθήκευση των στελεχών *S. aureus*

- 25 Τα απομονωμένα στελέχη *S. aureus* αποθηκεύονται σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-80°C), σε ειδικά φιαλίδια (cryovials) με την μορφή εναιωρήματος των μικροβιακών κυττάρων σε διάλυμα γλυκερόλης (20% v/v).

Δ) Επιδημιολογία *S. aureus*.

- 30 Διερευνάται η γενοτυπική ποικιλότητα των απομονωμένων μικροβιακών στελεχών από εκτροφές συγκεκριμένων περιοχών, με ηλεκτροφόρηση γέλης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο-Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Εικόνα 1) με στόχο την εκτίμηση της κλωνικής διαφοράς των παθογόνων μικροοργανισμών. Στη συνέχεια, επιλέγονται αντιπροσωπευτικά στελέχη *S. aureus*, των γενοτυπικών κλώνων που ανιχνεύονται μέσω της PFGE, για την καλλιέργειά τους και την παρασκευή του πολυδύμανου εμβολίου.

Ε) Καλλιέργεια μικροοργανισμών/Παραγωγή βιομάζας

- 35 Σε αυτό το στάδιο της διαδικασίας πραγματοποιείται η παραγωγή της βιομάζας των μικροοργανισμών σε 200 ml θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soya Broth (TSB), σε καλλιέργειες κλιμακούμενου όγκου, σε συστήματα ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές

φιάλες των 500 ml, στους 37 °C, 150 rpm για 24 ώρες. Στις συνθήκες αυτές έχει προσδιοριστεί με βάση τη καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού ότι ο μικροβιακός πληθυσμός βρίσκεται στην εκθετική φάση της ανάπτυξής του με 10^8 βιώσιμα κύτταρα/ml (CFU).

5 ΣΤ) Νέκρωση βακτηριακών κυττάρων/παραγωγή βακτηρίνης

Η νέκρωση των μικροβιακών κυττάρων και η επακόλουθη παραγωγή των θραυσμάτων τους (βακτηρίνη-bacterin) γίνεται με την προσθήκη διαλύματος φορμαλδεύδης (1%w/w) στις κωνικές φιάλες καλλιέργειας των μικροοργανισμών οι οποίες παραμένουν στους 4°C για 16h. Ακολουθεί η φυγοκέντρωση των
10 καλλιεργειών σε αποστειρωμένες φιάλες στα 4000 rpm για 10 min και η συλλογή της βιομάζας, η επαναιώρηση των νεκρών βακτηριακών κυττάρων σε φυσιολογικό ορό, η προσθήκη ανοσοενισχυτικού (1% υδροξείδιο του αργιλίου) και η ανάμιξη των καλλιεργειών των διαφορετικών στελεχών.

 Ζ) Παρασκευή τελικού προϊόντος/συντήρηση

15 Η αποθήκευσή του εμβολίου γίνεται σε αποστειρωμένες πλαστικές φιάλες των 500ml που διατηρούνται σε συνθήκες ψύξης (4°C). Για κάθε περιέκτη πραγματοποιείται έλεγχος στειρότητας με επίστρωση 100 μl σε αιματούχο άγαρ και επώαση των τριβλίων στους 37 °C, για 24 ώρες. Η τελική σύνθεση του αυτεμβολίου προσδιορίζεται ως εξής:

- 20 • Μίγμα νεκρωμένων βακτηριακών κυττάρων (θραύσματα κυττάρων/βακτηρίνη) των διαφορετικών στελεχών (10^8 κύτταρα/ml από κάθε στέλεχος)
- Υδροξείδιο του αργιλίου ως ανοσοενισχυτικό (1% w/w)

Περιγραφή των σχεδίων

25 Το σχήμα 1 δείχνει την αρχή λειτουργίας της συσκευής PFGE και συγκεκριμένα δείχνει την διάταξη των ηλεκτροδίων (Α), την πολικότητα της διάταξης της συσκευής (Β), το μοτίβο της κίνησης των θραυσμάτων DNA και (Δ) την κατεύθυνση της μετακίνησης των θραυσμάτων DNA

30 Το σχήμα 2 δείχνει το δένδρογραμμα γενοτυπικής συσχέτισης διαφορετικών βακτηριακών στελεχών.

ΑΞΙΩΣΕΙΣ

Αξίωση 1^η: Μέθοδος παρασκευής πολυδύναμου αυτεμβολίου που αποτελείται από τα εξής βήματα:

- A) Απομόνωση παθογόνων οργανισμών,
- B) Ταυτοποίηση/χαρακτηρισμός παθογόνων βακτηριακών στελεχών,
- 5 Γ) Επιδημιολογία *S. aureus*,
- Δ) Καλλιέργεια μικροοργανισμών/Παραγωγή βιομάζας,
- E) Νέκρωση βακτηριακών κυττάρων/παραγωγή βακτηρίνης,
- Στ) Παρασκευή τελικού προϊόντος/συντήρηση.

10 Αξίωση 2^η: Μέθοδος παρασκευής πολυδύναμου αυτεμβολίου, όπως περιγράφεται στην αξίωση 1, που χαρακτηρίζονται από το ότι η απομόνωση των παθογόνων οργανισμών γίνεται με λήψη δείγματος γάλακτος και χρήση θρεπτικών μέσων.

Αξίωση 3^η: Μέθοδος παρασκευής πολυδύναμου αυτεμβολίου, όπως περιγράφεται στην αξίωση 1, που χαρακτηρίζονται από το ότι για την απομόνωση του σταφυλόκοκκου ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- 15 A) το δείγμα του γάλακτος ενοφθαλμίζεται σε άγαρ Baird-Parker συμπληρωμένο με τελλουρίτη και κρόκο αυγού (egg-yolk tellurite)
- B) ακολουθεί αερόβια επώαση για 24-48 ώρες στους 35°C
- Γ) για κάθε δείγμα επιλέγονται έως και τέσσερις απομονωμένες αποικίες που παρουσιάζουν την τυπική μορφολογία του *S. aureus* (μαύρες με ή χωρίς αδιαφανές άλω)
- 20 Δ) για τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση των μικροβιακών στελεχών πραγματοποιείται η ανακαλλιέργεια τους σε μη εκλεκτικό θρεπτικό μέσο.

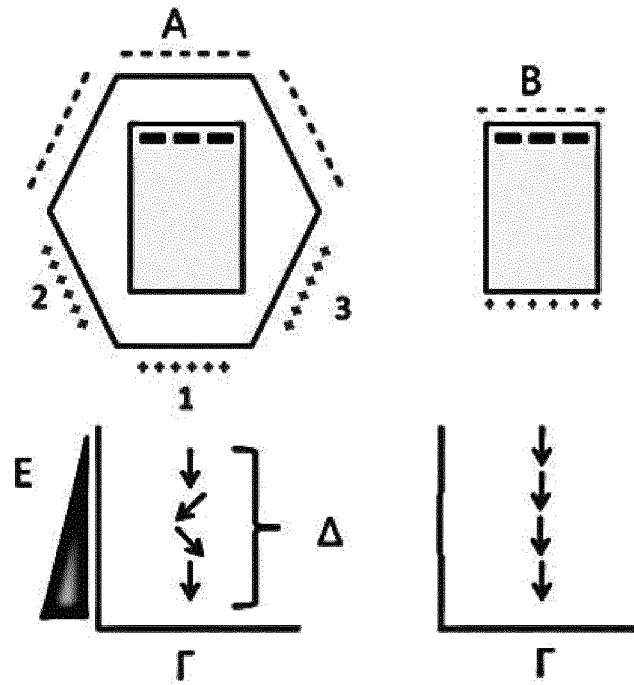
25 Αξίωση 4^η: Μέθοδος παρασκευής πολυδύναμου αυτεμβολίου, όπως περιγράφονται στις προηγούμενες αξιώσεις, που χαρακτηρίζεται από το ότι η ταυτοποίηση των μικροβιακών στελεχών γίνεται με μικροσκοπική παρατήρηση όσο και με βιοχημικές δοκιμές.

Αξίωση 5^η: Μέθοδος παρασκευής πολυδύναμου αυτεμβολίου, όπως περιγράφονται στις προηγούμενες αξιώσεις, που χαρακτηρίζεται από το ότι τα απομονωμένα

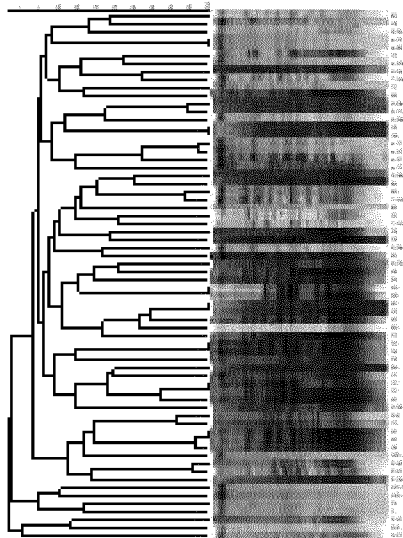
στελέχη *S. aureus* αποθηκεύονται σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης, σε ειδικά φιαλίδια με την μορφή εναιωρήματος των μικροβιακών κυττάρων σε διάλυμα γλυκερόλης.

- 5 Αξίωση 6^η Μέθοδος παρασκευής πολυδύναμου αυτεμβολίου, όπως περιγράφονται στις προηγούμενες αξιώσεις, που χαρακτηρίζεται από το ότι η καλλιέργεια μικροοργανισμών γίνεται με παραγωγή της βιομάζας των μικροοργανισμών σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soya Broth (TSB), σε καλλιέργειες κλιμακούμενου όγκου, σε συστήματα ασυνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες των 500 ml, στους 37 °C, 150 rpm για 24 ώρες.
- 10 Αξίωση 7^η: Μέθοδος παρασκευής πολυδύναμου αυτεμβολίου, όπως περιγράφεται στις προηγούμενες αξιώσεις, που χαρακτηρίζεται από το ότι η νέκρωση των μικροβιακών κυττάρων και η επακόλουθη παραγωγή των θραυσμάτων τους (βακτηρίνη-bacterin) γίνεται με
 - A) προσθήκη διαλύματος φορμαλδεύδης (1%w/w) στις κωνικές φιάλες
 - 15 καλλιέργειας των μικροοργανισμών οι οποίες παραμένουν στους 4°C για 16h,
 - B) φυγοκέντρηση των καλλιεργειών σε αποστειρωμένες φιάλες στα 4000 rpm για 10 min και συλλογή της βιομάζας,
 - Γ) επαναιώρηση των νεκρών βακτηριακών κυττάρων σε φυσιολογικό ορό,
 - Δ) προσθήκη ανοσοενισχυτικού,
 - 20 Ε) ανάμιξη των καλλιεργειών των διαφορετικών στελεχών.
- Αξίωση 8^η: Αυτεμβόλιο για χρήση σε μικρά και μεγάλα μηρυκαστικά ζώα εκτροφής που χαρακτηρίζεται από την εξής σύνθεση:
 - A) Μίγμα νεκρωμένων βακτηριακών κυττάρων (θραύσματα κυττάρων/βακτηρίνη) των διαφορετικών στελεχών (10^8 κύτταρα/ml από κάθε στέλεχος)
 - 25 B) Υδροξείδιο του αργιλίου ως ανοσοενισχυτικό (1% w/w).

ΣΧΕΔΙΑ



ΣΧΗΜΑ 1



ΣΧΗΜΑ 2



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ
ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ

ΤΕΛΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ ΕΡΕΥΝΑΣ

Αριθμός αίτησης
20230100868

ΕΓΓΡΑΦΑ ΘΕΩΡΟΥΜΕΝΑ ΩΣ ΣΧΕΤΙΚΑ			
Κατηγορία	Σχετικό έγγραφο με επισήμανση, όπου χρειάζεται, των σχετικών παραγράφων	Σχετικό με αξίωση	Διεθν. Ταξινόμηση Int. Cl. 01/01/2025(AL)
X	GRXP2024155 / (TAHIR MOHYUDDIN M., et al.) 17.07.2020 "Therapeutic evaluation of autogenous mastitis vaccine alone and in combination with routine therapy in subclinical mastitis" Pak. J. Agri. Sci., 57, 957 - 961 doi: 10.21162/PAKJAS/20.9040 *σελ. 958, Materials and Methods*	1-8	A61K 39/085
X	GRXP2024156 / (CZERNOMYSY - FUROWICZ D., et al.) 05.09.2014 "Herd - specific autovaccine and antibiotic treatment in elimination of Staphylococcus aureus mastitis in dairy cattle" Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 38, 5, article 7 https://doi.org/10.3906/vet-1401-3 *σελ. 497, ενότητες 2.2, 2.3, 2.5*	1-8	
X	US4762712 A / (STOLLE RESEARCH & DEVELOPMENT) 09.08.1988 *στήλη 2, σειρές 21 - 26* *στήλη 4, σ. 20 - στήλη 5, σ. 7* *στήλη 5, σειρές 8 - 33, 43 - 45*	1-8	Τεχνικά πεδία που ερευνήθηκαν
X	US2004028688 A1 / (GUIDRY A., et al.) 12.02.2004 *σελ. 2, παράγραφος 21* *σελ. 3, παράγραφος 28* *σελ. 4, παράγραφος 39*	1-8	A61K
A	US4840794 A / (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION) 20.06.1989 *στήλη 6, σειρές 1 - 12*	7	

Ημερομηνία περάτωσης της έρευνας :	17/02/2025
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΔΗΛΟΥΜΕΝΩΝ ΕΓΓΡΑΦΩΝ	
X: ιδιαίτερα σχετικό αν ληφθεί μεμονωμένα Y: ιδιαίτερα σχετικό αν συνδυαστεί με άλλο έγγραφο της ίδιας κατηγορίας A: τεχνολογικό υπόβαθρο O: μη έγγραφη αποκάλυψη P: ενδιάμεσο έγγραφο	T: βασική θεωρία ή αρχή στην οποία βασίζεται η εφεύρεση E: προγενέστερο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας, το οποίο δημοσιεύτηκε την ημερομηνία κατάθεσης ή μετά από αυτήν D: έγγραφο αναφερόμενο στην αίτηση L: έγγραφο αναφερόμενο για άλλους λόγους Δ: μέλος της ίδιας οικογένειας ευρεσιτεχνιών, αντίστοιχο έγγραφο

Δρ. Γλυνού Κυριακή
Προϊσταμένη Τμήματος Χημικών &
Βιοτεχνολογικών Εφευρέσεων

ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΜΕΝΗ ΓΝΩΜΗ

Αρ. φακέλου:	Ημερομηνία κατάθεσης (ημέρα/μήνας/έτος) 19.10.2023	Ημερομηνία προτεραιότητας (ημέρα/μήνας/έτος)	Αρ. αίτησης: 20230100868
Διεθνής Ταξινόμηση Ευρεσιτεχνιών (IPC) A61K39/085			
Αιτών ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΔΗΜΗΤΡΑ			

Η παρούσα γνώμη περιέχει επισημάνσεις αναφερόμενες στα ακόλουθα:

- ☒ Πλαίσιο αρ. I Θεμελίωση της γνώμης
- ☐ Πλαίσιο αρ. II Προτεραιότητα
- ☐ Πλαίσιο αρ. III Μη θεμελίωση της γνώμης όσον αφορά το νέον, το εφευρετικό βήμα και τη βιομηχανική εφαρμογή
- ☐ Πλαίσιο αρ. IV Έλλειψη ενότητας στην εφεύρεση
- ☒ Πλαίσιο αρ. V Αιτιολογημένη δήλωση αναφορικά με το νέον, το εφευρετικό βήμα ή τη βιομηχανική εφαρμογή- αναφορές και επεξηγήσεις της δήλωσης
- ☐ Πλαίσιο αρ. VI Ορισμένα αναφερόμενα έγγραφα
- ☐ Πλαίσιο αρ. VII Ορισμένες ελλείψεις στην αίτηση
- ☒ Πλαίσιο αρ. VIII Ορισμένες παρατηρήσεις στην αίτηση

Εξεί

ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΜΕΝΗ ΓΝΩΜΗ

Πλαίσιο αρ. Ι Θεμελίωση της παρούσας γνώμης

1. Η παρούσα γνώμη θεμελιώθηκε με βάση το τελευταίο αποδεκτό σύνολο αξιώσεων που κατατέθηκε πριν την έναρξη της Έρευνας/Τελικής Έκθεσης Έρευνας (Αρ. 8, παρ. 3 & 5Α, Ν.1733/1987)
2. Αναφορικά με αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και/ή αμινοξέων οι οποίες αποκαλύπτονται στην αίτηση, η παρούσα γνώμη θεμελιώθηκε με βάση:
 - α. Τύπος του υλικού
 - ☐ κατάλογος αλληλουχιών
 - ☐ πίνακας(ες) αναφερόμενος(οι) στον κατάλογο αλληλουχιών
 - β. Διαμόρφωση του υλικού
 - ☐ έντυπη
 - ☐ σε ηλεκτρονική μορφή
 - γ. Χρόνος κατάθεσης/παροχής
 - ☐ περιέχεται στην αίτηση όπως κατατέθηκε
 - ☐ κατατέθηκε μαζί με την αίτηση σε ηλεκτρονική μορφή
 - ☐ παρασχέθηκε στη συνέχεια για την έρευνα
3. ☐ Επιπλέον, στην περίπτωση κατάθεσης ή παροχής καταλόγου αλληλουχιών και/ή πίνακα που αναφέρεται σ'αυτόν σε περισσότερες από μία εκδόσεις ή περισσότερα από ένα αντίγραφα, παρασχέθηκαν αναλόγως οι απαιτούμενες δηλώσεις ότι οι πληροφορίες στα επακόλουθα ή επιπρόσθετα αντίγραφα ταυτίζονται με αυτές στην αίτηση όπως κατατέθηκε ή ότι δεν επεκτείνονται πέραν της αίτησης όπως κατατέθηκε.
4. Επιπλέον σχόλια:

ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΜΕΝΗ ΓΝΩΜΗ

Πλαίσιο αρ. V **Αιτιολογημένη δήλωση αναφορικά με το νέο, το εφευρετικό βήμα ή τη βιομηχανική εφαρμογή- αναφορές και επεξηγήσεις της δήλωσης**

1. Δήλωση

Νέο (N)

Ναι: Αξιώσεις 1-7...

Όχι: Αξιώσεις 8.....

Εφευρετικό βήμα (EB)

Ναι: Αξιώσεις

Όχι: Αξιώσεις 1-8.....

Βιομηχανική εφαρμογή (BE)

Ναι: Αξιώσεις 1-8.....

Όχι: Αξιώσεις

2. Αναφορές και επεξηγήσεις

Δείτε ξεχωριστό φύλλο

Πλαίσιο αρ. VIII **Ορισμένες παρατηρήσεις στην αίτηση**

Δείτε ξεχωριστό φύλλο

ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΜΕΝΗ ΓΝΩΜΗ

Σχετικά με το Αντικείμενο V: Αιτιολογημένη δήλωση σε σχέση με το νέο, το εφευρετικό βήμα ή τη βιομηχανική εφαρμογή· παραπομπές και επεξηγήσεις που δικαιολογούν τέτοια δήλωση

Γίνεται αναφορά στα ακόλουθα έγγραφα:

D1: GRXP2024155, 17.07.2020, MUHAMMAD TAHIR MOHYUDDIN, et al.

D2: GRXP2024156, 05.09.2014, CZERNOMYSY-FUROWICZ D., et al.

D3: US4762712 A, 09.08.1988, STOLLE RESEARCH & DEVELOPMENT CORPORATION

D4: US2004028688 A1, 12.02.2004, GUIDRY A., et al.

Νέο

Το έγγραφο D1 αποκαλύπτει [σελ. 958, *Materials and Methods, Isolation and identification of bacteria, Preparation of autogenous mastitis vaccine*] την παραγωγή αυτοεμβολίου που αποτελείται από τα εξής βήματα: απομόνωση μικροοργανισμών από γάλα, ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών με μικροβιολογική εξέταση, καλλιέργεια μικροοργανισμών με θρεπτικά μέσα και παραγωγή βιομάζας, νέκρωση βακτηριακών κυττάρων με φορμαλδεΰδη και παρασκευή τελικού προϊόντος. Επίσης, αποκαλύπτεται και το παραγόμενο αυτεμβόλιο για χρήση σε βοοειδή για την μαστίτιδα που περιλαμβάνει τα νεκρωμένα κύτταρα με υδροξείδιο του αργιλίου ως ανοσοενισχυτικό. Το έγγραφο D1 αποκαλύπτει όλα τα τεχνικά χαρακτηριστικά της αξίωσης 8.

Το έγγραφο D2 αποκαλύπτει [σελ. 497, 2.2. *Isolation and identification of bacteria*, 2.3. *Analysis of clonal relationships between strains of S. aureus*, 2.5. *Preparation of herd – specific autovaccine*] την παραγωγή αυτεμβολίου με απομόνωση *S. aureus* από το γάλα αγελάδων, ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό με βιοχημικές μεθόδους, επιλογή συγκεκριμένου στελέχους, καλλιέργεια των μικροοργανισμών με θρεπτικά μέσα, νέκρωση των βακτηριακών κυττάρων με φορμαλδεΰδη.

Το έγγραφο D3 αποκαλύπτει την παρασκευή πολυδύναμου αυτεμβολίου [στήλη 2, σειρές 21 – 36] με απομόνωση παθογόνων μικροοργανισμών από γάλα βοοειδών, ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό, καλλιέργεια μικροοργανισμών με χρήση θρεπτικών μέσων [στήλη 4, σειρά 20 – στήλη 5 σειρά 7], νέκρωση βακτηριακών κυττάρων [στήλη 5, σειρές 8 – 33] και παρασκευή του τελικού προϊόντος [στήλη 5, σειρές 43 – 45].

Το έγγραφο D4 αποκαλύπτει πολυδύναμο εμβόλιο για τη μαστίτιδα στα βοοειδή που περιέχει μίγμα νεκρωμένων κυττάρων συγκεκριμένου συνδυασμού στελεχών *S. aureus* [σελ. 2, παράγραφος 21]. Συγκεκριμένα στελέχη *S. aureus* επανενεργοποιούνται σε θρεπτικό μέσο TSB και καλλιεργούνται σε διαφορετικό κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια τα βακτήρια νεκρώνονται με φορμαλδεΰδη 1%, σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της νύκτας [σελ. 4, παράγραφος 39] και παρασκευάζεται το τελικό προϊόν, το οποίο σε κάποιες ενσωματώσεις περιλαμβάνει ανοσοενισχυτικό. Το ανοσοενισχυτικό επιλέγεται ανάμεσα σε γνωστά, γίνεται δε

ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΜΕΝΗ ΓΝΩΜΗ

αναφορά και στο υδροξείδιο του αργιλίου [σελ. 3, παράγραφος 28]. Το D4 αποκαλύπτει όλα τα τεχνικά χαρακτηριστικά της αξίωσης 8 (βλ. Μερικές παρατηρήσεις στην αίτηση).

Κανένα από τα παραπάνω έγγραφα δεν αποκαλύπτει ρητά όλα τα τεχνικά χαρακτηριστικά της αξίωσης 1. Συνεπώς, η αξίωση 1 και οι εξαρτημένες από αυτή 2 – 7 είναι όλες νέες.

Εφευρετικό βήμα

Οποιοδήποτε από τα D1 - D4 θα μπορούσε να θεωρηθεί ως η πλησιέστερη στάθμη της τεχνικής για την αξίωση 1. Τα έγγραφα D1 – D4 δεν περιλαμβάνουν ρητή αναφορά σε όλα τα στάδια της μεθόδου της αξίωσης 1, π.χ. στο D1 δεν αναφέρεται το στάδιο της επιδημιολογικής ανάλυσης ή στο έγγραφο D2 δεν αναφέρεται η παρασκευή του τελικού προϊόντος και η συντήρηση. Τα στάδια που έχουν παραληφθεί στα D1 – D4 είναι προφανή για τον ειδικό στην τεχνική και θα τα συμπεριελάμβανε σε μία μέθοδο χωρίς να ασκήσει εφευρετική δραστηριότητα. Επιπλέον, τα τεχνικά χαρακτηριστικά των αξιώσεων 2 – 7 είτε αναφέρονται στα έγγραφα όπως αναλύθηκαν στην προηγούμενη ενότητα για το «Νέο», είτε προκύπτουν προφανώς ή από πειραματικές βελτιστοποιήσεις που δεν ενέχουν εφευρετική δραστηριότητα, όπως π.χ. διαφοροποιήσεις σε θρεπτικά μέσα ή συνθήκες καλλιέργειας ή αντιδράσεων.

Συνεπώς, το αντικείμενο των αξιώσεων 1 – 8 δεν περιλαμβάνει εφευρετικό βήμα.

Βιομηχανική εφαρμογή

Το αντικείμενο των αξιώσεων 1 – 8 είναι επιδεκτικό βιομηχανικής εφαρμογής.

Σχετικά με το Αντικείμενο VIII: Μερικές παρατηρήσεις στην αίτηση

Η αξίωση 8 αναφέρεται σε αυτεμβόλιο που χαρακτηρίζεται από την σύνθεση: μίγμα νεκρωμένων βακτηριακών κύτταρων και υδροξείδιο του αργιλίου. Με την παρούσα διατύπωση, οποιοδήποτε εμβόλιο με νεκρωμένα βακτηριακά κύτταρα, ανεξάρτητα από τον παθογόνο μικροοργανισμό, και υδροξείδιο του αργιλίου προσβάλλει το νέο του αντικειμένου της αξίωσης 8. Ωστόσο, για την καλύτερη πληροφόρηση του καταθέτη αναζητήθηκαν μόνο εμβόλια με νεκρωμένα κύτταρα από στελέχη *S. aureus*. Επιπλέον, δεν προκύπτει από την αίτηση πως ένα εμβόλιο που περιέχει κύτταρα απομονωμένων στελεχών *S. aureus* διαφοροποιείται από το συγκεκριμένο αυτεμβόλιο, συνεπώς οποιοδήποτε εμβόλιο περιέχει νεκρωμένα βακτηριακά κύτταρα από στελέχη *S. aureus*, χωρίς απαραίτητα να είναι αυτεμβόλιο, και υδροξείδιο του αργιλίου αφαιρεί το νέο από το αντικείμενο της αξίωσης 8.

Στις αξιώσεις 1 – 7 γίνεται αναφορά σε «πολυδύναμο» εμβόλιο, χωρίς όμως να αναφέρονται τα τεχνικά χαρακτηριστικά που προσδίδουν αυτή την ιδιότητα στο εμβόλιο, π.χ. τα στελέχη του *S. aureus* των οποίων τα κύτταρα περιλαμβάνονται σε αυτό. Ως εκ τούτου, η ιδιότητα αυτή δεν λήφθηκε υπόψη στην έρευνα.

ΑΙΤΙΟΛΟΓΗΜΕΝΗ ΓΝΩΜΗ

Τα τεχνικά χαρακτηριστικά εντός των παρενθέσεων θεωρούνται προαιρετικά και δεν λαμβάνονται υπόψη στην έρευνα.