



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator
dokumenta:

HR P931065 A2

HR P931065 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) MKP⁶: **A 61 K 39/205**

(21) Broj prijave:

P931065

(22) Datum podnošenja prijave patenta:

19.07.1993.

(43) Datum objave prijave patenta:

28.02.1995.

(31) Broj prve prijave: 92 08947

(32) Datum podnošenja prve prijave: 20.07.1992.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: FR

(62) Broj i datum prvobitne prijave u slučaju podjele patenta:

(71) Podnositelj prijave:

Virbac S. A., 1 ere Avenue 2065m-L.I.D.-, 06516 Carros, FR

(72) Izumitelj:

Jacqueline Benejean, 8, rue Maurice Ravel, 91380 Chilly Mazarin, FR

Anne Flamand, 5, Clos de Monthyon, 91190 Gif sur Yvette, FR

Marie-Christine Tuffereau, 35, rue Jean Moulin, 75014 Paris, FR

Patrice Coulon, 17, alee de la Butte de Rheims, 91120 Palaiseau, FR

Florence Lafay, 9, boulevard de Lesseps, 78000 Versailles, FR

(74) Zastupnik:

CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.o.o., Zagreb, HR

(54) Naziv izuma: **AVIRULENTNO CJEPIVO PROTIV BJESNOĆE**

(57) Sažetak: Izum se odnosi na avirulentno cjepivo protiv bjesnoće koje se sastoji od avirulentnog mutanta SAD soja virusa bjesnoće, čiji glikoprotein u položaju 333 sadrži prirodnu amino kiselinu čiji se kodon razlikuje od kodona arginina u najmanje dva nukleotida.

HR P931065 A2

Prikazani izum se odnosi na novo cjepivo protiv bjesnoće.

5 Virus bjesnoće je rhabdovirus koji se sastoji od 5 proteina, uključujući vanjski protein, glikoprotein, koji potiče sintezu neutralizirajućih antitijela u inokuliranim životinjama. Iniciranje pročišćenog glikoproteina štiti životinju od superinfekcije. Najčešće upotrebljavani sojevi virusa bjesnoće, posebno CVS soj i ERA soj, iz kojih su dobiveni SAD sojevi kao što su SAD Berne i SAD B19 sojevi, opisani su u "Rabies Viruses" od H. F. Clarka i T. J. Wiktora "Strains of Human Viruses", koje je objavio Majer i Plotkin Karger, Basle, 1972, pp. 177-182. Redosljed amino kiselina u glikoproteinu CVS soja je opisano od Yelverton i sur. u "Rabies virus glikoprotein analogs: biosynthesis in Escherichia coli", Science, 219, 614-620.

Ovaj glikoprotein ima dvije glavne različite antigene strane vezane za neutralizaciju virusa (strana II i III). Strana III u položaju 330-340 sadrži arginin 333, koji određuje virulenciju ovog soja.

15 Redosljed amino kiselina glikoproteina SAD Berne soja nije do sada bio potpuno ustanovljen. Naravno, bilo je moguće odrediti da je antigena strana III glikoproteina SAD Berne soja identična onoj glikoproteina CVS soja. Cjepiva protiv bjesnoće u najnovijoj upotrebi su ili cjepiva dobivena iz inaktiviranih virusa ili cjepiva koja se sastoje od viralnih sojeva čija je virulencija oslabljena ili nanovo spajani virusi (na primjer cjepivo).

20 Virusi mogu biti inaktivirani različitim postupcima, naročito kemijskim kao što su tretiranje s formaldehidom ili β -propiolaktonom.

Veliki nedostatak ovog postupka dobivanja cjepiva je rukovanje s virulentnim sojevima što zahtjeva veoma stroge uvjete rada i sadrži rizik kontaminacije osoblja.

25 Nadalje, inaktivirana cjepiva primijenjena oralno, nemaju zaštitnu moć.

30 Slabljenje virulencije viralnih sojeva je dobro poznata tehnika; može se provesti, na primjer, sukcesivnim prolaženjem viralnih sojeva kroz domaćina koji je različit od osnovne vrste (zec ili miš, na primjer), ili u staničnim kulturama. To daje sojeve koji su slabo prilagođeni osnovnom domaćinu i zbog toga su manje patogeni za njega, dok u isto vrijeme zadržavaju sposobnost cjepivosti.

35 SAD sojevi, kao što su SAD B19 i SAD Berne sojevi, koji su u domeni publikacije, su oslabljeni sojevi koji su u Europi već bili testirani za cijepljenje lisica. Za oralnu primjenu mogu biti pomiješani s mamcem. Naravno, ovi sojevi su se pokazali patogenim prema ostalim životinjskim vrstama i prema ljudima. Zbog toga postoji potencijalni rizik kontaminacije koji naravno smanjuje vrijednost ovih sojeva za oralno cijepljenje.

40 U stvari, na primjer, oralna primjena SAD Berne soja grupi od 23 divlja glodavca, izabranih od Apodemus flavicollis i sylvaticus, Arvicola terrestris, Clethrionomys glareolus i Minotus agrestis izaziva smrt dviju životinja od bjesnoće.

Testovi na miševima također su pokazali da je SAD Berne soj patogen za te vrste i intracerebralnom i intramuskularnom primjenom, što je prikazano krivuljama na slikama 1a i 1b, gdje:

45 Slika 1a prikazuje krivulju mortaliteta za odrasle miševe kao funkciju doza (u jedinicama koje formiraju pločice) primijenjenih intracerebralno.

Slika 1b prikazuje krivulju mortaliteta za odrasle miševe kao funkciju doza (u jedinicama koje formiraju pločice) primijenjenih intramuskularno.

Mortalitet od 10% je zabilježen u miševa pri dozi $10^{5.5}$ PFU primijenjenog oralno.

50 Tako je SAD Berne soj kao takav opasan za divlje životinje i ljude ako se upotrebljava u kampanjama cijepljenja lisica. Isto se odnosi na SAD B19 soj.

55 Avirulentno cjepivo protiv bjesnoće je već bilo predloženo da bi ublažilo taj nedostatak. To cjepivo, opisano u Europskoj patentnoj prijavi 350 398, se sastoji od avirulentnog mutanta SAD soja virusa bjesnoće kod kojega je arginin 333 glikoproteina zamijenjen s amino kiselinom različitom od lizina, na primjer glicinom, isoleucinom ili serinom.

Taj mutant je dobiven zamjenom jednog nukleotida u kodonu arginina 333.

60 Na nesreću, taj mutant se može preobraziti u prvotni soj jednostavnom mutacijom suprotnog smjera.

To cjepivo, koje se upotrebljava za oralnu primjenu, iz tog razloga nije potpuno bezopasno za ostale životinjske vrste.

Prikazani izum se odnosi na djelotvorno cjepivo koje omogućava ublažavanje spomenutih nedostataka.

- 5 Cjepivo prema prikazanom izumu sadrži avirulentni mutant SAD soja virusa bjesnoće u kojemu je arginin 333 glikoproteina zamijenjen s prirodnom amino kiselinom čiji se kodon razlikuje u dva nukleotida od kodona arginina.

Izum se nadalje odnosi na avirulentne mutante SAD soja virusa bjesnoće u kojima je arginin na položaju 333 glikoproteina zamijenjen s amino kiselinom čiji se kodon razlikuje od kodona arginina u dva nukleotida.

10

Izum se nadalje odnosi na postupak dobivanja prethodno definiranih mutanata. Ovaj postupak se sastoji od:

- 1) selekcije, iz SAD soja virusa bjesnoće onih mutanata koji nisu neutralizirani monoklonskim antitijelima koja neutraliziraju rečeni SAD soj ali ne neutraliziraju TAG1 soj definiran u daljnjem tekstu;
- 15 2) izolacije, 333 područja glikoproteina mutanta iz koraka 1, mutanta koji ima lizin u položaju 333;
- 3) pripremanje monoklonskih antitijela koja neutraliziraju i SAD soj i mutant dobiven u koraku 2, ali ne neutraliziraju TAG1 soj; te
- 4) provođenje druge selekcije mutanata dobivenih u koraku 1 uz pomoć monoklonskih tijela pripremljenih u koraku 3.

20

Monoklonska antitijela upotrijebljena za selekciju mutanata prema izumu su dobivena fuzijom promijenjenih stanica sa stanicama koje produciraju antiviralna antitijela prema tehnici hibridizacije opisanoj od Kohler i Milstein u Nature, vol. 256, 495-497 (1975), tehnici koja je sada dobro poznata stručnjacima ove struke.

- 25 Ova tehnika se može upotrijebiti za spajanje stanica koje potječu od različitih vrsta; naravno prednost je upotrijebiti stanice koje potječu od iste životinjske vrste. Na primjer, povoljno je upotrijebiti s jedne strane stanice mieloma miša i s druge strane stanice slezene miševa prethodno imuniziranih sa sojem virusa bjesnoće prema protokolu prethodno opisanome.

- 30 Općenito uzevši, ovaj postupak hibridizacije, opisan s osvrtom na stanice miša, obuhvaća slijedeće korake:

- 1) imunizaciju miševa s danim iznosom virusa inaktiviranim s β -propiolaktonom;
- 2) uklanjanje slezene imuniziranih miševa i odjeljivanje splenocita;
- 3) fuziju tako dobivenih splenocita sa stanicama myeloma u prisutnosti sredstva za pospješivanje fuzije;
- 35 4) kultivaciju dobivenih hibridnih stanica u selektivnom mediju na kojem se ne razvijaju nefuzionirane stanice mieloma, te u prisutnosti odgovarajućih komponenti; te
- 5) selekciju stanica koje produciraju željena antitijela i kloniranje tih stanica.

- 40 Protokol imunizacije obuhvaća intraperitonealno iniciranje Balb-C miševima 100 μ g CV5 virusa inaktiviranog s β -propiolaktonom, zajedno s FIEUND=ovim pomoćnim sredstvom i intravenoznom dozom lijeka koji pojačava imunitet 4 dana prije fuzije nakon odmora od 1 mjeseca.

Splenociti imuniziranih miševa se otkrivaju nakon uklanjanja slezene prema uobičajenom postupku.

- 45 Stanice mieloma miša upotrijebljene za dobivanje neutraliziranih monoklonskih antitijela su stanice mieloma Balb-C miševa koji potječu od SP₂O linije. Ove stanice mieloma su izolirane zbog svoje selektivnosti prema aminopterinu i kultiviraju se na odgovarajućem mediju kao što je Eaglesov osnovni medij modificiran po DULBECCO (Dulbecco Modified Eagle medium), dalje označavan kao DMEM, u kojega se doda 15% seruma ždrebeta.

- 50 Stanice mieloma se fuziraju sa splenocitima miješajući 5×10^7 stanica mieloma s 5×10^7 stanica slezene imuniziranih miševa, u prisutnosti sredstva za pospješivanje fuzije kao što je, na primjer, polietilen glikol.

Nakon inkubacije na 37°C, stanice se isperu u DMEM, resuspendiraju i zatim kultiviraju na selektivnom mediju koji je odgovarajući jedino za rast hibridnih stanica. Takav medij sadrži hipoksantin, aminopterin i timidin.

55

Zatim se sakupe supernatanti kulture, 7 do 20 dana nakon fuzije, dovodeći supernatante u kontakt sa suspenzijom CVS virusa i izabiranjem antitijela koja neutraliziraju tu suspenziju.

- 60 "Antitijela koja neutraliziraju virus" podrazumijevaju antitijela koja, kada se dovedu u kontakt sa suspenzijom spomenutog virusa, inhibiraju njenu virulenciju.

Sposobnost neutralizacije prethodno dobivenih monoklonskih antitijela je određena uobičajenim postupkom poznatim stručnjacima. Taj postupak se sastoji od stavljanja 100 µl suspenzije virusa koja sadrži 1000 PFU virusa u kontakt s 100 µl supernatanta kulture hibridoma, inficiranja kulture stanica tom smjesom i 4 dana nakon inkubacije, brojanja liziranog plaqua ispod agara postupkom opisanom od Bussereau i sur., 1982, J. Virol. Meth., vol. 4, pp. 277-282. Antitijela su neutralizirajuća ako inhibiraju sve formacije plaqua ispod agara uz prethodno opisane uvjete.

Zatim od tih tijela se izaberu ona koja ne neutraliziraju TAG1 avirulentni mutant dobiven iz CVS soja, pohranjenog u Colection Nationale de Cultures de Micro-organismes (C.N.C.M.)

INSTITUT PASTEUR - FRANCE od 12. 4. 1985. pod brojem I-433.

Rezultirajuća monoklonska antitijela, koja neutraliziraju CVS soj, ali ne neutraliziraju TAG1 avirulentni mutant, mogu izabrati avirulentne mutante iz bilo kojeg virusa bjesnoće koji je neutraliziran u tim monoklonskim antitijelima.

Tako dobivena monoklonska antitijela su antitijela koja također neutraliziraju SAD sojeve virusa bjesnoće, pa su tako prikladne za provođenje prve selekcije postupka prema izumu.

Redoslijed 333 područja glikoproteina mutanata izabranih u koraku 1) je određen uobičajenim postupkom dobro poznatim stručnjacima [Sanger i sur., 1977, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol. 74, pp. 5463-5467].

Ovo određivanje redoslijeda daje mogućnost izoliranja mutanta koji ima lizin u položaju 333 glikoproteina; taj mutant će kasnije biti označen kao "SK mutant".

Kodon (AAA) ove amino kiseline (lizin) se razlikuje u jednom nukleotidu od kodoma arginina u položaju 333 SAD soja, kodon arginina u položaju 333 SAD soja je AGA.

Nakon toga slijedi pripremanje monoklonskih antitijela koja neutraliziraju i SAD soj i prethodno dobiven mutant.

Ta monoklonska antitijela su dobivena selekcijom, od monoklonskih antitijela koja neutraliziraju SAD soj i ne neutraliziraju TAG1, te također neutraliziraju lizin mutant ili SK mutant prethodno dobiven.

Ova monoklonska antitijela, zatim omogućavaju provođenje druge selekcije (korak 4) prema postupku ovog izuma.

Patogena moć mutanata dobivenih u drugom koraku selekcije se zatim testira intracerebralnim iniciranjem odraslih miševa s 10^5 PFU. Za mutante koji nisu ubijeni tom dozom i tim načinom iniciranja smatralo se da su avirulentni.

Mutanti prema ovom izumu su dvostruko virulentni mutanti SAD soja, kao što je SAD Berne soj posebno, te dobiveni pomoću dvije sukcesivne selekcije uz pomoć prethodno definiranih monoklonskih antitijela.

Mutanti prema ovom izumu mogu također sadržavati i ostale mutante, na primjer mutacija koja podrazumijeva rezistenciju monoklonskih antitijela specifičnih za antigenu stranu II, što omogućava prepoznavanje moguće virulencije SAD soja upotrijebljenog za oralno cijepljenje lisica.

Mutanti prema izumu se mogu umnožiti na BHK 21 baby hamster kidney stanicama u prisutnosti GEM (minimalni osnovni medij promijenjen od Glasgow, pod nazivom FLOW) i 2% seruma ždrebeta na 33°C i u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% CO₂.

Titiraju se uobičajenim postupkom, na primjer određivanjem 50% letalne doze (LD₅₀) u mladim miševa, imuno florescencijom ili brojanjem liziranog područja ispod agara. Mogu se čuvati na -70°C.

Analiza redoslijeda nukleotida glikoproteina ovih mutanata pokazuje da se kodon amino kiselina u položaju 333 razlikuje u najmanje dva nukleotida od svih mogućih kodoma arginina. Od mutanata koji zadovoljavaju taj uvjet, posebno se preferira mutant koji ima glutaminsku kiselinu u položaju 333 zbog toga što se dobro umnožava u staničnoj kulturi, te je manje patogen prema mladunčadi miševa i ima dobru zaštitnu moć.

Dvostruki mutant koji ima glutaminsku kiselinu s kodonom GAA na mjestu arginina u položaju 333, dobiven prethodnim postupkom iz SAD Berne soja i prikazan u daljnjem tekstu kao SAG2, je deponiran u Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (C.N.C.M.) INSTITUT PASTUER - FRANCE od 9. 7. 1992. pod brojem I-1238. Taj mutant sadrži još jednu mutaciju, rezistenciju prema monoklonskim antitijelima specifičnim za antigenu stranu II, koja služi kao dodatni marker soja.

Izum će sada biti detaljnije opisan sa bilješkama vezanim za SAG2 mutant, bez limitiranja izuma samo na taj mutant.

A- Testovi genetičke stabilnosti soja za vrijeme prolaska kroz mozgove mladih miševa

5 Čest četverodnevni miševa je inicirano s 10^3 PFU SAG2.

Kada se životinje razbole (D6), ubiju se. Načinjeno je šest pojedinačnih osnovnih preparata; svaki osnovni preparat se titrira te se 3 odrasla miša (kontrola patogenosti) i jedan mladi miš (idući prolazak) injicira s 30 μ l razrijeđenje 1/10. Tako je omogućeno da 6 mladih miševa provede 6 nezavisnih serija od po 3 prolaska.

Titri u mozgovima u PFU/ml su prikazani u sljedećoj tabeli:

10

Serija	A	B	C	D	E	F
1 prolazak	$>5 \times 10^7$	1.5×10^7	10^7	10^6	10^6	10^6
2 prolazak	$>5 \times 10^7$	2.5×10^7	$>5 \times 10^7$	$>5 \times 10^7$	$>5 \times 10^7$	$>5 \times 10^7$
3 prolazak	$>5 \times 10^7$	$>5 \times 10^7$	$>5 \times 10^7$	$>5 \times 10^7$	$>5 \times 10^7$	$>5 \times 10^7$

Svi odrasli (tj. 54 miša) inicirani nakon prvog, drugog ili trećeg prolaska su preživjeli, pokazujući odsutnost reverzije.

B- Protektivna moć SAG2

15

Miš je iniciran intracerebralno s SAG2 mutantom i protektivna moć ovog mutanta je određena intramuskularnim testiranjem 100 LD₅₀ CVS soja.

20

Dobiveni rezultati su prikazani na slici 2, koja je grafički prikaz odnosa protektivne moći (%) na koordinati kao funkcija iznosa injiciranog mutanta, izražena u PFU/mišu (10g). Isti test je ponovljen sa SK mutantom koji ima lizin u položaju 333.

Pronađeno je da je protektivna moć SK i SAG2 100% pri 10^4 PFU/mišu.

C- Patogenost SAG2 nakon intracerebralne primjene

25

Miševima se injicira SAG2 mutant pri dozama raspona $10^{-0.5}$ do 10^6 PFU/mišu i promatra se mortalitet tokom 28-dnevnog perioda.

Paralelno, isti eksperiment je proveden sa SAD Berne virusom ili SK mutantom.

30

Rezultati su prikazani na slici 3, koja je grafički prikaz % mortaliteta (na koordinati) kao funkcija iznosa injiciranog mutanta po mišu (na apscisi).

Pronađeno je da SAG2 mutant ne uzrokuje mortalitet, dok SK mutant ima slabu rezidualnu patogenost.

35

D- Patogenost SAG2 nakon intramuskularne primjene

Prethodni test je ponovljen osim što je primjena bila intramuskularna. Dobiveni rezultati su prikazani na slici 4, koja prikazuje % mortaliteta (na koordinati) kao funkciju doze primijenjene PFU/mišu (na apscisi).

40

Jasno je da SAG2 i SK mutant ne uzrokuju mortalitet.

Mutanti prema izumu mogu se primijeniti kao živa cjepiva bilo kojim putem primjene koji se uobičajeno upotrebljava, te posebno intermuskularnom ili oralnom primjenom. Mutanti se mogu razrijediti u farmaceutski prihvatljivom, inertnom sredstvu kao što je izotonična otopina.

45

PATENTNI ZAHTJEVI

50

1. Avirulentno cjepivo protiv bjesnoće, **naznačeno time**, da sadrži avirulentni mutant SAD spoja virusa bjesnoće čiji glikoprotein sadrži u položaju 333 prirodnu aminokiselinu čiji se kodon razlikuje od kodona arginina u najmanje dva nukleotida.

2. Cjepivo prema zahtjevu 1, **naznačeno time**, da je aminokiselina u položaju 333 glutaminska kiselina.

3. Cjepivo prema jednom od zahtjeva 1 ili 2, **naznačeno time**, da je mutant SAD Berne soja.

55

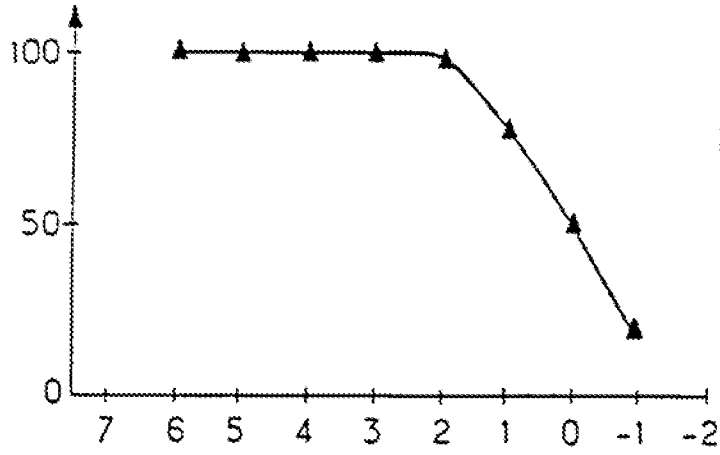
4. Cjepivo prema bilo kojem od zahtjeva od 1 do 3, **naznačeno time**, da je mutant onaj koji je pohranjen u Nacionalnoj kolekciji kultura mikroorganizama u Francuskoj (The Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - INSTITUT PASTEUR (C.N.C.M) France) od 9.7.1992. pod brojem I-1238.

5. Dvostruki avirulentni mutant SAD soja virusa bjesnoće, **naznačen time**, da njegov glikoprotein sadrži u položaju 333 prirodnu aminokiselinu čiji se kodon razlikuje od kodona arginina u dva nukleotida.
6. Dvostruki avirulentni mutant prema zahtjevu 5, **naznačen time**, da je aminokiselina u položaju 333 glutaminska kiselina.
- 5 7. Dvostruki avirulentni mutant prema jednom od zahtjeva 5 ili 6, **naznačen time**, da je mutant SAD Berne soja.
8. Dvostruki avirulentni mutant SAD Berne soja, **naznačen time**, da je pohranjen u Nacionalnoj kolekciji kultura mikroorganizama u Francuskoj (The Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes - INSTITUT PASTEUR (C.N.C.M) France) od 9.7.1992. pod brojem I-1238.
9. Postupak dobivanja dvostrukih mutanata prema bilo kojem od zahtjeva 5 do 8, **naznačen time**, da se sastoji od:
 - 10 a) selekcije, iz SAD soja virusa bjesnoće, onih mutanata koji nisu neutralizirani monoklonskim antitijelima koja neutraliziraju spomenuti SAD soj, ali ne neutraliziraju TAG1 soj;
 - b) izolacije, sekvenciranjem 333 područja glikoproteina mutanata izabranih u koraku 1.), mutanata koji sadrže lizin u položaju 333;
 - 15 c) pripremanja monoklonskih antitijela koja neutraliziraju i SAD soj i mutant dobiven u koraku 2.), ali ne neutraliziraju TAG1 soj; te
 - d) prevođenje druge selekcije mutanata dobivenih u koraku 1.) pomoću monoklonskih antitijela pripremljenih u koraku 3.).

20 SAŽETAK

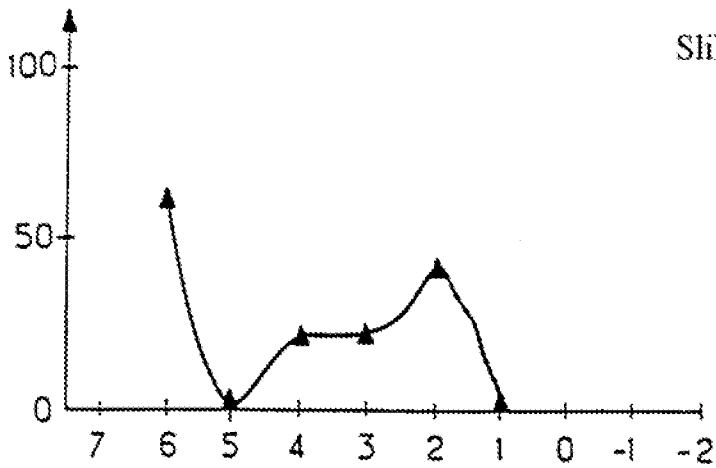
Izum se odnosi na avirulentno cjepivo protiv bjesnoće koje se sastoji od avirulentnog mutanta SAD soja virusa bjesnoće, čiji glikoprotein u položaju 333 sadrži prirodnu amino kiselinu čiji se kodon razlikuje od kodona arginina u najmanje dva nukleotida.

% MORTALITET



Slika. 1a

% MORTALITET



Slika. 1b

PFU/MIŠU (log)

