

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 133

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-37**
(22) Přihlášeno: **26.01.2016**
(40) Zveřejněno: **02.08.2017**
(Věstník č. 31/2017)
(47) Uděleno: **20.12.2017**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **31.01.2018**
(Věstník č. 5/2018)

(56) Relevantní dokumenty:
FENAUX M. et al.: „A Chimeric Porcine Circovirus (PCV) with the Immunogenic Capsid Gene of the Pathogenic PCV Type 2 (PCV2) Cloned into the Genomic Backbone of the Nonpathogenic PCV1 Induces Protective Immunity against PCV2 Infection in Pigs“, Journal of Virology, vol. 78, no. 12, 2004, str. 6297 – 6303, ISSN: 0022-538X; YIN S. et al.: „Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from Escherichia coli“, Virology Journal, vol. 7, 2010, str. 166, ISSN: 1743-422X; ZHANG H. et al.: „Virus-Like Particles of Chimeric Recombinant Porcine Circovirus Type 2 as Antigen Vehicle Carrying Foreign Epitopes“, Viruses, vol. 6, no. 12, 2014, str. 4839 – 4855, ISSN: 1999-4915; YE Y. et al.: „Introduction of robust immunity response in mice by dual-expression-system-based recombinant baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2“, Virology Journal, vol. 10, 2013, str. 316, ISSN: 1743-422X.
CN 103 540 605; CN 104 098 657; CN 104 043 117.

(73) Majitel patentu:
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze,
Praha 2, CZ
Dyntec spol. s r.o., Český Brod, CZ

(72) Původce:
doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc., Praha 4, CZ
Mgr. Martin Fraiberk, Teplice, CZ
RNDr. Hana Španielová, Ph.D., Zdíby, CZ
MVDr. Ivan Pšikal, CSc., Brno, CZ

(74) Zástupce:
Patentová a známková kancelář Novotný, Ing.
Jaroslav Novotný, Římská 45/2135, 120 00 Praha 2

(54) Název vynálezu:
**Vakcína založená na proteinové chimerické
nanočástici proti prasečímu cirkoviru 2**

(57) Anotace:
Vakcína založená na proteinové chimerické nanočástici proti prasečímu cirkoviru 2 má proteinovou nanočástici složenou z nosiče, který tvoří pentamer kapsidového proteinu VPI myšího polyomavíru, na který jsou kovalentně připojeny molekuly kapsidového proteinu prasečího cirkoviru 2 s připojenou His-tag kotvou. Kapsidový protein je tvořen kmenem prasečího cirkoviru 2B.

CZ 307133 B6

Vakcína založená na proteinové chimerické nanočástici proti prasečímu cirkoviru 2

Oblast techniky

5

Vynález se týká vakcíny založené na proteinové chimerické nanočástici proti prasečímu cirkoviru 2, která nahrazuje inaktivovanou virovou vakcínu proti uvedenému viru.

10

Dosavadní stav techniky

15

20

25

30

35

40

45

50

Ke dnešku jsou na trhu 4 vakcíny proti prasečímu cirkoviru 2. Francouzská firma Merial vyvinula vakcínu Circovac založenou na inaktivovaném PCV2 viru. Firma Fort Dodge připravila vakcínu spočívající v chimerickém viru PCV1, ve kterém byl gen pro Cap (kapsidový protein) zaměněn za protein z PCV2. Produkty Circoflex (Boehringer, Ingelheim) a Circumvent (Intervet) jsou založeny na inaktivovaných chimerických bakulovirech produkujících cirkovirový Cap protein. Vzhledem k vysokým cenám těchto vakcín ani v České republice, ani v celé řadě dalších zemí, nedochází k plošné vakcinaci. Po levnější účinné vakcinaci je stále poptávka, o čemž svědčí provedený průzkum trhu. Chimerická nanočástice – pentamer fúzního proteinu VP1 myšího polyomaviru a Cap proteinu prasečího cirkoviru 2, je produkována ve velkých množstvích v hmyzích buňkách z rekombinantního bakuloviru a díky připojené His-tag kotvě je snadno izolovatelná. Vzhledem k tomu, že se nejedná o virus, není třeba inaktivace. Při podobných vakcinačních účincích, jako má nejlepší z dostupných vakcín (Circoflex), bude cena nižší. Další zmínky o vakcínách uvedeného typu jsou v publikaci Beach N. M. et. al.: J.Virol., vol. 78, no 12 2004, str. 6297-6303, kde vakcína založená na chimerickém viru PCV1, do kterého byl vložen gen pro kapsidový protein (Cap) patogenního viru PCV2, je založena na zcela odlišném principu. Jedná se o inaktivovaný celý virus obsahující virovou genetickou informaci, a tedy vakcínu nesoucí rizika neúplné inaktivace, a tudíž možnost rekombinace s patogenním virem PCV pocházejícím z přírodních rezervoárů. Naproti tomu vakcína, která je předmětem této patentové přihlášky, neobsahuje genetickou informaci a není tedy schopna se replikovat v cílovém organismu. Z patentové literatury je znám čínský patent CN 103 540 605, kde podstata vakcíny popsané v tomto dokumentu je kompletní bakteriální virus (bakteriofág T7) s vloženými epitopy kapsidového proteinu prasečího cirkoviru 2 do proteinu hlavičky tohoto bakteriofága. Jedná se o zcela odlišný systém. Vakcínou je zde virus produkovaný v *E. coli*. Obsahuje tedy všechny proteiny bakteriofága i jeho genetickou informaci. Navíc je nutné zbavit bakteriofágovou preparaci speciálním postupem bakteriálních toxinů. Vlastní postup i následné testování prodražuje výrobu vakcíny. Pro účinnost vakcíny je důležitou vlastností indukce neutralizačních protilátek ve vakcinovaných zvířatech. Neutralizační epitopy jsou konformační a mohou být tímto postupem narušeny. Ostatně, původci tohoto čínského patentu vůbec indukci neutralizačních protilátek netestovali. Z odborné literatury je rovněž známa publikace Yin S. et.al.: Virology Journal, vol. 7, 2010, str. 166, kde se popisuje příprava viru podobných částic (VLPs) tvořených kapsidovým proteinem (Cap) prasečího viru PCV2. Protein Cap produkují autoři dokumentu v bakteriích *E. coli* jako fúzní protein (z jeho N konec je připojen k proteinu složeného ze 6 histidinů (His) a malého proteinu SUMO). Autoři potom izolují složený protein His-SUMO-Cap po jeho produkci v bakteriích afinitní chromatografií (přes kolonu s navázaným Ni²⁺, na který se váže His). Poté je nutno odštěpit His-SUMO protein specifickou TEV proteázou a pak následuje další čištění na koloně pro purifikaci samotného Cap, který by se v podobě fúzního proteinu neskládal do VLPs. Skládání VLPs *in vitro* z Cap proteinu není účinné, viz níže obrázek z tohoto dokumentu. (Skládání částic VLPs bylo v alternativním návrhu přípravy vakcíny vyzkoušeno po produkci Cap proteinu v hmyzích buňkách i autory této patentové přihlášky a zavrženo jako málo účinné). Navíc, preparaci z *E. coli*, tak jako v předchozích případech, by bylo nutno zbavit endotoxinů a provést testování na jejich přítomnost.



Figure 4) Shuanghui Yin, Virology Journal 2010

Elektronmikroskopické obrázky rekombinantních Cap VLPs PCV2

- 5 A - Rekombinantní protein His-SUMO-Cap Cap-tag
 B - Cap -VLPs po štěpení His-SUMO
 C - Imunoelektronová mikroskopie Cap-VLPs (C). Bar = 50 nm.

10 Úkolem vynálezců bylo vyvinout vakcínu založenou na proteinové chimerické nanočástici proti prasečímu cirkoviru 2, která nahrazuje inaktivovanou virovou vakcínu proti uvedenému viru.

Podstata vynálezu

15 Uvedené nedostatky odstraňuje vakcína založená na proteinové chimerické nanočástici proti prasečímu cirkoviru 2 podle tohoto vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že proteinová nanočástice je složena z nosiče, který tvoří pentamer kapsidového proteinu VP1 myšího polyomaviru, na který jsou kovalentně připojeny molekuly kapsidového proteinu prasečího cirkoviru 2 s připojenou His-tag kotvou. Vakcína má kapsidový protein tvořen kmenem prasečího cirkoviru 2B.

20 K největším výhodám tohoto vynálezu patří jednoduchá příprava, dále to, že chimerická nanočástice není vůbec virulentní z důvodu chybějící genové virové informace. Další výhodou je snadná izolovatelnost. Další výhody a unikátnost vakcíny navrhované v této patentové přihlášce jsou následující:

25 Použití bakulovirového expresního systému odstraňuje nutnost čištění od endotoxinů.

30 Fúze Cap proteinu s kapsidovým proteinem VP1 myšího polyomaviru zajišťuje stabilitu a vysokou výtěžnost proteinu. Ten se díky svým vlastnostem skládá ihned po syntéze v buňkách spontánně (s 100% účinností) do velmi stabilních pentamerů, z nichž každý obsahuje 5 molekul celého Cap proteinu PCV2.

35 VP1 pentamer (nosič) se podílí výrazně na indukcii imunitní odpovědi; je schopen fungovat jako adjuvans.

Purifikace VP1-Cap nanočástic je snadná - jedním krokem afinitní chromatografie nebo ultrafiltrací.

40 Vakcína zajišťuje tvorbu neutralizačních protilátek (testováno se séry prasat), protože díky velmi flexibilnímu C-konci VP1, ke kterému je Cap protein připojen, je Cap schopen zaujmout správnou konformaci, a tedy vytvořit konformační epitop.

45 Pro přípravu vakcíny tohoto typu je nosič, i když je známa „účinná látka“ – kapsidový protein Cap PCV2, krucíální částí, neboť imunizace monomerním kapsidovým proteinem Cap PCV2 je neúčinná. Nevyvolá totiž produkci virus-neutralizačních protilátek. Nosič, kromě již zmíněného adjuvantního efektu, předkládá imunitnímu systému antigen ve správné konformaci a velikosti.

Antigen je, díky nosiči dle předloženého vynálezu, prezentován ve vysoké hustotě a repetitivním uspořádání, což vede k účinnější stimulaci imunitního systému.

5 Příklady uskutečnění vynálezu

10 Nanočástice je složena z nosiče, který tvoří pentamer kapsidového proteinu VP1 myšího polyomaviru, na který jsou kovalentně připojeny molekuly kapsidového proteinu prasečího cirkoviru 2, a dále je připojena His-tag kotva. His-tag kotva je řetězec po sobě jdoucích aminokyselin histidinu. Tento řetězec je schopen vázat dvoumocné ionty kovů, nejčastěji Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺. Tyto ionty jsou ukotveny na nosiči v koloně a umožňují izolaci proteinu. Kapsidový protein je ve výhodném provedení tvořen prasečím cirkovirem 2B (v současnosti nejrozšířenějším kmenem). Chimerická nanočástice se připraví následujícím postupem:

15 Rekombinantní bakulovirus pro produkci chimerické nanočástice (složené z pentameru fúzního proteinu VP1 myšího polyomaviru a Cap proteinu prasečího cirkoviru) v hmyzích buňkách byl připraven metodou „Bac to Bac“ (Invitrogen). Hmyzí buňky Sf 9 adaptované na kultivaci v bezsérovém médiu se infikují v bioreaktoru inokulem rekombinantního bakuloviru s multiplicitou infekce 10. Po 5 dnech se buněčná suspenze lyzuje, opracuje DNAsou a pentamery se izolují
20 afinitní chromatografií s využitím His-tag kotvy. Rekombinantní bakulovirus není přítomen ve finálním produktu. Pracuje se pouze s geny pro kapsidové proteiny myšího polyomaviru a prasečího cirkoviru 2. Při výrobním procesu se nikde nepracuje s kompletními genomy myšího polyomaviru a prasečího cirkoviru 2. Nemůže tudíž dojít k replikaci virů.

25 Průmyslová využitelnost

30 Vakcína podle tohoto vynálezu je využitelná pro prevenci virových chorob v chovech hospodářských zvířat, kde není dostupná příliš drahá vakcína, nebo je použití vakcíny riskantní z hlediska možného rozvoje choroby po její aplikaci.

35 **P A T E N T O V É N Á R O K Y**

1. Vakcína založená na proteinové chimerické nanočástici proti prasečímu cirkoviru 2, **vyznačující se tím**, že proteinová nanočástice je složena z nosiče, který tvoří pentamer kapsidového proteinu VP1 myšího polyomaviru, na který jsou kovalentně připojeny molekuly kapsidového proteinu prasečího cirkoviru 2 s připojenou His-tag kotvou.

2. Vakcína podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kapsidový protein je tvořen kmenem prasečího cirkoviru 2B.

45

50

Konec dokumentu
