

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

31 355

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)
A61K 33/06 (2006.01)
A61K 33/42 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-34262**
(22) Přihlášeno: **27.10.2017**
(47) Zapsáno: **09.01.2018**

- (73) Majitel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ
Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané, CZ
- (72) Původce:
RNDr. Jiří Salát, Ph.D., Brno, Kohoutovice, CZ
doc. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D., Vyšší Brod, CZ
Mgr. Petra Formanová, Kuřim, CZ
RNDr. Luděk Eyer, Ph.D., Boskovice, CZ
MVDr. Milan Huňady, Bohdalice - Pavlovice, CZ
- (74) Zástupce:
INVENTIA s.r.o., Kateřina Hartvichová, Na bělidle
64/3, 150 00 Praha 5, Smíchov

- (54) Název užitého vzoru:
**Vakcína proti klíšťové encefalitidě k
veterinárnímu užití**

CZ 31355 U1

Vakcína proti klíšťové encefalitidě k veterinárnímu užití

Oblast techniky

Technické řešení se týká vakcíny proti klíšťové encefalitidě k veterinárnímu užití.

Dosavadní stav techniky

- 5 Klíšťová encefalitida (KE) je jedním z nejzávažnějších infekčních onemocnění postihujících centrální nervový systém vyskytujících se v České republice. Onemocnění způsobuje virus klíšťové encefalidity (VKE). K přenosu viru dochází typicky během sání krve infikovaným klíštětem, méně častým způsobem přenosu onemocnění je alimentární cesta při pozření virem kontaminované potravy. Mimo typických rezervoárových hostitelů může být klíšťovou encefalidou infikován i člověk a také domestikovaná zvířata. Nejzávažnější forma onemocnění člověka se projevuje jako zánět mozku a míchy a bývá spojena s nejtěžšími nebo i fatálními případy (Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A., Gould, E. A. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res* 2003, 57: 129-146). U některých druhů zvířat se může onemocnění manifestovat podobnými klinickými příznaky jako u lidí, například u psů byly popsány symptomy poukazující na závažné poškození mozku (Pfeffer, M., Dobler, G. Tick-borne encephalitis in dogs - is this an issue? *Par Vector* 2011, 4:59) a u koní je v souvislosti s onemocněním klíšťovou encefalidou popisována dlouhodobá ztráta celkové kondice (Klaus, C., Horugel, U., Hoffmann, B., Beer, M. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) in horses: clinical and laboratory findings and epidemiological investigations. *Vet Microbiol* 2013, 163:368-372). U přežvýkavců má klíšťová encefalitida obvykle podobu asymptomatické infekce a nepředstavuje tak zdravotní problém pro samotného nakaženého hostitele. Ve vzácných případech ale může nákaza virem klíšťové encefalidity u přežvýkavců vést k rozvoji závažné neuroinfekce (Böhm, B., Schade, B., Bauer, B., Hoffmann, B., Hoffmann, D., Ziegler, U., Beer, M., Klaus, C., Weissenbock, H., Böttcher, J. Tick-borne encephalitis in a naturally infected sheep. *BMC Vet Res.* 2017 Aug 22; 13(1):267. doi: 10.1186/s12917-017-1192-3.). Riziko nákazy také ohrožuje člověka konzumujícího mléko nebo mléčné produkty kontaminované virem. Zdrojem alimentární infekce člověka může být mléko koz, ovcí i krav infikovaných virem klíšťové encefalidity (Offerdahl, D. K., Clancy, N. G., Bloom, M. E. Stability of a tick-borne flavivirus in milk. *Front Bioeng Biotechnol* 2016, 4:40).

- 30 Kromě obecných pravidel ochrany před infestací klíšťaty je nejúčinnějším preventivním opatřením před onemocněním klíšťovou encefalidou aktivní imunizace (Kunz, C. TBE vaccination and the Austrian experience. *Vaccine* 2003; 21 Suppl 1 : S50-55). V Evropě jsou v současné době používány dvě humánní vakcíny založené na evropských kmenech viru klíšťové encefalidity: FSME-IMMUN - kmen Neudörfl (Pfizer Manufacturing Austria GmbH) a ENCEPUR - kmen 23 (Novartis Vaccines and Diagnostic). Vakcína proti klíšťové encefalitidě k veterinárnímu užití není v současné době k dispozici.

Podstata technického řešení

Podstatou technického řešení je vakcína proti klíšťové encefalitidě k veterinárnímu užití, která obsahuje inaktivovaný virus klíšťové encefalidity v celovirionové formě. Virus může být inaktivován známými způsoby, například ošetřením formaldehydem.

- 40 Aplikace vakcíny podle technického řešení vyvolává v cílovém subjektu tvorbu specifických protilátek proti viru klíšťové encefalidity (anti-VKE protilátek), které mají ochranný efekt proti infekci klíšťovou encefalidou. Vakcína je určena na ochranu zvířat před infekcí klíšťovou encefalidou.

- 45 Vakcína s výhodou obsahuje inaktivovaný virus klíšťové encefalidity kmene Hypr. Použitý kmen viru je dostupný například v European Virus Archive (<https://www.european-virus-archive.com/virus/tick-borne-encephalitis-virus-western-subtype-strain-uvetbev1953czhypr>).

Vakcína dále může obsahovat další farmaceuticky přijatelné pomocné látky, typicky rozpouštědla, nosiče a/nebo adjuvanty. Adjuvanty jsou látky zvyšující odpověď imunitního systému na vakcínu.

Vhodným rozpouštědlem může být například fyziologický roztok. Vhodným adjuvantem může být například hlinitá sůl, zejména hydroxid hlinitý nebo fosforečnan hlinitý, nebo skvalen.

Vakcína proti klíšťové encefalitidě k veterinárnímu užití podle předkládaného technického řešení je s výhodou upravena pro subkutánní nebo intramuskulární podání.

- 5 Cílem vakcíny podle předkládaného technického řešení je ochránit vakcinací zvíře před rozvojem infekce klíšťové encefalidity a zabránit tak:
- a) dočasnému či trvalému poškození zdraví infikovaného zvířete (např. u psů, koní a přežvýkavců),
 - b) rozvoji infekce u hospodářských zvířat chovaných pro mléko (kozy, ovce, skot) a tím způsobem zamezit kontaminaci mléka virem klíšťové encefalidity a ochránit tak spotřebitele (člověka) před infekcí klíšťovou encefalitidou alimentární cestou.

Objasnění výkresů

15 Obr. 1: Analýza antigenu připraveného v příkladu provedení. A: separace virových proteinů pomocí denaturační polyakrylamidové gelové elektroforézy. E protein (šipka). B: imunodetekce E-proteinu, hlavního obalového proteinu VKE (šipka). Popisky: Ag - vzorek antigenu. MM - molekulový marker (kDa)

Obr. 2: Imunogenita vakcíny připravené podle příkladu provedení. Tvorba specifických anti-VKE protilátek po vakcinaci u myši (A) a u ovcí (B). VIEU jsou specifické jednotky pro množství protilátek proti VKE.

20 Obr. 3. Účinnost vakcíny připravené podle příkladu provedení. Přežívání vakcinovaných a nevakcinovaných myši v infekčním experimentu, při kterém byly myši experimentálně infikovány živým kmenem VKE - Hypr (A) nebo terénním kmenem VKE - KE 9001 (B).

Příklad uskutečnění technického řešení

25 Vakcína proti klíšťové encefalitidě k veterinárnímu užití byla připravena pro subkutánní nebo intramuskulární podání. Jako specifický antigen vyvolávající tvorbu ochranných anti-VKE protilátek vakcína obsahuje inaktivovaný VKE kmen Hypr.

1) Příprava antigenu

30 Antigen pro vakcínu proti klíšťové encefalitidě byl připraven jako celovirionový preparát. VKE kmen Hypr byl pomnožen na buněčné linii BHK-21 (linie epiteliálních buněk z ledviny křečka). Následně byl virus purifikován z kultivačního média pomocí srážení, ultracentrifugací na gradientu a purifikací přes filtrační systémy. Množství proteinu v antigenním preparátu bylo měřeno metodou dle Bradfordové. Purifikace antigenu byla ověřena pomocí denaturační polyakrylamidové gelové elektroforézy (Obr. 1A), Westernova přenosu a následné imunodetekce. Pomocí těchto metod bylo prokázáno, že hlavní obalový protein viru - E protein, je majoritní součástí purifikovaného antigenu a je rozpoznáván specifickou monoklonální protilátkou proti tomuto proteinu (Obr. 1B).

2) Příprava a vlastní složení vakcíny

40 Pro účely přípravy vakcíny byl purifikovaný virus klíšťové encefalidity inaktivován formaldehydem. Úspěšnost inaktivace byla ověřena in-vitro na buněčné linii PS (linie epiteliálních buněk z ledviny prasete). Vlastní vakcína má následující složení:

- antigen: purifikovaný inaktivovaný virus (10 µg/dávka)
- adjuvans - hydroxid hlinitý ve formě 2 % Alhydrogelu - 10 % objemu jedné dávky
- fyziologický roztok.

Použitý celkový objem jedné dávky vakcíny: 0,15 ml pro myši, 1 ml pro ovce.

3) Ověření bezpečnosti a *imunogenity vakcíny*

Bezpečnost a imunogenita připravené vakcíny byla ověřena nejprve na myším modelu. Skupina deseti laboratorních myší byla subkutánně imunizována připravenou vakcínou. Celkový objem jedné dávky aplikované vakcíny byl 0,15 ml. Imunizační proces byl proveden třemi dávkami vakcíny s časovými prodlevami 14 dnů mezi jednotlivými dávkami. Vakcína byla bezpečná a byla zvířaty dobře snášena. Týden po poslední aplikaci vakcíny bylo stanoveno množství specifických protilátek proti VKE v séru imunizovaných myší metodou ELISA. Připravená vakcína vyvolala tvorbu specifických anti-VKE protilátek (Obr. 2A).

Následně byla testována bezpečnost a imunogenita vakcíny na ovcích. Tři zvířata byla vakcinována v obdobném schématu, které bylo použito u myší. Celkový objem jedné dávky aplikované vakcíny byl 1 ml. Následná detekce specifických anti-VKE protilátek prokázala jejich tvorbu u vakcinovaných zvířat (Obr. 2B). Vakcína byla bezpečná a byla zvířaty dobře snášena.

4) *Ověření účinnosti vakcíny*

Účinnost vakcíny byla ověřena nejprve na myším modelu infekčním pokusem s využitím živého kmene VKE Hypr a dalšího terénního kmene VKE (KE 9001). Imunizované myši podle schématu uvedeného výše (viz bod 3) byly experimentálně infikovány letální dávkou vakcinačního kmene Hypr (5 myší) a terénním kmenem KE 9001 (5 myší). Imunizace navodila ochranu před rozvojem letální infekce u všech imunizovaných myší jak proti vakcinačnímu kmenu Hypr (Obr. 3A) tak proti terénnímu kmenu (KE 9001) (Obr. 3B). Naproti tomu u všech experimentálně infikovaných nevakcinovaných myší docházelo k rozvoji fatální formy klíšťové encefalitidy u obou použitých kmenů.

V případě ověřování účinnosti vakcinace na ovcích byla sledována hladina virémie po infekci u vakcinovaných a nevakcinovaných zvířat. Ovce byly imunizovány podle schématu uvedeného výše (viz bod 3). Imunizovaná zvířata (3 ks) a neimunizovaná zvířata (4 ks) byla infikována terénním kmenem VKE (KE 9001), následně jim byla ve vybraných časových intervalech odebrána krev za účelem detekce VKE. Imunizace ovcí připravenou vakcínou zabránila virémii, VKE nebyl zachycen u žádného ze tří vakcinovaných zvířat. Naproti tomu u tří zvířat z nevakcinované skupiny (4 jedinci) byla plakovou metodou prokázána přítomnost VKE v krvi.

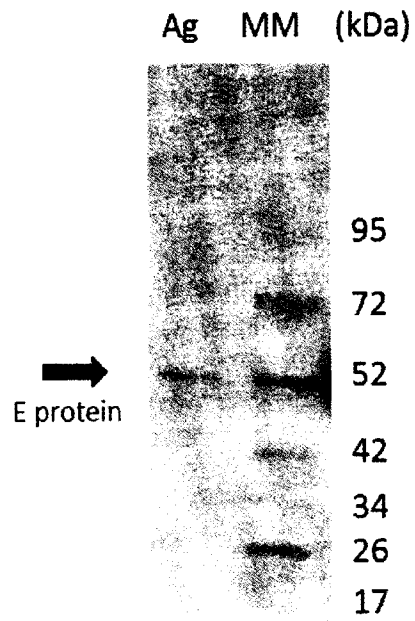
NÁROKY NA OCHRANU

1. Vakcína proti klíšťové encefalitidě k veterinárnímu užití, **vyznačující se tím**, že obsahuje inaktivovaný virus klíšťové encefalitidy v celovirionové formě.
2. Vakcína podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že inaktivovaný virus klíšťové encefalitidy je virus kmene Hypr.
3. Vakcína podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje další farmaceuticky přijatelné pomocné látky vybrané ze skupiny zahrnující rozpouštědla, nosiče a adjuvanty.
4. Vakcína podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že rozpouštědlem je fyziologický roztok.
5. Vakcína podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že adjuvantem je skvalen nebo hlinitá sůl, s výhodou hydroxid hlinitý nebo fosforečnan hlinitý.
6. Vakcína podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že je upravena pro subkutánní nebo intramuskulární podání.

Obr. 1

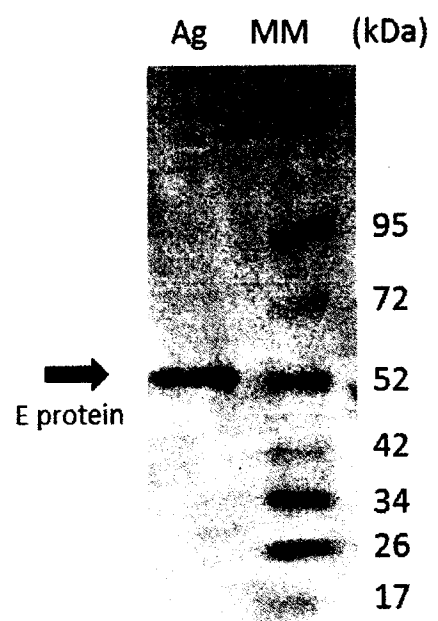
A

Gelová elektroforéza



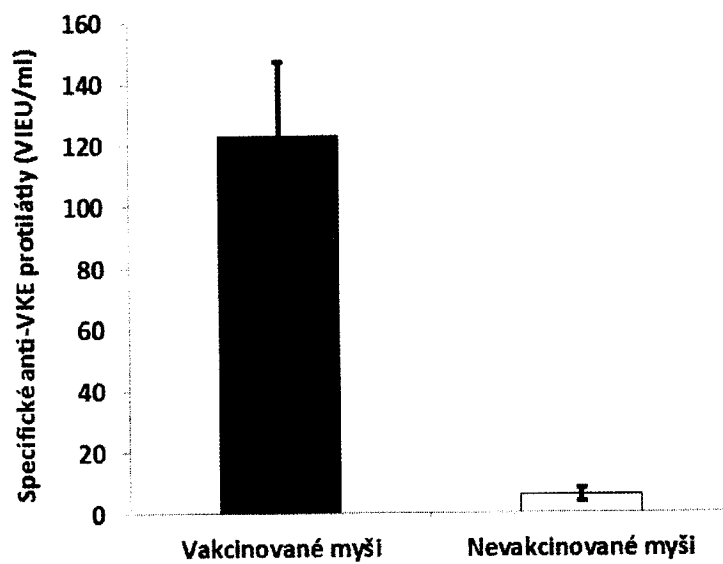
B

Imunodetekce

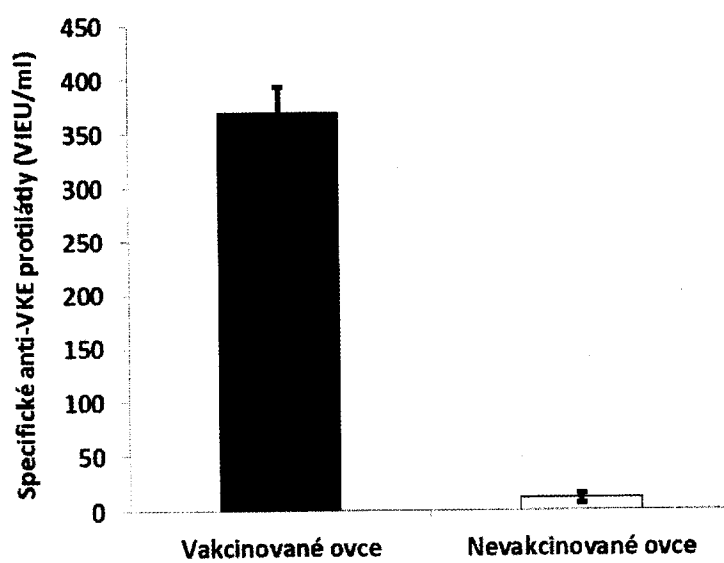


Obr. 2

A

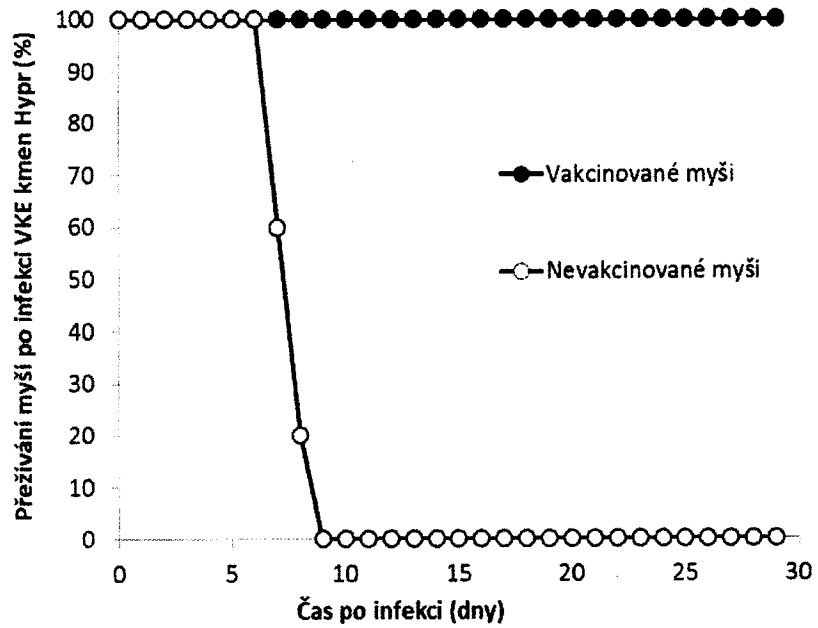


B

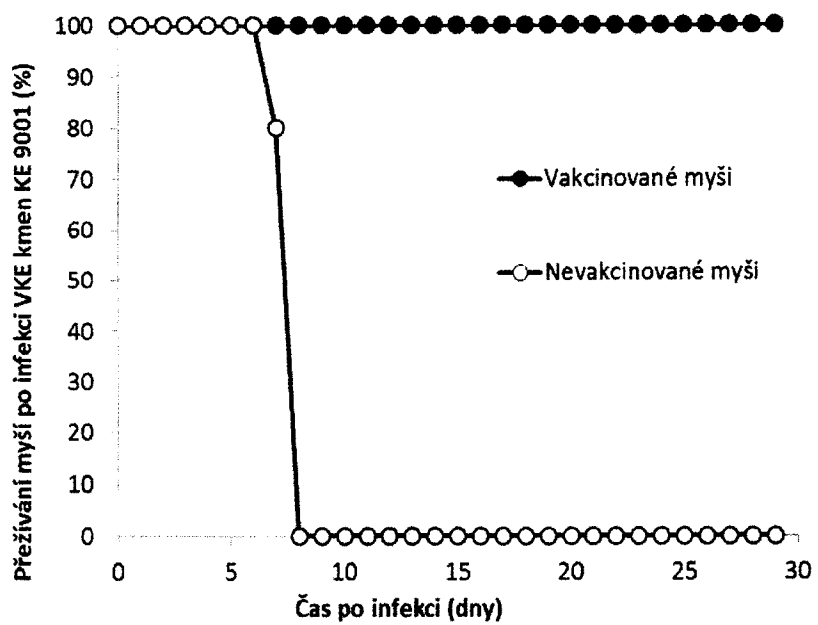


Obr. 3

A



B



Konec dokumentu