

**ZAKLJUČNO POROČILO**  
**O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA**  
**NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA**  
**PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«**

**I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta**

1. Naziv težišča v okviru CRP:

5. Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja

2. Šifra projekta:

V4-0481

3. Naslov projekta:

Rekombinantno cepivo proti aviarni influenci za peroralno uporabo

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Rekombinantno cepivo proti aviarni influenci za peroralno uporabo

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Recombinant Oral Vaccine Against Avian Influenza

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

Cepivo, rekombinantni proteini, hemaglutinin, aviarna influenza, ptičja gripa, H5N1, peroralna uporaba, parenteralna uporaba, proteinski nanodelci, neklasična inkluzijska telesa, peroksisomi

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

Vaccines, recombinant proteins, hemagglutinin, avian influenza, H5N1, oral application, parenteral application, protein nanoparticles, non-classical inclusion bodies, peroxisomes

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

0104 Kemijski inštitut

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

0406 Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani  
0312 Univerzitetni klinični center Ljubljana

6. Sofinancer/sofinancerji:

Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije  
Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

06108

Vladimira Gaberc-Porekar

Datum: 15.9.2010

Podpis vodje projekta:

Dr. Vladimira Gaberc-Porekar

---

Podpis in žig izvajalca:

Direktor Kemijskega inštituta  
Prof. dr. Janko Jamnik

---

## II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

### 1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti  
 b) delno  
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da  
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

## 2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela<sup>1</sup>:

Globalne podnebne spremembe (visoke temperature, poplave in pomanjkanje pitne vode) vplivajo tudi na zdravje ljudi. Eden izmed posrednih vplivov se kaže tudi v povečanem tveganju za nalezljive bolezni, ki se širijo z insekti ali drugimi živalmi. vedno znova se v svetu velika pozornost namenja ptičji gripi (oz. aviarni influenci), ki predstavlja grožnjo izbruha pandemije s katastrofalnimi posledicami za zdravje ljudi in svetovno gospodarstvo. Gre za nalezljivo živalsko bolezen, ki jo povzročajo podtipi virusa influence A. Med njimi je najbolj smrtonosen podtip H5N1, ki ga prenašajo zlasti prostoživeče ptice. Podnebne spremembe, predvsem segrevanje ozračja, naj bi vplivale na selitveni vzorec ptic, ki virus prenašajo, poleg tega pa naj bi povišane temperature vplivale na obdobje pojavljanja influence. Pričakujemo lahko, da bodo sčasoma tudi pri nas obdobja influence daljša ali pa bo influenza prisotna skozi celo leto. Perutninske farme z veliko gostoto živali so zelo občutljive za virusne bolezni. Tako z vidika zdravja živali kot z vidika gospodarske škode, do katere bi prišlo v primeru izbruha bolezni, je potrebno živali ustrezno zaščititi. V tem primeru je edina učinkovita zaščita cepljenje živali. Trenutno se za cepljenje živali komercialno uporabljajo zlasti vaccine z inaktiviranim celim virusom aviarnе influence in vektorska vakcina virusa kokošjih osepnic ("fowl-pox") z vstavljenim genom za H5 hemaglutinin. Slabost omenjenih vakcin je produkcija, ki je vezana na oplojena kokošja jajca oz. na uporabo celičnih linij, poleg tega pa se cepljenje izvaja v obliki parenteralne aplikacije v živali.

Velik napredek bi tako predstavljal razvoj cenovno bolj ugodnega cepiva za peroralno aplikacijo, ki bi omogočila enostavno vakcinacijo velikih populacij živali.

Naš pristop priprave rekombinantnega cepiva vključuje razvoj kvasnega ali bakterijskega vehikla s proteinskimi nanodelci hemaglutinina v notranjosti, ki bo sposoben prehajati skozi agresivni del prebavnega trakta in sprostiti aktiven protein za imunizacijo v alkalnem delu prebavnega trakta, kjer dejansko poteka vakcinacija. Prednost takšnega cepiva je hitra in poceni priprava, cepivo je varno, hkrati pa naj bi proteinski nanodelci zaradi svoje velikosti in izpostavljenosti epitopov sprožili močnejši imunski odziv kot prečiščen monomerni protein.

Proteinske nanodelce hemaglutinina smo pripravili in vivo, z izražanjem različnih trunkiranih oblik hemaglutinina v peroksisomih metilotrofne kvasovke *Pichia pastoris* ter z izražanjem različnih trunkiranih oblik hemaglutinina v bakteriji *Escherichia coli* v obliki neklasičnih inkluzijskih teles. Obe obliki izražanja vodita do nastanka proteinskih nanodelcev z večjimi segmenti pravilno zvitih proteinskih molekul.

Glavni cilj projekta je bil priprava različnih oblik rekombinantnega cepiva v kvasovki *Pichia pastoris* in bakteriji *Escherichia coli* ter dokaz njihove imunogenosti, t.j. dokaz visokega titra protiteles proti hemaglutininu, v krvi testnih živali po peroralni aplikaciji.

Delo na projektu je bilo razdeljen na pripravo cepiva v kvasovki *P. pastoris* ter na pripravo cepiva v bakteriji *E. coli*.

-Priprava rekombinantnega cepiva v kvasovki *P. pastoris*:

Na podlagi že pripravljenih kvasnih celic *P. pastoris*, ki izražajo fuzijski protein GFP-HA-His10 v peroksisomih v obliki kompaktnih fluorescirajočih delcev, smo pripravili

<sup>1</sup> Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

bioprodukcijo v 5L bioreaktorju, pri čemer smo dobili okrog 500 g mokre biomase. Za primerjavo glede na peroralno aplikacijo smo najprej izvedli poskus parenteralne (intramuskularne) aplikacije izoliranih nanodelcev (peroksisomov) v poskusne živali za dokaz tvorbe visokega titra protiteles proti HA5 v krvi. Za izolacijo nanodelcev, bogatih s proteinom HA, smo razbili kvasne celice s soniciranjem, nato pa izolirali organelno frakcijo z diferencialnim centrifugiranjem, kjer smo pri nizkih obratih (5.000 rpm) odstranili nerazbite celice in ostanke celic, pri visokih obratih (15.000 rpm) pa ločili topne proteine od organelne frakcije. Organelno frakcijo smo še dodatno očistili s centrifugiranjem v gostotnem gradientu Percolla na ultracentrifugi (31.000 rpm) in tako izolirali peroksisomalno frakcijo, ki je fluorescirala (zaradi prisotnosti GFP v fuzijskem proteinu). Tako smo dobili delno očiščen protein GFP-HA-His10 v obliki nanodelcev. Analizirali smo proteinsko sestavo peroksisomov ter potrdili in vitro imunoaktivnost z metodo Western blot z uporabo komercialnih protiteles proti H5N1 HA.

Živalski poskusi so bili izvedeni v okviru sodelujoče raziskovalne skupine na Veterinarski fakulteti. Intramuskularna imunizacija piščancev je bila izvedena na sedem tednov starih piščancih (izvaljeni iz Lohmann VALO SPF jajc (Nemčija)), in sicer so bili nanodelci aplicirani v prsno mišico trikrat v štirinajstdnevni presledkih. Pred vsako imunizacijo so piščancem odvzeli kri (1-2 ml), ki smo jo uporabili v testih za ugotavljanje prisotnosti specifičnih protiteles v serumu. Za vsako intramuskularno imunizacijo je bilo uporabljenih približno 60 mg izoliranih nanodelcev, raztopljenih v sterilni fiziološki raztopini. Pri prvi imunizaciji je bil delcem dodan še kompletni Freundov adjuvans, pri drugi in tretji imunizaciji pa je bil dodan nekompletni Freundov adjuvans. Za dokaz tvorbe protiteles proti H5 smo serume analizirali z metodo Western blot, kjer smo na membrano vezali čist protein H5 HA. Kot "primarna protitelesa" smo uporabili serume, kot sekundarna protitelesa pa smo uporabili protitelesa anti-chicken IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Sigma).

Titer anti-HA protiteles v krvi imuniziranih živali smo določili tudi s kompetitivnim ELISA testom, kjer določamo protitelesa, ki se vežejo na HA, in na ta način določimo jakost imunskega odziva.

V okviru sodelujoče raziskovalne skupine na Veterinarski fakulteti je bil za detekcijo imunskega odgovora izveden tudi test inhibicije hemaglutinacije. Protitelesa, prisotna v serumu, se vežejo na hemaglutinin in s tem preprečijo vezavo na eritrocite in s tem preprečijo hemaglutinacijo. Test je bil izveden po standardnem postopku z uporabo 4 HA enot antigena in 1% eritrocitov petelinov. Kot antigen je bil uporabljen inaktiviran virus H5N1. Za dokaz tvorbe nevtralizacijskih protiteles je bil v okviru sodelujoče raziskovalne skupine izveden tudi test zaščite piščančjega embrija s serumom s protitelesi ob dodatku visoko patogenega seva virusa aviarnе influence H5N1.

Izolacija nanodelcev je zaradi debele celične stene kvasovke *P. pastoris* neučinkovita in ni najbolj primerna za uporabo v večjem merilu, zato smo želeli za namen peroralne imunizacije pripraviti kvasne celice v obliki nosilnega vehikla s proteinskimi nanodelci, bogatimi s proteinom HA, v notranjosti. Kvasne celice smo permeabilizirali z uporabo različnih detergentov (0,2% N-lauroil sarkozil, DMA C14), med njimi tudi z žolčnimi kislinami, ki so naravni surfaktanti, prisotni v tankem črevesju (0,2 in 0,5 % deoksiholat ter holna kislina). Na podlagi analize topne (ekstrahirani proteini) in netopne frakcije (permeabilizirane celice) z metodo SDS-PAGE smo izbrali detergent DMA-C14. Pripravljeni biomasi smo dodali 5-kratni volumen raztopine za permeabilizacijo (0,44% raztopina DMA-C14 v 60 mM Na-fosfatu ter 350 mM NaCl, pH 7.2, 6% glicerol, 0,8 % Triton-X-100 ter 1 mM PMSF (sveže dodan)) glede na maso celic ter inkubirali na 4° C 2,5 h. s tem smo kvasne celice uspeli delno očistiti, saj se topni proteini ekstrahirajo,

netopni, med njimi tudi naši nanodelci, pa ostanejo v notranjosti celice (dokazano z analizo SDS-PAGE). Prisotnost nanodelcev v celici po permeabilizaciji smo potrdili tudi s fluorescenčno in konfokalno mikroskopijo.

Za uspešno peroralno aplikacijo je potrebno cepivo ustrezno zaščititi pred neugodnimi pogoji zgornjega dela prebavnega trakta (prisotnost proteinaz in nizek pH), ter doseči uspešno sproščanje v črevesju, kjer pride do imunskega prepoznavanja in odziva.

Prostorsko in časovno kontrolirano sproščanje smo dosegli z enkapsulacijo kvasnih celic v alginatne delce. Alginat je naravni polisaharid, ki v prisotnosti dvovalentnih kationov gelira in tvori porozno strukturo z velikostjo por 5-200 nm. Je netoksičen, biorazgradljiv ter po peroralni aplikaciji dokazano neimunogen. V odvisnosti od pH okolja se gel stanje alginata spremeni. V alkalnem okolju (pH okoli 7) začnejo alginatni delci intenzivno nabrekati, nato se delci razpustijo, kar omogoči sprostitvev enkapsuliranega materiala. Učinkovitejše sproščanje proteina HA iz kvasnih celic smo dosegli tudi s predhodno permeabilizacijo celic v detergentu (preizkusili smo različne detergente, tudi žolčne kisline oz. njihove soli, ki so v črevesju naravno prisotne).

Pripravljeno biomaso kvasnih celic smo predhodno permeabilizirali z uporabo detergenta DMA C14 (Sigma), nato pa zamešali v 1,5 % vodno raztopino alginata, pH 7 (uporabili smo alginat srednje viskoznosti) v takem razmerju, da je vsebnost kvasnih celic v alginatnih delcih 50 %. Na ta način smo dosegli maksimalno vsebnost kvasnih celic, ki je še omogočala tvorbo alginatnih delcev. Za tvorbo delcev smo raztopino alginata s pomočjo peristaltične črpalke in cevke, ki je imela na koncu iglo premera 0,7 mm kapljali v raztopino 50 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 5,5). Na ta način se sproži geliranje alginata in nastanek okroglih poroznih delcev s celicami v notranjosti. Pripravljene kroglice smo sušili na zraku približno 36 ur, nato pa jih shranili na 4° C.

Zaščito vehikla in uspešno razpustitev celic smo dokazali v in vitro poskusu z uporabo simulirane gastrointestinalne tekočine (SGF, 0.03M NaCl, pH 2 ter pepsin) ter simulirane intestinalne tekočine (SIF, 0.05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.8). pH tekočine SIF smo izbrali glede na znane pogoje v črevesju piščancev. Alginatne delce smo najprej inkubirali v tekočini SGF, jih nato 2x sprali v tekočini SIF (s tem smo dosegli, da je bil pH tekočine res 6.8). Sledila je enourna inkubacija v tekočini SIF. Tu so kroglice sprva nabrekli, nato pa so se v čisto razpustile. Proteinsko sestavo tekočine smo analizirali z metodo SDS-PAGE.

Pripravljeno cepivo v obliki kondicioniranih kvasnih celic zaščiteneh z alginatom smo uporabili za peroralno aplikacijo v poskusne živali. Uporabili smo sedem tednov stare piščance (izvaljeni iz Lohmann VALO SPF jajc (Nemčija)), in sicer so bili piščanci imunizirani trikrat v štirinajstdnevni presledkih. Pri vsaki imunizaciji so piščanci zaužili 0,7 g alginatnih delcev, pomešanih z njihovo krmo na dan, tri dni zaporedoma. Pred vsako imunizacijo so piščancem odvzeli kri (1-2 ml), ki je bila uporabljena v testih za ugotavljanje prisotnosti specifičnih protiteles v serumu.

Za dokaz tvorbe protiteles proti H5 smo serume analizirali z metodo Western blot, kjer smo na membrano vezali čist protein H5 HA. Kot primarna protitelesa smo uporabili serume, kot sekundarna protitelesa pa smo uporabili protitelesa anti-chicken IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Sigma). Titer anti-HA protiteles v krvi imuniziranih živali smo določili tudi s kompetitivnim ELISA testom, kjer določamo protitelesa, ki se vežejo na HA, in na ta način določimo jakost imunskega odziva.

V okviru sodelujoče raziskovalne skupine izveden tudi test inhibicije hemaglutinacije ter test zaščite piščančjega embrija s serumom s protitelesi ob dodatku visoko patogenega seva virusa aviarne influence H5N1.

-Priprava rekombinantnega cepiva v bakteriji E. coli:

Protein hemaglutinin se v bakteriji E. coli izraža v obliki inkluzijskih teles, ki so po sestavi proteinski nanodelci, sestavljeni pretežno iz tarčnega proteina. Na nastanek t.i. neklasičnih inkluzijskih teles, ki vsebujejo tudi določen delež pravilno zvitega proteina, smo skušali vplivati z gojenjem bakterijskih celic pri nižjih temperaturah (25° C namesto 37° C).

Za izražanje proteina HA v bakteriji E. coli smo uporabili trunkirano obliko proteina brez membranskega dela (HAD38) ter z dodanim repom šestih histidinov na C-terminalnem koncu. Pripravljen je bil sintetski gen, optimiziran za izražanje v E. coli, ki je bil nato vstavljen v plazmid pET17b. Za izražanje proteina smo uporabili celice E. coli BL21 (DE3). Pripravili smo stresano kulturo in analizirali izražanje proteina z metodo SDS-PAGE. Dokazali smo visok nivo izražanja proteina HA (15% glede na celokupne proteine) v obliki inkluzijskih teles (protein prisoten v netopni frakciji).

Za pridobitev večjih količin nanodelcev smo izvedli nizkotemperaturno fermentacijo v 5L bioreaktorju, pri čemer smo dobili okrog 75 g mokre biomase. Biomaso smo po resuspendiranju v 4-kratnem volumnu pufru 10mM TrisHCl razbili s homogenizatorjem EmulsiFlex C-5 v 2 pasajah. Razbito biomaso smo centrifugirali 15-30 min na 10 000 rpm, da smo ločili topno in netopno frakcijo, v kateri so prisotna inkluzijska telesa. Inkluzijska telesa smo dodatno očistili s tremi spiranji v ledenohladni vodi MilliQ. Proteinsko sestavo spranih inkluzijskih teles smo analizirali z metodo SDS-PAGE in dokazali več kot 80 % vsebnost proteina HA. In vitro imunoaktivnost smo dokazali z metodo Western blot z uporabo komercialnih protiteles proti H5N1 HA.

Imunogenost izoliranih inkluzijskih teles smo potrdili tudi v živalskih poskusih. V okviru sodelujoče raziskovalne skupine na Veterinarski fakulteti je bila izvedena parenteralna imunizacija piščancev. Tako kot v primeru izoliranih kvasnih peroksisomov so bili imunizirani sedem tednov stari piščanci (izvaljeni iz Lohmann VALO SPF jajc (Nemčija)), in sicer so bili nanodelci aplicirani v prsno mišico trikrat v štirinajstdnevnih presledkih. Pred vsako imunizacijo so piščancem najprej odvzeli kri (1-2 ml), ki je bila uporabljena v testih za ugotavljanje prisotnosti specifičnih protiteles v serumu. Za vsako imunizacijo je bilo uporabljenih približno 60 mg izoliranih nanodelcev, raztopljenih v sterilni fiziološki raztopini. Pri prvi imunizaciji je bil delcem dodan še kompletni Freundov adjuvans, pri drugi in tretji imunizaciji pa je bil dodan nekompletni Freundov adjuvans. Tvorbo protiteles proti HA v serumu smo dokazali z metodo Western blot, kjer smo na membrano vezali čist komercialni protein H5 HA, na katerega so se vezala protitelesa iz seruma imuniziranih piščancev. Titer anti-HA protiteles v krvi imuniziranih živali smo določili tudi s kompetitivnim ELISA testom, kjer določamo protitelesa, ki se vežejo na HA, in na ta način določimo jakost imunskega odziva.

Pri bakteriji E. coli izolacija nanodelcev v večjem merilu ni problematična, zato smo po potrditvi tvorbe protiteles pripravili večjo količino inkluzijskih teles za peroralno aplikacijo. Podobno kot pri kvasnih celicah pa smo pripravili tudi bakterijske celice v obliki nosilnega vehikla z inkluzijskimi telesi v notranjosti. Na ta način so inkluzijska telesa zaščitena v notranjosti celice. Bakterijske celice smo permeabilizirali z inkubacijo v 0,2 % raztopini detergenta NLS ob dodatku inhibitorja proteaz. S tem smo bakterijske celice uspeli delno očistiti, saj se topni proteini ekstrahirajo, inkluzijska telesa pa ostanejo v notranjosti celice (pokazano z analizo SDS-PAGE). Tako inkluzijska telesa kot permeabilizirane bakterijske celice smo zaščitili z enkapsulacijo v alginatne delce.

Pripravljen biomaso bakterijskih celic ter inkluzijska telesa smo zamešali v 1,5 % raztopino alginata v takem razmerju, da je vsebnost celic v alginatnih delcih 50 %.

Posušene alginatne delce smo uporabili za peroralno aplikacijo v poskusne živali. Uporabili smo sedem tednov stare piščance (izvaljeni iz Lohmann VALO SPF jajc (Nemčija)), in sicer so bili piščanci imunizirani trikrat v štirinajstdnevnih presledkih. Pri vsaki imunizaciji so piščanci zaužili 0,7 g alginatnih delcev, pomešanih z njihovo krmo na dan, tri dni zaporedoma. Pred vsako imunizacijo so piščancem odvzeli kri (1-2 ml), ki je bila uporabljena v testih za ugotavljanje prisotnosti specifičnih protiteles v serumu.

Serume smo analizirali z metodo Western blot, kjer smo na membrano vezali čist protein HA dokazali tvorbo protiteles proti HA. Titer anti-HA protiteles v krvi imuniziranih živali smo določili tudi s kompetitivnim ELISA testom, kjer določimo jakost imunskega odziva.

V okviru sodelujoče raziskovalne skupine izveden tudi test inhibicije hemaglutinacije ter test zaščite piščančjega embrija s serumom s protitelesi ob dodatku visoko patogenega seva virusa aviarne influence H5N1.

Tako po parenteralni aplikaciji kot po peroralni aplikaciji tako kvasnih celic s HA v notranjosti kot bakterijskih celic s HA v inkluzijskih telesih ter izoliranih HA, smo dokazali tvorbo visokega titra protiteles proti H5 HA v živalskih poskusih.

Za potrditev tvorbe zaščitnih protiteles smo vse živalske vzorce dodatno testirali s testom zaščite piščančjega embrija ob dodatku visoko patogenega seva H5N1. Ugotovili smo, da nastala protitelesa (kljub močnemu imunskemu odzivu) ne zagotavljajo zadostne zaščite pred infekcijo z virusom H5N1. Vzrok je verjetno v proteinskih delcih proteina HA, ki verjetno ne vsebujejo zadostnega števila molekul v pravi konformaciji, da bi zagotavljala tvorbo zaščitnih protiteles.

Ker je naš pristop priprave cepiva sprožil zelo dober imunski odziv pri živalih, so trenutno v teku dodatni poskusi za pripravo bolj pravilno zvitih proteinskih molekul, ki niso bili predvideni v okviru obstoječega projekta.



### 3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen<sup>2</sup> rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvom, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
  - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
  - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

---

<sup>2</sup> Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Naš način priprave rekombinantnega cepiva predstavlja nov pristop na področju tehnologije rekombinantnih vakcin. Rekombinantne vakcine na osnovi posameznih proteinov so sicer varne, a zaradi slabše imunogenosti še vedno v praksi manj uporabljene kot klasična cepiva na osnovi inaktiviranih celih virusov. V našem primeru smo z uporabo proteinskih delcev dosegli močnejši imunski odziv kot s samim proteinom HA, priprava je hitra in poceni, hkrati pa je pripravljeno cepivo varno. Cepivo je primerno tako za parenteralno kot peroralno aplikacijo, saj smo pri obeh načinih aplikacije dosegli dober imunski odziv. Vakcine, ki so trenutno odobrene za uporabo pri živalih, zahtevajo zamudno parenteralno aplikacijo v posamezne živali. Zato predstavlja možnost masovne imunizacije živali velik napredek na področju razvoja vakcin za uporabo v veterini.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Princip priprave rekombinantnega cepiva za peroralno uporabo bi bil lahko splošno uporaben tudi za zaščito v primeru drugih virusnih bolezni. Daljnoročno bi bilo možno isti pristop uporabiti tudi pri razvoju cepiva za uporabo pri ljudeh.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

-

3.7. Število diplomantov, magistrorv in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

-

#### 4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

-

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

-

**5. Bibliografski rezultati<sup>3</sup> :**

*Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.*

---

<sup>3</sup> Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani:<http://www.izum.si/>

## 6. Druge reference<sup>4</sup> vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

-Ker so principi razvoja cepiva proti aviarni influenci, ki smo jih preučevali in razvijali v sklopu projekta "Rekombinantno cepivo proti aviarni influenci za peroralno uporabo", povsem novi, namenoma nismo sproti objavljali znanstvenih rezultatov, saj smo želeli inovativne pristope patentno zaščititi. Vsaka objava v obliki znanstvenega ali strokovnega članka oziroma predstavitev na znanstvenih ali strokovnih srečanjih namreč onemogoča patentno zaščito. Na podlagi zbranih podatkov smo sedaj pripravili patentno prijavo, v katero bomo vključili še nekaj dodatnih poskusov, ki niso bili predvideni v sklopu tega projekta, pa tudi članek, ki je pripravljen za objavo v reviji Vaccine.

-Ustanovitev in vodenje diagnostičnega laboratorija (<http://www.vf.uni-lj.si/veterina/indexhtm>):

Na inštitutu za zdravstveno varstvo perutnine na Veterinarski fakulteti sta bila v okviru Nacionalnega veterinarskega inštituta ustanovljena Nacionalni referenčni laboratorij (NRL) za atipično kokošjo kugo in Nacionalni referenčni laboratorij (NRL) za aviarno influenco. Vodja NRL za atipično kokošjo kugo je Olga Zorman Rojs, vodja NRL za aviarno influenco pa Brigita Slavec. Laboratorija sta vključena v mrežo tovrstnih evropskih laboratorijev in aktivno sodelujeta z enakimi laboratoriji v okviru EU kot tudi s Centralnim referenčnim laboratorijem za aviarno influenco in atipično kokošjo kugo.

---

<sup>4</sup> Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije.

Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.