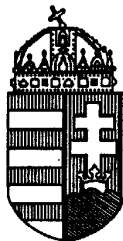


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

201 682 B

(21) A bejelentés száma: 506/86.
(22) A bejelentés napja: 1986. 02. 06.
(30) Elsőbbségi adatok
699 116 1985. 02. 07. US

(83) ATCC 39262

(51) Int. Cl⁵
A 61 K 39/015
C 12 N 15/30

(40) A közzététel napja: 1987. 05. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1990. 12. 28. SZKV 90/12.

(72) Feltalálók:

BALLOU W., Ripley, Silver Spring, Maryland,
GROSS Mitchell Sutart, Wayne, Pennsylvania,
HOCKMEYER Wayne T., Bethesda, Maryland,
YOUNG James Francis, Havertown, Pennsylvania (US)

(73) Szabadalmazók:

SMITHKLINE BECKMAN CORPORA-
TION, Philadelphia, Pennsylvania, THE UNI-
TED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF
THE ARMY, Washington D. C., (US)

(54)

Eljárás maláriaellenes vakcina előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya az ember Plasmodium falciparum fertőzése ellen védő vakcina előállítására szolgáló eljárás. A vakcinát úgy állítják elő, hogy a Plasmodium falciparum CS-protein 16–112 Asn-Ala(Val)-Asn(Asp)-Pro ismétlődő egységét – ahol az Asn-Ala-Asn-Pro ismétlődő egység az összes ismétlődő egység legalább 80%-át teszi ki – és kívánt esetben ehhez fuzionálva egy heterológ peptidet tartalmazó polipeptidet gyógyszeratilag elfogadható hordozóanyaggal összekeverik.

A fenti módon előállított vakcina emlős szervezetekben malária elleni védettséget biztosít.

A leírás terjedelme: 10 oldal, 1 rajz

HU 201 682 B

A malária súlyos, széles körben elterjedt betegség, amely ellen – éveken át tartó erőfeszítések ellenére – még nem sikerült vakcinát előállítani [Science, 226, 679 (1984)]. Kísérletesen már sikerült emlőssöket – beleértve az embert is – védetté tenni a malária kórokozója, a Plasmodium okozta fertőzések ellen, besugárzott sporozoitokkal végzett vakcinálással [Clyde és munkatársai: Am. J. Trop. Med. Hyg. 24, 397 (1975) és Rieckman és munkatársai: Bull. WHO 57 (Suppl. 1) 261 (1979)]. Yoshida és munkatársai [Science 207, 71 (1980)] ismertették, hogy a fenti védettséget – legalábbis részben – a sporozoit felületén lévő egyik proteinnel, a circumsporozoit (CS) proteinnel szembeni antitestek mediálják. A CS-proteinek ellen termelődött monoklonális antitestek in vitro semlegesítik a fertőzőképességet és in vivo védik az állatot. Úgy tűnik, hogy a CS-proteinek az egyes fajokon belül erősen megőrződnek az evolúció során, de különböző fajokban erősen eltérőek.

Négy Plasmodium fajt ismerünk, amelyek az embert fertőzhetik. Ezek a P. falciparum, a P. vivax, a P. ovale és a P. malariae, az utóbbi kettő sokkal ritkábban fordul elő. A tudományos érdeklődés szempontjából fontosak még a P. berghei és a P. knowlesi, mivel ezen fajok gazdaszervezetei a rágcsálók, illetve a majmok.

A P. knowlesi CS-proteinje egy 12 aminosavból álló szekvencia 12 egymás utáni ismétlődését tartalmazza. Zavala és munkatársai [J. Exp. Med. 157, 1947 (1983)] szerint az ismétlődő egység a fő immunogén a P. knowlesi CS-proteinen, a fenti megállapítást azokra a kísérletekre alapozták, amelyek azt mutatták, hogy az ismétlődő egységek elleni antitestek blokkolják az anti-sporozoit antiszérum hozzáférhetőségét a szolubilizált sporozoit proteinhez. Gysin és munkatársai [J. Exp. Med. 160, 935 (1984)] megállapították, hogy a P. knowlesi CS-proteinjének egymás utáni ismétlődő egységeit képviselő szintetikus, 24 aminosavból álló peptid semlegesíti a virulens sporozoitok fertőzőképességét majmok esetén.

Colman és munkatársai (WO 84-2922-A, nyilvánosságra kerülés: 1984. 08. 02.) ismertették P. knowlesi CS-protein ismétlődő egységét kódoló régió egy részének klónozását és béta-laktamázzal és béta-galaktoksidázzal fuzionálva annak kifejeződését. Nussenzweig és munkatársai (US 4 466 917) ismertették a P44 proteinnek nevezett sporozoit proteint, és annak klónozását és kifejeződését E. coliban.

Enea és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 7520 (1984)] is találtak egy hasonló ismétlődő egység szerkezetet P. cynomologi CS-proteinjében.

Kemp és munkatársai (W084 02917-A) leírták a P. falciparum CS-proteinjének klónozását és kifejeződését E. coliban.

Dame és munkatársai [Science 225, 593 (1984)] leírták a P. falciparum CS-proteinjének klónozását és kifejeződését E. coliban. A protein szerint közel 412 aminosavból áll, átlagos molekulatömege 44 000, és egy tetrapeptid 41 egymás utáni ismétlődését foglalja magában. Az ismétlődő szakaszból származó szintetikus 7-, 11 és 15-tagú peptid-törödrékek kötődnek a CS-proteinnel szembeni monoklonális antitestekhez.

A találmány tárgya egyrészt a Plasmodium falciparum CS-protein 16 vagy több egymás utáni ismétlődő egységét magában foglaló immunogén polipeptid, amely képes az emlős szervezet Plasmodium falciparum fertőzéssel szembeni immunitását biztosítani.

A találmány tárgya másrészt eljárás az ember Plasmodium falciparum sporozoit okozta fertőzése elleni vakcina előállítására, amely hatóanyagként a találmány szerinti eljárással előállított polipeptid immunológiai védelmet biztosító mennyiségét tartalmazza, gyógyászati lag elfogadható hordozó- és egyéb segédanyagokkal összekeverve.

Az 1a. ábra a CS-proteint kódoló szekvenciát tartalmazó P. falciparum genom DNS egy régiójának részleges endonukleázos hasításával nyert géntérképe.

Az 1b. ábra a pAS1 részleges endonukleázos hasításával nyert géntérképe.

A találmány szerinti eljárással előállított polipeptid E. coliban előállított, 16 vagy több egymás után ismétlődő CS-protein egységet tartalmaz. Ez ugyan nem azonos a CS-proteinnel, de tartalmazhatja a CS-protein bizonyos, az ismétlődő egységtől eltérő részeit is. A P. falciparum ismétlődő egysége egy tetrapeptid, amelynek szekvenciája az alábbi:

-Asn-Ala-Asn-Pro-,

a képletben Asn aszparagint, Ala alanint és Pro prolint jelent.

A találmány szerinti eljárással előállított polipeptidben a fenti tetrapeptid variációi is előfordulhatnak, feltéve, hogy nem csökkentik jelentősen a velük szembeni antitestek reaktivitását a P. falciparum CS-proteinnel. Például Dame és munkatársai [Science 225, 593 (1984)] világosan kifejtik, hogy a P. falciparum természetes CS-proteinjének 41 ismétlődő tetrapeptid egysége körül 37 szekvenciája Asn-Ala-Asn-Pro, míg 4 tetrapeptid szekvenciája Asn-Val-Asp-Pro – az utóbbi rövidítések közül Val jelentése valin és Asp jelentése aszparaginsav. A polipeptid ismétlődő egységeinek előnyösen több, mint fele úgynevezett működő szekvenciának, azaz -Asn-Ala-Asn-Pro- szekvenciának felel meg.

A találmány szerinti eljárással előállított polipeptid előnyösen 16–112 ismétlődő egységet tartalmaz.

A találmány szerinti eljárással előállított polipeptid hibrid is lehet, vagyis nem-CS-protein ismétlődő egységet tartalmazó fúziós polipeptid. A fenti nem-CS-protein ismétlődő szekvencia hordozó molekulaként szolgálhat, az immunogén tulajdonságok fokozására, vagy a rekombinációs mikroorganizmusban a klónozás és expresszió megkönnyítésére. Másik lehetőség, hogy a fenti kiegészítő szekvenciák más sporozoit-immunogénként, más Plasmodium-immunogénként és/vagy más nem-Plasmodium-immunogénként szolgáló egy vagy több helyet hordoznak. A találmány csak azokra a CS-proteinekre nem vonatkozik, amelyek gyakorlatilag használható mennyiségben nem fejeződnek ki megbízhatóan E. coliban, és nem szükségesek a P. falciparum elleni immunizáláshoz.

A találmány szerinti eljárással közelebbre az alábbi polipeptidek állíthatók elő:

R₁₆₋₃₂ polipeptidek, amelyek legalább 16 ismétlődő egységet tartalmaznak, és azok C-terminális végéhez a pBR322 tetraciklin-rezisztencia (tetR) génjéből származó kb. 32 N-terminális aminosav kapcsolódik;

F₁₆₋₃₂ polipeptidek, amelyek legalább 16 ismétlődő egységet tartalmaznak, és C-terminális végükhöz egy tetR gén termék van fuzionálva;

RNS1 polipeptidek, amelyek legalább 16 ismétlődő egységet tartalmaznak, és azok C-terminális végéhez az NS1 227 aminosavja kapcsolódik;

NS1R polipeptidek, amelyek legalább 16 ismétlődő

egységet tartalmaznak, és azok N-terminális végéhez az NS1 N-terminális 81 aminosavja van fuzionálva;

RG polipeptidek, amelyek legalább 16 ismétlődő egységet tartalmaznak, és azok C-terminális végéhez egy glicin-aminosavmaradék kapcsolódik;

RLA polipeptidek, amelyek legalább 16 ismétlődő egységet tartalmaznak, és azok C-terminális végéhez egy leucin-arginin aminosav-maradék kapcsolódik;

RN polipeptidek, amelyek legalább 16 ismétlődő egységet tartalmaznak, és azok C-terminális végéhez egy Asn-Thr-Val-Ser-Ser- szekvencia kapcsolódik.

A CS-protein ismétlődő egységeket genetikailag kódoló szekvenciát ismert módon állítjuk elő, például szintézissel; vagy, előnyösebben, *P. falciparum*-ból a mRNS reverz transzkripciójával, például Ellis és munkatársai [Nature 302, 536 (1983)] módszerével; vagy a *P. falciparum* genom DNS-éből származó érintetlen gén közvetlen klónozásával, például Dame és munkatársai fent idézett módszere szerint. Az 1a. ábra a CS-proteint kódoló régiót szemlélteti. A *P. falciparum*-ot és annak sporozoitáit fertőzött emberből vagy moszkítókból nyerhetjük.

A CS-proteint vagy annak egy részét kódoló szekvencia klónozása után ismert módon előállíthatjuk annak egy al-fragmentumát, amely az ismétlődő egységet vagy annak egy részét kódolja. A CS-protein génben lévő megfelelő hozzáférhető restriktációs helyeket az 1a. ábrán szemléltetjük. Előnyösek az Xho II helyek. Az Xho II-vel végzett hasítással egy

N-Asp-Pro-[(Asn-Ala-Asn-Pro)₁₅(Asn-Val-Asp-Pro)₁]_n-C képletű, 16 ismétlődő egységet kódoló szekvencia válik szabaddá, a fenti képletben n értéke 1. Több tandem Xho II fragmentumot a megfelelő orientációban használva hosszabb ismétlődő egységeket kapunk, azaz a fenti képletben n értéke 1-nél nagyobb lesz.

A szintetikus eljárások jól ismertek, és kereskedelmi forgalomban lévő DNS-szintetizátorok alkalmazásával végrehajthatók. Szintézissel előállítható olyan oligonukleotid, amely lényegében a fenti aminosavaknak megfelelő kodonokat tartalmazza, és ugyanazon Xho II végeket vagy más hasítási helyeket tartalmaz a végeken. A fenti szintetikus oligonukleotidok eltérhetnek a természetes 64 kodontól, és vagy ugyanezen aminosavakat kódolhatnak, vagy egy olyan polipeptidet, amelyben kis számú, előnyösen kb. nyolcnál kevesebb eltérő aminosav van, feltéve, hogy ezzel a polipeptid immunológiai védőképessége nem csökken jelentősen. A szintetikus kódoló szekvencia például a teljes működő szekvenciát kódolja, amelynek képlete

(-Asn-Ala-Asn-Pro)_n

és n értéke legalább 16.

A polipeptidet kódoló szekvenciát egy *E. coli* expressziós vektorba illeszthetjük, amelyek többsége ismert és hozzáférhető. A találmány szerinti polipeptidek magas szintű expressziója *E. coli*-ban meglepő, a termék szokatlan aminosav-összetétele – kb. 50% aszparagin, 25% alanin és 25% prolin – miatt. Mint azt alább ismertetjük, tapasztalataink szerint a kódoló szekvencia jól expresszálható a lambda PL promotoréból és a lambda cII riboszoma-kötőhelyéből álló regulátor elem használatával, amint azt a pAS1 plazmid tartalmazza [Rosenberg és munkatársai: Meth. Enzym. 101, 123 (1983)] és Shatzman és munkatársai: Experimental Manipulation of Gene Expression, szerk. M. Inouye, Academic Press, New York, 1982]. A pAS1 hordozza a replikáció pBR322

eredetét, egy ampicillin-rezisztencia markert, és a lambdából származó fragmentumok sorát, beleértve a PL-t, N-antiterminációs funkciójú felismerő helyeket (NutL és NutR), az rho-függő transzkripció terminációs szignált (tR1) és a cII riboszoma-kötőhelyet, amely magában foglalja a cII translációt iniciáló helyet, amelynek G-maradékát közvetlenül egy Bam HI hasítási hely követi. A pAS1 a pKC30cII-ből származtatható oly módon, hogy a pKC30cII cII-pBR322 csatlakozásánál lévő Bam HI hely és a cII ATG közötti nukleotidokat töröljük, és a molekulát újra összekapcsoljuk, hogy a Bam HI helyet közvetlenül az ATG-től lefelé regeneráljuk. A pKC30cII-t úgy szerkeszthetjük meg, hogy a lambda 1,3 kg-ból álló Hae fragmentumát – amely a cII gént hordozza – a pKC30 Hpa I helyébe illesztjük, Rosenberg és munkatársai, illetve Shatzman és munkatársai fent idézett módszerei szerint. A pKC30-at Shimitake és munkatársai [Nature 292, 128 (1981)] ismertették, ez egy pBR322 származék, amely a pBR322 tetR génjében a Hind III és Bam HI helyek közé illesztve egy 2,4 kg-ból álló lambda Hind III-Bam HI fragmentumot tartalmaz. A pAS1-hez hasonló szerkezetet ismertettek Courtney és munkatársai [Nature 313, 149 (1985)] is. A pAS1 az American Type Culture Collection-nél (Rockville, Maryland, Amerikai Egyesült Államok) van letétbe helyezve, ATCC 39262 számon. A találmány szerinti expressziós vektort úgy állítjuk elő, hogy a kódoló szekvenciát működőképes helyzetben – azaz helyes orientációban és megfelelő leolvasási rendben – ismert módszerrel egy *E. coli* expressziós vektor regulátor eleméhez kötjük.

A fenti módon kifejeződött polipeptidet a szokásos fehérje-elválasztási módszerekkel választjuk el és tisztítjuk az azt termelő tenyészetből. A tisztítást például az alábbi lépésekből álló eljárással végezhetjük: 1. a sejteket elroncsoljuk, 2. a sejt-törmelékeltől megtisztítjuk a rendszert, 3. a találmány szerinti eljárással előállított polipeptideket elválasztjuk a megtisztított sejt-extraktumban lévő egyéb polipeptidektől, 4. a maradék szennyeződést, így a maradék polipeptidet, szénhidrátot, nukleinsavat és/vagy lipopoliszacharidot egy befecéző tisztítási művelettel eltávolítjuk.

Az első lépést úgy hajthatjuk végre, hogy például lizozimet vagy más lizáló vagy permeabilizáló szert adunk a rendszerhez, vagy a sejteket mechanikusan vagy ultrahangos kezeléssel roncsoljuk el. Az extraktum tisztítására szolgáló centrifugálás vagy ultraszűrés előtt felületaktív szert adunk a rendszerhez, a találmány szerinti eljárással előállított polipeptidek oldatban tartására. A találmány szerinti eljárás egyik lényeges elemét az a felismerés képezi, hogy a találmány szerinti eljárással előállított bizonyos polipeptideket úgy választjuk el igen nagy hatékonysággal az egyéb polipeptidektől, ha a tisztított extraktumot a protein oldatban tartására adott detergens beadagolása után közel 80 °C-ra melegítjük. Azt tapasztaltuk, hogy ha az extraktumot 80 °C-on legalább 4 percen át melegítjük, csaknem az összes bakteriális polipeptid kicsapódik, anélkül, hogy a lényegében az ismétlődő egységekből álló, vagy az ismétlődő egységek más, nem hőre denaturálódó szekvenciákhoz való kapcsolódásából álló polipeptidek denaturálnának. A denaturált bakteriális polipeptideket centrifugálással tömöríthetjük és eltávolíthatjuk. A fenti eljárás az Rtet₃₂, RG, RLA és Rtet₈₆ polipeptidek tisztítására használható. Közelebből, a fenti eljárást sikeresen alkalmaztuk az

R16tet₃₂, R32tet₃₂, R48tet₃₂, R64tet₃₂, R48G, R32LA és R16tet₆₆ tisztítására, amint azt a példákban ismertetjük, míg az R16NS1 és R32NS1 melegítése ezen polipeptidek kicsapódását okozta.

A találmány szerinti eljárással előállított polipeptidet tovább tisztíthatjuk, például szelektív kicsapószer hozzáadásával, majd egy kromatográfiás lépéssel, például ioncserélő kromatográfiával vagy fordított fázisú nagynyomású folyadékromatográfiával.

A találmány szerinti eljárással előállított vakcinában a találmány szerinti eljárással előállított polipeptid víz, előnyösen fiziológiai pH-n puffertolt oldatát közvetlenül használhatjuk. A találmány szerinti eljárással előállított polipeptidet – liofilizálás után vagy anélkül – különféle ismert adjuvánsokon is adszorbeálhatjuk vagy azokkal keverhetjük. A fenti adjuvánsok többek között alumínium-hidroxid, muramil-dipeptid vagy szaponinok, így Quil A lehetnek. További alkalmazási módként például a polipeptid mikrorészecskébe – például liposzómákba – való kapszulázást említhetjük. Úgy is eljárhatunk, hogy a polipeptidet egy immunstimuláló makromolekulával – például elölt Bordatellával vagy egy tetanusz toxoiddal – kapcsoljuk össze.

A vakcinák előállítását például a New Trends and Developments in Vaccines, szerk. Voller és munkatársai, University Park Press, Baltimore, Maryland, Amerikai Egyesült Államok, 1978 irodalmi helyen ismertetik általánosan. A liposzómákba való kapszulázást például Fullerton (US-PS 4 235 877) ismertette. A proteinek makromolekulákhoz kapcsolását például Likhite (US-PS 4 372 945) és Armor és munkatársai (US-PS 4 474 757) írták le. A Quil A használatát például Dalsgaard és munkatársai [Acta Vet. Scand. 18, 349 (1977)] munkájából ismerjük.

A vakcina-dózisokban a polipeptid mennyiségét úgy választjuk meg, hogy azzal az immunprotektív válasz elérhető legyen, a szokásos vakcinák hátrányos mellékhatásai nélkül. A fenti dózis az alkalmazott specifikus polipeptidről, valamint attól függ, hogy a vakcina adjuvánt is tartalmaz-e. Általában minden egyes dózis 1–1000 µg, előnyösen 10–200 µg polipeptidet tartalmazhat. Az egyes vakcinák optimális dózist szokásos módon, például az antitest-titer meghatározásával vagy a kezelendő alany más válaszával mérésével határozhatjuk meg. Az első vakcinálást követően a kezelt alany előnyösen kb. 4 hét múlva újabb adagot kap, és ezt követően minden 6 hónapban megismételjük az adagolást, egészen a fertőzésvészély fennállásáig.

A találmányt közelebből – a korlátozás szándéka nélkül – az alábbi példákban kívánjuk ismertetni. A CS-proteint kódoló szekvenciát James Webertől (Walter Reed Army Institute for Research) kaptuk, egy standard E. coli klónozó vektorba, a pUC8-ba (Bethesda Research Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD, Amerikai Egyesült Államok) az Eco RI helynél illesztett λmPFI (Dame és munkatársai, fent idézve) 2337 bázispárból álló Eco RI fragmens formájában (lásd 1a. ábra). A kapott pUC8 származékot a továbbiakban pUC8 1. klónnak nevezzük.

1. példa

CS-protein származék

40 µg tisztított pUC8 1. klón plazmid DNS-t 100 egység StuI és 100 egység RsaI restrikciós endonukleázokkal emésztünk, 400 µl puffer-közegben (amelynek

összetétele 50 mmól/l Tris, pH 7,5, 50 mmól/l NaCl, 1 mmól/l ditiotritol (DTT) és 10 mmól/l MgCl₂), 37 °C-on, 1,5 órán át. A kapott, a CS-protein első 18 aminosavját kódoló, 1216 bázisból álló fragmentumot 5% poli(akril-amid)-gélén elektroforézissel (PAGE) választjuk el.

10 µg pASI expressziós vektort (ATCC 39 262) 200 µl puffer-közegben 1,5 órán át, 37 °C-on 25 egység Bam HI restrikciós endonukleázzal emésztünk. A szétvágott plazmidot ezután DNS-polimeráz nagy fragmentummal (Klenow, 5 egység; 20 mmól/l Tris-HCl, pH 7,5, 7 mmól/l MgCl₂, 60 mmól/l NaCl, 6 mmól/l 2-merkapto-etanol és 0,25 mmól/l a négy dezoxinukleotid-trifoszfát mindegyikéből; 25 °C, 15 perc) kezeljük, a Bam HI helynél a vég betöltésére.

A CS-gén fragmentum 1 µg-ját ezután 100 ng fenti vektorral kötjük össze, 30 µl ligáz-pufferben (50 mmól/l Tris, pH 7,5, 1 mmól/l DTT, 10 mmól/l MgCl₂, 100 µmol/l rATP), 1 egység T4-DNS ligáz segítségével, 16 órás reakcióidőt alkalmazva, 4 °C-on. A ligációs elegyet E. coli MM294CI* törzsbe (Am. N. X. Acad. Sci 478, 233–248.) transzformáljuk, ampicillin-rezisztens telepeket kapunk, és ezeket vizsgáljuk a CS-gén fragmentum pASI-be való beépülése szempontjából. Egy megfelelő szerkezetűnek talált plazmidot (pCSP) azonosítás után E. coli N5151 törzsbe transzformálunk (Clis857) [(Mol. Cell. Biol. 5, (5), 1015–124 (1985)] és a teljes hosszúságú CS-protein expressziója szempontjából vizsgáljuk. (A protein-N-terminálisánál a 18 aminosav törlése az autentikus CS-protein hasított szignálpeptidjének felelne meg.) A sejteket Luria-Bertani tápközegben (LB) tenyésztjük 32 °C-on, amíg a tenyészet abszorpciója 650 nm-en (A₆₅₀) eléri a 0,6 értéket, majd a hőmérsékletet 2 órán át 42 °C-on tartjuk, az expressziós plazmid PL-promotere transzkripciójának beindítására és a CS-protein származék ezt követő transzlációjára. A sejtenyészetből 1 ml-es mintákat veszünk, tömörítjük, lizáló pufferben [10 mmól/l Tris-HCl, pH 7,8, 25 térfogat% glicerint, 2% 2-merkapto-etanol, 2% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 0,1 % brómfenolkék] újraszuszpendáljuk és 105 °C-os melegítő egységben 5 percen át melegítjük. A proteineket SDS-PAGE segítségével elválasztjuk [13% akril-amid, 30 : 0,8 akril-amid : bisz (akril-amid) arány]. A proteineket nitro-celulózra visszük és az E. coliban termelődött CS-proteint ún. western blot analízissel mutatjuk ki, a P. falciparum tetrapeptid ismétlődő szakaszával reagáló öt monoklonális antitestet használva (Dame és munkatársai fent idézett munkája).

2. példa

R16tet₆₆ polipeptid

100 µg tisztított pUC8 1. klón DNS-t 40 egység Xho II restrikciós endonukleázzal emésztünk, 400 µl puffer-közegben, 37 °C-on, 16 órán át. A CS-protein 16 tetrapeptid ismétlődő egységét kódoló, 192 bázispárból álló fragmentumot ezután PAGE segítségével izoláljuk. A pASI expressziós vektort az 1. példában ismertetett módon Bam HI restrikciós endonukleázzal hasítjuk. 1 µg 192 bázispárból álló Xho II fragmentumot 100 ng pASI-hez kötünk, annak Bam HI helyén, az 1. példában leírt módon. A ligációs elegyet E. coli MM294CI* törzsbe transzformáljuk. Egy, a pASI Bam HI helyén megfelelő orientációban egy 192 bázispárból álló Xho II fragmentumot tartalmazó klónt azonosítottunk, a plazmid

Bam HI-Hind II fragmentumának poli(akril-amid) gél-elektroforézisével, amelynek Hind II helye a tetR gén-től lefelé helyezkedik el, és a Bam HI hely a cII ATG és a beillesztett fragmentum csatlakozásánál van a helyesen orientált plazmidban. A fenti pR16tet₈₆ plazmid szerkezete az alábbi:

pBR322 PL ismétlődő egység tetR S pBR322
 ... BH B B ...

ahol BH jelentése Bam HI hely, B jelentése Ban II hely és S jelentése terminációs kodon.

A pR16tet₈₆-tal transzformáljuk az E. coli N5151 törzset (cIts857) és a CS-protein tetrapeptid ismétlődő egységének termelődése szempontjából vizsgáljuk, western blot analízissel. A képződött protein szerkezete az alábbi:

N-Met-Asp-Pro-(Asn-Ala-Asn-Pro)₁₅-(Asn-Val-Asp-Pro)₁-T86-C

ahol T86 a pAS1-ben lévő tetraciklin rezisztencia génből származó 86 aminosavat jelenti. Az N-terminális metionin (Met) aminosav-maradék szintén a vektorból származott, közelebből a cII protein iniciációs kodonból.

2A. példa

R32tet₈₆ és R48tet₈₆ polipeptidek

10 µg tisztított pR16tet₈₆ plazmid DNS-t 25 egység Bam HI restrikciós endonukleázzal emésztünk 200 µl puffer-közegben, 37 °C-on, 2 órán át. A fenti DNS 100 ng-ját ezután 1 µg fent ismertetett 192 bázispárból álló Xho II fragmentummal kapcsoljuk össze. Előállítjuk az alábbi szekvenciájú polipeptideket kódoló expressziós vektorokat:

N-Met-Asp-Pro-[(Asn-Ala-Asn-Pro)₁₅-(Asn-Val-Asp-Pro)]₁-T86-C,

ahol n értéke 2 (R32tet₈₆), vagy n értéke 3 (R48tet₈₆), és azokat E. coliban fejezzük ki. Azokat a pAS1 klónokat, amelyekben n értéke 2 vagy 3, elválasztjuk azoktól a klónoktól, amelyekben n értéke 2-től vagy 3-tól eltérő, mint azt fent ismertetettük. Minden egyes vizsgált klón a helyes orientációban tartalmazza a beépült fragmentumot. Mind az R32tet₈₆, mind az R48tet₈₆ közel azonos mértékben expresszáldott az R16tet₈₆-tal, amint azt immun-lenyomat analízissel (immunoblotting) kimutattuk.

Az Rtet₈₆ proteinek immun-lenyomat analízisével kimutatható volt a termékek heterogén összetétele, amelyet Coomassie Brilliant Blue R-250-es festéssel nem lehetett látni. Ezek a proteinek úgy tűnik, hogy közel fele mennyiségben az alább ismertetett Rtet₃₂ polipeptidek-től állnak. Úgy tűnt, hogy a kisebb degradációs termékek mérete arányos a klónban lévő tetrapeptid ismétlődő egységek számával. A fenti proteinek instabilitása a heterológ COOH-terminális vég degradációjának tulajdonítható valószínűleg.

3. példa

R16tet₃₂ polipeptid

10 µg tisztított pR16tet₈₆ DNS-t 25 egység Ban II restrikciós endonukleázzal hasítunk, 200 µl puffer-közegben, 37 °C-on, 2 órán át. A fenti hasított DNS 100 ng-ját ezután ligázal zárjuk. A fenti művelet eredményeként töröltünk egy 14 bázispárból álló Ban II fragmentumot, és egy terminációs kodon alakult ki éppen a megmaradt Ban II helytől lefelé. Az így kapott

pR16tet₃₂ plazmidot használjuk fel E. coli N5151 törzsben az R16tet₃₂ kifejezésére, majd a tenyészetből tisztítjuk az R16tet₃₂-t. Az R16tet₃₂-t tartalmazó E. coli 30 g-ját (nedves tömeg) 200 ml A-pufferben [50 mmól/l Tris-HCl, pH 8,0, 2 mmól/l etiléndiamin-tetracetsav (EDTA), 0,1 mmól/l ditiotritol, 5 térfogat% glicerin] újrasszuszpendáljuk. 0,2 mg/ml végkoncentrációban lizozimet adunk hozzá, és az elegyet jégen 30 percen át inkubálva lizáljuk a sejteket. Az elegyet ezután Waring homogenizátorban 3 percen át magas fordulatszámot alkalmazva kezeljük, majd 1 percen át Brason 350 szonikátorban ultrahangos kezeléssel szétgyűrjük a bakteriális DNS-t. 0,1 vegyes% végkoncentrációban nátrium-dezoxi-kolatot adunk az elegyhez, és 30 percen át 4 °C-on keverjük. A szuszpenziót ezután 12 000 g-vel 30 percen át centrifugálva eltávolítjuk a sejt-törmelékeket. A felülúszót egy lombikban összegyűjtjük és forró vízfürdőn 10 percen át inkubáljuk, majd 12 000 g-vel 30 percen át centrifugáljuk. Azt tapasztaltuk, hogy közel az összes E. coli protein kicsapódott a hőkezelési lépés alatt, és kiülepedt a centrifugáláskor, míg az R16tet₃₂ protein oldatban maradt és a felülúszóban gyűlt össze. A felülúszót összegyűjtjük és 20%-os telítettséget biztosító koncentrációban lassan ammónium-szulfátot adunk hozzá. A fenti módon szelektíven kicsapott R16tet₃₂-t centrifugálással (12 000 g, 30 perc) összegyűjtjük. Ezen a ponton az R16tet₃₂ protein 95%-nál nagyobb tisztaságú, az egyéb szennyező bakteriális proteinek tekintetében.

Az egyéb anyagok – például proteinek, szénhidrátok, nukleinsavak vagy lipopoliszacharidok – által okozott maradék szennyezést egy végső kromatográfiás tisztítással – például ioncserélő kromatográfiával, fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiával, fenil-Sepharose kromatográfiával, méret szerinti elválasztással stb. – távolíthatjuk el. A képződött tisztított R16tet₃₂ közel 5%-át teszi ki az összes E. coli proteinnek, azaz 30–60 mg/l koncentrációjú, amint az Coomassie Blue festéssel megállapítottuk.

Az R16tet₃₂ szekvenciája az alábbi:

N-Met-Asp-Pro-[(Asn-Ala-Asn-Pro)₁₅-(Asn-Val-Asp-Pro)]₁-T32-C, ahol n értéke 1 és T32 a tetraciklin rezisztencia génből származó 32 aminosavat jelenti. Közelebből, a T32 szekvenciája az alábbi:

–Leu–Arg–Arg–Thr–His–Arg–Gly–Arg–His–His–Arg–Arg–His–Arg–Cys–Gly–Cis–Trp–Arg–Leu–Tyr–Arg–Arg–His–His–Arg–Trp–Gly–Arg–Ser–Gly–Ser–C,

a megmaradt Ban II hely a 30. és 31. aminosav között van.

3A. példa

R32tet₃₂ és R48tet₃₂ polipeptidek

Lényegében a 3. példa szerint eljárva állítjuk elő az R32tet₃₂-t és R48tet₃₂-t (azaz egy olyan R16tet₃₂-nek megfelelő szekvenciát, amelyben n értéke 2, illetve 3) E. coliban, és azonos hozammal és tisztasági fokkal izoláljuk, mint az R16tet₃₂-t. Kiindulási vektorként pR32tet₈₆-ot, illetve pR48tet₈₆-ot használunk.

3B. példa

R64tet₃₂ és R80tet₃₂ polipeptid

10 µg tisztított pR48tet₃₂ plazmid DNS-t 25 egység Bam HI-val emésztünk 200 µl puffer-közegben, 37 °C-on, 2 órán át. 100 ng fenti DNS-t ezután 1 µg fent ismertetett, 192 bázispárt tartalmazó Xho II fragmentummal kapcsolunk össze. Előállítjuk az alábbi szekven-

ciájú polipeptideket kódoló plazmid expressziós vektorokat:

N-Met-Asp-Pro-[(Asn-Ala-Asn-Pro)₁₅-(Asn-Val-Asp-Pro)]_nT32-C, ahol n értéke 4 (R64tet₃₂) vagy n értéke 5 (R80tet₃₂), és azokat E. coliban kifejezzük. Azokat a pAS1 klónokat, amelyekben n értéke 4 vagy 5, azoktól a klónoktól, amelyekben n értéke 4-től vagy 5-től eltérő, a fent leírt módon elválasztjuk. Az R64tet₃₂, és az R80tet₃₂ közel azonos mértékben expresszálódott, mint az R48tet₃₂. Az R64tet₃₂-t lényegében az R16tet₃₂, R32tet₃₂ és R48tet₃₂, előállításával kapcsolatban ismertetett módon tisztítjuk.

3C. példa

R96tet₃₂ és R112tet₃₂ polipeptid

Lényegében a 3B. példában leírtak szerint eljárva állítjuk elő az R96tet₃₂ és R112tet₃₂ polipeptideket (amelyek képletében n értéke 6, illetve 7), az R48-tet₃₂-vel közel azonos mennyiségben. Kiindulási vektorként pR80tet₃₂-t használunk.

Noha a tisztított Rtet₃₂ polipeptidekben észlelhető bizonyos mértékű heterogenitás immun-lenyomatos módszerrel, a reakcióképes fő foltok összhangban vannak a protein-festéssel kimutatható sávokkal. Az SDS-PAGE módszerrel meghatározott molekulatömegek a vártnál kb. kétszer nagyobbak, noha az egyes proteinek vándorlása minden egyes előállított polipeptid esetén arányos a tetrapeptid ismétlődő egységek számával. Néhány esetben meghatároztuk az Rtet₃₂ peptid aminosav-összetételét is, amelyek a várt értékeknek megfeleltek.

4. példa

R16G polipeptid

A pAS1 Bam HI helyére egy 5'-GATCCCGGGTGACTGACTGA-3' 3' GGCCCACTGACTGACTCTAG-5' szekvenciájú szintetikus kötőt illetve pTerm-et állítunk elő. 10 µg pAS1-et 25 egység Bam HI-vel emészünk. 100 ng Bam HI-vel hasított pAS1-et 20 ng szintetikus kötővel kötünk össze, és a pTerm plazmidot mint a pAS1 Bam HI helyén egy beépült kötő-szekvenciát tartalmazó plazmidot azonosítjuk. A fenti vektorban megmarad a Bam HI hely, és a TGA terminációs kodonoknak a cII protein ATG iniciációs kodonjától lefelé való beillesztését eredményezi, mind a három leolvasási rendszerben.

A pR16G plazmidot úgy állítjuk elő, hogy a pUC8 1. klónjából származó 192 bázispárból álló Xho II fragmentumot a pTerm Bam HI helyre illesztjük, és kiválasztjuk a fent ismertetett módon azokat a klónokat, amelyek megfelelő orientációban tartalmaznak egyetlen Xho II betoldást.

A pR16G-t lényegében a fent ismertetett módon klónozzuk és fejezzük ki E. coli N5151 törzsben.

Az R16G szekvenciája az alábbi:

N-Met-Asp-Pro-[(Asn-Ala-Asn-Pro)₁₅-(Asn-Val-Asp-Pro)]_n-Gly-C, ahol n értéke 1.

A fenti proteinben nincs aromás gyűrűs aminosavmaradék, így a képződött polipeptid mennyiségét nem tudjuk Coomassie Brilliant Blue R-250-es festéssel vizuálisan meghatározni. A CS-proteinre specifikus 5 monoklonális antitesttel végzett immun-lenyomatos analízis (lásd Dame és munkatársai fent idézett munkája) szerint a kívánt polipeptid közel 1%-át teszi ki az összes

sejt-proteinnek, az R16tet₃₂-vel összehasonlítva, amely utóbbinál lehetséges Coomassie Brilliant Blue R-250-es festéssel meghatározni a protein-tartalmat.

4A. példa

R32G, R48G, R64G, R80G és R112G polipeptid

Az R32G, R48G, R64G, R80G és R112G polipeptideket – amelyek szekvenciája azonos az R16G-vel, de n értéke 2, 3, 4, 5, illetve 7 – a 4. példában ismertetett módon E. coli N5151 törzsben termeljük. A fenti polipeptidok közel azonos mennyiségben képződnek, mint az R16G. Az R48G-t lényegében a 3. példában leírtak szerint tisztítjuk.

5. példa

R16LA és R32LA polipeptid

A pAS1 Bam HI helyére egy

5'-GATCCGCTGCGTT-3'

GCGACGCAACTAG-5'

szekvenciájú szintetikus kötőt illetve pTerm2-t állítunk elő, lényegében a 4. példában leírt módon. A pTerm2-ben megmarad a Bam HI hely. A pUC8 1. klónból származó 192 bázispárból álló Xho II fragmentumot a fent ismertetett módon illesztjük be a pTerm2 Bam HI helyére. A pR16LA és pR32LA klónokat, amelyek egy, illetve két Xho II beillesztést tartalmaznak a megfelelő orientációban, lényegében a fent ismertetett módon választjuk ki. Az R32LA-t lényegében a 3. példában leírt módon tisztítjuk.

A pR16LA-t és pR32LA-t a fent ismertetett módon klónozzuk és fejezzük ki E. coli N5151 törzsben.

Az R16LA és R32LA szekvenciája az alábbi:

N-Met-Asp-Pro-[(Asn-Ala-Asn-Pro)₁₅-(Asn-Val-Asp-Pro)]_n-Leu-Arg-C,

ahol n értéke 1, illetve 2. A C-terminális leucin és arginin a pTerm2-ben lévő szintetikus kötőből származik.

Az R16LA közel 1%-át teszi ki az E. coli összes proteinjének, míg az R32LA az összes sejt-proteinnek közel 5%-a.

6. példa

R16NS1 polipeptid

A pASIdeltaEH plazmidot úgy állítjuk elő, hogy a pAS1 pBR322 eredetű nem létfontosságú Eco RI – Hind III régióját töröljük. 10 µg pAS1-et 20 egység Eco RI-vel és 20 egység Hind III-mal hasítunk, 200 µl puffer-közegben, DNS-polimerázzal (Klenow) kezeljük, ligázzal zárjuk, és E. coliba transzformáljuk, lényegében a fent ismertetett módon. Azonosítunk egy olyan klónt, amelyből a 29 bázispárból álló Eco RI – Hind III fragmens törölve van. A pASIdeltaEH Bam HI helyére beillesztjük a pAPR801 1236 bázispárból álló Bam HI fragmentumát [Young és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 6105 (1983)], amely az influenza vírus (A/PR/8/34) NS1 kódoló régióját tartalmazza, ami 861 virális eredetű bázispárból és a pBR322-ből származó 375 bázispárból áll. A kapott pASIdeltaEH/801 plazmid az autentikus NS1-et (230 aminosav) kódolja. A fenti plazmidban megmarad a Bam HI hely, a cII transzlációt indító hely és az NS1 kódoló szekvencia között.

10 µg pASIdeltaEH/801 plazmidot 20 egység Eco RI-vel és 20 egység Sal I-vel hasítunk, 200 µl nagy ioncserés pufferben (50 mmól/l Tris-HCl, pH 7,5, 1 mmól/l DTT, 10 mmól/l MgCl₂, 100 mmól/l NaCl), 37 °C-on 2

órán keresztül, DNS-polimeráz nagy fragmentummal (Klenow) kezeljük és ligázzal zárjuk, lényegében a fent leírtak szerint. Izolálunk egy olyan klónt, amelyből a 650 bázispárt tartalmazó Eco RI – Sal I régió törölve van. A fenti pNS1deltaES plazmid az autentikus NS1-et kódolja.

A pR16NS1 plazmidot úgy állítjuk elő, hogy a pUC8 1. klónjából származó 192 bázispárt tartalmazó Xho II fragmentumot a pNS1deltaES plazmid Bam HI helyére illesztjük, és lényegében a fent ismertetett módon kiválasztjuk azokat a klónokat, amelyek megfelelő orientációban tartalmaznak egyetlen Xho II betoldást.

A pR16NS1-et E. coliban klónozzuk és kifejezzük, és az R16NS1-et lényegében a fentiek szerint tisztítjuk, azzal az eltéréssel, hogy a forralást elhagyjuk.

Az R16NS1 szekvenciája az alábbi:
N-Met-Asp-Pro-[(Asn-Ala-Asn-Pro)₅-(Asn-Val-Asp-Pro)]_n-N227,
ahol n értéke 1 és N227 az NS1-ből származó 227 aminosavat jelenti.

A fenti módon előállított R16NS1 készítményben az R16NS1 a protein-tartalom több, mint 80%-ára becsülhető, a forralás vagy ioncserélős lépés nélkül. Az R16NS1 meglepően magas, közel 25%-át képezi az összes sejt-proteinnek.

6A. példa

R32NS1, R48NS1 és R64NS1 polipeptid

Az R32NS1-et (amelynek szekvenciája az R16NS1-ével azonos, és n értéke 2) lényegében a 3. példában leírtak szerint fejezzük ki E. coliban és tisztítjuk abból, a forralás elhagyásával. Az R32NS1 az R16NS1-gyel közel azonos mértékben képződik, és tisztasága is közel azonos.

Az R48NS1-et (amelynek szekvenciája az R16NS1-ével azonos, és n értéke 3), és az R64NS1-et (n értéke 4 az R16NS1 képletében) lényegében a fentiek szerint eljárva állítjuk elő E. coliban. Az R48NS1 közel 10%-át, az R64NS1 közel 5%-át teszi ki az E. coli összes protein-tartalmának.

7. példa

NS1R48 polipeptid

A pR48tet₈₆ plazmidot Bam HI-vel hasítjuk és NDS-polimerázzal (Klenow) töltjük be a véget, lényegében a fent leírt módon. A plazmidot ezután Ban II-vel hasítjuk, a fent ismertetett módon, így módon egy 672 bázispárból álló, 3 Xho fragmentumot hordozó fragmentum és 96 bázispár válik szabaddá a tetraciklin rezisztencia génből.

10 µg pASIdeltaEH/801 plazmidot 20 egység Nco I-gyel hasítunk 200 µl nagy ionerősségű pufferben, 37 °C-on 2 órán át, és a véget DNS-polimeráz nagy fragmentummal (Klenow) töltjük be, a fent ismertetett módon. Az NS1-ben az Nco I hely a 81. aminosavnak megfelelő kodonban van. A plazmidot ezután Ban II-vel hasítjuk a fent ismertetett módon, ezáltal töröljük a megmaradt NS1 kodonokat és a tetraciklin rezisztencia gén egy részét, és pASIdeltaEH/801-1 plazmidot kapunk.

A 672 bázispárból álló Bam HI (betöltött végű) – Ban II fragmentumot a pASIdeltaEH/801-1 plazmidba illesztve állítjuk elő a pNS1R48 plazmidot. A fenti plazmidot az előzőekben ismertetett módon fejezzük ki E. coliban. A kapott NS1R48 szekvenciája az alábbi:

N-81N-Asp-Pro-[(Asn-Ala-Asn-Pro)₅-(Asn-Val-Asp-Pro)]_n-T32-C,
ahol 81N az NS1 N-terminális 81 aminosavját jelenti, n értéke 3, és T32 jelentése a fent megadott. Az NS1R48 az összes sejt-protein közel 5%-át képezi.

8. példa

R32N polipeptid

10 µg pR32NS1 plazmidot 25 egység Hind III-mal hasítunk, 200 µl puffer-közegben, 2 órán át, 37 °C-on, és a véget DNS-polimerázzal töltjük be, a fent ismertetett módon, pR32NS1-1 plazmidot kapunk. A Hind III hely az NS1 kódoló régiójában az 5. aminosav-maradékot kódoló kodonban van. 100 ng pR32NS1-1-et ezután a fent ismertetett módon ligázzal zárunk. A kapott pR32N plazmid most egy TAA terminációs kodont tartalmaz az NS1 kódoló szekvencia 5. kodonjában. A pR32N plazmidot a fentiekben ismertetett módon használjuk az R32N polipeptid előállítására E. coliban.

Az R32N szekvenciája az alábbi:
N-Met-Asp-Pro-[(Asn-Ala-Asn-Pro)₅-(Asn-Val-Asp-Pro)]_n-N5-C,
ahol n értéke 2 és N5 az NS1 génből származó 5 aminosavat jelenti. Közelebből, az N5 az alábbi szekvenciának felel meg:
-Asn-Thr-Val-Ser-Ser-C.

Az R32N az E. coli összes proteinjének közel 5%-át teszi ki.

9. példa

Antitest-válasz – ELISA

Az R16tet₃₂, R32tet₃₂ és R48tet₃₂ rekombináns proteinek a fentiek szerint tisztítjuk, 0,01 mol/l koncentrációjú foszfáttal pufferolt sóoldattal (pH 7,0) szemben (PBS) dializáljuk, alikvotokra osztjuk és –80 °C-on tároljuk. Az előállított proteinek PBS-sel, alumínium-hidroxiddal (alum) vagy komplett Freund-féle adjuvánssal (CFA) összekeverve 0,5 ml-es dózisokat készítenek, amelyek protein-tartalma 50 µg. A CFA-t (GIBCO, Grand Island, New York, USA) és antigént PBS-ben 1 : 1 arányban emulgeáljuk, 30 perces keveréssel, mechanikus keverőberendezésben. Az alumot gyógyszer-könyvi tisztaságú alumínium-hidroxid-gélből készítjük, PBS-sel végzett hígítással. Az antigént 4 °C-on, 12 órán át rotációs keverőben keverve adszorbeáljuk az alumon. A szuszpenziót további 12 órán át ülepedni hagyjuk, majd a felülúszó megfelelő mennyiségét leöntjük, hogy 0,80 mg Al-t és 50 µg rekombináns proteint kapjunk dózisonként.

6–8 hetes C57Bl/6 egereket (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) csoportonként 5 állatot) szubkután vagy intraperitoneális úton összesen 50 µg proteinnel immunizálunk. Az állatoknak az első immunizálás után 4 héttel ugyanezen módon újabb dózist adunk, azzal az eltéréssel, hogy azoknak az állatoknak, amelyek az immunogént CFA-ban kapták, az proteint nem-komplett Freund-féle adjuvánssal (IFA) emulgeálva adjuk. Egy hét elteltevel a farok véreztetésével kapott teljes vért összegyűjtjük, 4 °C-on megalkasztjuk és centrifugálással elkülönítjük és a felhasználásig –80 °C-on tároljuk a szérumokat.

Az egyes szérumok reakcióképességét egy 16 aminosavból álló szintetikus peptiddel szemben – amely a P. falciparum CS-protein négy ismétlődő egységének [(Asn-Ala-Asn-Pro)₄] felel meg – enzimhez kötött im-

mun-szorbens vizsgálattal (ELISA) vizsgáljuk, Dame és munkatársai [Science 225, 593 (1984)] módszere szerint. A mikrotitrátor lemezek lyukainak bevonására marha-szérumalbuminhoz (BSA) kapcsolt szintetikus peptid antigént használunk. 50 µl (0,1 µg) 0,01 mól/l koncentrációjú foszfáttal pufferolt sóoldattal (pH 7,0) (PBS) hígított vizsgálandó antigént pipettázunk a polisztirol mikrotitrátor lemezek (Immunlon 2 Dynatech Laboratories, Alexandria, VA, USA) lyukaiba, és egy éjszakán át szobahőmérsékleten (kb. 22. °C) tartjuk. A lyukak tartalmát ezután leszivatjuk, gátló pufferral (BB, amelynek összetétele: 1,0% BSA, 0,5% kazein, 0,005% timerszol és 0,0005% fenolvörös PBS-ben) töltjük fel és 1 órán át szobahőmérsékleten tartjuk. Az egérszérumot sorozathígításos módszerrel BB-vel hígítjuk, és minden egyes lyukba 50 µl-t mérünk belőle. A lemezeket szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáljuk, majd a lyukakat leszivatjuk, háromszor mossuk PBS-0,05% Tween 20 (PBS-TW20) eleggyel és 50 µl, 10% hővel inaktivált emberi szérumot tartalmazó PBS-sel 1/500-szorosára hígított kecske anti-egér IgG-vel konjugált torna-peroxidázt. (H+I) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) mérünk az egyes lyukakba. Egy óra elteltével a lyukak tartalmát leszivatjuk, háromszor mossuk PBS-TW20-szal és 150 µl szubsztátot [1 mg 2,2'-azino-di(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)/1 ml 0,005% hidrogén-peroxidot tartalmazó 0,1 mól/l koncentrációjú citrát-foszfát puffer, pH 4,0, a hidrogén-peroxidot közvetlenül felhasználás előtt adjuk a pufferhez] mérünk minden egyes lyukba. Egy óra elteltével 414 nm-en meghatározzuk az abszorpciót, ELISA lemez-leolvasó (Titertek Multiskan, Flow Laboratories Inc., McLean, VA) segítségével.

Az R16tet₃₂, R32tet₃₂ és R48tet₃₂ polipeptidek mindegyike olyan antitest-termelést váltott ki, amely ELISA tesztben reakcióképes volt. Az R16tet₃₂, önmagában alkalmazva, kevésbé volt immunogén tulajdonságú, mint az R32tet₃₂ vagy az R48tet₃₂. Az alum és a CFA növelte mind a három találmány szerinti eljárással előállított protein immunogén tulajdonságát, és még 102 000-en felüli titer esetén is észlelhető antitest legalább egy vizsgálatban.

10. példa

Antitest-válasz – IFA

A 9. példa szerinti antiszérum vizsgálataink szerint erősen reagált autentikus *P. falciparum* CS-proteinnel, indirekt immunofluoreszcens antitest vizsgálatban (IFA). *P. knowlesi*, *P. cynomologi*, *P. viva* és *P. gallinaceum* elleni reaktivitást nem tapasztaltunk. Az R32tet₃₂-vel szembeni antiszérum csekély reaktivitást mutatott *P. berghei* ellen. Ez az eredmény összhangban van Hockmeyer és munkatársai [Proc. 3d Int'l. Symp. Immunobiol. Proteins Peptides, szerk. Atassi, M. Z., Plenum New York (nyomdában)] azon megfigyelésével, miszerint a *P. falciparum*mal szembeni bizonyos Mab-ok reagálnak a *P. berghei* sporozoitokkal IFA vizsgálatban.

A sporozoitokat fertőzött moszkító nyálmirigyéből preparáljuk, lényegében Bosworth [J. Parasitol. 61, 769 (1975)] módszere szerint, sóoldattal vagy 0,5% BSA-t tartalmazó Medium 199-cel (GIBCO) hígítjuk, hemaciotómetert alkalmazva számoljuk és 2000–5000 sporozoit/10 µl értékre hígítjuk. 10 µl-es alikvotokat mérünk a

többszörös, nyomott IFA-lemez minden egyes lyukába, szobahőmérsékleten, levegővel szárítjuk és –80 °C-on tároljuk.

Az IFA-vizsgálatot azzal kezdjük, hogy 20 µl térfogatú, BB-vel 1/100-szorosára hígított szérumot szélesztünk a szárított sporozoitokat tartalmazó IFA-lemez lyukaiba. Nedves kamrában, szobahőmérsékleten, 20 percen át végzett inkubálás után a szérumoldatokat leszivatjuk és a lyukakat 2 csepp PBS-sel mossuk. Az egyes lyukakba ezután 20 µl, BB-vel 1 : 40-szeresére hígított, fluorescein-izotiocianáthoz kapcsolt kecske anti-egér antitestet (Kirkegard és Perry, Gaitersburg, MD, USA) adunk. Szobahőmérsékleten 20 percen át tartó inkubálás után a lyukakat ismét kimossuk 2 csepp PBS-sel, glicerinben tárgylemezre helyezzük és UV-fényben 500-szoros nagyítással meghatározzuk a fluoreszcenciát.

11. példa

CSP-reakció

R16tet₃₂-vel, R32tet₃₂-vel és R48tet₃₂-vel immunizált egerekből származó szérumok erős CSP-pozitív reakciókat adnak, amint az az 1. táblázat adataiból látható. Adjuváns nélkül alkalmazva csak az R16tet₃₂-re nem termelődik olyan antitest, ami pozitív CSP-reakciót adna, míg CFA-val vagy alummal együtt adva mind a három találmány szerinti eljárással előállított protein olyan antitest-termelést indukál, amely erős CSP-reakciókat ad.

1. táblázat: R16tet₃₂, R32tet₃₂ és R48tet₃₂ elleni antiszérum CSP-reaktivitása

Adjuváns	Antisérum		
	R16tet ₃₂	R32tet ₃₂	R48tet ₃₂
–	0/25(–)	17/25(2+)	21/25(4+)
CFA	23/25(4+)	21/25(4+)	21/25(4+)
alum	25/25(4+)	25/25(4+)	16/27(2+–4+)

A CSP-reakciókat lényegében Vanderberg és munkatársai [Mil. Med. 134 (Supp. 1), 1183 (1969)] módszere szerint hajtjuk végre. 5 µl mintát, amely 500–1000 moszkító nyálmirigyből származó *P. falciparum* sporozoitot tartalmaz Medium 199-ben újrászuszpendálva, mikroszkóp tárgylemezen 5 µl szérummal keverünk össze, vazelinnal szegélyezett zárólemezzel lefedjük és 37 °C-on 1 órán át inkubáljuk. A reakciót fázis-kontraszt mikroszkóppal értékeljük ki, 400-szoros nagyítást alkalmazva. Minden egyes szérum-mintában 25 véletlenszerűen választott sporozoitot vizsgálunk meg, és feljegyezzük a CSP-pozitív organizmusok számát. A CSP-reaktivitás mértékét – Vanderberg és munkatársai fenti idézett módszere szerint meghatározva – zárójelben tüntetjük fel. A (–) érték azt jelenti, hogy nem észlelhető CSP-reaktivitás; (2+) szemcsés csapadék megjelenését jelenti a sporozoitok felületén; (4+) hosszú, fonalszerű filamentum megjelenését jelzi a sporozoitok egyik végén. A normál egérszérum, vagy a csak CFA-val immunizált egérből származó szérum nem vált ki kimutatható mértékű CSP-reakciót, párhuzamos vizsgálatokban.

12. példa

Hepatocita-blokkolás

A 9. példa szerinti szérumokat *in vitro* invázió-gátlás szempontjából is megvizsgáljuk, az eredményeket a 2. táblázatban ismertetjük.

2. táblázat: *P. falciparum* sporozoitok HepG2 – A16 hepatoma sejtek elleni inváziójának gátlása

Adjuváns	Antiszérum		
	R16	R32	R48
–	46	95	92
CFA	76	92	94
alum	100	100	96

Az eredmények szerint az R32tet₃₂ és R48tet₃₂ proteinek erősen blokkoló hatású antitestek képződését indukálják, még adjuváns nélkül is. Az R16tet₃₂ kevésbé hatásos erősen blokkoló hatású antitestek kiváltásában, csak alumhoz adszorbeálva fejt ki megfelelő hatást. A fenti eredmény összhangban van az R16tet₃₂-re termelt antiszérum esetén megfigyelt gyenge CSP-reaktivitással és alacsony ELISA-uterekkel.

A sporozoit-invázió gátlásának vizsgálatát tenyésztett sejteken lényegében Hollingdale és munkatársai [J. Immunol. 32, 909 (1984)] módszere szerint végezzük. Az R16tet₃₂-vel, R32tet₃₂-vel és R48tet₃₂-vel immunizált egerekből nyert szérumot azon képessége szempontjából vizsgáljuk, hogy milyen mértékben tudja meggátolni a *P. falciparum* sporozoitok invázióját tenyésztett sejtek ellen. A szérumot a tápközeggel hígítjuk és 1 : 20-szoros végső hígításban (térfogat/térfogat) HepG2-A16 sejtenyészethez [(Am. J. Trop. Med. Hyg. 32, 682–684 (1983)] adjuk. A tenyészetekhez ezután 12 000–40 000 moszkító nyálmirigyből nyert *P. falciparum* sporozoitot adunk és 5% széndioxidot tartalmazó atmoszférában 37 °C-on 3 órán át inkubáljuk, Dulbecco-féle foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) öblítjük, metanolban fixáljuk és PBS-sel kétszer öblítjük.

Azokat a sporozoitokat, amelyek bejutottak a sejtbe, immunperoxidáz antitest vizsgálattal (IPA) tesz-szük láthatóvá (Hollingdale és munkatársai fent idézett munkája szerint). Az IPA vizsgálatot úgy végezzük, hogy a fixált tenyészetet először *P. falciparum*-mal szembeni Mab-bal (2F1.1, lásd Dame és munkatársai fent idézett munkája) kezeljük, majd torna-peroxidázhoz kapcsolt nyúl anti-egér immun-globulin-al inkubáljuk és 3,3-diamino-benzidinnel megfestjük. A tenyésztett sejtekbe bejutott sporozoitok számát úgy határozzuk meg, hogy megszámláljuk a teljes preparátumban a sejten belüli parazitákat, Leitz mikroszkópot használva, 250-szeres nagyítás mellett, sötétkéék színűszűrővel. A vizsgálatokat vagy két, vagy három párhuzamos mintát vizsgálva hajtjuk végre, és minden egyes sejtenyészethez azonos számú sporozoitot adunk egy kísérletsorozaton belül. A gátlást a találmány szerinti polipeptidekkel szembeni immun-szérum által kifejtett sporozoit-invázió%-os csökken-tésével adjuk meg, normál egérszérum kontrollkhoz viszonyítva, ahol a CS-reaktív Mab 2F1.1 100%-os gátlást fejt ki a sporozoit-invázió ellen, 1/20-as hígítá-sban.

A találmány szerinti eljárással előállított RLA, R16NS1 és R32NS1 rekombináns polipeptideket is ha-sonlóképpen vizsgáltuk, ELISA és IFA vizsgálatokkal, és azt tapasztaltuk, hogy azok hasonlóképpen olyan antitestet indukálnak, amely reagál a 16 aminosavból álló szintetikus polipeptiddel, és így pozitív CSP-reak-ciót adnak. Előnyösek az R32tet₃₂ és R32LA proteinek, viszonylagos homogenitásuk, képződési szintjük és könnyű előállításuk következtében.

A szintetikusan előállított vakcinák esetén elsődleges fontosságú, hogy a szintetikus immunogénnel szemben termelődő antitest felismeri-e az autentikus molekulát, és vajon az antitest rendelkezik-e a megfelelő védelem kialakításához szükséges biológiai tulajdonságokkal. Az immunfluoreszcencia vizsgálat és a CSP-reakció eredménye szerint az *E. coli*-ban termelt polipeptidekkel szemben képződő antitest reagál a sporozoit felületével, és így felismeri az autentikus CS-proteint. Állatkísérle-tekben és emberben is kimutatták, hogy a CSP-antitest jelenléte jelentősen összefügg a protektív immunitással. Az a tény, hogy a találmány szerinti eljárással előállított proteinek ellen termelődő antitestek gátolják a humán hepatoma sejtek sporozoitok általi invázióját *in vitro*, igen jelentős. Hollingdale és munkatársai (lásd fent idé-zett munkájuk) kimutatták, hogy mind a *P. falciparum*, mind a *P. vivax* elleni Mab-ok, valamint a fenti malária-fajok ellen immunis emberekből nyert poliklonális szé-rum is gátolják a sporozoit-inváziót. Ezért a sporozoitok invázió-gátlásának *in vitro* vizsgálata megfelelő vizsgá-lati módszert jelent a protektív antitestek kimutatására. A fent ismertetett vizsgálatok eredményei összességük-ben azt mutatják, hogy a találmány szerinti eljárással előállított vakcinát a humán gyógyászatban *P. falcipa-rum* által okozott fertőzések elleni védelemre használ-hatjuk.

A találmány szerinti eljárással előállított rekombi-náns proteinek immun-válasza Freund-féle komplett ad-juvánssal vagy alummal egyaránt növelhető, amint azt ELISA-titerük, felületi reaktivitásuk (IFA és CSP) és sporozoit-inváziót gátló hatásuk vizsgálatakor megállá-pítottuk. A Freund-féle komplett adjuváns emberben nem használható, mivel lázat okoz, granulomákat vált ki és tuberkulin-túlérzékenységet eredményez. Az alumot jelenleg már bevezetett vakcinákban – például a diftéria és a tetanusz toxoid, valamint az egyik legújabb vakcina, a Hepatitis B esetén – is használják adjuvánsként. Haté-konyasága és a humán gyógyászatban régóta tartó bizton-ságos használata bizonyított.

13. példa

Vakcina előállítása

A találmány szerinti eljárás értelmében például az alábbi módon készíthetünk vakcinát.

3%-os vizes, pufferolt alumínium-hidroxid-oldathoz (10 mmól/l nátrium-foszfát, 150 mmól/l NaCl, pH 6,8; szűrővel sterilizálva) ugyanezen összetételű pufferben oldva adjuk keverés közben a találmány szerinti eljárás-sal előállított polipeptidet, a peptidre nézve 100 µg/ml, az AL³⁺-ra nézve 1,0 mg/ml végkoncentrációban. A pH-t, 6,6 értéken tartjuk. Az elegyet egy éjszakán át 0 °C körüli hőmérsékleten tartjuk. 0,005% végkoncentráció-ban timerszolt adunk hozzá. A pH-t ellenőrizzük, és szükséges esetben 6,8-ra állítjuk.

Noha a találmány szerinti eljárást a fentiekben rész-letesen ismertettük, beleértve az előnyös megoldásokat

is, nyilvánvaló, hogy a találmány oltalmi körét nem kívánjuk a fenti megoldásokra korlátozni, hanem az ismertett megoldások összes módosításai is a találmány oltalmi körébe tartoznak.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az ember *Plasmodium falciparum* fertőzése ellen védő vakcina előállítására, *azzal jellemezve*, hogy *Plasmodium falciparum* CS-protein 16–112 Asn - Ala(Val)-Asn(Asp)-Pro ismétlődő egységét – ahol az Asn-Ala-Asn-Pro ismétlődő egység az összes ismétlődő egység legalább 80%-át teszi ki – és kívánt esetben ehhez fuzionálva egy heterológ peptidet tartalmazó polipeptidet gyógyászatiilag elfogadható hordozóanyaggal összekeverünk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy polipeptidként a Rtet₃₂ polipeptidet, RNS1 polipeptidet, NS1R polipeptidet, Rtet₈₆ polipeptidet, RG

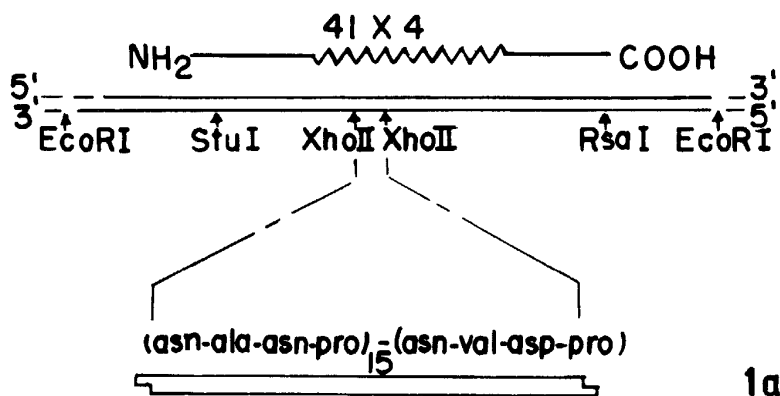
polipeptidet, RLA polipeptidet vagy RN polipeptidet keverjük a hordozóanyaggal.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy polipeptidként a

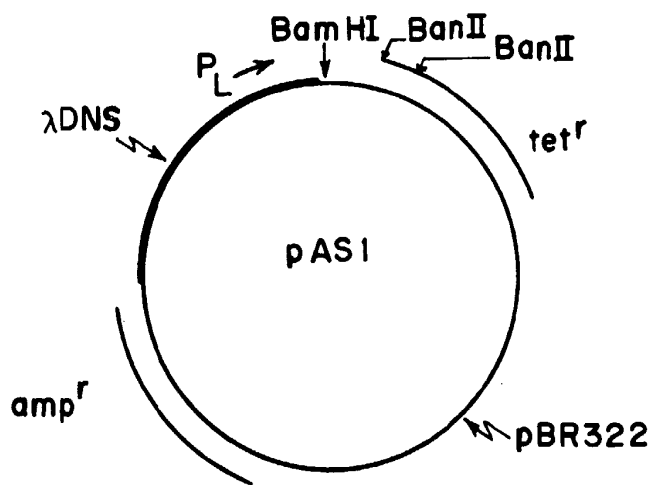
- | | | |
|----|-------------------------|--------------|
| 5 | R16tet ₈₆ , | R32G, |
| | R32tet ₈₆ , | R48G, |
| | R48tet ₈₆ , | R64G, |
| | R16tet ₃₂ , | R80G, |
| | R32tet ₃₂ , | R112G, |
| 10 | R48tet ₃₂ , | R16LA, |
| | R64tet ₃₂ , | R32LA, |
| | R80tet ₃₂ , | R16NS1, |
| | R96tet ₃₂ , | R32NS1, |
| | R112tet ₃₂ , | R48NS1, |
| 15 | R16G, | R64NS1, vagy |
| | NS1R48, | R32N |

polipeptidet keverjük a hordozóanyaggal.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy polipeptidként a R32tet₃₂ vagy R32LA polipeptidet keverjük a hordozóanyaggal.



1a. ábra



1b. ábra