

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 32 296

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

**A61K 39/29** (2006.01)

**C12N 15/51** (2006.01)

**C12N 15/34** (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35428**

(22) Přihlášeno: **04.10.2018**

(47) Zapsáno: **06.11.2018**

(73) Majitel:  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,  
Brno, Medlánky, CZ

(72) Původce:  
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D., Hostěnice, CZ  
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D., Tišnov, CZ  
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D., Opava, Kateřinky, CZ  
Hana Kudláčková, Dolní Kounice, CZ  
Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D., Černá Hora, CZ

(74) Zástupce:  
HARBER IP s.r.o., Na bělidle 64/3, 150 00 Praha 5,  
Smíchov

(54) Název užitého vzoru:  
**Rekombinantní antigen indukující produkci  
protilátek proti viru hepatitidy E, jeho  
kódující sekvence, a vakcína obsahující  
tento antigen**

CZ 32296 U1

## Rekombinantní antigen indukující produkci protilátek proti viru hepatitidy E, jeho kódující sekvence, a vakcína obsahující tento antigen

### 5 Oblast techniky

Předkládané technické řešení se týká rekombinantního antigenu schopného po vakcinaci indukovat u hospodářských zvířat, zejména prasat, produkci protilátek proti viru hepatitidy E.

10

### Dosavadní stav techniky

Virus hepatitidy E (HEV) je řazen mezi nejčastější původce perorálně přenosných hepatitid. Jedná se o neobalený virus o velikosti 27 až 34 nm. V současné době je zařazen do čeledi Hepeviridae a většina savčích izolátů do rodu Hepevirus (Carstens, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). Archives in Virology, 2010, 155, 133 – 146). Genom HEV je tvořen jedním řetězcem ribonukleové kyseliny (RNA) s pozitivní polaritou. Skládá se ze tří otevřených čtecích rámců (ORF). ORF1 kóduje nestrukturální proteiny, tzn. enzymy potřebné pro replikaci virového genomu, jako jsou RNA polymeráza a helikáza. ORF2 kóduje jediný glykoprotein virové kapsidy, který zahrnuje imunogenní epitopy. ORF3 kóduje fosforylovaný protein (fosfoprotein), který je asociován s cytoskeletem infikované buňky a podílí se na replikaci virových částic (Yamada, K., Takahashi, M., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Nagashima, S., Tanaka, T., Okamoto, H. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. Journal of General Virology, 2009, 90, 1880 – 1891). Na základě analýzy genomů dostupných izolátů a v souvislosti se schopností infikovat člověka lze v rámci rodu Hepevirus rozpoznat čtyři hlavní genotypy: HEV1, HEV2, HEV3 a HEV4 (Lu, L., Li, C., Hagedorn, C.H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. Rev Med Virol., 2006, 16, 5-36). Tyto genotypy mohou mít různé způsoby šíření, rezervoáry, možnosti mezidruhového přenosu a s tím spojenou etiopatogenezi onemocnění.

Virus hepatitidy E (HEV) je původcem onemocnění člověka, virové hepatitidy typu E, které je v Evropě za posledních 10 let spojováno s 21 000 hlášenými akutními případy hepatitidy a 28 úmrtími. V tomto období byl pozorován téměř desetinásobný nárůst hlášených případů tohoto onemocnění. V celé řadě evropských zemí virová hepatitida E nepodléhá povinnosti hlášení, proto celkové množství případů této hepatitidy je v Evropě velmi pravděpodobně podhodnoceno. Infekce člověka má většinou mírný průběh, ale zejména u pacientů s preexistujícím onemocněním jater může mít až fatální následky, u imunosuprimovaných pacientů je popisován přechod do chronicity. Pro humánní použití byla vyvinuta vakcína proti HEV1, která je používána v Číně a chrání člověka před infekcí a projevy onemocnění. Jedná se o inaktivovanou vakcínu založenou na rekombinantní *E. coli* exprimující část kapsidového proteinu viru (ORF2) (Li, S.W., Zhang, J., Li, Y.M., Ou, S.H., Huang, G.Y., He, Z.Q., Ge, S.X., Xian, Y.L., Pang, S.Q., Ng, M.H., Xia, N.S. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. Vaccine, 2005, 23, 2893 - 2901).

45

V evropských zemích je nejčastěji zaznamenán výskyt genotypu 3 (HEV3), u něhož byl prokázán zoonotický potenciál. HEV3 byl zjištěn v chovech prasat domácích i u prasat divokých téměř po celém světě. Za hlavní cestu šíření tohoto genotypu byl stanoven přenos kontaminovanými potravinami živočišného původu, přičemž prasata domácí i divoká jsou považována za hlavní zvířecí rezervoár HEV3 (van der Poel, W.H. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. Current Opinion in Virology, 2014, 4, 91 - 96).

50

I přes zoonotický potenciál HEV3 se v populacích zvířat dosud žádná imunizace neprovádí. Předkládané technické řešení si klade za cíl poskytnout vakcinační antigen proti viru hepatitidy E, genotypu 3 (HEV3) vhodný pro vakcinaci zejména prasat proti tomuto viru.

Podstata technického řešení

Předmětem předkládaného technického řešení je rekombinantní antigen ORF2HEV3 mající aminokyselinovou sekvenci:

IALTLFNLADTLLGGLPTELISSAGGQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQQDKGIAIP  
HDIDLGDSRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTA AEYDQTTYGS  
STNPMYVSDTVTLVNVATGAQAVARSLDWSKVTL DGRPLTTIQQYSKTFYVLPLRGKLS  
FWEAGTTKAGYPYNYNTTASDRILIENAAGHRVAISTYTTSLGAGPVSVSAVGLAPHS  
ALAVLEDTVDPARAHTFDDFCPECRTLGLQGCAFQSTIAELQRLKMKVGTKRES.

Tento rekombinantní antigen odpovídá části strukturálního proteinu HEV3 v rozsahu aminokyselin 386 až 661 (AA386-661) nativního proteinu a je schopen indukovat produkci protilátek proti viru hepatitidy E u hospodářských zvířat, zejména u prasat.

Dále je předmětem předkládaného technického řešení nukleotidová sekvence kódující rekombinantní antigen ORF2HEV3, mající sekvenci nukleotidů:

ATTGCTCTGACACTGTTCAACCTTGCTGACACGCTCCTTGGTGGTTTGCCGACAGAAT  
TAATTTTCGTCGGCCGGGGGTCAGTTGTTCTACTCCCGCCCTGTCGTCTCAGCCAATGG  
CGAGCCGACTGTCAAGTTATATACATCTGTTGAGAATGCACAGCAGGATAAGGGCAT  
CGCTATCCACACGACATAGACCTGGGTGACTCCCGTGTGGTGATT CAGGATTATGA  
TAATCAACATGAGCAGGACCGGCCTACCCCTTACCCGCCCGTCTCGCCCTTTTTTCG  
GTTCTTCGTGCAAATGATGTTTTGTGGCTGTCTCTTACTGCCGCTGAATATGACCAGA  
CTACATATGGGTTCGTCCACCAACCAATGTATGTCTCAGACACTGTTACATTAGTTAA  
TGTGGCCACAGGGGCCAGGCTGTCGCTCGTTCCCTTGATTGGTCTAAGGTCACCCT  
GGACGGCCGCCCTTACTACCATCCAGCAGTATTCTAAGACATTCTATGTTCTCCCG  
CTCCGTGGCAAGTTGTCTTTCTGGGAGGCTGGTACAACCAAGGCTGGCTACCCTTAT  
AATTACAACACA ACTGCCAGTGATCGAATTCTGATTGAAAATGCGGCTGGCCATCGT  
GTCGCTATATCCACTTATACTACTAGCCTGGGTGCCGGCCCTGTGTCAGTCTCTGCGG  
TTGGGGTACTAGCCCCACACTCGGCCCTTGCCGTTCTTGAAGACACTGTGCATTATCC  
GGCCCGTGCCACACCTTTGATGACTTTTGCCCGGAGTGCCGCACCCTCGGTCTGCA  
GGGGTGC GCCTTCCAGTCTACTATTGCTGAGCTTCAGCGCCTTAAAATGAAGGTAGG  
TAAACCCGGGAGTCTTAA.

Uvedený rekombinantní antigen ORF2HEV3 AA386-661 může být připraven vložením kódující sekvence do expresního vektoru (např. pTRC-His od Thermo Fischer Scientific), transformací tohoto vektoru do hostitelské buňky, např. *Escherichia coli*, indukcí exprese rekombinantního proteinu a následnou inaktivací bakteriální kultury nebo sklizením rekombinantního antigenu z hostitelských buněk.

Předkládané technické řešení dále zahrnuje vakcínu pro imunizaci hospodářských zvířat, zejména prasat, proti viru hepatitidy E, která obsahuje rekombinantní antigen ORF2HEV3 AA386-661 a alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.

Farmaceuticky přijatelné pomocné látky zahrnují rozpouštědla (např. voda, pufr), stabilizátory, imunogenní adjuvanty (např. sloučeniny hliníku nebo olejová adjuvans), inaktivační činidla (např. formaldehyd) a další farmaceuticky přijatelné excipienty podle potřeby.

V jednom výhodném provedení je vakcínou inaktivovaná vakcína, která obsahuje 0,001 až 2 % hmotn., s výhodou 0,001 až 1 % hmotn. formaldehydu.

Objasnění výkresů

Obr. 1: SDS-PAGE (vlevo) a imunoblot (vpravo) bakteriálního klonu po indukci exprese ORF2HEV3 AA386-661 v časových intervalech (0 h, 3 h, 6 h a 18 h po indukci IPTG, IPTG = isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid). S - standard molekulových hmotností (Thermo scientific), hvězdičky ukazují proužek patřící rekombinantnímu proteinu ORF2 HEV3 AA386-661.

Obr. 2: SDS-PAGE (vlevo) a imunoblot (vpravo) bakteriální kultury použité pro přípravu vakcíny, hvězdičky ukazují proužek patřící rekombinantnímu proteinu ORF2HEV3 AA386-661, S - standard molekulových hmotností (Thermo scientific).

Obr. 3: Hladiny protilátek proti rekombinantnímu antigenu ORF2 HEV3 v séru prasat; DPV - dny po vakcinaci.

5 Obr. 4: Hladiny protilátek měřených soupravou ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species v séru nevakcinovaných a vakcinovaných prasat.

Obr. 5: Výsledky ELISA měření s pomocí soupravy ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species s vybranými séry prasnic z terénních chovů. T-a, T-b = séra prasnic s nízkou hladinou protilátek, T+a, T+b = séra prasnic s vysokou hladinou protilátek.

10

Obr. 6: Imunoblot purifikovaného rekombinantního antigenu ORF2HEV3 se séry z nevakcinované skupiny prasat (V-), vakcinované skupiny prasat (V+), séry prasnic z chovu a s nízkou hladinou protilátek v ELISA (T-) a séry prasnic z chovu a s vysokou hladinou protilátek v ELISA (T+). Hvězdičky ukazují proužek patřící rekombinantnímu proteinu ORF2HEV3 AA386-661, S - standard molekulových hmotností (Thermo scientific).

15

Příklad uskutečnění technického řešení

Příprava inzertu:

Rekombinantní protein ORF2HEV3 představuje část strukturálního proteinu HEV3 v rozsahu aminokyselin 386 až 661 nativního proteinu.

Aminokyselinová sekvence ORF2HEV3 AA386-661:

```
IALTLFNLADTLLGGLPTELISSAGGQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQQDKGIAIP
HDIDLGDSRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQTTYGS
STNPAMYVSDTVTLVNVATGAQAVARSLDWSKVTL DGRPLTTIQQYSKTFYVLPLRGKLS
FWEAGTTKAGYPYNYNTTASDRILIENAAGHRVAISTYTTSLGAGPVSVSAVGV LAPHS
ALAVLEDTVDPARAHTFDDFCPECRTLGLQGCAFQSTIAELQRLKMKV GKTRES
```

20 Kódující nukleotidová sekvence antigenu ORF2HEV3 AA386-661:

```
ATTGCTCTGACACTGTTCAACCTTGCTGACACGCTCCTTGGTGGTTTGCCGACAGAAT
TAATTTTCGTCGGCCGGGGTTCAGTTGTTCTACTCCC GCCCTGTCGTCTCAGCCAATGG
CGAGCCGACTGTCAAGTTATATACATCTGTTGAGAATGCACAGCAGGATAAGGGCAT
CGCTATCCACACGACATAGACCTGGGTGACTCCCGTGTGGTGATT CAGGATTATGA
TAATCAACATGAGCAGGACCGGCCTACCCCTTACCCGCCCGTCTCGCCCTTTTTCG
GTTCTTCGTGCAAATGATGTTTTGTGGCTGTCTCTTACTGCCGCTGAATATGACCAGA
CTACATATGGGTTCGTCCACCAACCCAATGTATGTCTCAGACACTGTTACATTAGTTAA
```

TGTGGCCACAGGGGCCAGGCTGTCGCTCGTTCCTTGATTGGTCTAAGGTCACCCT  
 GGACGGCCGCCCTTACTACCATCCAGCAGTATTCTAAGACATTCTATGTTCTCCCG  
 CTCCGTGGCAAGTTGTCTTTCTGGGAGGCTGGTACAACCAAGGCTGGCTACCCTTAT  
 AATTACAACAACAAGTCCAGTGATCGAATTCTGATTGAAAATGCGGCTGGCCATCGT  
 GTCGCTATATCCACTTATACTACTAGCCTGGGTGCCGGCCCTGTGTCAGTCTCTGCGG  
 TTGGGGTACTAGCCCCACACTCGGCCCTTGCCGTTCTTGAAGACACTGTCGATTATCC  
 GGCCCGTGCCACACCTTTGATGACTTTTGCCCGGAGTGCCGCACCCTCGGTCTGCA  
 GGGGTGCGCCTTCCAGTCTACTATTGCTGAGCTTCAGCGCCTTAAAATGAAGGTAGG  
 TAAAACCCGGGAGTCTTAA

Kódující sekvence ORF2HEV3 AA386-661 byla amplifikována pomocí PCR z RNA izolované z terénního kmene HEV3 u prasete.

5 Klonování a transformace do *Escherichia coli*:

Kódující sekvence ORF2HEV3 AA386-661 byla vložena do vektoru pTRC-His (Thermo Fischer Scientific), připojující na N-konec exprimovaného proteinu polyhistidinovou kotvu umožňující jeho detekci a purifikaci. Pro konstrukci plasmidu umožňujícího expresi fragmentu ORF2HEV3  
 10 byl použit kmen *Escherichia coli* K12/TOP10 (Thermo Fischer Scientific). Finální plasmid byl následně transformován do *Escherichia coli* BL21 (Sigma-Aldrich), která po indukci exprese produkuje fragment ORF2HEV3 AA386-661.

Vložení DNA sekvence pro ORF2HEV3 AA386-661 do vektoru pTRC-His bylo provedeno pomocí GENEART Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen), podle návodu výrobce.

Po transformaci vektoru s insertem ORF2HEV3 AA386-661 do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10 byly bakterie vysety na Petriho misky s LB agarem s 50 µg/ml ampicilinu. Po inkubaci při 37 °C jsme identifikovali kolonie pozitivní na přítomnost sekvence pro ORF2HEV3 AA386-661 pomocí PCR reakce. Po ověření sekvence pomocí sekvenace plasmidu, byly rekombinantním plasmidem transformovány chemicky kompetentní buňky *E. coli* BL21. Po inkubaci při 37 °C jsme opět identifikovali kolonie pozitivní na přítomnost sekvence pro ORF2 HEV3 AA386-661 pomocí PCR reakce.

Indukce exprese rekombinantního ORF2 HEV3 AA386-661 v bakteriích *E. coli* BL21:

15

Individuální kolonií po antibiotické selekci s prokázanou přítomností sekvence pro ORF2HEV3 AA386-661 bylo inokulováno 10 ml LB média (20 g/l LB, 0,5 % glukózy, 50 µg/ml ampicilinu) v 50ml sterilní zkumavce a kultivováno v inkubátoru při 37 °C za stálého třepání (250 až 300 ot/min) po dobu 18 hodin. Buňky narostlých bakterií byly zakoncentrovány do pelety centrifugací při 3000 x g, 10 min při pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn dekantací. Peleta obsahující bakterie byla resuspendována v 10 ml LB média bez glukózy (20 g/l LB, 50 µg/ml ampicilinu) a kultivována v inkubátoru při 37 °C za stálého třepání (250 ot/min) do optické hustoty kultury OD<sub>600</sub> = 0,6 (buňky v logaritmické fázi růstu). Poté byla indukce exprese zahájena přidávkem IPTG do konečné koncentrace 1mM. Kultura byla umístěna do inkubátoru (37 °C, 250 ot/min). Poté byly odebírány 1 ml alikvoty v časových intervalech (0 h, 3 h, 6 h a 18 h) z důvodů nalezení optimální produkce rekombinantního ORF2HEV3 AA386-661 proteinu. Alikvoty byly umístěny do 1ml zkumavek, následně centrifugovány při 14 000 x g 10 min při pokojové teplotě. Pelety s bakteriemi byly resuspendovány v Laemmli vzorkovém pufru, povařeny (5 min, 95 °C), sonikovány a podrobeny analýze pomocí SDS-PAGE a imunoblotu na přítomnost rekombinantního ORF2HEV3 AA386-661 proteinu (Obr. 1). K detekci byla použita monoklonální protilátka proti 6xHis Tag na N-konci ORF2HEV3 AA386-661 proteinu (ThermoFisher). Jako sekundární protilátka byla použita kozí anti-prasečí polyklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA). Vizualizace proteinů na membráně byla provedena pomocí 3,3'-diaminobenzidinu jako chromogenu.

Po třech a více hodinách indukce je patrná exprese rekombinantního ORF2HEV3 AA386-661 o přibližné molekulové hmotnosti cca 38 kDa.

Imunogenita rekombinantního antigenu:

5

Příprava vakcíny:

Klon *E.coli* BL21 ORF2HEV3 AA386-661 byl kultivován v 5 ml tekutého LB (0,5 % glukózy, 50 µg/ml ampicilinu) v 50 ml sterilní zkumavce při 37 °C za stálého třepání (250 až 300 ot/min) po dobu 18 hodin. Buňky narostlých bakterií byly zakoncentrovány do pelety centrifugací při 3000 x g, 10 min při pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn dekantací. Peleta obsahující bakterie byla resuspendována do 24 ml LB media (50 µg/ml ampicilinu, bez glukózy) a inkubována při 37 °C za stálého třepání (250 až 300 ot/min). Při OD 0,6 byla zahájena indukce 1mM IPTG a následovala inkubace po dobu 18 h za stálého třepání při 37 °C. Poté byl odebrán 1 ml suspenze na ověření exprese rekombinantního antigenu. Bakteriální buňky byly centrifugovány do pelety. Peleta byla následně považena ve vzorkovém SDS pufru a podrobena analýze pomocí SDS-PAGE a imunoblotu na přítomnost exprimovaného HEV3 proteinu (Obr. 2). Po ověření exprese rekombinantního antigenu bylo zbylých 23 ml suspenze centrifugováno do pelety, 1x promyto v PBS (PBS = fosfátový pufr), peleta bakterií byla resuspendována v 23 ml PBS a inaktivována přidavkem formaldehydu do výsledné koncentrace 1 % hmotn. 15 ml takto připraveného bakterinu obsahujícího rekombinantní protein ORF2HEV3 AA386-661 bylo smícháno s 15 ml Montanide ISA206 a homogenizováno pipetováním a protřepáním.

Na základě výsledků elektroforézy a imunoblotu (Obr. 2) lze konstatovat přítomnost rekombinantního antigenu v bakterinu použitém pro přípravu vakcíny.

Vakcinace prasat:

Dvacet odstavených selat ve věku 28 dnů bylo rozděleno do dvou skupin (kontrolní a vakcinované) po 10 zvířatech. Týden po ustájení byl všem selatům odebrán vzorek 2 až 5 ml krve z vena jugularis a po koagulaci bylo z krve získáno sérum. Následně byla deseti selatům ve vakcinační skupině intramuskulárně aplikována dávka 1 ml vakcíny do levé strany šije. Za dva týdny byla selata ve vakcinační skupině revakcinována dávkou 1 ml vakcíny do levé strany šije. Za další dva týdny, tj. 28 dní po první vakcinaci, byl selatům v obou skupinách odebrán vzorek krve z vena jugularis na stanovení hladin protilátek.

Měření hladiny protilátek proti viru hepatitidy E soupravou ELISA založenou na vakcinačním antigenu:

Hladina protilátek byla stanovena pomocí ELISA soupravy připravené z purifikovaného rekombinantního antigenu ORF2HEV3, izolovaného ze stejného kmene, jaký byl použit pro vakcinaci prasat. ELISA test byl připraven potažením jamek mikrotitrační desky rekombinantním proteinem ORF2HEV3 v pracovním ředění 1 µg/ml v karbonát-bikarbonátovém pufru (0,05 M, pH 9,6) v objemu 100 µl na jamku (inkubace 16 hodin, 4 °C). Následně byly desky třikrát promyty PBS s obsahem 0,05 % Tween 20 (PBS-T, pH 7,2). Vyšetřované vzorky prasečího séra byly ředěny 100x v PBS-T s přidavkem 0,5 % kaseinového hydrolyzátu a v objemu 100 µl byly aplikovány do jamek mikrotitrační desky. Po inkubaci (1 h, 37 °C, vlhká komůrka) byly desky třikrát promyty roztokem PBS-T a do jamek bylo přidáno 100 µl anti-prasečí polyklonální protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) v příslušném pracovním ředění. Po inkubaci (60 min, 37 °C, vlhká komůrka) byly desky opět třikrát promyty a do jamek bylo přidáno 100 µl roztoku substrátu s chromogenem TMB Complete (Test-line, Brno, Česká republika). Enzymatická reakce byla zastavena po 10 minutách přidavkem 50 µl 2M kyseliny sírové. Výsledná absorbance byla odečtena pomocí multikanálového spektrofotometru Synergy H1 (Biotek, USA) při vlnové délce 450 nm (Obr. 3).

Rozdíly v hladinách protilátek mezi vakcinovanou a nevakcinovanou skupinou byly testovány pomocí t-testu.

5 Výsledek měření hladiny protilátek: Dva dny před vakcinací se hladina protilátek u obou skupin neliší ( $p > 0,05$ ). 28 dní po vakcinaci je u vakcinované skupiny absorbance protilátek proti rekombinantnímu antigenu 2,30; SD 0,11, tj. vyšší než absorbance protilátek 0,16; SD 0,05 u skupiny nevakcinované. Rozdíl je statisticky významný na hladině významnosti  $p < 0,001$ .

10 Měření hladiny protilátek proti rekombinantnímu antigenu ORF2HEV3 soupravou ELISA ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species (IDvet, Francie):

15 Pomocí komerční ELISA soupravy ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species (IDvet, Francie) byla změřena hladina protilátek proti rekombinantnímu antigenu ORF2 HEV3 v séru selat 28 den po vakcinaci podle návodu výrobce (Obr. 4). Rozdíly v hladinách protilátek mezi vakcinovanou a nevakcinovanou skupinou byl testován pomocí t-testu.

20 Výsledek: 28. den po vakcinaci je u vakcinované skupiny absorbance protilátek proti antigenu HEV3 3,48; SD 0,25, tj. vyšší než absorbance protilátek 0,12; SD 0,03 u skupiny nevakcinované. Rozdíl je statisticky významný na hladině významnosti  $p < 0,001$ .

Porovnání reaktivity post-vakcinačních a post-infekčních protilátek:

25 Pro požadovaný protektivní účinek vakcíny založené na rekombinantním antigenu ORF2 HEV3 je potřebné, aby post-vakcinační protilátky reagovaly s povrchovým antigenem viru HEV3 cirkulujícím v populaci prasat (obecněji hospodářských zvířat). Přímé testování vazby post-vakcinačních protilátek na přirozený antigen (virus) HEV3 bohužel zatím není možné, protože virus HEV3 nelze kultivovat a nepodařilo se ho získat v množství potřebném pro provedení experimentu. Namísto toho lze použít průkaz, že post-vakcinační protilátky reagují podobně jako protilátky post-infekční.

30 Z výsledků ELISA ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species a vlastní ELISA soupravy založené na rekombinantním antigenu ORF2HEV3 vyplývá, že post-vakcinační protilátky reagují s různě připravenými ORF2HEV3 antigeny použitými v těchto ELISA soupravách. Podobně reagují v ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species ELISA séra prasat z terénu, kdy u některých jedinců lze předpokládat protilátky proti HEV3 po pravděpodobně prodělané spontánní infekci tímto virem (Obr. 5).

40 Výsledek: Séra T-a a T-b vykazují nízkou hladinu protilátek, naopak séra T+a a T+b vysokou hladinu protilátek v ELISA ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species testu. Séra prasat po pravděpodobně prodělané spontánní infekci HEV3 tak reagují podobně jako séra vakcinovaných prasat (Obr. 4).

45 Dále bylo pomocí imunoblotu testováno, zda se post-vakcinační a post-infekční protilátky váží přímo na rekombinantní protein ORF2HEV3 AA386-661. Pro imunoblot s purifikovaným rekombinantním antigenem ORF2HEV3 AA386-661 byla séra nevakcinovaných zvířat smíchána (V-), stejně tak séra vakcinovaných zvířat (V+), terénní séra T-a a T-b (T-) a terénní séra T+a a T+b (T+) (Obr. 6).

50 Výsledek: Séra, která vykazovala v ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species ELISA testu vysokou hladinu post-vakcinačních protilátek (V+) nebo vysokou hladinu post-infekčních protilátek po pravděpodobně prodělané spontánní infekci (T+), vykazují silnou vazbu protilátek na vakcinační rekombinantní antigen ORF2HEV3 AA386-661. Naopak séra nevakcinovaných prasat nebo séra prasat z chovu, která měla nízkou hladinu protilátek v ELISA testu, vykazují velmi malou vazbu protilátek na tento antigen.

55

Závěr: Post-vakcinační i post-infekční protilátky vykazovaly specifickou vazbu na rekombinantní vakcinační antigen. Lze tak uzavřít, že se post-vakcinační protilátky budou vázat také na přirozený antigen viru hepatitidy E.

5

## NÁROKY NA OCHRANU

10 **1.** Rekombinantní antigen ORF2HEV3 pro indukci produkce protilátek proti viru hepatitidy E u hospodářských zvířat, **vyznačený tím**, že má aminokyselinovou sekvenci:

IALTLFLNADTLLGGLPTELISSAGGQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQQDKGIAIP  
 HDIDLGDSRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQTTYGS  
 STNPMYVSDTVTLNVATGAQAVARSLDWSKVTLDGRPLTTIQQYSKTFYVLPLRGKLS  
 15 FWEAGTTKAGYPYNYNTTASDRILIENAAGHRVAISTYTTSLGAGPVSVSAVGV LAPHS  
 ALAVLEDTVDPARAHTFDDFCPECRTLGLQGCAFQSTIAELQRLKMKVGTKRES

**2.** Nukleotidová sekvence kódující rekombinantní antigen ORF2HEV3 podle nároku 1, **vyznačená tím**, že má sekvenci nukleotidů:

20 ATTGCTCTGACACTGTTCAACCTTGCTGACACGCTCCTTGGTGGTTTGCCGACAGAAT  
 TAATTTTCGTCGGCCGGGGGTCAGTTGTTCTACTCCCGCCCTGTCGTCTCAGCCAATGG  
 CGAGCCGACTGTCAAGTTATATACATCTGTTGAGAATGCACAGCAGGATAAGGGCAT  
 CGCTATCCACACGACATAGACCTGGGTGACTCCCGTGTGGTGATTCAGGATTATGA  
 TAATCAACATGAGCAGGACCGGCCTACCCCTTACCCGCCCGTCTCGCCCTTTTCG  
 25 GTTCTTCGTGCAAATGATGTTTTGTGGCTGTCTTACTGCCGCTGAATATGACCAGA  
 CTACATATGGGTTCGTCCACCAACCAATGTATGTCTCAGACACTGTTACATTAGTTAA  
 TGTGGCCACAGGGGCCAGGCTGTCGCTCGTTCCTTGATTGGTCTAAGGTCACCCT  
 GGACGGCCGCCCTTACTACCATCCAGCAGTATTCTAAGACATTCTATGTTCTCCCG  
 CTCCGTGGCAAGTTGTCTTTCTGGGAGGCTGGTACAACCAAGGCTGGCTACCCTTAT  
 30 AATTACAACAACACTGCCAGTGATCGAATTCTGATTGAAAATGCGGCTGGCCATCGT  
 GTCGCTATATCCACTTATACTACTAGCCTGGGTGCCGGCCCTGTGTCAGTCTCTGCGG  
 TTGGGGTACTAGCCCCACACTCGGCCCTTGCCGTTCTTGAAGACACTGTCGATTATCC  
 GGCCCGTGCCACACCTTTGATGACTTTTGCCCGGAGTGCCGCACCCTCGGTCTGCA  
 GGGGTGCGCCTTCCAGTCTACTATTGCTGAGCTTCAGCGCCTTAAAATGAAGGTAGG  
 35 TAAAACCCGGGAGTCTTAA

**3.** Vakcína pro imunizaci hospodářských zvířat, zejména prasat, proti viru hepatitidy E, **vyznačená tím**, že obsahuje rekombinantní antigen ORF2HEV3 podle nároku 1 a alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.

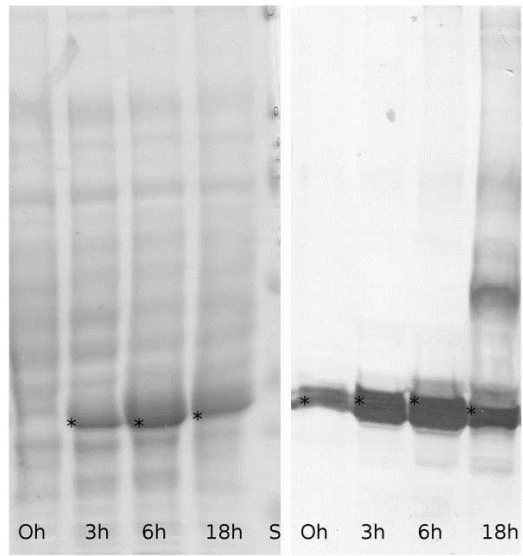
40

**4.** Vakcína podle nároku 3, **vyznačená tím**, že farmaceuticky přijatelná pomocná látka je vybrána ze skupiny zahrnující rozpouštědla, stabilizátory, imunogenní adjuvanty, inaktivační činidla.

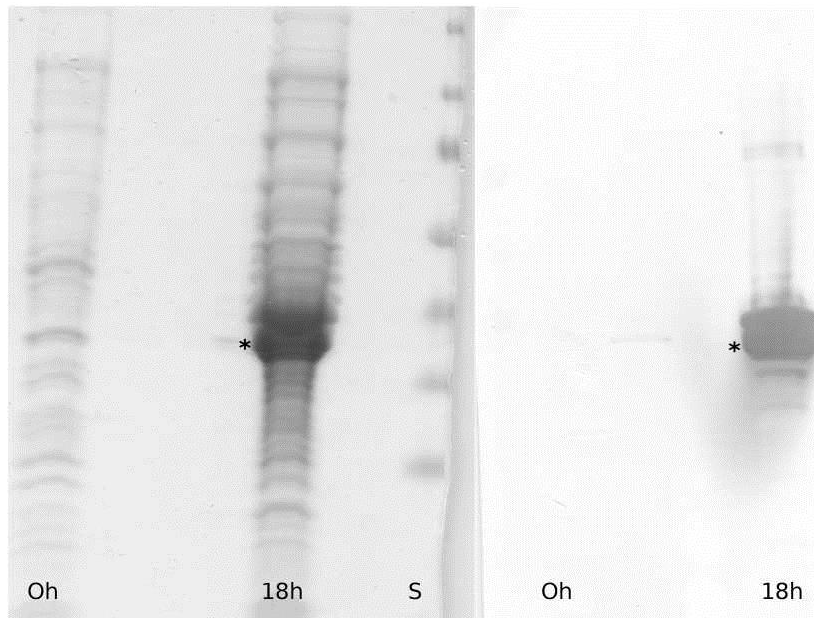
45 **5.** Vakcína podle nároku 3, **vyznačená tím**, že obsahuje 0,001 až 2 % hmotn., s výhodou 0,001 až 1 % hmotn., formaldehydu, a jedná se o inaktivovanou vakcínu.

3 výkresy

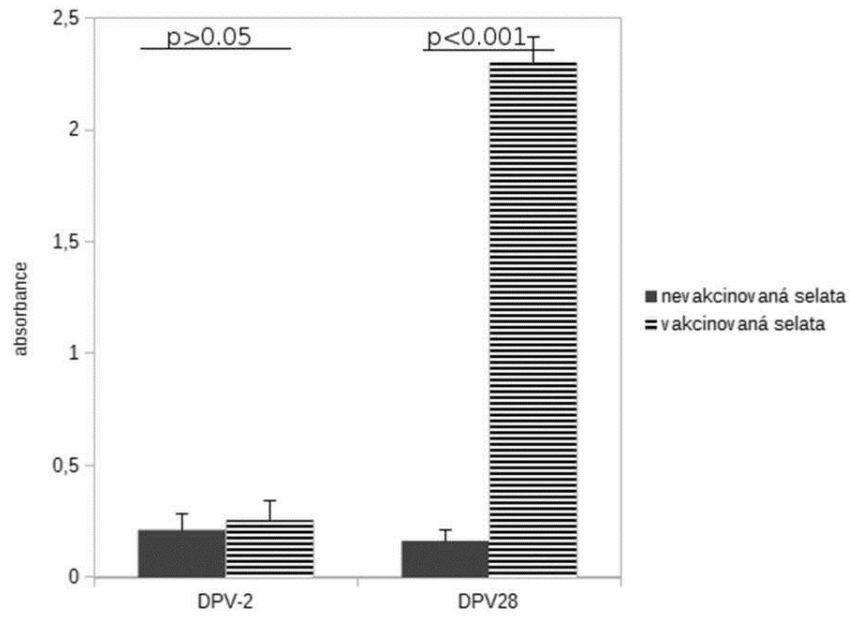




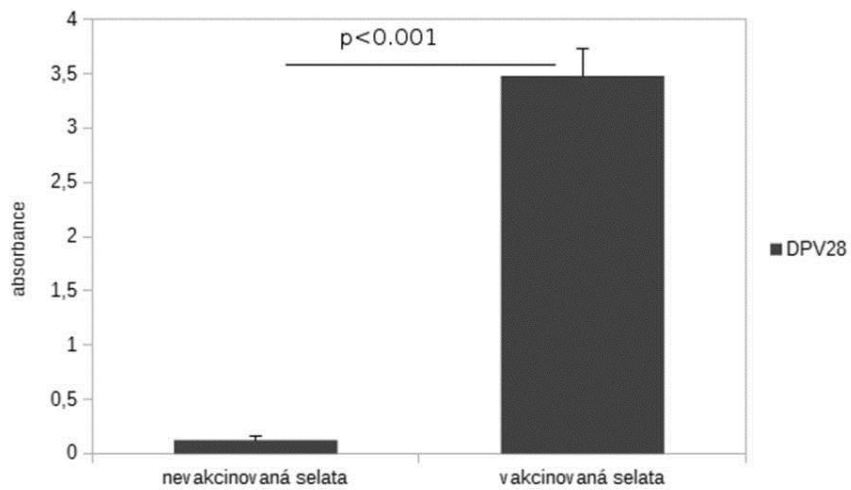
Obr. 1



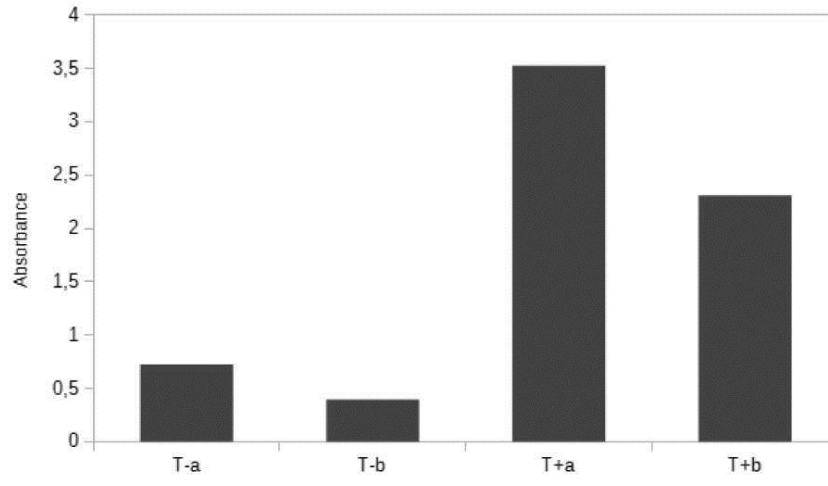
Obr. 2



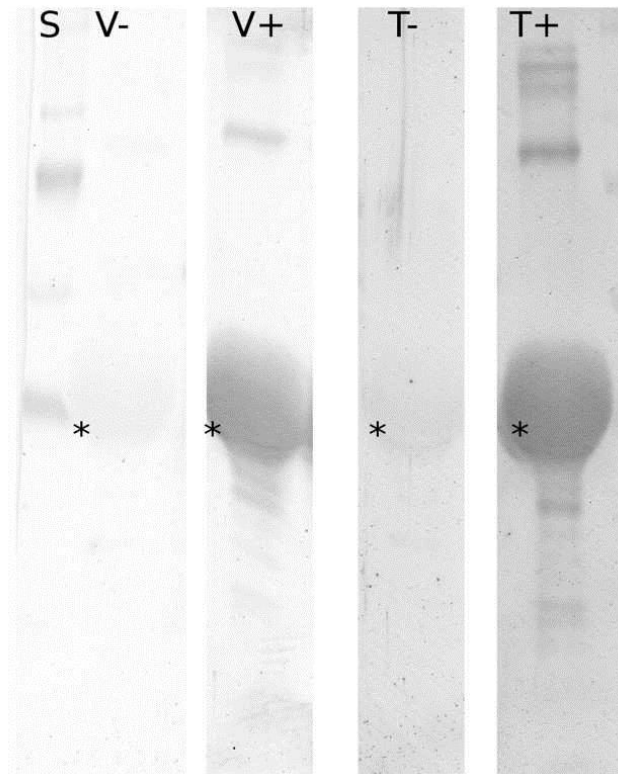
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6