



(19) **HU**

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **226 257**

(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 02 00984**

(22) A bejelentés napja: **2002. 03. 14.**

(40) A közzététel napja: **2006. 12. 28.**

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2008. 07. 28.**

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

A61P 1/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

(30) Elsőbbségi adatok:

MI2001A000555 2001. 03. 14. IT

(72) Feltaláló:

**Kramer, Theodore T., Fort Collins,
Colorado (US)**

(73) Jogosult:

FATRO S.p.A., Ozzano Emilia (IT)

(74) Képviselő:

**Svingor Ádám, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest**

(54) **Gyengített *Salmonella gallinarum-pullorum* törzs és e törzset tartalmazó vakcina**

(57) Kivonat

A találmány tárgyát gyengített *Salmonella gallinarum-pullorum* törzs, az új törzs előállítására szolgáló eljárás,

illetve a törzset tartalmazó, állati és emberi salmonellosis elleni vakcinák képezik.

HU 226 257 B1

A találmány tárgyát gyengített *Salmonella gallinarum-pullorum* törzs, az új törzs előállítására szolgáló eljárás, illetve a törzset tartalmazó, állati és emberi salmonellosis elleni vakcinák képezik.

Állati és emberi salmonellosis általában két formában létezik:

1. Jellemzően enterikus forma, amelyet gyakran általánosan elterjedt (nem gazdaspecifikus) Salmonellák – többek között *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. heidelberg*, *S. anatum*, *S. montevideo*, és hasonlók – okoznak. Ezen általánosan elterjedt törzsek könnyen átvihetők egyik gazdáról (ideértve az embert is) a másikra.

2. Fajspecifikus *Salmonella* fajok vérmérgezést okoznak a gazdában. Ezek ritkán kerülnek át másik gazdára, amelyben egyébként enteritist és diarrhoeát okoznak. E *Salmonella* fajok az alábbiak: *S. typhi* (vagy *typhosa*), amely emberben tifuszos lázat okoz; *S. dublin* amely enteritist, vérmérgezést, koraszülést és emlődgyulladást okoznak szarvasmarhában (és néha juhban); *S. choleraesuis*, amely sertésben vérmérgezést okoz; *S. gallinarum-pullorum*, amely madarakban pullosist és typhosist okoz. A *Salmonella gallinarum-pullorum* előnyösen az 1, 9, 12 szerotípusokhoz tartozik.

Ismert, hogy a *Salmonella gallinarum-pullorum* ellen a kereskedelmi forgalomban elérhető, élő, gyengített vakcinák különféle eljárásokkal legyengített mikroorganizmusokat tartalmaznak.

Az EP555.366 sz. európai közzétételi irat a *Salmonella choleraesuis* elleni élő, gyengített vakcinák előállítását ismerteti, míg az EP876.476 sz. európai közzétételi iratban madarakban a *Salmonella enteritidis* által okozott fertőzés elleni élő, gyengített vakcinát írnak le. Ezen eljárások leállításának az az oka, hogy a folyamat során a virulenciát nem sikerült teljesen kiküszöbölni, sőt mi több, az esetleges fertőzés kockázata, alacsony szinten ugyan, de továbbra is fennáll.

Az elérhető egyetlen termék esetében sem gyengítették a mikroorganizmusokat heterofil granulocitákkal végzett fagocitózis útján.

Váratlanul új, tökéletesen avirulens *Salmonella gallinarum-pullorum* törzset találtunk, ami megfelel a találmány céljának.

A találmány szerinti, SGP695AV elnevezésű törzset 2000. december 27-én PTA 2589 katalógusszámon letétbe helyeztük az ATCC-nél (American Type Culture Collection).

A találmány tárgyát képezik továbbá az új törzsből előállított, élő, gyengített vakcinák mellett a találmány szerinti törzs előállítására szolgáló eljárás is.

Vakcinák előállíthatók és kereskedelmi forgalomba hozhatók liofilizált formában, illetve az orális vagy parenterális beadásra szuszpenzióként vagy oldatként.

A gyógyászati készítmény a találmány szerinti *Salmonella gallinarum-pullorum* törzset és alkalmas adalék anyagokat, adjuvánsokat és tartósítószeret tartalmaz.

A találmány szerinti vakcina előnyösen alkalmazható a *Salmonella gallinarum-pullorum* okozta fertőzés

közvetlen megelőzésre. Konkrétan, a találmány szerinti, egyedülálló gyengítési eljárásnak köszönhetően az élő vakcina jellemző előnye – nevezetesen az, hogy a *Salmonella* (amely fakultatív sejten belüli kórokozóként működhet) által indukált fertőzések esetében fontos, sejt által közvetített immunvédekezés serkentésére kerül sor – társul, az inaktivált vakcinákkal összevethető, biztonságos alkalmazással.

A találmány szerint baktériumokat gyengítünk heterofil granulocitákkal végzett fagocitózis alkalmazásával.

A Salmonellák, heterofilek általi fagocitózisa következtében a Salmonellák virulenciájának jellemzői megváltoznak, amely a Salmonellák gyengülését eredményezi. A fagocitált baktériumklónokat avirulencia szempontjából megvizsgáljuk, és amennyiben az összes fagocitált baktérium nem megfelelően avirulens, a fagocitálást megismételjük. Teljesen, vitán felül avirulens törzseket a leginkább avirulens törzs kiválasztásával és annak ismételt fagocitózisával állíthatunk elő.

A találmány szerinti vakcinák beadhatók az ismert vakcinák esetében alkalmazott eljárások szerint (dózisok, ismétlési és beadási rendek). A találmány szerinti vakcinák előnyösen alkalmazhatók madarak, előnyösen baromfi, typhosis és a madarak pullosisa elleni vakcinálására.

Továbbá a találmány szerinti vakcinák előnyösen alkalmazhatók 1, 9, 12 vagy 9, 12 szerotípusokhoz sorolt Salmonellák okozta *Salmonellosis* elleni vakcinálásra.

A találmányt részletesebben leírjuk az alábbi példában.

Példa

1. Kórokozó, virulens *Salmonella gallinarum-pullorum* (SGP) törzset tápoldaton 1×10^8 CFU/ml (Colony Forming Unit, telepformáló egység) koncentrációig tenyésztettünk. Friss baromfivérből kinyert, $6,5 \times 10^6$ /ml heterofil granulocitát tartalmazó szuszpenzió 3 ml-ét 1 ml, 1×10^8 CFU/ml koncentrációjú SGP-hez adtuk és fagocitózis céljából 20 percig inkubáltuk.

2. Az SGP-heterofil granulocita keveréket 250 g-vel lecentrifugáltuk, és az üledéket 4 ml, 100 μ /ml gentamicint tartalmazó HBSS-ben (Hank-féle kiegyensúlyozott sószuszpenzió) 10 percig inkubáltuk.

3. Az élő, nem fagocitált, extracelluláris SGP-k hiányáról úgy győződünk meg, hogy centrifugálás után a felülúszót tápoldatban tenyésztettük.

4. A 3. lépésből származó üledéket 100 μ l kanamicint tartalmazó HBSS-ben felszuszpendáltuk és 10 percig inkubáltuk.

5. Az élő, nem fagocitált, extracelluláris SGP-k hiányáról úgy győződünk meg, hogy centrifugálás után a felülúszót tápoldatban tenyésztettük.

6. A 4. lépésből származó üledéket, antibiotikumot nem tartalmazó HBSS-ben felszuszpendáltuk és 10 percig inkubáltuk.

7. Az élő, nem fagocitált, extracelluláris SGP-k hiányáról úgy győződünk meg, hogy centrifugálás után a felülúszót tápoldatban tenyésztettük.

8. A 6. lépésből származó sejtüledéket 1% szaponinoldatot és desztillált vizet tartalmazó oldatban 3 percig történt inkubálással lizáltuk. A visszamaradt üledéket TSA-ba (Trypticase soy agar) oltottuk és a fagocitált SGP telepek összegyűjtése céljából 24 órán át inkubáltuk.

9. A 8. lépésből származó telepek közül 10 különböző telepet orálishan, 10^7 CFU koncentrációban, egy napos csirkéknek adtuk be az avirulencia megállapítása céljából.

Valamely (egyetlen) telepet akkor tekintünk avirulensnek, ha ötnapos csirkék, fagocitált SGP-kel történt oltás után 10 nappal életben maradnak és jó egészségi állapotot mutatnak.

10. Az 1–9. lépésekből álló eljárással előállított, avirulens klónon, a klón avirulenciájának megállapítására, újból elvégeztük a fenti lépéseket.

A konkrét esetben:

A kiindulási törzs *Salmonella gallinarum-pullorum* (SGP) virulens törzs volt, amelyet a fentiekben leírt 10 lépésből álló eljárással kezeltünk. Az egyes fagocitózis ciklusok végén klónt szelektáltunk és további fagocitózis ciklusnak vetettük alá. Az eredményül kapott SGP695AV törzset 47 db egynapos csirkén teszteltük. Huszonöt darab egynapos csirkén, a vad típusú, virulens törzsszel végzett összehasonlító tesztek kimutatták, hogy az SGP695AV törzs avirulens és az ugyanazon környezetben lévő fogékony „őrszem”-egyedekre („sentinel”) nem vihető át. Ellenben, a vad típusú SGP695AV törzs a fertőzés után 10 nappal az egyedek 64%-ának halálát, az esetek 89% a belső szervek fertőzését, illetve a fogékony őrszem egyedek átfertőzését okozta.

Az adatokat az 1. és 2. táblázat tartalmazza.

1. táblázat

A virulens és a gyengített törzsekkel végzett fertőzés eredménye egynapos POF (kórokozó szervezettől mentes) csirkéken

Csoportok	Elhalt egyedek száma	Százalékos mortalitás	Pozitív tenyészetek száma		Pozitív tenyészetek aránya (%)	
			Belső szervek	Vak vékonybél	Belső szervek	Vak vékonybél
I. SGP695AV $1,1 \cdot 10^7$ CFU	0/26	0	1/26	0/26	3,8	0
II. SGP695AV $1,1 \cdot 10^8$ CFU	0/21	0	1/21	0/21	4,8	0
III. SGP695V (virulens) $1,1 \cdot 10^7$ CFU	16/25	64	8/9	8/9	89	89

2. táblázat

SGP695AV és SGP695V (virulens) törzsek, vakcinált állatokból őrszem állatokba történő horizontális átvitelének összehasonlítása

Csoportok	Elhalt egyedek száma	Pozitív sejtek száma		Károsodott egyedek száma
		Szervek	Vak vékonybél	
10^7 és 10^8 CFU SGP695AV-vel vakcinált I. és II. csoport, megfelelően	0/8	0/8	0/8	0/8
10^8 CFU SGP695V-vel (virulens) fertőzött III. csoport	3/5	3/3	3/3	1/3

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Az SGP695AV elnevezésű, American Type Culture Collectionnél PTA 2589 katalógusszámon letétbe helyezett *Salmonella gallinarum-pullorum* törzs.

2. Élő gyengített vagy inaktivált vakcina, amely aktív összetevőként az 1. igénypont szerinti *Salmonella gallinarum-pullorum* törzset tartalmazza.

3. A 2. igénypont szerinti vakcina madarak vakcinálására.

4. A 3. igénypont szerinti vakcina baromfi vakcinálására.

5. A 2–4. igénypontok bármelyike szerinti vakcina madarak *typhosisa* elleni vakcinálásra.

5 6. A 2–4. igénypontok bármelyike szerinti vakcina madarak *pullorosisa* elleni vakcinálásra.

7. A 2–4. igénypontok bármelyike szerinti vakcina az 1, 9, 12 vagy 9, 12 szérumsoportokba tartozó Salmonellák okozta *salmonellosis* elleni vakcinálásra.