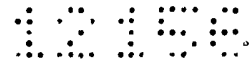


**Metazoon paraziták ellen ható vakcinák****MALLINCKRODT VETERINARY, INC., Mundelein, IL, US****K I V O N A T**

A találmány tárgyát új metazoon parazita antigének, ezeket kódoló nukleinsavak, és ezek alkalmazása férgek vagy más metazoon paraziták, főként férgek és ízeltlábú paraziták háziállatokban okozott fertőzéseinek gátlása. A találmány tárgyát képezik különösen az olyan védő metazoon parazita antigének vagy antigén fragmentumok, komponenseik vagy prekurzoraik vagy funkciósan ekvivalens származékaik, analógjaik vagy variánsaik, amelyek egy vagy több metazoon parazitával szemben védő antigén aktivitással bírnak, és amely antigén a pepsztatinhoz való kötődésre képes, natív formájában egy integráns membrán protein vagy protein komplex. A találmány körébe tartoznak aszpartil-proteináz-szerű és/vagy neutrális endopeptidáz-szerű aktivitással bíró antigének is.

P9500125

**KÖZZÉTÉTELI  
FÉLDÁNY**



**KÉPVISELŐ:**

**DANUBIA SZABADALMI ÉS  
VÉDJEGY IRODA KFT  
BUDAPEST**

"A"

**Metazoon paraziták ellen ható vakcinák**

**MALLINCKRODT VETERINARY, INC., Mundelein, IL, US**

**Feltalálók:**

SMITH, William, David,	Edinburgh, GB
SMITH, Stuart, Kevin,	Edinburgh, GB
MURRAY, Jacqueline,	Bellevue, WA, US
LIDDELL, Susan,	Edinburgh, GB
KNOX, David Patrick,	East Lothian, GB

A bejelentés napja: 1993. 07. 20.

Elsőbbsége: 1992. 07. 21. (9215505.0)

1992. 08. 19. (9217635.3) GB

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB93/01521

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/02169

80756-215-GÁ/KmO

A találmány tárgyát új metazoon parazita antigének képezik, valamint ezek alkalmazása férgek, és más metazoon paraziták által okozott megbetegedések, különösen háziállatok férgessége és ízeltlábú parazitákkal való fertőzöttsége ellenőrzésére.

A háziállatok minden faja megfertőződhet számos különböző parazitával, ezek közül a férgek és ízeltlábúak sok fajával, ez a fertőződés rendszerint betegséget okoz. Ezen betegségek némelyike gazdasági szempontból jelentős, például a *Haemonchus contortus* okozta haemonchosis. A *Haemonchus contortus* egy olyan bélféreg (nematóda), amely különböző kérődzők, köztük birka oldógyomrában vagy valódi gyomrában élőszködik. A fejlődő és a kifejlett *Haemonchus* vérszívó, amely száji részével a gyomor-nyálkahártyában a kis véreerekhez tapad. Az élőszködővel súlyosan fertőzött birkák vérük nagy részét elveszítik, ami anémiához, satnyuláshoz, és gyakran pusztuláshoz vezet. A Haemonchosis döntően a világ trópusi és szubtrópusi részeiben jelentkezik, mivel a nem-parazita életszakaszában a mezőkön fellelhető *H. contortus* az alacsony hőmérsékletre érzékeny, és gyakran nem éli túl a mérsékelt éghajlati telet.

Gazdasági szempontból nagy jelentőséggel bírnak a nem-vérszívó nematódák, az *Ostertagia ostertagi* és az *Ostertagia* (*Teladorsagia*) *circumcincta* is (az *O. circumcincta* a legújabb osztályozás szerint *T. circumcincta*, bár ez az új név sem terjedt még el széleskörűen). Az *O. ostertagi*val és *O. circumcincta*val fertőzött marha és birka nem fejlődik jól, kezelés hiányában elpusztulhat, az *Ostertagiosis* az állattenyésztésben problémákat okozó féregfertőzések legnagyobbikának egyike.

További, gazdasági jelentőséggel bíró parazita férgek az

alábbi féregcsaládok körébe tartozó különböző fajok: Trichostrongylus, Nematodirus, Dictyocaulus, Cooperia, Ascaris, Dirofilaria, Trichuris, Strongylus, Fasciola, Oesophagostomum, Bunostomum és Metastrongylus. A haszonállatokon kívül a kedvtelésből tartott háziállatok és emberek is megfertőződhetnek, ez nem ritkán végzetes kifejlettel jár, így a féregfertőzések világméretű jelentőséggel bíró problémát okoznak.

A további, jelentőséggel bíró metazoon paraziták körébe tartozik számos ízeltlábú faj, különösen a pókfélék és a rovarok osztályaiba tartozók, főként az ektoparaziták, például a vérszívó (haematophagous) rovarok (például az exopterygota és endopterygota rovarok körébe tartozók), a fémzöld döglegyek (Lucilia) és a kullancsok.

Külön említést érdemelnek ebből a szempontból a következő kullancsfajok: Boophilus spp, Amblyomma spp, Argas spp, Rhipicephalus spp, Hyalomma spp, Ornithodoros spp, Dermacentor spp, Ixodes spp; legyek, különösen a Lucilia spp. és légyálcák, szívó- és csípő legyek például a Stomoxys calcitrans, Oestrus ovis, Hydrotaea irritans, Gasterophilus spp, Simulium spp, Lyperosia irritans, Haematobia spp, Tabanus spp, Chrysomyia spp, Calliphora spp, Phlebotomus spp, Glossina spp, Hypoderma spp, Dermatobia spp és Cochliomyia spp, tetvek, például Haematopius eurysternus, Linognathus vittuli, Solenopotes capillatus, Linognathus ovillus és Menacanthus spp, atkák, például Psoroptes spp, Demodex spp, Sarcoptes spp, Chorioptes spp, Psorergates spp, Dermanyssus spp, Ornithonyssus spp, Otodectes spp és Notoedres spp: bolhák, például Ctenocephalides canis és C. felis; kullancsok, például Melophagus ovinus és poloskák,

például *Cimex* spp.

Parazita hatásaikon túlmenően a vérszívó rovarok közül számos gyógyászati és állatgyógyászati szempontból is jelentőséggel bír különböző patogének, például patogén protozoák vagy vírusok átvitele szempontjából. Az állattenyésztőket év mint év jelentős veszteség éri a vérszívó ízeltlábúak és az általuk közvetített betegségek következtében.

A legelőn nevelt állatállomány féreg- és ízeltlábú parazitáinak szabályozása jelenleg elsősorban anthelmintikumok, endektozidok és/vagy inszekticidok alkalmazásán, és ezzel együttesen legelő-kezelésen alapszik. Ezek az eljárások gyakran nem kielégítőek, részben annak folytán, hogy a gyógyszert gyakran kell használni, részben, mivel egyre elterjedtebb az anthelmintikumok és ízeltlábúak elleni hatóanyagok iránti rezisztencia, továbbá, mivel a megfelelő legelő-kezelés bizonyos gazdaságokban gyakran nem lehetséges, és ahol lehetséges, ott is gátat szab a hozzáférhető legelőterület legjobb kihasználásának.

Kísérleteket tettek háziállatok parazitáinak immunológiai módon való szabályozására. Kevés kivétellel (például a marha tüdőféreg, *Dictyocaulus viviparus*) ez nem bizonyult lehetségesnek, és napjainkban nem létezik kereskedelmi forgalomban beszerezhető vakcina a kérődzők gasztrointesztinális nematódái, például a *Haemonchus* és az *Ostertagia*, valamint a fő ízeltlábú paraziták ellen.

Az utóbbi években azonban megjelent néhány közlemény, amelyekben *Haemonchus*ból izolált új fehérjéket ismertetnek, amely fehérjék nemcsak *Haemonchus* ellen lehetséges védő antigének, hanem a háziállatok ezzel rokon endoparazitáinak egy köre ellen

is [ismertetésük az Emery és Wagland, Parasitology Today 7 347-349 (1991) szakirodalmi helyen szerepel].

A contortint, amely a *Haemonchus contortus* bélsejtjeinek luminális felületével kapcsolatos csavarvonalas polimer extracelluláris fehérje, elsőként Munn [Tissue and Cell, 9, 23-34 (1977)] írta le, és azt ismertette, hogy ha a nyers extraktumot nagy dózisban (néhány mg mennyiségben) adagolják, ez védelmet nyújt bárányoknak haemonchosissal szemben [Munn, Parasitology 94, 385-397 (1987)]. A beinjektált készítmény nagy dózisa és szennyezettsége folytán nem volt egyértelmű, hogy ezekben a vizsgálatokban a védelem valóban a contortinnak magának vagy más, a vakcina szennyezőiként jelenlévő antigéneknek köszönhető-e. További vizsgálatok mutatták ki, hogy az ilyen contortin készítményekkel immunizált birkákban antitestek vannak jelen H110D bél membrán protein dublett ellen. A későbbiekben kimutatták, hogy nagy tisztaságú H110D kis dózisaival immunizált birkák (néhány 100 µg-mal) lényegében védettek voltak haemonchosissal szemben [Munn, WO88/00835 közzétételi számú PCT szabadalmi leírás, és Munn és Smith, WO90/11086 közzétételi számú szabadalmi leírás]. Napjainkban a H110D tűnik a legígéretesebb vakcinának *Haemonchus* ellen. Felismertek egy harmadik *Haemonchus* bél membrán fehérjét is, amely védő antigén tulajdonságokkal bír, ennek elnevezése H45 [Munn és Smith, WO90/11086 közzétételi számú PCT szabadalmi leírás].

A szakirodalomban kevésbé sikeres kísérletekről is beszámolnak védő antigének kimutatására *Haemonchus*ban és más féregfajokban. Így például kifejezett *Haemonchus*ból izoláltak egy 45 kD membrán glikoproteint, amely a fenti parazitával fertőzött

tengerimalacokban immunogénként alkalmazva a férgek számát tekintve 50 %-os védettséget eredményezett (Sharp, Wagland és Cobon, W092/13889). Ezt a hatást birkákban nem írták le. Nem jelölték meg ennek az antigénnek a féregben való természetes elhelyezkedését, és nincs arra vonatkozó utalás, hogy ez egy luminális bél felületi protein lenne. Jóval szennyezettebb (nyers) Haemonchus membrán extraktum frakciókat - amelyek szinte biztosan tartalmaztak H110D-t - alkalmaztak birkákon, a peték és férgek számának 88 és 75 %-ig terjedő mértékű csökkenéséről számoltak be, de nem adtak információt az egyes csoportok méretét, illetve a birkák közötti variációt tekintve. A Haemonchus contortus természetes körülmények között nem élőszkodik tengerimalacon. Ahelyett, hogy néhány hétig tartózkodnának a tengerimalacon, amint az a természetes gazdaállat, a birka esetén előfordul, a tengerimalac Haemonchus fertőzése jelentősen lerövidül, szinte minden féreg kiürül a fertőzést követő 5. és 7. nap között, mielőtt a kifejlett állapotot elérné [Wagland, Abeydeera, Rothwell és Ouwerkerk, International Journal for Parasitology 19, 301-305 (1989)]. A W092/13889 közzétételi számú szabadalmi leírásban ismertetett tengerimalac modell esetén az állatokat a fertőzést követő 5. vagy 6. napon leülték, így a vakcinált és a kontroll állatok között jelentkező bármely különbség csak a kiürülési jelenség 1 vagy 2 napos felgyorsulását tükrözi. Ez az igen kis eltérés különbözik a találmány szerint birkákon kapott eredményektől (lásd még a W088/00835 és a W090/11086 közzétételi számú, az előzőekben említett szabadalmi leírásokban), és kétséges teszi ennek a laboratóriumi állatmodellnek ebben az összefüggésben való értékét. Ezt a kétséget

hangsúlyosabbá teszik a leírás későbbi részében következő kísérletek, amelyekben azt találtuk, hogy *Haemonchus* membrán extraktum búzacsíra lektint kötő frakciója erős védőhatással bírt birkáknál, míg egy lényegében hasonló készítményt a W092/13889 közzétételi számú szabadalmi leírásban tengerimalac modellen működésképtelennek írtak le.

A W089/00163 közzétételi számú szabadalmi leírásban egy 41kD proteint kódoló gén klónozását és expresszióját írták le *Trichostrongylus colubriformis*ből, amely ugyanannak a taxonómiai családnak tagja, mint a *Haemonchus*, és birkák vékonybelében élősködő parazita. A proteint nem jellemezték, és míg a gént kifejező rekombináns organizmusból származó proteinnel vakcinált birkákról azt írták le, hogy kontroll birkákhoz képest *Haemonchus* provokációt követően csökkent pete- és féregszámot mutattak, ez a csökkenés statisztikailag nem volt szignifikáns, és ha csak nem fejlesztik, a nyújtott védelem mértéke széleskörű felhasználást tekintve nem kielégítően hasznos.

A közelmúltban egy vízoldható cisztein proteázt izoláltak *Haemonchus contortus*ből, és az ezt kifejező gént klónozták és kifejezték [Cox, Pratt, Hageman és Boisvenue, *Molecular and Biochemical Parasitology* 41, 25-34 (1990)]. Ennek a proteáznak a molekulatömege redukáló körülmények mellett végzett SDS-PAGE (nátrium-dodecil-szulfátot tartalmazó poliakrilamid gélen végzett elektroforézis) szerint 35 kD, bár azonosítottak egy 37 kD molekulatömegű erősebben glikozilált változatot is. Feltételezték, hogy ez a proteáz, amely állítólag a fibrinogént bontja, megakadályozza, hogy a gazdaállat vére a *Haemonchus* táplálkozása idején megalvadjon, feltehetőleg egyaránt fokozva

ezzel a táplálék-vér fogyasztását és emésztését. Azt állították, hogy a natív cisztein proteázban dúsult frakció néhány 100 µg-jával ismételtén injektált birkák védettek voltak Haemonchussal szemben, mivel 2500 Haemonchus lárvával való provokálást követően székletük peteszáma és féregszám-terhelésük kisebb volt, mint a kontroll birkáké [Boisvenue, Stiff, Tonkinson, Cox és Hageman; Proceedings of the VIIth International Congress of Parasitology, 1990, 475. oldal]. Ezen vizsgálatok részletei - amelyeket a 408 339 és a 487 181. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban tettek közzé - felfedik, hogy a vakcinált és a kontroll csoportok féreg és peteszámában jelentkező aktuális különbségek minimálisak voltak, statisztikailag nem voltak szignifikánsak.

Egy 44 kD-os proteázt tisztítottak harmadik lárvaállapotú Haemonchus vedlést elősegítő folyadékából [Gamble, Purcell és Fetterer, Molecular and Biochemical Parasitology 33, 49-58 (1989)]. Ezt a proteázt, amelyet metalloproteázként határoztak meg, a pepsztatin nem gátolta, a proteáz vedlést közvetít, védő funkcióját nem vizsgálták. Maki és Yanagisawawa [Journal of Helminthology, 60, 31-37 (1986)] karboxil (aszpartil) és tiol proteáz aktivitásokat írtak le kifejlett Schistosoma mansoni, Dirofilaria immitis, Angiostrongylus cantonensis és Ascaris suum esetén. Azonban nem frakcionálták ezt az aktivitást kifejtő anyagot, nem határozták meg molekulatömegét, és nem tettek kísérletet annak meghatározására, hogy ez egy lehetséges védő antigén lehetne-e.

Harmadik lárva állapotú O. circumcincta-ból egy 31 kD-os glikoproteint izoláltak [McGillivery, Young, Riffkin és Adler,

International Journal for Parasitology 19, 473-478 (1989)]. Az ezzel a glikoproteinnel immunizált birkák részben védettek voltak fertőzéssel szemben (W091/01150).

T. colubriformis külső és belső elválasztású nedveiből két alacsony molekulatömegű, egy 11 és egy 17 kD-os proteint izoláltak [Savin és munkatársai, Molecular and Biochemiocal Parasitology 41, 167-176 (1990); Dolpheide és munkatársai, Molecular and Biochemical Parasitology 45, 101-108 (1991)]. Ezeknek az antigéneknek birkák T. colubriformissal való provokálás elleni immunizálására való használata során alacsony és változó mértékű védelmet észleltek (Emery és Wagland, 1991).

Ami az ízeltlábú parazitákat illeti, a szakirodalomban még kevesebb közlemény szerepel vakcinálási javaslatokra vonatkozóan, és ezek is főként marha kullancsaira, különösen a Boophilus microplus kullancsra vonatkoznak. Így Johnson és munkatársai azt a feltételezést javasolták, hogy B. microplus ellen védő antigének lennének találhatóak felnőtt nőstény kullancsok extraktumaiból származó oldható és oldhatatlan frakciókban egyaránt [Johnson és munkatársai, Int. J. Parasitol, 16(1); 27-34 (1986)]. Az azóta megjelent közleményekben javasolták marháknak kullancsok ellen való immunizálását kifejezett kullancsok beléből származó extraktumokból, kullancs lárva extraktumokból és nyálmirigy komponensekből származó kullancs antigének alkalmazásával [lásd például a Willadsen és munkatársai, Int. J. Parasitol 18(2), 183-189 (1989); Wong és munkatársai, Parasite Immunology, 12, 75-83 (1990); Jackson és munkatársai, Parasite Immunology, 12, 141-151 (1990) szakirodalmi helyeken].

Folyamatos igény áll fenn új és javított metazoon parazita elleni vakcinák iránt, különösen olyan vakcinák iránt, amelyek a férgek és/vagy ízeltlábú fajok széles köre ellen hatásosak.

A találmány ezt az igényt kielégítő új antigéneket nyújt metazoon paraziták elleni vakcinák céljára, különösen férgek és más metazoon paraziták által okozott megbetegedések szabályozására szolgáló védő immunogének céljára.

Közelebbről, a találmány alapját az a felismerés képezi, hogy a *H. contortus* bele egy proteolitikusan aktív glikoprotein komplexet tartalmaz, amelyet H-gal-GP-ként neveztünk el (a *Haemonchus galaktóz-tartalmú glikoprotein kifejezés rövidítése-ként), és amely képes állatoknak immunitás nyújtására Haemonchus és rokon paraziták ellen. A H-gal-GP-vel analóg glikoprotein komplexeket, amelyeket Oo-gal-GP és Oc-gal-GP rövidítéssel jelölünk, izoláltunk Ostertagia ostertagi és Ostertagia circumcincta extraktumokból, hasonló proteolitikus aktivitást figyeltünk meg más férgekben, például Trichostrongylusban. Az ilyen komplexek a membránból, amelynek integráns részei, felszabadítva, például detergenssek, így például Triton X-100 alkalmazásával, újak, és féreg-fertőzések elleni vakcinák gyártására alkalmazhatók. A férgekben jelenlévő enzimek megfigyelhetők más metazoon parazitákban, például a fémzöld döglégyben is.*

Egy további szempontját tekintve a találmány egy védő metazoon parazita antigént vagy antigén fragmentumot, komponenst vagy egy prekursorát és funkciósan ekvivalens származékát, analógját vagy variánsát nyújtja, amely védő antigén aktivitással bír egy vagy több metazoon parazitával szemben, erre az antigénre az jellemző, hogy

- a) proteolitikus aktivitással bír;
- b) natív formájában a parazita belének bél kefeszegélyében jelenlévő integráns membrán protein vagy protein komplex;
- c) pepsztatin kötésére képes; és
- d) búzacsíra lektin és  $\beta$ -kötésű N-acetil-galaktózamin specifikus lektinek kötésére képes.

A találmány tárgya továbbá védő antigének és antigén fragmentumok, komponensek vagy prekursoraik és funkciósan ekvivalens származékaik, analógjaik vagy variánsaik alkalmazása metazoon paraziták elleni immunválasz stimulálására emberben vagy nem-emberben, előnyösen emlősben, különösen előnyösen kérődzőben, állatban.

A kérdéses antigén prekuzora lehet egy nagyobb protein, amelyet például proteolízissel feldolgozva nyerjük magát az antigént. Az ilyen prekuzorok lehetnek zimogén formájúak, azaz az enzim inaktív prekuzorai, aktiválhatók proteolitikus hasítással, például a pepszin/pepszinogén rendszer analógiájára, vagy lehetnek a véralvadás-kaszkádban érintett jól ismert zimogének.

A találmány szerinti új antigéneket a természetes immunitású állatokból származó szérum nem ismeri fel. Más szóval, ezek az antigének normálisan, natív formájukban nem hozzáférhetőek a fertőzött gazdaállat immunrendszere számára, így "titkos", "rejtett" antigének.

Ami a találmány szerinti új antigének lektinkötő tulajdonosságát illeti, a Con A-hoz, a borsó és a Lotus lektinekhez való kötődés, amely megállapítást nyert, mannóz és/vagy fukóz egységek jelenlétét jelzi. Az, hogy ezek az antigének nem kötődnek

Datura és Bandeiraea lektinekhez, azt jelzi, hogy nem tartalmaznak N-acetil-glükózamin-tartalmú szerkezeteket, de, mint azt az előzőekben említettük, az N-acetil-galaktózamin fajlagos lektinekhez, különösen a  $\beta$ -kötésű N-acetil-galaktózamin fajlagos lektinekhez való kötődés hangsúlyozott, különösen a földimogyoró és a jakalin lektinekhez való kötődés.

Ami a proteolitikus aktivitást illeti, míg ez általános proteáz szubsztrátok, például azokollagén, azokazein, hemoglobin és zselatin alkalmazásával kimutatható, több fajlagos aktivitás is észlelhető volt, legjelentősebb azonban az aszpartil-proteináz-szerű és a neutrális-endopeptidáz-szerű aktivitás. Így például mind a H-, mind az O-gal-GP készítményekben, mind a férgekben, például a Trichostrongylusban kimutattunk aszpartil-proteináz-szerű aktivitást. A találmány szerinti antigéneket tartalmazó extraktumok tartalmazznak neutrális endopeptidáz-szerű aktivitást. Továbbá, ami a H-gal-GP fajlagos antigént illeti, a H-gal-GP-t kódoló cDNS klón előzetes nukleotid szekvencia adatai jelentős homológiát mutatnak az ismert neutrális endopeptidáz enzimekkel.

Igy - különböző szempontokból tekintve - a találmány egy védő metazoon parazita antigént vagy antigén fragmentumot, komponenst vagy ezek prekursorát és funkciósan ekvivalens származékaikat, analógjaikat vagy variánsaikat biztosítja, amelyek védő antigén aktivitással bírnak egy vagy több metazoon parazitával szemben, erre az antigénre az jellemző, hogy aszpartil-proteináz-szerű és/vagy neutrális-endopeptidáz-szerű aktivitással bír, és natív formájában integráns membrán protein vagy protein komplex.

A találmány szerinti antigének egy további fő jellemzője, hogy pepsztatinhoz kötődnek. A pepsztatin jól ismert aszpartil-proteáz inhibitor, és kisebb mértékben azt is kimutatták róla, hogy membrán metallo-endopeptidázokhoz, köztük neutrális endopeptidázhoz kötődnek.

Azt találtuk, hogy a Haemonchus, Ostertagia és Trichostrongylus proteolitikus aktivitását pepsztatin gátolja. A találmány további szempontja ennek megfelelően védő metazoon parazita antigének vagy antigén fragmentumok, ezek komponensei vagy prekursorai, és funkciósan ekvivalens származékai, analógjai vagy variánsai, amelyek egy vagy több metazoon parazita ellen védő antigén aktivitással bírnak, amely antigénre az jellemző, hogy pepsztatinhoz való kötődésre képes, és amely natív formájában integráns membrán protein vagy protein komplex.

Izoelektromos fókuszálással a találmány szerinti glikoprotein antigének izoelektromos pontját (pI) pH 2 és 7,5 közöttinek találtuk.

A találmány szerinti antigéneket poliakrilamid gél elektroforézissel (PAGE) vizsgáltuk. Ezek a vizsgálatok eltérő viselkedést mutattak redukáló és nem-redukáló gélek alkalmazásakor. Különösen a nem-redukáló géleken megjelenő nagyobb sávok hasadnak szét kisebb sávokká redukáló körülmények mellett történő ismételt elektroforéziskor. Amint azt a későbbiekben részletesebben ismertetjük, a proteolitikus és védő antigén aktivitás egyedi vagy összetett sávok proteinjének tulajdonítható, bár bizonyos sávok "aktívabbak" lehetnek a többinél. Lehetséges, hogy a találmány szerinti antigének multimer enzim komplexek.

A H-gal-GP antigén PAGE vizsgálatának eredményeit az 1.

példában írjuk le részletesen. Ennek megfelelően a találmány szerinti antigének (és fragmentumaik vagy komponenseik) egy előnyös szűkebb körét alkotják az 1. példában leírtak, valamint ezek funkciósan ekvivalens származékai, analógjai és variánsai, beleértve a más nemzetségekből vagy fajokból származó analógokat is. Így a találmány szerinti antigének előnyös köre felöleli a Haemonchus-ból és más metazoon parazitákból izolálható, SDS-PAGE elemzéssel az 1. táblázatban bemutatott molekulatömegű antigéneket.

A H-gal-GP antigén esetében a védő antigén aktivitás bizonyos protein-sáv komponensekkel bizonyult kapcsolatosnak, különösen azokkal, amelyeket részletesebben a 7. példa 5. vizsgálatában ismertetünk.

Így a találmány tárgyát képezi továbbá egy védő metazoon parazita antigén vagy antigén fragmentumok, komponensek vagy prekursoraik, és funkciósan ekvivalens származékaik, analógjaik vagy variánsaik, amelyek egy vagy több metazoon parazita ellen védő antigén aktivitással bírnak, amely antigén a Haemonchus sp. beléből nyerhető integráns membrán protein vagy protein komplex vagy annak része, és amelynek molekulatömege SDS-PAGE (nátrium--dodecil-szulfátos gélen végrehajtott poliakrilamid gél elektroforézis) révén 5 %-os gélen, nem redukáló körülmények között meghatározva mintegy 190 - 205 kD, és SDS-PAGE révén 10 %-os gélen nem-redukáló körülmények között meghatározva mintegy 35 vagy 45 - 50 kD.

A találmány körén belül különös érdeklődésre számotartó metazoon paraziták körébe különösen a férgek és az ízeltlábú paraziták tartoznak, az utóbbiak esetén főként a vérszívó rovar

paraziták, marhák kullancsai és légylárvá-betegséget okozó legyek. Az ilyen férgek és ízeltlábú paraziták példáulként többek között az előzőekben felsorolt különféle fajokat említhetjük.

A "védő antigén" megjelölésen az olyan antigéneket értjük, amelyek egy a gazdaszervezetet védő, azaz immunogén immunválasz kiváltására képesek, azaz a gazdaszervezetnek egy olyan válaszára, amely immun-hatású molekulák, antitestek vagy sejtek létrejöttére vezetnek, amelyek gátolják vagy előlik a parazitákat, és ezáltal "védik" a gazdaszervezetet vagy a gazdafajokat a klinikai vagy szubklinikai kóroktól és termékenységük elveszésétől. Az ilyen védő immunválasz közönségesen antitestek képződésével valósulhat meg, amely antitestek képesek a parazita metabolikus funkcióinak gátlására, annak elsatnyulására, petetermelésének hiányára és/vagy pusztulására vezetnek.

Bizonyos metazoon paraziták esetén, nevezetesen férgek és olyan ektoparaziták esetén, amelyek obligát táplálkozók, például tetvek és atkák, vagy olyanok esetén, amelyek a gazdaszervezeten egy bizonyos időtartamon át táplálkoznak, például fémzöld döglegyek, böglyök, bivaly-legyek és kullancsok, a gazdaállatot védő immunválasz ezeknek a parazitáknak a pusztulását, legyengülését és/vagy a fertőzött állatból való kiűzését eredményezi. Más szóval, a fertőzött állat parazita terhelése csökken, és a fertőzött állat önmaga közvetlenül élvezi hasznát saját immunválaszának. Más esetekben azonban "epidemiológiai" hatás figyelhető meg, amelynek során a gazdaszervezet nem feltétlenül maga élvezi saját immunválaszának hasznát. Például egy adott terület parazitáinak populációja csökkenhet és/vagy legyengülhet annak következtében, hogy immunizált gazdaszervezeten táplálko-

zik, ez a gazdaszervezetek későbbi csordáinak/nyájainak védelmét szolgálja. Az immunizálás több szezonon át való folyamatos fenntartása a parazita kórok által való fenyegetettség csökkenéséhez vezet. Ez különösen igaz ízeltlábú ektoparaziták, például kullancsok és legyek esetén, amelyek a gazdaállaton való táplálkozás után gyorsan távoznak. Ily módon a paraziták által elfogyasztott antitestek azt követően fejthetik ki hatásukat a parazitára, miután az a gazdaállatot elhagyta, és ezek a parazita elpusztítják, legyengítik vagy megtermékenyítésüket csökkentik, így a gazdaállatok más csoportját védik.

Amint azt a későbbiekben részletesen ismertetjük, a találmány szerinti antigének védő, immunogén aktivitását mutattuk ki. Továbbá, kimutattuk, hogy ez a védő aktivitás fennmarad, ha az antigéneket denaturáljuk, például disszociálás és/vagy redukálás révén. Valójában, amint azt az előzőekben említettük, a Haemonchus antigén komplex bizonyos komponensei bizonyultak különösen védő hatásúnak.

Más szempontból tekintve, a találmány tárgya egy vagy több metazoon parazita ellen védő antigén aktivitással bíró, az előzőekben meghatározott találmány szerinti metazoon parazita antigén, komponensei, fragmentumai, prekurzorai és funkciósan ekvivalens származékai, analógjai vagy variánsai alkalmazása olyan vakcina kompozíció előállítására, amely emberben vagy nem-emberben, előnyösen emlősben, különösen előnyösen kérődző állatban metazoon paraziták elleni immunválasz kiváltására szolgál.

A találmány tárgyát képezi egy metazoon paraziták ellen emberben vagy nem-emberben, előnyösen emlős állatban immunválasz

kiváltására képes vakcina kompozíció, amely egy vagy több előzőekben leírt antigént vagy komponensét, fragmentumát, prekursorát, funkciósan ekvivalens származékát, analógját vagy variánsát tartalmazza, amely egy vagy több metazoon parazita elleni védő antigén aktivitással bír, a kompozíció tartalmaz még gyógyászati szempontból elfogadható hordozó- vagy hígítóanyagot, továbbá a találmány tárgyát képezi egy eljárás metazoon paraziták elleni immunválasz fokozására emberben vagy nem-emberben, előnyösen emlős állatban, amely eljárás abban áll, hogy az említett állatnak az előzőekben ismertetett vakcina kompozíciót adjuk be.

Amint azt az előzőekben leírtuk, a találmány oltalmi körébe tartoznak az új glikoprotein antigének funkciósan ekvivalens származékai, analógjai és variánsai. A "funkciósan ekvivalens" megjelölésen a natív enzim proteinekből származó vagy azzal rokon proteint értünk, amelyeknek aminosav szekvenciája egy vagy több aminosav helyettesítéssel, hozzáadással és/vagy kiiktatással módosított, továbbá olyan szekvenciákat, amelyek aminosavjai kémiaiilag módosítottak, beleértve ebbe a deglikozilálást és glikozilálást, és amely proteinek ezen változások ellenére védő antigén aktivitásukat megőrzik, például képesek a gazdaszervezetet védő antitestek és/vagy funkciós immunitás kiváltására a parazitákkal szemben. Az ilyen funkciósan ekvivalens variánsok előfordulhatnak természetes biológiai variánsokként vagy ismert eljárásokkal előállított formában. Például funkciósan ekvivalens rekombináns proteinek előállíthatók nukleinsavak ismert enzimes hasításával és/vagy ligálásával, hely-specifikus mutációval vagy random mutációval. Amint azt az

alábbi példákban részletesen bemutatjuk, a H-gal-GP és az O-gal-GP analóg antigén komplexekre való hivatkozással, az ilyen funkciósan ekvivalens analógok különböző parazita fajokban előfordulhatnak.

A találmány szerinti antigének egy sor metazoon parazita fajból kinyerhetők, ezek közé tartoznak például a *Haemonchus*, *Ostertagia* és *Trichostrongylus* nematódák. (A kétségek kizárása érdekében, az "Ostertagia" kifejezésbe, amint azt a leírásban használjuk, a *Teladorsagia* sp. is beletartozik). Előnyösek azok az antigének, az úgynevezett "széles spektrumú" antigének, amelyek a gazdaszervezetben azon parazita elleni védő immunválasz kiváltásán túlmenően, amelyből izolálás révén származnak, más paraziták széles köre elleni védő immunválasz kiváltására is képesek. Így például a H-gal-GP *Haemonchus* glikoprotein komplex védelmet nyújt az *Ostertagia* nematódák különböző fajaival szemben is, és ez fordítottn is fennáll.

Amint azt az előzőekben említettük, az egyik mód, amelynek révén a találmány szerinti antigének védő hatásukat a gazdaszervezetre kifejtik, abban áll, hogy olyan gátló antitestek létrejöttét váltják ki, amelyek gátolják a parazita szaporodását, fennmaradását és/vagy kifejlődését. A találmány egy további körét képezik az ilyen antitestek és antigén-kötő fragmentumaik (például az  $F(ab)_2$ , Fab és Fv fragmentumok, azaz az antitest "variábilis" régiójának fragmentumai, amelyek az antigén-kötő helyet foglalják magukban), ezek lehetnek mono- vagy poliklonálisak, továbbá a találmány körébe tartoznak az ezeket tartalmazó vakcina kompozíciók, és gazdaszervezetek paraziták elleni immunizálására szolgáló vakcina kompozíciók előállítására

való alkalmazásuk. Az ilyen gátló antitestek kifejleszthetők idiotípusos antitestek alkalmazásával. Anti-idiotípusos antitestek használhatók vakcinákban immunogénekként.

A találmány szerinti antigének előállíthatók parazitákból, például férgekől való extrahálással is szokásos biokémiai és sebészeti eljárások, például homogenizálás alkalmazásával, amelyhez az egész parazitát vagy csak annak belét alkalmazzuk, majd ezt követően a kívánt enzimnek szokásos tisztítási eljárásokkal, például centrifugálással, szelektív kicsapással, kromatografálással vagy hasonló eljárásokkal való izolálásával. Egy előnyös eljárásban hasznosítjuk azt a tényt, hogy a célmolekulák sajátos szelektív kötődési aktivitással bírnak, ennek megfelelően olyan affinitás-kromatográfiás rendszert alkalmazunk, amelyben a sajátos ligandumok szilárdfázisú mátrixon rögzítettek.

A fentieknek megfelelően a találmány körébe tartozik egy ember vagy nem-ember, előnyösen emlős állat metazoon parazita fertőzése elleni immunizálására szolgáló vakcina előállítására szolgáló eljárás, amely eljárás abban áll, hogy a legalább egy előzőekben meghatározott védő antigént tartalmazó említett parazitából extraktumot készítünk, ebből az antigént az antigénre fajlagos sajátos kötő-párt tartalmazó immobilizált (rögzített) fázison való kötéssel tisztítjuk, majd az antigént az immobilizált fázisról eluáljuk. A megfelelő fajlagos kötő-párok körébe tartoznak szubsztrát analógok, például a pepsztatin inhibitor, valamint oligoszacharid fajlagos lektinek, például azok, amelyek fajlagosan kötődnek galaktózhoz, különösen  $\beta$ -kötésű N-acetil-galaktózaminhoz.

Tény, hogy vizsgálataink azt mutatták, hogy bizonyos lektinek különösen alkalmas ligandumok affinitás-kromatográfiás eljárásban az olyan glikoproteinek azonosítására, amelyek védő antigén hatással bírnak parazita bél luminális felületén.

Így a találmány tárgyát képezi egy olyan eljárás is, amely parazitában lévő védő antigének azonosítására szolgál, ez az eljárás abban áll, hogy a parazita integráns membrán frakcióját affinitás-kromatográfiás eljárásnak tesszük ki olyan immobilizált fázis alkalmazásával, amely egy vagy több N-acetil-galaktózamin fajlagos lektint hordoz.

Ilyen lektinek előnyösen a földimogyoró vagy a jakalin lektin, vagy más olyan lektinek, amelyek  $\beta$ -kötésű N-acetil-galaktózaminra fajlagosak.

A parazita integráns membrán frakciója könnyen elkészíthető szakember számára jól ismert eljárások, például detergens extrahálás, például Triton X-100 alkalmazásával végzett detergens extrahálás végrehajtásával.

Az affinitás-kromatográfiás eljárások ugyancsak jól ismertek szakember számára, ezek az eljárások szakaszos és oszlop-rendszerű megoldásokat foglalnak magukban. A lektinek számos különböző szilárd fázishoz köthetők, például gélekhez, így például agaróz vagy sepharose gélhez. A földimogyoró vagy jakalin lektineket hordozó agaróz gyöngyök kereskedelmi forgalomban beszerezhetők (Vector Laboratories).

Más eljárás szerint az antigének előállíthatók rekombináns DNS eljárással szokásos megoldások, például a Sambrook és munkatársai [Molecular Cloning, a laboratory manual 2. kiadás, (1989), Cold Spring Harbor Press] által leírt eljárás alkalmazá-

sával.

A találmány további tárgyát képezik a találmány szerinti antigéneket kódoló nukleotid szekvenciát magukban foglaló nukleinsav molekulák.

Előzetes szekvencia vizsgálatokat végeztünk a H-gal-GP antigénnek megfelelő klónok vizsgálatára. Egy ilyen klón, a HG3 jelölésű, szekvenciáját mutatjuk be a 33. ábrán (szekvencia azonosítási szám: 1). Ez a szekvencia jelentős homológiát mutat ismert emlős neutrális endopeptidáz enzim szekvenciákkal, amint az a 34. ábrán bemutatott aminosav sorrendből látható (szekvencia azonosítási szám: 2).

Ennek megfelelően egy találmány szerinti előnyös nukleinsav molekula egy vagy több olyan nukleotid szekvenciát tartalmaz, amely a 33. ábrán bemutatott (azonosítási szám: 1) nukleotid szekvencia egészének vagy egy részének megfelelő, vagy attól degenerált szekvencia vagy egy azzal lényegében homológ vagy azzal hibridizálható szekvencia.

A találmány szerinti nukleinsav molekulák lehetnek szimpla vagy kettős szálú DNS, cDNS vagy RNS molekulák, előnyösen DNS molekulák, körükbe tartoznak degenerált, lényegében homológ és hibridizálódó szekvenciák, amelyek az érintett antigén vagy antigén fragmentum kódolására képesek. A "lényegében homológ" megjelölésen olyan szekvenciákat értünk, amelyek legalább 60 %, előnyösen legalább 70 % vagy 80 % szekvencia homológiát mutatnak. A találmány körébe tartozó hibridizáló szekvenciák közé tartoznak azok, amelyek nem-sztringens körülmények mellett (6 x SSC/50 % formamid szobahőmérsékleten) kötődnek, és alacsony sztringenciájú körülmények mellett (2 x SSC, szobahőmérsékleten,

még előnyösebben 2 x SSC, 42 °C hőmérsékleten) vagy magasabb sztringenciájú körülmények mellett, például 2 x SSC, 65 °C (ahol SSC = 0,15 mól/liter NaCl, 0,015 mól/liter nátrium-citrát, pH = 7,2) mosódnak, valamint azok, amelyek - ha csak nem degenerált a kód - a fenti körülmények mellett hibridizálódnak.

A találmány szerinti antigénesen aktív antigéneket vagy antigén variánsokat kódolni képes nukleotid szekvencia származékok a szakterületen szokásos módszerekkel nyerhetők.

A találmány szerinti antigének rekombináns formában előállíthatók olyan rekombináns DNS molekulát tartalmazó gazdasejtből való kifejeződéssel, amely egy az előzőekben széleskörűen meghatározott nukleotid szekvenciát tartalmaz operatíván egy expressziós kontroll szekvenciához kapcsolva, vagy olyan gazdasejtben való kifejeződés révén, amely egy ilyen rekombináns DNS molekulát tartalmazó vektort vagy DNS klónozó hordozót tartalmaz. Az ilyen módon kifejeződött szintetikus polipeptidek a találmány egy további tárgyát képezik (a "polipeptid" megjelölésen mind a teljes hosszúságú proteint, mind a rövidebb peptid szekvenciákat értjük).

Az így kifejeződött antigén lehet egy olyan fúziós polipeptid, amely egy a találmány szerinti antigén egészét vagy egy részét tartalmazza, továbbá tartalmaz ehhez kapcsoltnan egy olyan további polipeptidet, amelyet a vele fuzionált rekombináns molekula DNS-e kódolt. Ez lehet például  $\beta$ -galaktozidáz, glutation-S-transzferáz, hepatitis mag antigén vagy bármely más olyan polipeptid, amelyet szokásosan alkalmaznak a fúziós proteinek szakterületén.

Egy további szempontját tekintve a találmány magában fog-

lalja a találmány szerinti antigént kódoló DNS-t tartalmazó klónozó és kifejező vektorokat, valamint a találmány szerinti rekombináns nukleinsav molekulák készítésére szolgáló eljárásokat, amelyek magukban foglalják az antigént kódoló nukleotid szekvenciák vektor nukleinsavba, például vektor DNS-ba való inszertálását. Az ilyen expressziós vektorok megfelelő kontroll szekvenciákat tartalmaznak, például transzlációs (például start és stop kodonokat, riboszóma kötő helyeket) és transzkripciós kontroll elemeket (például promoter-operátor régiókat, terminációs stop szekvenciákat), a találmány szerinti nukleinsav molekulákkal illesztett leolvasási keretbe kötve.

A találmány szerinti vektorok körébe tartozhatnak plazmidok és vírusok (ezen belül mind bakteriofág, mind eukarióta vírusok), amelyek a szakterületen jól ismertek és leírtak, és számos különböző, a szakterületen ugyancsak jól ismert expressziós rendszerben fejeződhetnek ki. A megfelelő vírus vektorok körébe tartoznak baculovírusok és adenovírusok, továbbá vakcinia vírusok is. Ezeken kívül számos további vírus vektort írnak le a szakirodalomban.

Számos olyan eljárás ismert, amelyekkel a kifejeződés megvalósítására az ilyen vektorok prokarióta vagy eukarióta sejtekbe bevihetők, vagy csíra vonalakba vihetők be vagy szomatikus sejtekbe vihetők transzgénes állatok létrehozására. A megfelelő transzformációs és transzfekciós eljárások a szakirodalomból jól ismertek.

A találmány körébe tartoznak transzformált vagy transzfektált prokarióta vagy eukarióta gazdasejtek vagy a találmány szerinti, az előzőekben leírt nukleinsav molekulákat tartalmazó

transzgénes állatok is. A transzgénes sejtek körébe tartoznak például prokarióta sejtek, például *E. coli*, eukarióta sejtek, például élesztők vagy baculovírus-rovar sejtrendszerek, transzformált emlős-sejtek és transzgénes állatok és növények. Különös említést érdemelnek a transzgénes nematódák [a Fire, EMBO J., 5, 2673 (1986) szakirodalmi helyen például a *Caenorhabditis* nematóda transzgénes rendszerének megvitatása szerepel].

Egy további szempontját tekintve a találmány eljárást nyújt a találmány szerinti, az előzőekben ismertetett antigén előállítására, amely abban áll, hogy az antigén egészét vagy egy részét kódoló nukleinsav molekulát tartalmazó gazdasejtet olyan körülmények között tenyésztjük, amelyek mellett az antigén kifejeződik, és az így termelt antigént kinyerjük.

A találmány szerinti antigének és funkciós ekvivalens antigén variánsok előállíthatók kémiai úton is, például a jól ismert Merrifield szilárdfázisú szintetikus eljárással.

A találmány egy további körét alkotják az előzőekben leírt új antigének vízoldható származékai. Az ilyen oldható formák proteolitikus emésztéssel nyerhetők, például elasztáz enzim alkalmazásával. Általában az antigének enzimes emésztése két frakciót eredményez, egy detergensben oldható frakciót (amely a membránban marad), és egy vízoldható frakciót.

A találmány szerint egy vakcina készítmény is előállítható a vakcinagyártásban jól ismert módszerek alkalmazásával. A szokásos vakcina készítmények egy vagy több találmány szerinti antigént vagy antitestet tartalmazhatnak kívánt esetben egy vagy több megfelelő segédanyaggal, például alumínium-hidroxiddal, szaponinnal, quil A-val vagy tisztítottabb formáival együtt,

muramil dipeptiddel, ásványolajjal vagy növényi olajokkal, Novasomákkal vagy nemionos blokk-kopolimerekkel vagy DEAE dextránnal együtt, egy vagy több gyógyászati szempontból elfogadható hordozóanyag vagy hígítószer jelenlétében. A megfelelő hordozóanyagok körébe tartoznak például folyékony közegek, így olyan sóoldatok, amelyek alkalmasak a peptidek vagy polipeptidek állati vagy emberi szervezetbe való bevitelére szolgáló vivőanyagként. A vakcina készítmények további összetevőket, például tartósítószeret is tartalmazhatnak.

Egy alternatív vakcina készítmény tartalmazhat egy vírus- vagy gazdasejtet, például egy mikroorganizmust (például vakcinia vírust, adenovírust vagy Salmonellát), amely lehet élő, elölt vagy legyengített, és amely egy találmány szerinti nukleinsav molekulát (például DNS molekulát) tartalmaz inszertálva az inszertált nukleinsav molekula által kódolt polipeptid ellen irányuló immunválasz stimulálására.

A vakcina készítmény beadása bármely szokásos úton történhet, például orálisan vagy parenterálisan, így például intramuszkuláris injekció formájában, amely adott esetben több részletben, például két injekció formájában adható egy 7 - 35 napos időszakban.

Az antigének a találmány szerint alkalmazhatók azonos vagy különböző fajú parazitákból származó más védő antigénekkal kombinálva is. Így egy találmány szerinti vakcina készítmény tartalmazhat egy vagy több, az előzőekben meghatározott antigént, például H-gal-GP-t az előzőekben említett H110D és H45 antigénekkal együtt. Az ilyen kombinált vakcina készítmények a különböző antigénekből kisebb mennyiségeket tartalmazhatnak, mint

az egyedi vakcina készítmények, amelyek csak a kérdéses antigént tartalmazzák.

A találmány előnyei hasznosíthatók bármely állat, ezen belül ember esetén is, de előnyös a társ-állatok, különösen kutyák és macskák, továbbá a háziállatok, különösen a kérődzők esetén. Külön kiemeljük a birkákat, marhákat, sertéseket, szarvasokat és kecskéket.

A következőkben a találmányt részletesebben ismertetjük, különösen a H. contortus, O. ostertagi és O. circumcincta eredetű antigénekre hivatkozva, amelyekre rövid formában H-gal-Gp, Oo-gal-GP és Oc-gal-GP megnevezéssel hivatkozunk. Bár a találmány előzőekben leírt általánosabb körét nem kívánjuk korlátozni, megjegyezzük, hogy a H-gal-GP, Oo-gal-GP és Oc-gal-GP és/vagy különböző komponenseik alkalmazása férgek elleni vakcinák készítésére, valamint ezek az antigének és vakcinák magukban a találmány egy különösen előnyös körét képezik.

A H-gal-GP protein a Haemonchus bélsejtek kefehatár burkolatában lévő integráns membrán protein. Ez a protein glikozilált, és lektinekhez szelektíven kötődik, N-acetil-galaktózaminra fajlagos. Olyan proteáz aktivitással bír, amely pepsztinnal, az aszpartil proteázok fajlagos inhibitorával gátolható. Redukáló körülmények mellett SDS-poliakrilamid géleken futtatva nyolc nagyobb sávot ad. Ezért ezt a proteint Haemonchus galaktóz-tartalmú glikoprotein komplexként vagy H-gal-GP-ként nevezzük.

A következőkben a találmányt példákban ismertetjük a korlátozás szándéka nélkül. A példákban hivatkozott ábrák jelentése a következő:

Az 1. ábrán H-gal-GP, H110D és H-45 komplex 10 %-os akrilamid-géleken végzett SDS-PAGE révén kapott sávjainak összehasonlítását adjuk.

Az 1-3., illetve a 4.-6. gélsávokon nem-redukált, illetve redukált mintákat mutatunk be.

Az 1. és 4. gélsávon H11 és H45 komplex elegyben dúsult frakció látható.

A 2. és 5. gélsávokon H45 komplex, míg a 3. és 6. gélsávokon H-gal-GP látható.

Meghatároztuk a 3. gél 47 és 50 kD-os sávjainak N-terminális aminosavszekvenciáját.

A 2. ábrán H-gal-GP SDS-PAGE profilját mutatjuk be 5 %-os géleken nem-redukáló körülmények mellett. A sávok mellett szereplő betűk az 5. birka vizsgálatból kimetszett antigén sávokat jelölik (lásd a 7. példában és a 22. ábrán), amelyek jelentése a következő:

A = a 15. csoport 230 kD-os sávja.

B = a 16. csoport 190-205 kD-os diffúz sávja.

C = a 17. csoport 170 kD-os sávja.

D = a 18. csoport színezékfront sávja.

A 3. ábrán az előzőekben nem-redukáló körülmények mellett elválasztott nagyobb H-gal-GP sávok redukáló körülmények mellett végrehajtott elemzésének eredményét látjuk:

1. gélsáv H-gal-GP

2. gélsáv 230 kD az ezekkel a látszólagos molekulatö-

3. gélsáv 170 kD megekkel bíró sávokat 5 %-os nem-redukáló

4. gélsáv színezék gélből metszettük ki (lásd például a 2. ábrán),

front majd redukáló körülmények mellett újra elektroforézist hajtottunk végre.

Meghatároztuk a 3. gél 45 és 48 kD-os sávjainak N-terminális aminosavszekvenciáját.

A 4. ábrán a H-gal-GP komplex előállítására szolgáló három eljárás folyamatábráját mutatjuk be.

Az 5. ábrán H-gal-GP komplex Mono Q közegen végrehajtott ioncserélő kromatografálása révén kapott frakciókból 10 %-os gélben, redukáló körülmények mellett végrehajtott SDS-PAGE révén kapott sávokat mutatjuk be:

a) Az 5a. ábra olyan elválasztás eredményét mutatja, amelynek kiindulási anyaga előzetesen földimogyoró lektinnel izolált:

- |                   |   |
|-------------------|---|
| 1. gélsáv         | Az oszlopra vitt kiindulási anyag,                |
| 2. gélsáv         | Meg nem kötött frakció                            |
| 3-5. gélsávok     | 140 mmól/l-es nátrium-kloriddal eluálódó frakció, |
| 6. és 7. gélsávok | 400 mmól/l-es nátrium-kloriddal eluálódó frakció; |

b) az 5b. ábra olyan vizsgálat eredményét mutatja, amelynek kiindulási anyaga előzetesen jacalin lektinnel izolált:

- |                   |   |
|-------------------|---|
| 1. gélsáv         | Az oszlopra vitt kiindulási anyag,                |
| 2. gélsáv         | Kötetlen frakció                                  |
| 3.-5. gélsávok    | 140 mmól/l-es nátrium-kloriddal eluálódó frakció, |
| 6. és 7. gélsávok | 400 mmól/l-es nátrium-kloriddal eluálódó frakció, |



mért abszorpció szerepel, a minták jelölése: ▲ H-gal-Gp, ● Oc-Gal-GP, + Oo-gal-GP).

A 9. ábrán a pH optimumot mutatjuk be haemoglobin szubsztrát mellett (az abszcisszán a pH-t, az ordinátán az 562 nm-nél mért abszorpciót ábrázoljuk, a minták jelölése: ● H-gal-Gp, ▲ Oc-Gal-GP, + Oo-gal-GP).

A 10. ábrán a H-gal-GP komplex földimogyoró lektinhez való kötődését mutatjuk be (10 %-os gél, redukáló körülmények):

az 1. gélsávon földimogyoró-lektin oszlopra felvitt Haemonchus S<sub>1</sub> traktuma látható,

a 2.-5. sávokon az oszlopról 0,3 mól/l-es galaktózzal eluált csúcs frakciói láthatók.

A 11. ábrán H-gal-GP komplex jacalin lektinhez való kötődése látható (10 %-os gél, redukáló körülmények):

az 1. gélsávon a jacalin-lektin oszlopra felvitt anyag látható (Haemonchus S<sub>3</sub> egy frakciója, amely búzacsíra lektinhez kötött, majd arról eluált),

a 2. gélsávon a kötetlen, H110D-ben dúsult frakció látható,

a 4-7. gélsávokon az oszlopról 0,8 mól/l-es galaktózzal eluált csúcs frakciói láthatók.

Megjegyzés: a kiindulási anyag egy nagyobb sávja a H110D. Ez nem kötődik jacalinhoz, és ilyen körülmények között éppen megkülönböztethető, mivel némileg kisebb, mint a H-gal-GP 130 kD-os komponense.

A 12. ábrán H-gal-GP szelektív kötődését mutatjuk be pepsztatin agarózhoz (10 %-os gél, nem redukáló körülmények):

1. gélsáv: alacsony (5,5) pH-n pepsztatin agarózra vitt

Haemonchus S3,

2. gélsáv: H110D-ban gazdag kötetlen anyag,

3. gélsáv: pH = 8,5-nél eluált anyag,

4. gélsáv: 1 %-os SDS alkalmazásával pH = 7,4-nél eluált anyag,

5. gélsáv: H-gal-GP (pozitív kontroll).

A 13. ábrán H-gal-GP szelektív kötődését mutatjuk be pepsztatin agarózhoz, és a 47 és 50 kD-os sávok aviditását (immunoblot 10 %-os gélen nem redukáló körülmények között végzett futtatásról, anti H-gal-GP szérummal végzett próba):

1. gélsáv: H110D-ben gazdag kötetlen anyag,

2. gélsáv: pH = 8,5-nél eluált anyag,

3. gélsáv: 1 %-os SDS-szel pH = 7,4-nél eluált anyag,

4. gélsáv: az 1 %-os SDS-es eluálási lépés után még a pepsztatin agarózhoz kötött anyag (amelyet a töltetnek az oszlopból való eltávolítása után SDS-t és DTT-t tartalmazó SDS-PAGE minta-pufferrel való forralással teszünk szabaddá),

5. gélsáv: H-gal-GP (pozitív kontroll).

A 14. ábrán fluoreszcenssel jelzett földimogyoró lektinnel színezett H. contortus kriosztátos metszetét mutatjuk be.

A 15. ábrán fluoreszcenssel jelzett búzacsíra lektinnel színezett H. contortus kriosztátos metszetét mutatjuk be.

A 16. ábrán anti-H-gal-GP szérummal festett H. contortus kriosztátos metszetét mutatjuk be.

A 17. ábrán H-gal-GP-vel immunizált birkából visszanyert H. contortus birka-immunglobulinra fajlagos antiszérummal festett kriosztátos metszetét mutatjuk be.

A 18. ábrán H-gal-GP megoszlását mutatjuk be H. contortus

membránok PBS (S1), Tween (S2) és Triton X-100 (S3) extraktumai-  
ban. A 3., 2. és 1. gélsávok ugyanazon adag féregből egymást  
követően PBS-sel, Tween-nel és Triton X-100-zal készült  
extraktumokat tartalmazzák. A mintákat redukáljuk, 10 %-os gélen  
elektroforézist végzünk, blottoljuk, perjodáttal kezeljük a  
szénhidrát csoportok denaturálására, majd H-gal-GP elleni anti-  
szérummal próbát végzünk.

A 19. ábrán H-gal-GP és H110D kötődését mutatjuk be búza-  
csíra lektinhez (10 %-os gél, redukáló körülmények):

Az 1. gélsávon oszlopra vitt Haemonchus S3 extraktuma  
szerepel,

A 2-8. gélsávokon egymást követően, H110D-ben és H-gal-GP-  
ben dúsult frakciók láthatók, amelyeket 0,5 mól/l-es N-acetil-  
-glükózaminnal eluáltunk a csúcscról.

A 20. ábrán H-gal-GP pepsztatin agarózhoz való kötődését  
mutatjuk be (5 %-os vagy 10 %-os akrilamid gélek, nem-redukáló  
körülmények):

az 1. gélsávon pepsztatin agaróz oszlopra vitt H-gal-GP  
látható,

a 2. gélsávon az oszlopról 1 % SDS-t tartalmazó 10 mmól/l-  
es Trisz-HCl, 50 mmól/l NaCl, pH = 8,0 oldattal deszorbeált  
anyag látható.

A 21. ábrán H-gal-GP hidrolitikus aktivitásának szubsztrát-  
-gél analízise látható, 0,1 % zselatint tartalmazó 7,5 %-os nem  
redukáló akrilamid gél szubsztrátról készült közeli felvétel:

1. gélsáv pepsztatinnal előinkubált H-gal-GP
2. gélsáv kezeletlen H-gal-GP.

A 22. ábrán a birkák védelmére végzett vizsgálatban -

amelyet a 7. példában írunk le - alkalmazott immunogének frakcionálásának folyamatábrája látható.

A 23. ábrán a 7. példa 1. vizsgálatának eredményeit mutatjuk be, a csoportonkénti átlagos bélsár peteszámot mutatjuk be, a minták jelölése: ● Búzacsíra (1), ▲ kontroll (2) [az abszcisszán a fertőzést követően eltelt napok számát, az ordinátán az átlagos peteszám/g (+/- SE) értéket adjuk meg].

A 24. ábrán a 7. példa 2. vizsgálatának eredményeit mutatjuk be, a csoportonkénti átlagos bélsár peteszám értékeket adjuk meg, a minták jelölése: ● H11 nélküli búzacsíra (3), ▲ kötetlen lektin (4), + kontroll (5) [az abszcisszán a fertőzést követően eltelt napok számát, az ordinátán az átlagos peteszám/g (+/- SE) értéket adjuk meg].

A 25. ábrán a 7. példa 3. vizsgálatának eredményeit mutatjuk be, a csoportonkénti átlagos bélsár peteszám értéket adjuk meg, a minták jelölése: ● H110D (6), ▲ földimogyoró (7), + kontroll számát, az ordinátán az átlagos peteszám/g (+/- SE) értéket adjuk meg].

A 26. ábrán a 4. vizsgálat eredményeit mutatjuk be: a csoportonkénti átlagos bélsár peteszám értéket adjuk meg, a minták jelölése: ● natív (9), ▲ kontroll (12), + SDS (10), ◇ SDS+DTT (11) [az abszcisszán a fertőzést követően eltelt napok számát, az ordinátán az átlagos peteszám/g (+/- SE) értéket adjuk meg].

A 27. ábrán a H-gal-GP és az O. circumcincta és O. ostertagi eredetű ekvivalens proteinek közötti hasonlóságokat mutatjuk be. A mintákat 5 %-os nem-redukáló akrilamid géleken elektroforézissel vizsgáljuk, és immobilon membránra blottoljuk. A baloldali blottal biotinezett földimogyoró lektinnel próbát

végzünk, a jobboldalival anti-H-gal-GP szérummal végzünk próbát. A bloton antiszérummal végzett próbát 50 mmól/l-es perjodáttal előinkubáljuk, hogy az esetlegesen keresztreakciót adó szénhidrát epitópokat denaturáljuk. Normál szérummal inkubált kontroll bloton nem észleltünk elszíneződést:

1. gélsáv H-gal-GP
2. gélsáv O. circumcincta-gal-GP
3. gélsáv O. ostertagi-gal-GP

A 28. ábrán O. circumcincta-gal-GP pepsztatin agarózhoz való kötődését mutatjuk be.

Pepsztatinnal, földimogyoró lektinnel vagy Dolichos lektinnel kapcsolt agaróz gyöngyöket tartalmazó csövekbe O. circumcincta-gal-GP azonos mennyiségeit adjuk, és a csöveket 3 órán át 4 °C hőmérsékleten enyhén keverjük. A gyöngyöket ezután kiülepítjük, és a kötetlen felülúszót kinyerjük. A gyöngyöket háromszor mossuk, majd minimális mennyiségű SDS PAGE minta-pufferben forraljuk, ezután kiülepítjük. Az ebből a lépésből származó, az agarózhoz kötött anyagot a kötetlen felülúszóval együtt tartalmazó felülúszót nem-redukáló 5 %-os SDS-PAGE-géleken futtatjuk, immobilon membránra blottoljuk, és biotinezett földimogyoró lektin alkalmazásával próbát végzünk vele.

Az eredmények azt mutatják, hogy az O. circumcincta-gal-GP földimogyoró lektinhez és pepsztatin agarózhoz fajlagosan kötődik, mivel nem kötődik más ligandummal (például dolichos lektinnel) kapcsolt agarózhoz.

1. gélsáv Dolichos kötetlen
2. gélsáv Dolichos kötött
3. gélsáv Földimogyoró kötetlen

4. gélsáv Földimogyoró kötött
5. gélsáv Pepsztatin kötetlen
6. gélsáv Pepsztatin kötött

A 29. ábrán 0. circumcincta integráns membrán proteinjé egy antigén készítményének (amelyet egy következő immunizáló vizsgálatban alkalmazunk) SDS-PAGE profilját mutatjuk be (10 %-os akrilamid gélen, redukáló körülmények mellett):

az 1. gélsávon teljes féregből származó 0. circumcincta membránok Trion X-100-as extraktuma (S3) szerepel,

a 2. gélsávon az S-3 ConA kötő frakciója (amelyet a 8. példa 1. vizsgálatában birkák immunizálására használunk) szerepel,

a 3. gélsávon ConA-hoz nem kötődő S3 frakció szerepel.

A további gélsávok a molekulatömeg markereket mutatják.

A 30. ábrán kontroll és konkavalinA-val (ConA) kötődő 0. circumcincta integráns membrán proteinekkal immunizált bárányok 5000 0. circumcincta lárvával való provokálását követően kapott átlagos bélsár peteszámát mutatjuk be [az abszcisszán a provokálástól eltelt napok számát, az ordinátán a csoport átlagos bélsár peteszámát: átlagos peteszám/g (+/- SE)] mutatjuk be.

A 31. ábrán a 8. példa 1. vizsgálatából származó ConA-val kötődő frakció blotját mutatjuk be (5 %-os akrilamid gél, nem-redukáló körülmények), amelyből Oc-gal-GP jelenléte látható:

az 1. gélsávon 0. circumcincta ConA S3 frakciójának földimogyoró lektinnel adott próbája szerepel,

a 2. gélsávon a molekulatömeg markerek láthatók,

a 3. gélsávon 0. circumcincta ConA S3 frakciójának ConA lektinnel adott próbája szerepel.

A 32. ábrán normál kifejlett O. circumcincta kriosztátos metszetének fluoreszceinnel konjugált földimogyoró lektinnel való fluoreszcens festését mutatjuk be.

A 33. ábrán a HG3 klón nukleotid szekvenciája látható.

A 34. ábrán a HG3 klónból származó aminosavszekvencia és ezzel összevetve humán neutrális aminosavszekvenciája látható. Mindkét szekvencia cDNS-ből leszámaztatott. Az aminosav azonosság mértéke 33 %, a hasonlóság szintje 65 %. A két aminosav összevetését a Wisconsin Egyetem GCG csomagjának BESTFIT programját alkalmazva végeztük.

A 35. ábrán egy southern blot látható, amely a HG11 klónnak különböző metazoon parazitákból származó, és Eco RI-vel emésztett genom DNS-sel való hibridizálódását mutatja. A hibridizálást mérsékelten sztringens körülmények között hajtottuk végre.

1. gélsáv Haemonchus
2. gélsáv Lucilia
3. gélsáv Nematodirus
4. gélsáv Boophilus

### 1. Példa

#### H-gal-GP komplex leírása és biokémiai jellemzői

##### 1) SDS-PAGE profilok

Az erre a vizsgálatra használt H-gal-GP komplexet kifejlett Haemonchus Triton X-100-as extraktumából izoláljuk oly módon (amint azt részleteiben a 2. példában leírjuk, és a 4. ábrán bemutatjuk), hogy földimogyoró lektines affinitás kromatográfiás eljárásnak, kisózási lépésnek, majd anioncserélő kromatográfiás

eljárással Mono Q közeg (Pharmacia) alkalmazásával végzett besűrítésnek tesszük ki. A 100 és 350 mmól/l NaCl között eluálódó frakciókat nyerjük ki. A jellemző hozam a Triton X-100-as extraktum össz-proteintartalmának közelítőleg 2 %-a, ez férgenként mintegy 200 µg proteinnak megfelelő.

Ha a H-gal-GP komplexet 7,5 vagy 10 %-os géleken redukálás nélkül tesszük ki elektroforézisnek, a kapott protein profil egy mintegy 200 kD-os vagy nagyobb molekulatömegű polipeptid csoportból áll egy gyengébben festődő sáv-párral együtt, amely utóbbiak mintegy 47 és 50 kD-osak (lásd az 1. ábra 3. gélsávján). Ha azonban az akrilamid koncentrációt 5 %-ra csökkentjük, a nagy molekulatömegű anyag két fő sávra bomlik, amelyek mintegy 230 és 170 kD-osak (lásd a 2. ábrán). Ezek egy gyengébb 205 kD-os polipeptidet és egy diffúzan festődő területet visznek magukkal (2. ábra). Az első ábra harmadik gélsávjában látható kisebb polipeptidek a színezék fronttal vagy annak közelében futnak felbomlás nélkül.

Redukáló körülmények mellett a nem-frakcionálódott H-gal-GP komplex 10 %-os gélen 8 sávra válik szét. A protein legnagyobb része három, 45 és 50 kD közötti sávra válik szét, de halványabb sávok is láthatók, mintegy 33, 35, 37, 90 és 130 kD-nál (1. ábra, 6. gélsáv).

A nem redukált polipeptidek összetételének további elemzését - amelynek eredményei az 1. táblázatban láthatók - úgy végezzük, hogy a három fő sávot kivágjuk az 5 %-os nem-redukáló gélekből (azaz a 230 kD, 170 kD sávot és a színezékfrontot, például a 2. ábrán látható sávból), és elektromos eluálás és besűrítés után ezeket redukáló körülmények mellett 10 %-os akril-

amidon elektroforézissel további sávokra választjuk (3. ábra). A 170 kD-os sáv egyértelműen két nehezen festődő, mintegy 45 és 48 kD-os komponensre redukálódik (3. ábra, 3. gélsáv). A nagyobb, 230 kD-os sáv komplexebb, mintegy öt alkomponensre válik szét, amelyek molekulatömege mintegy 130, 90, 48, 40 és 33 kD (3. ábra, 2. gélsáv). A "színezékfront" sávok három komponensre bomlottak fel, amelyek molekulatömege mintegy 50, 47 és 35 kD (3. ábra, 4. gélsáv). Ezek közül az első kettőt az 1. ábra 3. gélsávjánál is leírjuk, amelyben a H-gal-GP komplex 7,5 vagy 10 %-os géleken redukálás nélkül való elektroforézisét ismertetjük.

A fenti sávok proteinjének mindegyike a találmány szerinti H-gal-GP komponenseket képviseli.

### 1. Táblázat

#### A H-gal-GP redukált és nem-redukált polipeptidjeinek kD-ban megadott látszólagos molekulatömegei

Nem-redukáló körülmények között végrehajtott elektroforézissel nyert, láthatóvá tett komponensek	Elektromos eluálás és redukáló körülmények között végrehajtott elektroforézis után kapott szétválás
--	---

<u>10 %-os gél</u>	<u>5 %-os gél</u>	<u>10 %-os gél</u>
	(230#	= 130,90,48,40,33
	(	
	(205 )# )	
200-250	= (190-200):# )	nincs adat
	(	
	(170#	= 48*,45*

50\*)

)

## 1. Táblázat

(folytatás)

Nem-redukáló körülmények között végrehajtott elektroforézissel nyert, láthatóvá tett komponensek	Elektromos eluálás és redukáló körülmények között végrehajtott elektroforézis után kapott szétválás
--	---

---

47\*)                      színezékfront# =            50\*, 47\*, 35

)

35 )

\* Ezen polipeptidek N-terminális aminosavszekvenciáját meghatároztuk.

# Ezeket a sávokat immunogéneként megvizsgáltuk birkákban, a 7. példa 5. vizsgálatában leírt módon. Megjegyezzük, hogy a 205 és a 190-200 kD-os polipeptideket elegyítve, egy frakcióként vizsgáltuk.

A fentiekből láthatóan a H-gal-GP legalább 10 különböző komponenst foglal magában, valamint a nem-redukáló körülmények mellett 205 és 190-200 kD-nál látható anyagot.

**2) A négy fent megjelölt sáv N-terminális aminosavszekvenciája.**

Elkészítjük a 3. ábra 3., és az 1. ábra 3. gélsávjának megfelelő géleket, és membránokon (ProBlott - Applied Biosystems) elektroforézissel szétválasztjuk ezeket. Coomassie Blue-val való festést követően az 1. és 3. ábrákon azonosított polipeptid párokat a membránokból kivágjuk, és meghatározzuk N-terminális aminosav összetételüket Applied Biosystems Model 477A peptid szekvenáló berendezésen. Az alábbi szekvenciákat nyerjük:

3. ábra, 3. gélsáv 45 kD: Val-Asp-Asn-Val-Phe-?-Pro-Asn-Val-Gly-Leu (szekvencia azonosítási számok: 3 és 4)

48 kD: Val-Glu-Arg-Thr-Asp-Ala-Arg-Met-Asn (azaz -Glu- vagy -Asn) (szekvencia azonosítási számok: 5 és 6)

1. ábra, 3. gélsáv 47 kD: Val-Phe-Pro-His-Pro-Ile-Tyr-Asp-Tyr-Gln (szekvencia azonosítási szám: 7)

50 kD: Ala-?-Gln-Thr-Val-Phe-Pro-His-Lys (szekvencia azonosítási szám: 8)

A komputeres kutatások nem fedtek fel semmiféle szignifikáns homológiát különféle adatbankokban összegyűjtött szekvenciákkal.

### 3) Ioncserélő kromatográfia

A 0,1 térfogat% Triton X-100-t tartalmazó 10 mmól/l-es, pH = 7,4-es Trisz-HCl pufferben felvett H-gal-GP komplex kötődik az azonos pufferrel egyensúlyba hozott MonoQ ioncserélő közeghez. A H-gal-GP komplex többsége 140 és 400 mmól/l közötti koncentrációjú NaCl eluenssel lejön az oszlopról (5a és 5b. ábra). Ebben a sókoncentráció tartományban nem választhatók szét az alkomponens sávok még akkor sem, ha a sókoncentrációt kis lépésekben növeljük.

### 4) Lektin kötés

a) Natív körülmények mellett

A H-gal-GP komplex Haemonchus membránok Triton X-100-as extraktumából izolálható affinitás kromatográfiás eljárással különböző, szilárd fázishoz, például agaróz gyöngyökhöz kereszt-kötéssel kötött lektinek alkalmazásával (lásd a 10. és 11.

ábrákon, és a 2. példában).

A natív H-gal-GP komplex bizonyos lektinek iránti becsült relatív affinitását a 2. táblázatban összegezzük. A *Dolichos biflorus* kivételével az N-acetil-galaktózaminra fajlagos lektinek a H-gal-GP-t szelektíven visszatartják. A *Dolichos* esetén kapott negatív eredmény azt a feltételezést kelti, hogy ez az affinitás inkább  $\beta$ , mint  $\alpha$ -kötésű N-acetil-galaktózaminokra fajlagos.

Az a felismerés, hogy a ConA, borsó és Lotus lektinek is visszatartják a H-gal-GP komplexet, azt jelzik, hogy az mannózt és/vagy fukózt tartalmazó glikoproteineket tartalmaz, míg a *Datura* és *Bandeiraea* esetén kapott negatív eredmények N-acetil-glükózamint tartalmazó szerkezetek hiányára utalnak (2. táblázat). Azonban mindazok a lektinek, amelyek visszatartják a H-gal-GP-t, megkötik minden alkotmányát, és nem mutatnak ezek iránt differenciált affinitást, amint az a 6. ábrán látható.

#### b) Disszociált és redukált állapotban

Annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy a H-gal-GP melyik alkotmánya glikozilált, a komplexet SDS-PAGE alkalmazásával redukáljuk, és disszociáljuk, blottoljuk, és biotinezett lektinek sorozatával próbát végzünk. Az eredmények (7. ábra) azt mutatják, hogy bizonyos lektinek (például a lencse lektinje) a sávok legtöbbszöréhez kötődnek, míg mások (például a földimogyoró, helix pomatia és szukcinilezett búzacsíra lektinjei) szelektívebbek. A szójababot kivéve minden más esetben erősen alátámasztotta egy 130 kD-os sáv és egy kevéssel kisebb komponens jelenlétét, ami ebben a tartományban egy dublett jelenlétére utal; egyes esetekben, például lencsénél, ConA-nál

ebben a tartományban festés után egy diffúz felület látható; mások, különösen a búzacsíra, földimogyoró, jacalin, szukcinilezett búzacsíra és *Helix pomatia* diffúzan reagál egy Coomassie blue-val gyengén festődő, mintegy 60 kD-os glikoproteinnel; a ConA, jacalin, búzacsíra és lencse is erősen kötődik az 50 kD-os sávhoz, míg a 47 kD-os sáv csak lencsével mutatkozik meg.

2. Táblázat

Különböző, agarózzal keresztkötéses lektinek relatív affinitása H-gal-GP, H110D vagy H45 iránt

Lektin	Cukor fajlagosság	Relatív kötődési affinitás			Az oszlop eluálására alkalmazott cukor
		H-gal-GP	H110D	H45	
KonkanavalinA	$\alpha$ -D-mann; $\alpha$ -D-glc	+++	+++	+++	0,5 mó1/1 metil-mannozid
Búzacsíra (Triticum vulgare)	(D-glc-NAC) <sub>2</sub> , NeuNAC	+++	+	?	0,5 mó1/1 N-acetil-glükóz-amin
Borsó (Pisium sativum)	$\alpha$ -D-mann.	+++	++	?	0,2 mó1/1 metil-mannozid + 0,2 mó1/1 metil-glükozid
Földimogyoró (Arachis hypogea)	$\beta$ -D-gal. (1-3)-D-gal NAC	+++	-	-	0,5 mó1/1 galaktóz
Jacalin (Artocarpus integrifolia)	$\beta$ -D-gal. (1-3)-D-gal NAC	+++	-	-	0,8 mó1/1 galaktóz
Szójabab (Glycine max)	$\alpha, \beta$ kapcsolt terminális gal NAC	++	-	-	0,2 mó1/1 N-acetil-galaktózamin
Vicia villosa	$\beta$ -D-gal(1-3)-D-gal NAC	+	-	-	0,2 mó1/1 N-acetil-galaktózamin
	$\alpha, \beta$ kapcsolt terminális gal NAC				

2. Táblázat (folytatás)

Lektin	Cukor fajlagosság	Relatív kötődési affinitás		Az oszlop eluálására alkalmazott cukor
		H-gal-GP	H110D H45	
Lotus tetragonobulus	$\alpha$ -L-fukóz	+	-	0,1 mó1/1 L-fukóz
Dolichos biflorus	$\alpha$ -D-gal NAC	-	-	0,2 mó1/1 acetyl-galaktóz-amin
Datura stramonium	$\beta$ -D-glc (1-4)-D-glc NAC	-	-	0,5 mó1/1 N-acetyl- -glükózamin
Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia	$\alpha$ -D-glc NAC $\beta$ -D-glc NAC	-	-	0,2 mó1/1 N-acetyl- -glükózamin

1000

### 5) Proteáz aktivitás

A H-gal-GP komplex proteáz aktivitással bír, azokazein vagy hemoglobin szubsztrát alkalmazása mellett pH optimuma 4,0 illetve 6,0 (7. és 8. ábra). Ez az aktivitás pepsztatinnal gátolható, a pepsztatin a H-gal-GP-vel szorosan kötődik. Ez utóbbi tulajdonság használható ki a H-gal-GP komplex affinitáskromatográfiás eljárással való dúsításánál.

### 6) Izoelektromos pont

A H-gal-GP komplexet előre képzett lineáris pH gradiens (pH = 2-9) alkalmazásával izoelektromos fókuszálásnak tesszük ki Miniphor preparatív szabadon-folyó készülékben. A komplex nagy része pH 2 és 7,3 között eluálódik. Ez a széles tartomány jellemző a glikoproteinekre, amelyeknél a változó szénhidrát egységek töltés-heterogenitást visznek a molekulába.

### Két eljárás H-gal-GP komplex előállítására H. contortusból

Az eljárásokat a 4. ábrán folyamatábra formájában összegezzük, részletesebben a 2. és 3. példákban mutatjuk be.

Haemonchus membránokból detergens extraktumot (S3) készítünk lényegében a WO90/11086 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásban Munn és Smith által leírt módon.

### 2. Példa

Kifejlett Haemonchus contortus-t homogenizálunk 4 °C hőmérsékleten acetátpufferben vagy foszfáttal pufferolt sóoldatban savas vagy semleges körülmények között 1 mmól/liter EDTA és 1 mmól/liter PMSF proteáz inhibitor jelenlétében. A homogenizátumot 10 000 g mellett 20 percig centrifugáljuk szokásos körülmények mellett, majd a képződött üledéket 0,1 %-os Tween 20-szal extraháljuk, és ismét centrifugáljuk. Az eljárást megismételjük,

és a kapott üledéket 2 %-os Triton X-100-zal extraháljuk, és szokásos körülmények mellett centrifugáljuk. A felülúszót 100 000 g mellett 1 órán át ultracentrifugáljuk, és a kapott felülúszót (S3) 0,22 mikronos szűrőn szűrjük, pufferrel, nevezetesen pH = 7,4-es, 0,5 mól/l NaCl-t, 0,01 % NaN<sub>3</sub>-t tartalmazó 10 mmól/l-es Trisz-HCl pufferrel négyszeresre hígítjuk.

A hígított S3 felülúszót agaróz gyöngyökhöz kötött különböző lektinokkal lektin affinitáskromatográfiás eljárásba visszük. A hígított felülúszót felvisszük az oszlopra, az oszlopot néhány oszlopnyi térfogatú pufferrel mossuk, majd a lektin által kötött anyagot egy megfelelő cukorral eluáljuk.

A 11 különböző lektin mindegyikéhez kötődő H-gal-GP relatív mennyiségét vizuálisan értékeljük SDS-PAGE géleken a 6. ábrán bemutatott módon. A 2. táblázatban közölt eredmények azt mutatják, hogy míg néhány lektin kötődik a H-gal-GP-hez, fajlagos kötődés csak azoknál észlelhető, amelyek β-kötésű N-acetil-galaktózaminra fajlagosak, ezek közül is különösen hatékony a földimogyoró és a jacalin lektin. Egyetlen lektinnel sem észlelhető a H-gal-GP alkotmensekre való szétválása (6. ábra).

Földimogyoró vagy jacalin lektin alkalmazásakor a H110D és H45 proteinek - egyéb anyagokkal együtt - mosáskor átfolynak, míg a H-gal-GP komplex kötött marad. Ezt lényegében tiszta formában eluáljuk földimogyoró lektint, illetve jacalin lektint tartalmazó oszlopokról 0,3 mól/literes, illetve 0,8 mól/literes galaktózoldattal (10. és 11. ábra).

Búzacsíra lektin alkalmazásakor hasonló eredményt érünk el 0,5 mól/l-es N-acetil-glükózaminnal végzett eluálást követően, azzal az eltéréssel, hogy némi H110D kötődik, és a H-gal-GP

komplexszel együtt eluálódik (ez az anyag látható a 11. ábra 1. gélsávjában, ez a jacalin oszlopra vitt anyag).

### 3. Példa

#### **Annak igazolása, hogy a pepsztatin a H-gal-GP fajlagos és erőteljesen reagáló liganduma**

Az S3 felülúszót alacsony pH-jú, nagy ionerősségű pufferben, nevezetesen pH = 5,5-ös, 1 mól/l NaCl tartalmú 20 mmól/l-es nátrium-acetát-pufferben agaróz gyöngyökhöz kötött pepsztatint tartalmazó oszlopon engedjük át. A polipeptidek zöme, köztük a H110D nem kötődik ehhez a mátrixhoz (a 12. ábra 1. és 2. gélsávjai). Az oszlopot néhány oszloptérfogatnyi fenti savas pufferrel mossuk, majd a pH 8,5-ig való növelésével kevés H-gal-GP-t és más gyengén kötött anyagot eluálunk. Ha az oszlopot ezután egy olyan pufferoldattal eluáljuk, amely alacsony koncentrációban erősen töltött detergenst (például 1 % nátrium-dodecil-szulfátot) tartalmaz, az eluált polipeptidek profilja igen hasonló a H-gal-GP-hez, bár csökken a nem redukáló 10 %-os géleken általában mintegy 45 kD-nál észlelhető sávpár (lásd a 12. ábra 4. gélsávján). Ha az oszlopból a töltetet eltávolítjuk, és az agaróz alikvot részeit 5 %-os SDS-ben DTT (ditiotreitól) jelenlétében inkubáljuk, egy olyan frakció eluálódik, amely ezekben a hiányzó sávokban dúsult, ami arra utal, hogy ezen sávok visszatartása igen erőteljes volt (lásd a 13. ábra 4. gélsávját). Az eluált anyagban nem mutatható ki proteáz aktivitás, ami azt jelzi, hogy az enzim SDS jelenlétében nem működőképes.

Kontroll vizsgálatokat végeztünk, melyek során az oszlopból eltávolított agarózt a fentiekben leírt savas mosási lépést követően ismételt szuszpendálással és centrifugálással többször

mostuk magában a pufferben vagy 2 % dezoxikolátot és 0,1 %-ig terjedő mennyiségű SDS-t tartalmazó pufferben. Ezen kezelések egyikével sem távolítottunk el jelentős mennyiségű H-gal-GP-t az agarózról, ami azt jelzi, hogy a jelenség nem pusztán annak következménye, hogy az oszlop tetején oldhatatlan protein fizikailag kötődik. Az a felismerés, hogy a H-gal-GP nem kötődik bizonyos lektin-agaróz oszlopokhoz (2. táblázat és a 6. ábra, 5. gélsávja) további bizonyítékát adja annak, hogy a pepsztatin-agarózhoz való kötődés ligandum-fajlagos.

#### **4. Példa**

**Annak igazolása, hogy a H-gal-GP a Haemonchus contortus bélsejtjei kefehatár felületén helyezkedik el, ahol egy integráns membrán glikoprotein van jelen**

##### **(a) Bél kefehatár lokalizálása**

i) Kifejlett H. contortus-ból készült kriosztátos metszeteket egy sorozat fluoreszcenssel jelzett lektinnel festettünk meg. Azt találtuk, hogy mind a földimogyoró, mind a búzacsíra lektin szelektíven festi a bél kefehatárt (14. és 15. ábra). Egyes lektinek (például a ConA) a legtöbb szerkezetet festi, míg mások (például Ulex) keveset vagy semmit nem festenek. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a bélsejtek kefehatára jóval nagyobb sűrűségben tartalmazza a búzacsíra és földimogyoró lektin kötőhelyeket, mint a Haemonchus más anatómiai szerkezetei. Mivel a H-gal-GP földimogyoró és búzacsíra lektinekhez kötődik, valószínű, hogy ez a glikoprotein van jelen a bélsejtek kefehatárában.

ii) Kifejlett H. contortus-ból készült kriosztátos metszeteket Freund-féle komplett adjuvánsban lévő H-gal-GP-vel immunizált birkák szérumával vagy csak adjuvánssal injektált

kontroll birkák szérumával inkubáltunk (lásd a 7. példa 3. és 4. vizsgálataiban). A metszeteket gondos mosás után birka immunglobulinra fajlagos fluoreszcein izotiocianáttal konjugált ló-antitestekkel inkubáltuk. További mosás után a metszeteket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk.

Az anti-H-gal-HP szérummal inkubált metszetek a szubkutikuláris réteg, valamint a bél kefehatár membrán sajátos fluoreszcenciáját mutatták (16. ábra). Nem észleltünk sajátos festődést a kontroll birkákból származó szérummal festett metszeteken. Ezek a eredmények azt jelzik, hogy a H-gal-GP a Haemonchus kefehatár membránján és felhám alatti rétegében helyezkedik el.

iii) Olyan kifejlett Haemonchusokból készítettünk kriosztátos metszeteket, amelyeket Freund-féle komplett adjuvánsban lévő H-gal-GP-vel immunizált vagy csak adjuváns injekcióval kezelt birkákból nyertünk ki (lásd a 7. példa 3. és 4. vizsgálatában).

A metszeteket birka immunglobulinra fajlagos, fluoreszcein izotiocianáttal konjugált antitestekkel inkubáltuk. Gondos mosást követően a metszeteket az előzőekben leírt módon fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk.

A H-gal-GP-vel történt immunizálást túlélő férgekől származó metszetek közül néhány, bár nem mind sajátos fluoreszcenciát mutatott. Ezt a belsejtek kefehatárának tulajdonítottuk (17. ábra). Nem észleltünk festődést a kontroll birkákból származó Haemonchus metszeteken.

Az eredmények azt mutatják, hogy a H-gal-GP-vel történt immunizálást túlélő férgek némelyike belsejt kefehatár membránjain birka immunglobulin bevonattal bír. Ezért a H-gal-GP-nek

ezen a membránon kell elhelyezkednie. Az előzőekben leírt in vitro vizsgálatban észlelt szubkutikuláris festődést itt nem észleltük. Feltehetőleg ennek oka az, hogy in vivo a gazdaszervezet immunglobulinja nem kerül érintkezésbe a parazitának ezzel az anatómiai részével.

#### **b) Integráns membrán glikoprotein**

Ha a teljes féreg PBS, Tween és Triton X-100-as extraktumait tartalmazó, perjodáttal kezelt blottokat (azaz a 4. ábrán leírt S1, S2 és S3 valamelyikét) a 3. vizsgálatban kifejlesztett anti-H-gal-GP szérummal próbának tesszük ki, H-gal-GP-t csak a Triton X-100-as extraktumban tudunk kimutatni (18. ábra). Ez az eredmény - egy viszonylag érzékeny vizsgálati mód alkalmazása mellett - arra utal, hogy a H-gal-GP nem volt jelen mint oldható citoplazma protein vagy mint perifériális membrán protein, és hogy Triton X-100 hatása volt szükséges ahhoz, hogy ezt a sejtmembránokból szabaddá tegye.

Ez az eredmény, a 2. táblázatban összegzett lektin-kötő tulajdonságokkal együtt, bőséges bizonyítékot szolgáltat arra, hogy a H-gal-GP egy integráns membrán glikoprotein.

#### **5. Példa**

**Annak bizonyítása, hogy a H-gal-GP komplex mind a H110D protein dublettől (WO90 11086), mind a H45 protein komplextől (WO90/11086), mind a 45 kD-os membrán proteintől (WO92/13889), mind a fibrinolitikus proteáztól (EP-A-434909) különböző**

**a) A H-gal-GP komplex, a H110D és a H45 protein komplex eltérései**

**i) Lektin kötés**

A H-gal-GP komplex, a H110D és a H45 komplex bizonyos lektinek iránti becsült relatív affinitását a 2. táblázatban foglaljuk össze. A Dolichos biflorus kivételével, amely egyikükhöz sem kötődik, az N-acetil-galaktózaminra fajlagos lektinek visszatartják a H-gal-GP komplexet, de nem tartják vissza a H110D vagy H45 komplexet.

ii) Izoelektromos pont

A H-gal-GP komplex alacsonyabb izoelektromos ponttal bír, mint a H110D vagy a H45 komplex, és ezektől ioncserélő kromatográfiás eljárással elválasztható. Például a H45 komplex nagyon kis része kötődik pH = 7,4-es, 0,1 térfogat% Triton X-100-t tartalmazó 10 mmól/l-es Trisz-HCl pufferrel egyensúlyba hozott Mono Q-tölteten, megerősítve Smith, Munn, Graham, Tavernor and Greenwood [International Journal for Parasitology 23, 271-280 (1993)] eredményeit. A visszatartott kis mennyiség a H110D előtt eluálható 50 mmól/l-es NaCl alkalmazásával. A H110D komplex teljes egésze deszorbeálható 200 mmól/l-es NaCl alkalmazásával, ez megelőzi azt, hogy a H-gal-GP komplex nagy része megkezdene az eluálódást.

iii) SDS-PAGE profil

A H110D dublett, amely redukáló vagy nem-redukáló körülmények között futtatva változatlanul 110 kD-nál maradt (1. ábra, 1. és 4. gélsáv), nyilvánvalóan különbözik a H-gal-GP komplextől mindkét szituációban (1. ábra, 1. és 3., valamint 4. és 6. gélsáv). Mivel azonban a redukálás a H45 komplex profilját lényegesen megváltoztatja (1. ábra, 2. és 5. gélsáv), a H-gal-GP komplextől való különbözősége kifejezettebb, ha a redukálatlan mintákat hasonlítjuk össze (1. ábra, 2. és 3. gélsáv), mint a

redukált minták összehasonlításakor (1. ábra, 5. és 6. gélsáv).

iv) Pepsztatinnal való kötődés

Sem a H110D, sem a H45 nem kötődik pepsztatin agarózhoz, amely közeghez a H-gal-GP komplex erőteljesen kötődik (12. és 13. ábra)

**b) A H-gal-GP komplex és a W092/13889 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásban ismertetett 45kD-os membrán protein közötti különbségek**

i) Lektinnel való kötődés

Natív körülmények között a H-gal-GP komplex búzacsíra lektinhez kötődik (2. táblázat, 19. ábra). A W092/13889 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásban szereplő védő antigének nem kötődnek ehhez a lektinhez, ezt a tulajdonságot használták ki a 45 kD-os membrán protein tisztítására.

ii) N-terminális aminosavszekvencia

A W092/13889 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásban szereplő 45 kD-os membrán protein közölt N-terminális aminosavszekvenciája nem hasonlít a H-gal-GP komplex 1. példa 2. részében leírt 45, 47, 48 vagy 50 kD-os komponensei megfelelő adatainak egyikéhez sem.

iii) A denaturált antigén H-gal-GP komplex megőrzi védő kapacitását birkák védelmében SDS-szel való disszociálást és ditiotreitolos redukálást követő denaturálás után is (lásd a 7. példa, 4. és 5. vizsgálatában), míg a W0 92/13889 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásban ismertetett 45 kD-os membrán protein védő antigén kapacitását - tengerimalac vizsgálat alapján - elveszíti denaturált formában.

**c) H-gal-GP komplex és fibrinolitikus proteáz közötti  
különbségek**

**i) Szubsztrát fajlagosság**

Cox, Pratt, Hageman és Boisvenue [Molecular and Biochemical Parasitology 41, 25-34 (1990)] Haemonchus-ból származó fibrinolitikus proteázról írnak le, amely szerintük - két kisebb birka vizsgálat nem meggyőző adatai ellenére - védő antigén hatással bír (Cox, G.N., Milhausen M. és Hageman R., 434909 számú európai szabadalmi bejelentés, 1990). A H-gal-GP komplex nem mutatott semmiféle proteolitikus aktivitást fibrinogénnel szemben (lásd a 4. táblázatban és a 6. példában).

**ii) Oldhatóság**

A Cox és munkatársai (1990) által leírt fibrinolitikus proteáz Haemonchus-ból sóoldattal extrahálható ki. Ezzel ellentétben, a H-gal-GP komplex nem mutatható ki a sóoldatos extraktumban, a parazitából csak detergenssel, például Triton X-100-zal extrahálható (4. és 5. ábra).

**6. Példa**

**Annak igazolása, hogy a H-gal-GP aszpartil-proteáz jellemzőkkel bír**

**i) pH optimumok**

Földimogyoró lektinnel tisztított H-gal-GP előzetes vizsgálatok szerint inkább hidrolizálja az azokazeint, mint az azokollagént. Ennek az aktivitásnak a pH optimuma 4 és 9 közötti, 0,1 mól/l-es acetát, foszfát vagy trisz pufferek átlapoló alkalmazásával (8. ábra). Az optimális aktivitást 4,5 és 6,5 közötti pH értéknél észleltük.

**ii) Inhibitor érzékenység**

A proteínáz aktivitás inhibitor érzékenységét négy különböző, földimogyoró lektinnel tisztított H-gal-GP készítményen vizsgáltuk. Az enzimaktivitás majdnem teljesen gátolható pepsztatinnal minden vizsgált készítményben, ami azt jelzi, hogy a proteolízis egy aszpartil-proteáz hatásának tulajdonítható (3. táblázat).

### 3. Táblázat

**H-gal-GP-vel kapcsolatos és az O. circumcincta és O. ostertagi eredetű ekvivalens enzimek proteáz aktivitásának inhibitor érzékenysége**

Inhibitor	Jelölt proteínáz osztály	Az inhibitor jelenlétében megmaradó aktivitás (%)		
		H-gal-GP	Oc-gal-GP	Oo-gal-GP
PMSF	szerin (tiol)	100	104	84
E64	tiol	87.8	101	101
1, 10				
Fenantrolin	metallo	97	94	99
EDTA	metallo	97.8	NH	NH
Pepsztatin	karboxil (aszpartil)	8.5	23	0

(Az eredmények H-gal-GP esetén négy különböző észlelés, és minden Ostertagia faj esetén két észlelés átlagai). NH = nem határoztuk meg.

#### iii) Affinitás kromatográfiás vizsgálat pepsztatin agarózon

Az 1. példa első részében leírt módon tisztított H-gal-GP-t pepsztatin agarózzal töltött oszlopon engedünk át. A pepsztatin agaróz töltetet előzetesen pH = 4,5-es, 1 mól/l NaCl-t és 0,1

térfogat% redukált Triton X-100-t tartalmazó 25 mmól/l-es nátrium-acetát pufferrel hozzuk egyensúlyba [Do és munkatársai, J. Biol. Chem. 262, 1037-1043 (1987)]. Az oszlopról pH 4,5 és 10 közötti tartományú folyadékkal való kimerítő mosás során kevés protein deszorbeálódik. Azonban, ha az eluálást 1 %-os SDS-vel végezzük, a H-gal-GP zöme deszorbeálódik (20. ábra). A H-gal-GP nem kötődik "negatív kontroll" ligandummal (például Dolichos lektinnel) kapcsolt agarózhoz. Ez az eredmény a 3. példában az előzőekben leírtakkal együtt azt jelzi, hogy a H-gal-GP erősen fajlagos pepsztatinra, amely az aszpartil proteázok és kisebb mértékben a membrán metallo-endopeptidázok egy klasszikus jellemzője [Zoller, H., Handbook of enzyme, inhibitors, 1990, kiadó: VCH, Weinheim, Németország]. A H-gal-GP profilja 5 vagy 10 %-os nem-redukáló géleken azonos pepsztatin agarózhoz való kötődés előtt vagy után (20. ábra). Ez az eredmény arra utal, hogy a H-gal-GP egy multimer enzim komplex, pepsztatinhoz kötődő proteázok elegye vagy ezen enzimek és prekurzoraik elegye.

#### iv) Szubsztrát-gél analízis

H-gal-GP-t pepsztatin jelenlétében vagy hiányában előinkubálunk, majd 0,1 tömeg/térfogat% zselatint tartalmazó 7,5 %-os SDS-PAGE géleken nem-redukáló körülmények mellett elválasztjuk. Az elektroforézist követően az SDS-t feleslegben lévő Triton X-100-zal való mosással eluáljuk, és a géleket éjszakán át 37 °C hőmérsékleten pH = 6,0-os foszfát pufferben inkubáljuk. A proteolízis zónákat Coomassie Blue színezéssel való ellenfestéssel tesszük láthatóvá.

Az eredmények változóak voltak, de egy alkalommal a proteolízis a H-gal-GP komplex mindkét nagyobb nagy molekulatö-

megű sávjával és a mintegy 45 kD-os kisebb komponensekkel is korrelált. Minden aktív zóna érzékeny volt pepsztatinra. Egy másik alkalommal úgy tűnt, hogy az aktivitás csak a komplex 170 kD-os sávjára lokalizálódik, és pepsztatinnal egyértelműen gátolható (21. ábra). Az aszpartil-proteinázoknak ezt a változó láthatóvá tételét már korábban is leírták, és a zselatinhoz mint szubsztráthoz való viszonylag gyenge affinitásnak tulajdonították [Simkin, K.G., Chapman, C.R. és Coles, G.C., *Experimental Parasitology* 49, 281-387 (1980)]. Ennek folytán úgy tűnik, hogy a H-gal-GP a komplexnek nem-redukáló körülmények között észlelt minden sávjával kapcsolatosan aszpartil-proteináz aktivitással bír.

**v) H-gal-GP affinitása természetes vér-proteinek iránt**

H-gal-GP-t fibrinogénnel, albuminnal, hemoglobinnal, valamint azokazeinnel inkubálunk (mindegyik esetben 1 mg/ml pH = 5,5-ös puffer en), majd az emésztetlen proteint azonos térfogatú 1 mól/l-es perklórsav hozzáadásával kicsapjuk. A proteolízist a szabaddá vált szabad  $\alpha$ -amino-nitrogénnek ninhidrin vizsgálattal való kimutatásával követjük nyomon [Mathews, B.E. *Symposium of British Society of Parasitology* 15: 103-119 (1977)].

Az eredmények azt mutatják, hogy a H-gal-GP megkülönböztett fajlagossággal bír hemoglobin iránt (4. táblázat), és ennek az aktivitásnak az optimuma pH = 4,0 értéken van (9. ábra).

## 4. Táblázat

**H-gal-GP affinitása természetes vér-proteinek és azokazein iránt**

Szubsztrát	Proteolízis	(Abszorbcio 563 nm-nél)
Fibrinogén	0,00	
Haemoglobin	5,12	
Albumin	0,77	
Azokazein	0,55	

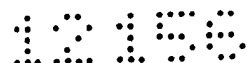
**vi) H-gal-GP proteolitikus aktivitás gátlása immunizált birkákból származó szérummal**

H-gal-GP-vel immunizált vagy adjuvánssal kezelt (a 7. példa 3. vizsgálatában leírt módon) bányókból származó szérumot azonos mennyiségű H-gal-GP alikvotokkal inkubáltunk. Az elegyek proteolitikus aktivitását ezután azokazein szubsztrát alkalmazásával megvizsgáltuk. Az 5. táblázatban látható eredmények azt jelzik, hogy a H-gal-GP-vel végzett immunizálás egy fajlagos gátló választ vált ki, amely feltehetően a H-gal-GP proteolitikus aktivitása ellen irányuló antitest következménye.

## 5. Táblázat

**H-gal-GP gátlása immun-szérummal**

Szérum	Proteolízis gátlás %	
	1. vizsgálat	2. vizsgálat
Kontroll bányó	0	2
A immun-bányó	58	55
B immun-bányó	51	59



## **7. Példa**

### **Annak igazolása, hogy H-gal-GP-vel immunizált birkák védettek Haemonchus contortus-sal szemben**

A védelemre vonatkozó kísérlet-sorozatot hajtottunk végre H. contortus különböző frakcióinak alkalmazásával. A 22. ábrán folyamatábrában foglaljuk össze annak az eljárásnak a vázlatát, amellyel az immunogéneket előállítottuk az öt vizsgálatban szereplő minden egyes birka-csoport számára.

#### **A védelemre vonatkozó vizsgálatok**

19 csoport birkát magában foglalóan 5 immunizálási provokációs vizsgálatot végeztünk a következőkben bemutatásra kerülő kronológiai rendben. Az egyes vizsgálati csoportok egymáshoz viszonyítva az állatok nemét és testtömegét illetően kiegyensúlyozottak voltak.

Az egyes csoportok tervezett mérete 6 vagy 7 állat, azonban a 9. és a 10. csoportban egy-egy birka elpusztult vesekő folytán a provokálást megelőzően. Az egyes csoportok immunizálására alkalmazott antigéneket a 6. táblázatban és a 22. ábrán mutatjuk be. Minden birkát 3 alkalommal immunizáltunk a protein egyenlő dózisaival vagy kontrollok esetén csak adjuvánssal és sóoldattal, és minden állatot 5000 H. contortus lárvával provokáltunk. Mindig Freund-féle komplett adjuvánst alkalmaztunk, az oltóanyagot 1 vagy 2 ml-es adagokban intramuszkulárisan adtuk be mindkét hátsó lábba. A bárányok kora és a kezelés időzítése az egyes vizsgálatoknál némileg változott, amint az a 7. táblázatban látható.

#### **1. Vizsgálat**

A vizsgálat célja teljes féreg membránok Triton X-100-as

extraktumának búzacsíra lektinnel kötődő frakciója védő kapacitásának meghatározása.

Ez az immunogén igen hatékony a provokált kontroll birkákban észlelt bélsár peteszám visszaszorításában (23. ábra). Hasonló módon, leötléskor az immunizált csoport szignifikánsan kevesebb férget tartalmazott, mint a kontroll, és az immunizált csoportban szignifikánsan nagyobb a hímek aránya a nőstényekhez (6. táblázat), mint a normális.

Ez az eredmény ellentétes a W092/13889 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásban közöltekkel, ahol a búzacsíra lektinnel kötődő frakció gyenge védelmet nyújtott tengerimalacoknak. Ez a különbség vagy az alkalmazott provokálási rendszer eltérő voltának tulajdonítható, vagy annak a ténynek, hogy a W092/13889 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásban ismertetett vizsgálatban lényegében a H110D volt a fő védő alkotóanyag, amelynek nagy tömege nem kötődik búzacsírához (19. ábra).

Azt a felismerést, hogy a nőstény *Haemonchus* érzékenyebb a hímnél az immunizálás hatásaira, már korábban ismertették más bél-membrán antigén vizsgálatokban [például Smith, Res Vet Sci 54, 94-101 (1993)], és annak a ténynek tulajdonították, hogy mivel a nőstény férgek nagyobbak a hímeknél, nagyobb sebességgel fogyasztják a vért azoknál, és nagyobb dózis arányban jutnak a káros antitesthez. Más elképzelés szerint ez a jelenség annak a ténynek a következménye lehet, hogy a nőstények anabolikus igényei a peterakás folytán sebezhetőbbé teszik őket a táplálékot biztosító enzimek blokkolása iránt. A visszanyert férgek nem szerinti arányának mérése hasznos további paraméter a találmány szerinti módszerrel végrehajtott sikeres immunizálás okozta

hatások kimutatására.

## 2. Vizsgálat

Mivel az már korábban ismert volt, hogy az 1. csoportban alkalmazott búzacsírával kötődő frakció tartalmaz némi H110D-t, amely *Haemonchus* ellen már erősen védő hatásúnak bizonyult protein (Munn és Smith, 1990), a fő cél az volt, hogy olyan búzacsírával kötődő frakciót vizsgáljunk, amelyből a H110D-t ioncserélő kromatográfiával eltávolítottuk. Annak ellenőrzésére, hogy lehetséges-e egy nem-glikozilált védő membrán-protein létezése, egy második csoportot egy olyan frakcióval immunizáltunk, amely nem kötődött sem búzacsíra, sem ConA lektinhez (22. ábra).

Mindkét immunizált csoportban következetesen alacsonyabb átlagos peteszámot észleltünk, mint a kontrollokban (24. ábra), de csak a búzacsíras csoportban volt szignifikáns különbség a mintavételi napok többségében. Egyik immunizált csoport sem tartalmazott szignifikánsan kevesebb férget, mint a kontrollok, bár a búzacsíras csoportban a terhelés lényegesen több hím, mint nőstény féregből tevődött ki (6. táblázat).

Ebben a vizsgálatban a kontroll csoport birkáinak átlagos pete- és féregszáma lényegesen alacsonyabb volt, mint a másik négy vizsgálat kontroll értékei (24., 23., 25. és 26. ábrák, és 6. táblázat), két állatnál igen alacsonyak voltak ezek a számok. Ez a nagy variáció (amely valószínűleg az öregebb birkák bevonását tükrözi) nehezítette a szignifikancia értékelését - ha egyáltalán volt - a harmadik csoportnak tulajdonított védettség tekintetében, ez a helyzet a vizsgálat megismétlését igényli.

### 3. Vizsgálat

Ennek a vizsgálatnak a célja a H110D-mentes búzacsírához kötődő frakció ismételt vizsgálata fiatalabb, egyenletesebben érzékeny bárányokon. Időközben azt észleltük, hogy ugyanaz a frakció egyszerűbben előállítható affinitás-kromatográfiás eljárással földimogyoró lektin alkalmazásával (22. ábra), mivel ez a ligandum egyáltalán nem köt meg kimutatható H110D-t. Ezért ebben a vizsgálatban a földimogyoróval kötődő frakció (azaz H-gal-GP) és H110D védő kapacitását hasonlítjuk össze.

Az immunizált bárányok mindkét csoportjának bélsár peteszáma lényegesen csökkent a kontrollokhoz hasonlítva (25. ábra), és lényegesen kevesebb férget nyertünk belőlük, emellett a hímek aránya a nőstényekhez képest rendellenesen magas volt (6. táblázat).

Arra a következtetésre jutottunk, hogy a H-gal-GP *Haemonchus e.* antigén.

### 4. Vizsgálat

A vizsgálat célja a natív H-gal-GP-vel kapott védő hatás tényének megerősítése, és annak meghatározása, hogy ez a komplex megőrzi-e védő hatását disszociált vagy redukált és disszociált állapotban.

Ennek megfelelően a H-gal-GP alikvot részét disszociáljuk oly módon, hogy 0,5 % SDS-szel (SDS : protein tömegarány 2,5:1) 25 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk. Egy második alikvot részt azonos mennyiségű SDS és ezzel együtt 2,5 mmól/liter ditiotreitól (DTT) redukálószer alkalmazásával 100 °C hőmérsékleten 5 percig tartó disszociálással denaturálunk. A 10. és 11. csoportokat a fenti módokon kezelt H-gal-GP alkalmazásával immu-

nizáljuk, míg a 9. csoportnak azonos, de kezeletlen natív H-gal-GP alikvot részét adjuk (6. táblázat).

Mindhárom immunizált csoport esetén a bélsár peteszám és féregszám értékeiben is erősen szignifikáns csökkenést észleltünk a kontrollokhoz képest (26. ábra, 6. táblázat), bár ez a hatás kifejezettebb a natív és a csak SDS alkalmazásával kezelt csoportoknál. A korábbiakhoz hasonlóan a nőstény férgek érzékenyebbek a hímeknél az immunizálás hatására. Azt a következtetést vontuk le, hogy a H-gal-GP védő epitópjai nagyrészt érintetlenek maradnak mind a komplex SDS-szel való disszociációja, mind az SDS-szel való disszociáció és DTT-vel végzett redukálás révén bekövetkező denaturálódás esetén. Ez az eredmény ellentétes azzal, amelyet a WO92/13889 közzétételi számú PCT bejelentésben leírt 45 kD-os membrán glikoproteinnel nyertek, és arra enged következtetni, hogy a H-gal-GP alegység-polipeptidjeit is meg lehetne egyéenként vizsgálni azt követően, hogy ezeket SDS tartalmú akrilamid géleken elválasztjuk, és a gélről extraháljuk.

### 5. Vizsgálat

A vizsgálat célja H-gal-GP nem-redukáló SDS-PAGE révén elválasztott különféle polipeptid-alkomponensei védő antigén hatásának vizsgálata.

A 13. és 14. csoportokat 500, illetve 200  $\mu$ g olyan H-gal-GP komplexszel immunizáljuk, amelyeket előzetesen a fenti 4. vizsgálatban leírt módon SDS alkalmazásával disszociáltunk. A 15-18. csoportok immunizálását nem-redukáló körülmények mellett SDS-PAGE alkalmazásával 5 %-os gélen elválasztott H-gal-GP komplex (22. ábra) elválasztás után kimetszett egyedi komponenseivel végezzük. Amint a 2. ábrán látható, a 15. csoportnak a 230 kD-os

sávot, a 16. csoportnak a 190-205 kD-os diffúz tartományt, a 17. csoportnak a 170 kD-os sávot, a 18. csoportnak a színezékfront sávot (2. ábra) injektáltuk be. A megfelelő sávokat tartalmazó gélszeleteket megfelelő térfogatú hígítóanyagban szuszpendáljuk, és azonos térfogatú adjuvánssal homogenizáljuk. A frakcionált H-gal-GP mennyiségét úgy számoljuk, hogy a 15-18. csoportok 500 µg H-gal-GP-vel ekvivalens polipeptid dózist (azaz a 13. csoporttal ekvivalens polipeptid dózist) kapjanak. Egy kontroll csoportot (19. csoport) csak magával az adjuvánssal immunizálunk.

Egy állat kivételével (a 4. számú birka) mindkét SDS-szel disszociált H-gal-GP-vel immunizált pozitív kontroll csoport védett volt a provokált fertőzéssel szemben. Ez a kontrollokhoz viszonyított csökkent pete- és féregszámban, valamint a hím férgek arányának növekedésében nyilvánult meg. Ha a 4. számú birkát az értékelésből kizárjuk, a 13. csoport védelmére vonatkozó számok a következők: 79 % féregszám és 87 % peteszám (a 18-35. napok átlagolt értékei). A 14. csoportnál a megfelelő eredmények: féregszám: 70 %, peteszám: 84 %. Azt a következtetést vontuk le, hogy a 14. csoportnál alkalmazott csökkentett dózis nem okozott eltérést, és hogy a 13. csoportnál kapott eredmény hasonló volt, mint a fenti 4. vizsgálatban kapott.

Sokkal nagyobb egyedi variációkat észleltünk a H-gal-GP különböző alegység sávjaival immunizált csoportoknál. Az eredmények azonban azt mutatták, hogy a védelem elérhető a gélekből kimetszett egyedi alegység sávokkal is. Ezek közül a 16. csoport (190-205 kD-os diffúz sáv) és a 18. csoport (színezék front sávja) volt a legjobban védett.

A legjobb alegység csoportban nyújtott védelem kevésbé következetesnek tűnt, mint a teljes komplexszel immunizált csoporté. Ennek oka az lehet, hogy az elektroforetikus elválasztás folyamán a védő epitóp valamilyen módon károsodott, vagy az, hogy egy következetes hatáshoz 1-nél több alegység kombinációja lehet szükséges.

Az öt vizsgálatból arra a következtetésre jutottunk, hogy a H-gal-GP új, és következetesen hatékony védő antigén komplex *Haemonchus* ellen mind natív állapotában, mind disszociált, vagy akár redukált és disszociált állapotában is.

#### 6. Táblázat

**1-4. vizsgálat birkák védelmére: csoportonkénti féregszám és a visszanyert *Haemonchus* nemek szerinti aránya**

A vizsgálat száma	Csoport	n	Antigén	Dózis*	Átlag szám $\pm$ SE	Hím %
1.	1.	7	Búzacsíra kötés	200	1086 $\pm$ 326 <sup>a</sup>	62,3 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>
	2.	7	Nincs (kontroll)	-	3068 $\pm$ 416 <sup>b</sup>	48,6 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>
2.	3.	6	Búzacsíra mínusz H110D	140	1809 $\pm$ 115 <sup>a</sup>	63,1 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>
	4.	7	Lektin, kötetlen	140	1387 $\pm$ 350 <sup>a</sup>	49,6 $\pm$ 4,1 <sup>b</sup>
	5.	7	Nincs (kontroll)	-	1644 $\pm$ 344 <sup>a</sup>	51,5 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>
3.	6.	7	H110D	100	518 $\pm$ 133 <sup>a</sup>	66,8 $\pm$ 5,4 <sup>a</sup>
	7.	7	Földimogyoró kötés (H-gal-GP)	200	1765 $\pm$ 167 <sup>b</sup>	64,2 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>
	8.	7	Nincs (kontroll)	-	3744 $\pm$ 187 <sup>c</sup>	50,1 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>

6. Táblázat (folytatás)

A vizsgálat száma	Csoport	n	Antigén	Dózis*	Átlag szám ± SE	Hím %
	9.	5	Natív H-gal-GP	200	1052±424 <sup>a</sup>	75,5±6,2 <sup>a</sup>
	10.	5	H-gal-GP + SDS	500	902±295 <sup>a</sup>	65,7±3,2 <sup>a</sup>
4.	11.	6	H-gal-GP + SDS + DTT	500	1466±476 <sup>a</sup>	70,6±5,4 <sup>a</sup>
	12.	6	Nincs (kontroll)	-	3705±627 <sup>b</sup>	56,1±5,4 <sup>b</sup>

\* Az immunizálásnál birkánként beinjektált protein (μg).

Az egyes vizsgálatokon belül a különböző index-számokkal jelölt oszlopokban lévő értékek szignifikánsan különbözőek.

7. Táblázat

A vizsgálati rend különbözőségei a birka vizsgálatnál

A vizsgálat száma	A bérány kora	Megerősítés ideje <sup>b</sup>	Időtartam a provokálásig <sup>c</sup>	A leölés napja <sup>d</sup>
1.	2	4 és 7	1	23
2.	8	3 és 6	2	28
3.	2	3 és 6	2	34
4.	5	3 és 6	2	35
5.	3	3 és 6	2	34 vagy 35

<sup>a</sup> Az állat kora az első injekció beadásakor hónapokban;

<sup>b</sup> Az első "vakcinálástól" eltelt hetek száma;

<sup>c</sup> A harmadik "vakcinálás" és a provokálás közötti hetek száma;

<sup>d</sup> A provokálástól az állat leöléséig eltelt napok száma.

## 8. Példa

### **Ostertagia fajokban jelenlévő ekvivalens enzimek**

Ostertagia circumcincta vagy Ostertagia ostertagi a 4. ábrán bemutatott módon való extrahálása, majd földimogyoró lektinnel való affinitás-kromatográfiás kezelése SDS-PAGE profiljuk alapján a H-gal-GP-vel nagyjából hasonló protein komplexeket eredményez. A H-gal-GP-hez hasonlóan mindkét extraktum proteáz aktivitást mutat azokazeinnel és birka hemoglobinnal szemben, amelyek pH optima 4 és 5,0 közötti (8. és 9. ábra), aktivitásukat pepsztatin fajlagosan átolja (3. táblázat).

Pepsztatinnal, földimogyoró lektinnel vagy Dolichos lektinnel kapcsolt agaróz gyöngyöket tartalmazó csövekhez azonos mennyiségű Oc-gal-GP-t adunk, és a csöveket 3 órán át 4 °C hőmérsékleten enyhén keverjük. A gyöngyöket kiülepítjük, a megkötetlen felülúszót visszanyerjük. A gyöngyöket háromszor mossuk, majd minimális mennyiségű SDS-PAGE minta-pufferrel forraljuk, ezután ülepitjük. Ennek a lépésnek a felülúszóját, amely az agarózhoz kötött anyagot tartalmazza, a megkötetlen felülúszóval együtt nem-redukáló 5 %-os SDS-PAGE géleken futtatjuk, immobilon membránon blottoljuk, és biotinezett földimogyoró lektinnel kapcsoljuk.

A 28. ábrán bemutatott eredmény azt mutatja, hogy az Oc-gal-GP földimogyoró lektinhez és pepsztatin agarózhoz fajlagosan kötődik, mivel az agarózzal kapcsolt negatív kontroll ligandumhoz (Dolichos lectin) nem kötődik.

A H-gal-GP-vel a 7. példa 1. és 2. vizsgálata szerint immunizált birka széruma keresztreakciót ad bármely Ostertagia komplex protein epitópjaival (27. ábra).

Ezek az eredmények együttevén azt a feltételezést támasztják

alá, hogy a *H. contortus*, az *O. circumcincta* és az *O. ostertagi* pepsztatinnal gátolható proteáz aktivitást tartalmazó, antigénesen rokon galaktóztartalmú glikoprotein komplexek egy közös családjába tartoznak.

Részletesebb eredményeinket az alábbi vizsgálatokban ismertetjük.

### 1. Vizsgálat

**Annak igazolása, hogy *Ostertagia circumcincta* integráns membrán proteinjeivel immunizált bérányok védettek az ezzel a parazitával való provokációtól**

*Ostertagia circumcincta* integráns membrán proteinjeinek konkavalin A-val (ConA) kötődő frakciójával immunizált bérányokkal végzett kísérletben a bérányokat ennek a parazitának fertőző lárvaival provokáltuk, és meghatároztuk védettségüket hasonló módon provokált kontroll csoporttal szemben.

Minden antigén-előállítási műveletet jégben vagy 4 °C hőmérsékleten 10 000 g mellett 15 percig végzett centrifugálási lépéssel valósítunk meg, ha más megjelölés nem szerepel. Fagyasztott, kifejlett *O. circumcincta*-t kiolvasztunk, és pufferben homogenizálunk (pH = 7,4-es, 1 mmól/l EDTA, 1 mmól/l PMSF és 1 mmól/l N-etil-maleimid proteáz inhibitorokat tartalmazó foszfáttal pufferolt sóoldat). A homogenizátumot centrifugáljuk, az üledéket 0,1 térfogat% Tween 20-t tartalmazó homogenizáló pufferben újra szuszpendáljuk. Ezt a lépést még egyszer megismételjük, és a mosott üledéket, amely a féreg-membránokat tartalmazza, ismét szuszpendáljuk, és 2 % Triton X-100-t tartalmazó, EDTA nélküli homogenizáló pufferben 2 órán át történő gondos keveréssel extraháljuk. Az extraktumot ismét centrifugáljuk, a kapott felül-

úszót 100 000 g mellett 1 órán át ultracentrifugáljuk, ezt a felülúszót, amelynek jelölése S3 (29. ábra, 1. gélsáv), és az oldhatóvá tett integráns membrán proteinek tartalmazza, 22  $\mu\text{m}$  pórusú szűrőn engedjük át, majd négyszeresére hígítjuk 0,5 mól/l NaCl-t és 0,01 tömeg/térfogat%  $\text{NaN}_3$ -t tartalmazó 10 mmól/l-es, pH = 7,4-es Trisz-HCl pufferrel, majd az oldatot ConA-agaróz oszlopra visszük. A kötetlen anyagot (29. ábra, 3. és 4. gélsáv) előntjük, majd gondos mosás után a megkötött frakciót 200 mmól/l-es  $\alpha$ -metil-mannozid/ $\alpha$ -metil-glükóziddal eluáljuk (29. ábra, 2. gélsáv). Ezt a frakciót gélszűréssel (Sephadex G-25, Pharmacia) cukortól és sótól mentesítjük, Mono Q ioncserélővel besűrítjük, majd hideg, foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) hígítjuk, ezután azonos térfogatú Freund-féle adjuvánssal emulgeáljuk.

14 Suffolk félvér bárányt, amelyeket olyan körülmények között neveltünk és tartottunk, hogy kizárjuk a nematóda parazitákkal való fertőződést, két csoportra osztottunk, amelyek az állatok neme és testtömege szerint kiegyensúlyozottak voltak, és hat immunizált és 8 kontroll bárányt öleltek fel. Az immunizált csoport mintegy 7 hónapos korában kapott 100  $\mu\text{g}$  antigén injekciót, a kontroll bárányoknak csak adjuvánst injektáltunk be. Az állatok mindkét hátsó lábába 1 ml vakcinát injektáltunk a félig hárttyás (semimembranosus) és félig inas (semitendinosus) izmokba. Minden csoport további azonos oltást kapott 3 és 6 héttel később. Két héttel az utolsó emlékeztetőt követően a bárányok mindegyikét orálisan 5000 harmadik állapotú *O. circumcincta* lárvával provokáltuk. A provokálást követő 2 hét eltelté után hetente kétszer meghatároztuk a bélsár-peteszámot, és az összes féregszám meghatározására az állatokat a provokálást követően 5 héttel leöltük.

Az immunizált bányók csoportonkénti átlagos bélsár-peteszáma szignifikánsan alacsonyabb volt a vizsgálat során végig, mint a kontroll csoportoké (8. táblázat és 30. ábra). A csoportok átlagainak a 21. és 35. nap közötti értékeit átlagolva azt az eredményt kaptuk, hogy az immunizált csoport peteszáma több mint 80 %-kal csökkent.

Megvizsgáltuk az oltógyomor tartalmak és nyálkahártya kivonatok almintáit (5-10 %) férgek tekintetében. Nem találtunk korai negyedik állapotú lárvát, minden féreg az ötödik állapotig vagy kifejlett állapotig fejlődött. A férgekkel való terheltség mértékének összehasonlítása azt mutatta, hogy az immunizált birkák férgekkel való terheltsége mintegy 60 %-kal csökkent, ami statisztikailag szignifikáns különbség (8. táblázat).

### 8. Táblázat

#### Bélsár-peteszám és össz Ostertagia terhelés immunizált és kontroll birkákban

Csoport	Birka	A provokálást követő napok száma							Férgek <sup>a</sup>
		14	18	21	25	28	32	35	
Immunizált	1.	0 <sup>b</sup>	45	198	30	108	30	162	2673
	2.	0	0	1	8	36	24	15	321
	3.	0	0	1	12	27	15	48	905
	4.	0	0	2	24	33	15	36	322
	5.	7	207	315	162	108	63	207	2563
	6.	0	1	63	72	198	135	189	2914
	Átlag	1,17	42,2	96,7	51,3	85,0	47,0	109,5	1616

Kontroll	7.	0	342	459	72	495	387	450	3830
	8.	6	198	450	297	720	432	558	4979
	9.	13	261	585	297	603	927	603	3292
	10.	11	432	441	252	252	693	612	3993
	11.	7	279	405	207	378	486	*	3806
	12.	9	396	297	369	1134	495	459	4189
	13.	3	27	189	108	72	162	198	2088
	14.	27	333	486	450	288	531	639	4568
Átlag		9,62	283,5	414,0	256,5	493,0	514,1	502,7	3843
P érték		<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,02	<0,01	<0,01	<0,01

a - Össz féregszám

b - a bélsár-petes szám/g érték

\* - nincs minta

P érték - az immunizált és a kontroll csoport megfelelő átlagai közötti különbség szignifikanciája T teszttel meghatározva.

## 2. Vizsgálat

**Annak igazolása, hogy a védő antigének magukban foglalják az *Ostertagia circumcincta* galaktózt tartalmazó (Oc-gal-GP) glikoprotein komplexét**

a) Az 1. vizsgálatban a birkák immunizálására alkalmazott ConA-val kötődő frakciót 10 %-os redukáló SDS-PAGE géleken elektroforetizáljuk, és immobilon membránra blottoljuk. A blotokkal próbát végzünk biotinezett földimogyoró lektinnel, ez a ligandum fajlagosnak bizonyult Oc-gal-GP-re (28. és 29. ábra). A pozitív eredmény (31. ábra) azt mutatta, hogy az Oc-gal-GP jelen volt a védő antigén készítményben.

b) Oc-gal-GP előállítására kifejlett *O. circumcincta* S3

állapotig feldolgozunk, majd földimogyoró lektin - agaróz oszlopon visszük át az 1. vizsgálatban leírt módon. Az oszlopot néhány oszloptérfogatnyi pufferrel mossuk, majd a megkötött anyagot 0,5 mól/l-es galaktózzal mosva nyerjük az Oc-gal-GP-t.

Oc-gal-GP blotokat készítünk az előzőekben leírt módon, azzal az eltéréssel, hogy először perjordátos kezelést végzünk a szénhidrát epitópok roncsolására és a lehetséges keresztreakciók csökkentésére [Woodward, Young és Bloodgood, Journal of immunological methods, 78, 143-153 (1985)]. A blotokkal próbát végzünk vagy a 8. példa 1. vizsgálatából származó immun szérummal vagy O. circumcincta iránt természetes immunitással bíró birkákból származó gyomornyirokkal [Smith, Jackson, Jackson és Williams, Journal of Comparative Pathology 95, 235-275 (1985)]. Az 1. vizsgálatból származó, a ConA-val kötődő antigén elleni antiszérum reagált az Oc-gal-GP-vel, de nem volt látható reakció a természetes immunitású állatok nyirokjával. Ezek az eredmények a 2(a) vizsgálatban az előzőekben tett azon megfigyelést támasztják alá, hogy a birkák immunizálására használt ConA-val kötődő frakcióban Oc-gal-GP volt jelen, és hogy az Oc-gal-GP ugyancsak egy "rejtett" antigén.

### **3. Vizsgálat**

#### **Annak igazolása, hogy az Oc-gal-GP egy bél membrán protein**

O. circumcincta-ból kriosztátos metszeteket készítettünk, és ezeket fluoreszcenciával kapcsolt földimogyoró lektinnel festettük. Intenzív fluoreszcenciát észleltünk a bél mentén, bár egy ez ideig nem azonosított belső szerkezet ugyancsak festődött kevésbé intenzíven (32. ábra). Mivel a földimogyoró lektin fajlagosan kötődik Oc-gal-GP-hez, ez az eredmény azt jelzi, hogy az

Oc-gal-GP egy bél membrán-protein.

### **9. Példa**

#### **Ekvivalens enzimek Trichostrongylus fajokban**

Kifejlett T. vitrinus extraktumának proteolitikus aktivitása pepsztatin jelenlétében 40 %-kal csökkent. Emellett egy proteolitikusan aktív dublett (molekulatömege mintegy 205 kD), amely nem-redukáló körülmények mellett zselatin szubsztrát gélen analizálva vált láthatóvá, aktivitása jelentősen csökkent pepsztatin jelenlétében. Ezek a megfigyelések azt jelzik, hogy a T. vitrinus ugyancsak tartalmaz aszpartil-proteináz aktivitást a Haemonchus és Ostertagia fajokhoz hasonlóan.

### **10. Példa**

**Annak igazolása, hogy a H-gal-GP egy neutrális endopeptidázt tartalmaz**

**1. H-gal-GP-vel kapcsolatos neutrális endopeptidáz-szerű aktivitás kimutatása**

#### **Módszerek**

A proteináz aktivitást mikrovizsgálati rendszerben azo-kazein szubsztrát alkalmazásával határoztuk meg. H-gal-GP-t (mintegy 5  $\mu\text{g}$  20  $\mu\text{l}$ -ben) 30 percig 37 °C hőmérsékleten előinkubálunk 200  $\mu\text{l}$  steril, pH = 7,0-ás inhibitorot nem tartalmazó (kontroll) vagy 1 mmól/l végkoncentrációban inhibitorot tartalmazó 0,1 mól/l-es foszfátpufferben. Az alkalmazott inhibitorokból 100  $\mu\text{mól/l}$ -es vizes törzsoldatokat készítünk, kivéve a 4-hidroxi-merkuri-benzoátot (4HMB) és a pepsztatint, amelyeket metanolban oldunk. A vizsgált inhibitorok ditiotreitól (DTT); L-cisztein; redukált glutation; 4HMB; N-etil-maleimid; EDTA; 1,10-fenantrolin és pepsztatin, amelyek mindegyikét a Sigma

cégtől szereztük be. Az előinkubálást követően a reakcióelegyekhez 20  $\mu$ l azokazeint (5 mg/ml steril desztillált vízben, Sigma) adunk, és az elegyet éjszakán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Párhuzamos vakmintákat készítünk, amelyek H--gal-GP helyett steril vizet tartalmaznak, a vakmintákat minden vizsgált inhibitorral elkészítjük, és a vizsgálatokat párhuzamos mérésekben végezzük. A reakció leállítását azonos térfogatú 1 mól/l-es perklórsav (BDH chemicals) hozzáadásával végezzük, és az elegyet 15 percig jégen tartjuk az emésztetlen proteinek kicsapására, majd ezeket mikrocentrifugán 11 000 g mellett végrehajtott rövid centrifugálással kiülepítjük. Meghatározzuk a felülúszó OD<sub>405</sub> értékét egy "Monarch" mikrocentrifugás analizátor (Instrumentation Laboratory, Warrington, UK) alkalmazásával. A megfelelő vakminták értékeinek levonása után a gátlás mértékét a kontroll reakcióhoz hasonlítottn megmaradó aktivitás százalékos értékében fejezzük ki.

## **2. A neutrális endopeptidázt kódoló lambda gt11 klónok izolálása és jellemzése**

### **1. Poli(A)+mRNS izolálása kifejlett férgekéből**

Kísérleti úton fertőzött birkák oltógyomrából nyert kifejlett *H. contortus*-t sóoldattal mosunk, és folyékony nitrogénben gyorsfagyasztunk. A fagyott parazitákat finom porrá őröljük mozsár és törő alkalmazásával, amelyeket -70 °C hőmérsékletre előhűtünk, majd a kapott port 5 ml extrakciós pufferben oldjuk (a puffer 4 mól/l guanidin-izotiocianátot, 25 mmól/l nátrium-citrátot, 0,5 tömeg/térfogat% szarkozilt és 0,7 térfogat% 2-merkaptoetanolt tartalmazó desztillált víz). Az oldathoz 5 ml fenol/kloroformot adunk, és 5 percig erőteljesen keverjük, majd

jégen 10 percreg inkubáljuk. A vizes és szerves fázisokat 10 000 g mellett 4 °C hőmérsékleten 30 percreg végzett centrifugálással elválasztjuk, a vizes fázist megőrizzük, és az RNS-t kicsapjuk belőle azonos térfogatú izopropanol hozzáadásával, és 1 órán át -20 °C hőmérsékleten való tárolással. Az elegyből az RNS-t kiülepítjük, extrakciós pufferben újra oldjuk, és az előzőekben leírt módon ismételten kiülepítjük. Az üledéket 70 %-os etanollal mossuk, szárítjuk, majd 0,5 ml steril desztillált vízben oldjuk.

A Poli(A)+mRNS-t oligo-dT-cellulóz-kromatográfiás úton, Efstratiadis és munkatársai [Cell, 7, 279-288 (1976)] által leírt eljárással izoláljuk. A poli(A)+mRNS-t etanollal kicsapjuk, szárítjuk, és 10-20 µl steril desztillált vízben újra oldjuk.

## 2. cDNS szintézis és λgt11 könyvtár készítése

Kettőszálú cDNS-t készítünk 1 µg poli(A)+mRNS-ből az Amersham cégtől beszerzett kit alkalmazásával a gyártó utasításai szerint. Az első szál szintézisét AMV reverz transzkriptázzal végezzük, a reakciót random hexanukleotid primerek alkalmazásával indítjuk. A második szál szintézisét RN-áz H és E. coli DNS polimeráz 1 alkalmazásával hajtjuk végre. Végül T4 DNS polimerázt alkalmazunk a cDNS tompa vég kialakítására. A cDNS-t λgt11 bakteriofágba (λgt11) ligáljuk Amersham kit (RPN 1280) alkalmazásával. Röviden összefoglalva, EcoR1 adaptorokat ligálunk a cDNS készletbe, a ligálatlan adaptor molekulákat gélszűrővel eltávolítjuk, és az 500 bázispárnál nagyobb cDNS-t megőrizzük a λgt11 karokba való ligálásra. Az "adaptált" cDNS végeket T4 polinukleotid kinázzal végrehajtott reakcióban foszfo-

riláljuk, és különböző mennyiségeit (100, 75, illetve 40 ng)  $\lambda$ gt11 karokba (1  $\mu$ g) ligáljuk. A ligációs elegyet in vitro burkoljuk (Boehringer), és alikvot részeit E. coli Y1090-en szélesztjük izopropil-tio-galaktopiranozid (IPTG) és 5-bróm-4-klór-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozid (X-gal) jelenlétében, hogy meg tudjuk határozni a rekombináns titert. Minden ligációs reakció mintegy  $2 \times 10^5$  rekombináns fágot eredményezett. A H-gal-GP komponenseket kifejező fágokat  $10^5$  rekombináns fág immunoszkrinelésével választottuk ki birka anti-H-gal-GP antiszérum alkalmazásával (lásd a következőkben).

### 3. Immunoszkrinelés

A  $\lambda$ gt11 cDNS expressziós könyvtárat 90 mm-es Petri-csészékben E. coli Y1090 tenyészetben szélesztjük 1000 fág/liter agar/ampicillin lemez sűrűségben. A lemezeket 42 °C hőmérsékleten inkubáljuk addig, míg a plakkok éppen láthatók (4 óra), majd 10 mmól/l IPTG-vel telített és levegőn szárított nitrocellulóz szűrőkkel felülrétegezzük. A szűrőkkel ellátott lemezeket 37 °C hőmérsékleten éjszakán át inkubáljuk. A következő napon a szűrőket eltávolítjuk, TBST-ben (50 mmól/l trisz-bázis, 150 mmól/l NaCl, pH = 8,0, 0,05 térfogat% Tween-20) kimerítően mossuk, majd 5 %-os TBST-ben készült lószérummal 1 órán át inkubálva blokkoljuk. A szűrőket ezután 5 % lószérumot tartalmazó TBST-vel 1/500 arányban hígított birka anti-H-gal-GP antiszérummal 4 órán át inkubáljuk. További alapos TBST-vel történő mosás után a szűrőket peroxidázzal konjugált ló antibirka immunoglobulin antiszérummal (1/200 TBST-ben) 2 órán át inkubáljuk, mossuk, majd az immunpozitív fágokat DAB kifejlesztő oldattal (10 mg diamino-benzidin-HCl 50 ml vízben, amely 50  $\mu$ l

30 %-os hidrogén-peroxidot tartalmaz, Sigma) inkubálva láthatóvá tesszük. Az immunpozitív plakkokat kivágjuk, és újra szélesztjük, a plakk tisztaság biztosítására egymást követő újraszélesztés/immunszkrínelési ciklusokat végzünk.  $10^5$  fág szkrínelésével 7 pozitív fagot találtunk. Ezeket antitest eluálással tovább vizsgáltuk.

#### **4. Antitest eluálás**

A rekombináns fágokat  $10^3/90$  mm-es lemez sűrűségben szélesztjük E. coli Y1090-en, és  $42\text{ }^\circ\text{C}$  hőmérsékleten 4 órán át inkubáljuk. Ezeket ezután IPTG-vel telített nitrocellulóz szűrőkkel fűtetegezzük, és éjszakán át  $37\text{ }^\circ\text{C}$  hőmérsékleten inkubáljuk. Ezután a szűrőket eltávolítjuk, TBST-vel kimerítően mossuk, majd birka anti-H-gal-GP szérummal 4 órán át inkubáljuk. A megkötött antitesteket kétszer 2 percen át eluáló pufferrel (5 mmól/l glicin, 500 mmól/l NaCl, 0,2 % Tween 20, pH 2,3) eluáljuk. A kapott 4 ml antitest oldatot  $200\text{ }\mu\text{l}$  pH = 7,4-es, 1 mól/l-es Trisz-HCl hozzáadásával semlegesítjük, TBS-ben készült (TBST a Tween 20 kihagyásával) 5 %-os lószérummal háromszorosan hígítjuk, és éjszakán át 7,5 %-os SDS-PAGE géleken elválasztott H-gal-GP csíkok Western blotjával inkubáljuk. Az ezt követő mosási eljárás, egy második antitesttel való inkubálás és DAB oldattal való láthatóvá tétel az előzőekben leírtak szerint történik.

#### **5. Immunpozitív fágok cDNS inszertjeinek sokszorozása**

##### **polimeráz láncreakcióval (PCR) és Southern blot készítése**

Preparatív mennyiségű inszertált cDNS-t nyertünk PCR sokszorozással  $\lambda$ gt11-ben az EcoR1 klónozó helyet határoló régióra irányuló primerek alkalmazásával [Saiki és munkatársai,

Science 239, 487-491 (1988)]. Röviden, a fág részecskéket a kimetszett plakkokból 0,5 ml-es Eppendorf csőben lévő 50  $\mu$ l steril desztillált vízbe eluáljuk. Egy rövid fagyasztás/felolvasztási ciklus után 25 ml felülúszót használjunk fel a PCR reakcióban, amelyet Saiki és munkatársai (1988) által leírt módon hajtunk végre. A primereket 55 °C hőmérsékleten illesztjük. A PCR termékeit 0,8 %-os agaróz gélekben vagy 7,5 %-os folytonos poliakrilamid-gél lemezeken frakcionáljuk, és a termékeket etidium-bromid festéssel (agaróz esetén) vagy ezüst festéssel (poliakrilamid esetén) tesszük láthatóvá.

Ezen kívül a cDNS inszertek PCR sokszorozásának termékeit agaróz géleken frakcionáljuk és nylon membránokra Southern blotokat készítünk (Hybond-N, Amersham) a Maniatis és munkatársai által leírt kapilláris transzfer alkalmazásával [Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory, 1982]. A HG3 fág PCR sokszorozásával 100 ng DNS-t készítünk a blot próbájára az előbbieken leírt módon, és digoxigenin módszerrel jelezzük a gyártó utasítása szerint (nukleinsav jelző és kimutató kit, Boehringer). A hibridizálást nagy sztringenciájú körülmények mellett hajtjuk végre (5 x SSC, 0,5 tömeg/térfogat% blokkoló reagens, 0,1 tömeg/térfogat% N-lauril-szarkozin, 0,02 tömeg/térfogat% 50 %-os formamidos SDS) 42 °C hőmérsékleten éjszakán át. A próba DNS-t 25 ng/ml végkoncentrációnak megfelelő mennyiségben adjuk a hibridizáló oldatba. Nagy sztringenciájú mosást követően (a végső mosás 0,1 X SSC, 0,1 % SDS 15 percig 65 °C hőmérsékleten) a hibridizálást immunológiai detektálással, lúgos foszfátázzal konjugált anti-digoxigenin alkalmazásával és enzimesen katalizált szín-reakcióval

(Boehringer) láthatóvá tesszük.

### **6. Szekvencia analízis**

PCR eljárással sokszorozott cDNS inszerteket PCR 1000 vektorba (In-Vitrogén) szubklónozzuk a gyártó utasítása szerint. A DNS szekvenciát a didezoxi láncterminációs eljárással határozzuk meg [Sanger és munkatársai, Proceedings of National Academy of Science 79, 5463-5467 (1977)]. A szekvenálási reakciókat Pharmacia T7 szekvenáló kit alkalmazásával végezzük, és a primer illesztést és a szekvencia reakciókat pontosan a kitben részletezett utasítások szerint hajtjuk végre. A reakció termékeit 50 % karbamidtartalmú 6 %-os poliakrilamid géllemezeken frakcionáljuk trisz/acetát/EDTA futtató pufferrel 6 órán át 50 W konstans áram mellett. Az elektroforézist követően a géleket ecetsav:metanol:víz 5:5:90 arányú elegyében áztatjuk 40 percig, Whatman 31 szűrőpapíron szárítjuk, majd a szétvált DNS fragmentumokat autoradiográfiás eljárással szobahőmérsékleten mutatjuk ki egy éjszaka alatt. A DNS és az ebből következő aminosav-szekvenciákat a már ismert, a GENBANK és az EMBL adatbázisokban szereplő szekvenciákkal hasonlítjuk össze.

A következőkben eredményeinket ismertetjük.

#### **1. H-gal-GP-ben lévő neutrális endopeptidáz - biokémiai kimutatás**

A H-gal-GP-vel kapcsolatos neutrális endopeptidáz-szerű aktivitást azokazein szubsztrát alkalmazásával, proteínáz inhibitorok eltérő érzékenysége révén mutattuk ki. Egy jellemző analízis eredményeit a 9. táblázatban mutatjuk be.

## 9. Táblázat

**Azokazein proteolízisének érzékenysége H-gal-GP alkalmazásával  
pH = 7-nél különböző proteináz inhibitorok mellett**

<u>Inhibitor</u>	<u>Maradék aktivitás %</u>	
Inhibitor nélküli kontroll	100	100
Ditiotreitol	48	44
Cisztein	0	0
Glutation	87	85
4-hidroxi-merkuri-benzoát	88	91
N-etil-maleimid	74	77
EDTA	25	10
1,10-fenantrolin	26	23
pepszatin	75	85

A százalékos gátlást az inhibitor nélküli kontrollhoz hasonlított maradék aktivitás százalékában adjuk meg. Azonos H-gal-GP tétel alkalmazásával végzett két különböző analízis eredményeit adjuk meg.

Az enzimaktivitást az EDTA kelátképzőszer, az 1,10-fenantrolin, valamint a cisztein és ditiotreitol tiol-reagensek gátolták. Az aktivitás lényegében változatlan maradt 4-hidroxi-merkuri-benzoát, N-etil-maleimid, pepszatin és glutation alkalmazásakor. Ez a gátlási profil a korábban az emlősökből származó neutrális endopeptidázokra leírt profillal konzisztens [Kenny közleménye a Proteinases in mammalian cells and tissues, szerkesztő: Barrett, A.J., 1977, Elsevier szakirodalmi helyen].

## 2. H-gal-GP pozitív $\lambda$ gt11 rekombinánsok molekula analízise

$10^5$   $\lambda$ gt11 rekombináns immunszkrínelésével 7 immunpozitív fagot találtunk. Antitest elúciós vizsgálatok azt mutatták, hogy

csak a HG3 jelölésű rekombináns fágról eluált antitestek ismerték fel egyértelműen a H-gal-GP-t redukáló SDS-PAGE gélekről készült Western blot csíkokon. A nem-rekombináns  $\lambda$ gt11-ről eluált antitest nem ismerte fel a H-gal-GP komponenseket, ami a HG3 reakció fajlagosságát mutatja. Sokszorozott HG3 DNS inszertet használtunk olyan DNS inszert Southern blot próbájához, amelyet más immunpozitív plakkokról sokszoroztunk, és rekombináns HG11 pozitív hibridizációs jelet adott. A HG3 és HG11 cNDS inszertek mérete 212, illetve 1019 bázispár.

A HG3 nukleotid szekvenciáját (33. ábra) és aminosav szekvenciáját (34. ábra) egészében meghatároztuk. A HG3 33 %-os azonosságot és 65 %-os hasonlóságot mutatott humán neutrális endopeptidázzal, azaz egy igen szignifikáns homológiát. A HG11 szekvencia analízise folyamatban van, de a HG3-nek megfelelő régiót azonosítottuk, ez 96 %-os azonosságot mutat nukleotid szinten. Ezért a HG11 a HG3 egy variánsának tűnik. Az ilyen variáció lehet a különböző törzsek közötti természetes biológiai variáció jelenlétének következménye, vagy adódhat a férgek különböző életciklus szakaszai folytán. Továbbá létezhet többféle enzimforma (izoenzimek), amelyek a parazita fejlődése folyamán vagy különböző eredetű törzsek esetén különbözőképpen fejeződhetnek ki.

#### **11. Példa**

**Neutrális endopeptidázokat kódoló gének létének kimutatása különböző metazoon parazitákban; HG11 klón hibridizálása EcoRI-vel emésztett metazoon paraziták genom DNS-ébe**

Különböző metazoon parazitákból (Haemonchus, Lucilia, Nematodirus és Boophilus) genom DNS előállítására az egyes para-

zitákból 2-2 g mennyiséget folyékony nitrogénben gyorsfagyasztunk, és folyékony nitrogénben finom porrá őrlünk. A port lassan hozzáadjuk 25 ml lizáló pufferhez (0,05 mól/l Trisz-HCl, pH = 8,0, 0,1 mól/l EDTA, 1 tömeg/térfogat% szarkozil, 0,05 mg/ml proteináz K), és az elegyet 2 órán át 65 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A szuszpenziót ezután kétszer extraháljuk 1-1 térfogat fenol + kloroform eleggyel, ezután kétszer két térfogat kloroformmal, majd etanollal kicsapjuk. A csapadékot ezután 20 ml Trisz, EDTA pufferben (TE, pH = 8,0) újra szuszpendáltuk, éjszakán át 4 °C hőmérsékleten rázógépen rázzuk, majd kétszer váltott 1 liter TE-vel szemben dializáljuk. Az RNS-t DN-áz-mentes RN-áz A I típus (Sigma) alkalmazásával 20 µg/ml végkoncentráció mellett 1 órán át 37 °C hőmérsékleten végzett inkubálással eltávolítjuk, majd az elegyet fenol és kloroform elegyével egyszer, és kloroformmal egyszer extraháljuk, majd etanollal az előbbieket szerint kicsapjuk. Az üledéket 70 térfogat%-os etanollal kétszer mossuk, majd 1 ml TE-ben az előzőek szerint újra szuszpendáljuk.

5 µg genom DNS-t éjszakán át 37 °C hőmérsékleten EcoRI-vel emésztünk, majd gélsávonként 5 µg mennyiséget 1 tömeg/térfogat%-os agaróz gélen Trisz-acetát pufferben elektroforézissel elválasztunk. A gélről kapilláris transzferrel [Maniatis és munkatársai, (1982) eljárásával] Hybond-N membránra (Amersham International) Southern blottot készítünk. A DNS-t a membránra ultraibolya fényel rögzítjük a gyártó ajánlásai szerint.

A HG11 klónt SacI-vel és BamHI-vel emésztjük, majd a kapott anyagot elektroforézissel szétválasztjuk, egy 750 bázispár nagyságú fragmentumot nyerünk. Az inszertet <sup>32</sup>P-dCTP izotóppal

jelezzük Nick transzlációs kit alkalmazásával (Promega Biotech) a gyártó utasításai szerint. A jelzett DNS-t a be nem épült jelző anyagtól spin oszlopkromatográfiás eljárással választjuk el.

A Southern blot-ot hibridizációs oldatban (6X SSC, 50 % formamid, 5X Denhardt oldat, 0,1 % SDS) előhibridizáljuk 3 órán át 28 °C hőmérsékleten, majd mérsékelt sztringens körülmények mellett hibridizáljuk izotóppal jelzett próba jelenlétében 28 °C hőmérsékleten. A blotot szobahőmérsékleten 10 percig mossuk, majd 42 °C hőmérsékleten 1 órán át egy második mosást végzünk, mindkettőt 2X SSC, 0,1 % SDS alkalmazásával. Autoradiográfiás műveletet követően a blotot a próbától 30 perces 42 °C hőmérsékleten 0,4 n nátrium-hidroxidban végzett inkubálás révén elválasztjuk. A próba eltávolítását éjszakán át végzett autoradiográfiás művelettel igazoljuk.

A blotot ezután alacsony sztringenciájú körülmények mellett azonos próbával újra hibridizáljuk. Az előhibridizálást és a hibridizálást az előzőekben leírtak szerint végezzük, azzal az eltéréssel, hogy 24 °C hőmérsékletet alkalmazunk. A mosási műveleteket is az előzőekben leírtak szerint végezzük, azzal az eltéréssel, hogy a második mosást 24 °C hőmérsékleten 30 percig folytatjuk.

A HG11 próba alkalmazásával készült Southern blot azt mutatta, hogy nemcsak a Haemonchus eredetű DNS-hez történt kötődés, hanem más Haemonchus, Lucilia, Nematodirus, Boophilus meta-zoon parazitákhoz is, amint az a 35. ábra 1-4. gélsávjain látható. Ezt igazoltuk mind mérsékelt, mind alacsony sztringenciájú körülmények mellett végrehajtott hibridizálással is.

### Szabadalmi igénypontok

1. Egy vagy több metazoon parazitával szemben védő antigén aktivitással bíró védő metazoon parazita antigén vagy antigén fragmentumok, komponensei vagy prekursorai és funkciósan ekvivalens származékai, analógjai vagy variánsai, amely antigénre a pepsztatin-kötő képesség jellemző, és amely antigén natív formában egy integráns membrán protein vagy protein komplex.

2. Az 1. igénypont szerinti antigén, antigén fragmentum, komponens, prekursor vagy funkciósan ekvivalens származéka, analógja vagy variánsa, azzal jellemezve, hogy az előzőekben leírt jellemzőkön túlmenően

(a) proteolitikus aktivitással is bír;

(b) natív formájában a parazita belének bél-kefhatárában helyezkedik el; és

(c) búzacsíra lektinhez és  $\beta$ -kötésű N-acetil-galaktózaminra fajlagos lektinekhez való kötődésre képes.

3. Az 1. igénypont szerinti antigén, antigén fragmentum, komponense vagy prekursora, vagy funkciósan ekvivalens származéka, analógja vagy variánsa, amely natív állapotban ConA, borsó, lótosz, *Helix pomatia*, földimogyoró és jakalin lektinek kötésére képes.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti antigén, antigén fragmentum, komponense vagy prekursora vagy funkciósan ekvivalens származéka, analógja vagy variánsa, azzal jellemezve, hogy az antigén aszpartil-proteináz-szerű és/vagy neutrális endopeptidáz-szerű aktivitással bír.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti antigén, antigén fragmentum, komponense vagy prekursora vagy funkciósan ekviva-

lens származéka, analógja vagy variánsa, amely a Haemonchus, Ostertagia vagy Trichostrongyles nemzetségbe tartozó férgекből nyerhető.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti antigén, antigén fragmentum, komponense vagy prekuzora vagy funkciósan ekvivalens származéka, analógja vagy variánsa, amely az 1. táblázatban bemutatott molekulatömeg megoszlással bír SDS-PAGE vizsgálattal elemezve, vagy ennek komponense.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti antigén, antigén fragmentum, komponense vagy prekuzora vagy funkciósan ekvivalens származéka, analógja vagy variánsa, amely antigén a Haemonchus sp. beléből nyerhető, molekulatömege mintegy 190-205 kD SDS-PAGE eljárással 5 %-os gélen nem-redukáló körülmények között meghatározva, vagy 35 vagy 45 - 50 kD SDS-PAGE eljárással 10 %-os gélen nem-redukáló körülmények között meghatározva.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti antigén, antigén fragmentum, komponense vagy prekuzora vagy funkciósan ekvivalens származéka, analógja vagy variánsa alkalmazása emberben vagy nem-ember állatban metazoon paraziták elleni immunválasz fokozására.

9. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti metazoon parazita antigén, antigén fragmentum, komponense, prekuzora vagy funkciósan ekvivalens származéka, analógja vagy variánsa alkalmazása emberben vagy nem-ember állatban metazoon paraziták elleni immunválaszt fokozó vakcina készítmény előállítására.

10. Vakcina készítmény metazoon paraziták elleni immunválasz fokozására emberben vagy nem-ember állatban, amely vakcina készítmény egy vagy több, az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti antigént, antigén fragmentumot, komponensét, prekuzorát vagy

funkciósan ekvivalens származékát, analógját vagy variánsát tartalmazza gyógyászati szempontból elfogadható hordozó- vagy hígítóanyaggal együtt.

11. A 10. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a 10. igénypont szerinti antigének közül egyet vagy többet tartalmaz egy vagy több további antigénnel együtt, amely lehet H110D vagy H45 antigén vagy ezek komponensei.

12. Olyan antitest- vagy antigén-kötő fragmentum, amely az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti antigén, antigén fragmentum, komponense vagy prekuzora vagy funkciósan ekvivalens származéka, analógja vagy variánsa vagy az előbbi antigén-kötő antitest idiotipje szelektív kötésére képes.

13. Eljárás ember vagy nem-ember állat metazoon parazita fertőzés elleni immunizálására szolgáló vakcina előállítására, azzal jellemezve, hogy a parazitából legalább egy, az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti védő antigént tartalmazó extraktumot készítünk, ebből az antigént az antigént fajlagosan kötő partnert tartalmazó immobilizált fázison való kötéssel tisztítjuk, majd az antigént az immobilizált fázisról eluáljuk.

14. Eljárás védő antigének azonosítására metazoon parazitákban, azzal jellemezve, hogy a parazita integráns membrán frakcióját affinitás-kromatográfiás eljárásnak tesszük ki olyan immobilizált fázis alkalmazásával, amely egy vagy több N-acetil-galaktózaminra fajlagos lektint hordoz.

15. A 13. vagy 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fajlagos kötődő partner vagy lektin földimogyoró vagy jakalin lektin.

16. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti antigént, antigén fragmentumot, komponensét vagy prekuzorát, vagy funkciósan

ekvivalens származékát, analógját vagy variánsát kódoló nukleotid szekvenciát tartalmazó nukleinsav molekula.

17. A 16. igénypont szerinti nukleinsav molekula, azzal jellemezve, hogy egy vagy több olyan nukleotid szekvenciát tartalmaz, amely lényegében megfelel a 33. ábrán bemutatott nukleotid szekvencia egészének vagy egy részének, vagy egy olyan szekvenciának, amely degenerátja vagy lényegében homológja a fenti szekvenciának, vagy ezzel a szekvenciával hibridizálódásra képes.

18. A 16. vagy 17. igénypont szerinti nukleinsav molekulát tartalmazó expressziós vagy klónozó vektor.

19. A 16. vagy 17. igénypont szerinti nukleinsav molekulát tartalmazó gazdasejt vagy transzgénes organizmus.

20. Eljárás az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti antigén, antigén fragmentum, komponense vagy prekuzora, vagy funkciósan ekvivalens származéka, analógja vagy variánsa előállítására, azzal jellemezve, hogy az említett antigén egészét vagy egy részét kódoló nukleinsav molekulát tartalmazó gazdasejtet olyan körülmények között tenyésztünk, amelyek mellett az antigén kifejeződik, és az így képződött antigént kinyerjük.

21. Egy vagy több metazoon parazita ellen védő antigén aktivitással bíró védő metazoon parazita antigén vagy antigén fragmentum, komponense vagy prekuzora, vagy funkciósan ekvivalens származéka, analógja vagy variánsa, azzal jellemezve, hogy az antigén aszpartil-proteináz-szerű és/vagy neutrális endopeptidáz-szerű aktivitással bír, és natív formában egy integráns membrán protein vagy protein komplex.

22. Egy vagy több metazoon parazita ellen védő antigén aktivitással bíró védő metazoon parazita antigén vagy antigén

fragmentum, komponens vagy prekuzora, vagy funkciósan ekvivalens származéka, analógja vagy variánsa, azzal jellemezve, hogy ez az antigén Haemonchus sp. beléből nyerhető integráns membrán protein vagy protein komplex vagy ennek egy része, és molekula-tömege SDS-PAGE eljárással 5 %-os gélen nem-redukáló körülmények között meghatározva mintegy 190 - 205 kD, 10 %-os gélen nem-redukáló körülmények között meghatározva mintegy 35 vagy 45-50 kD.

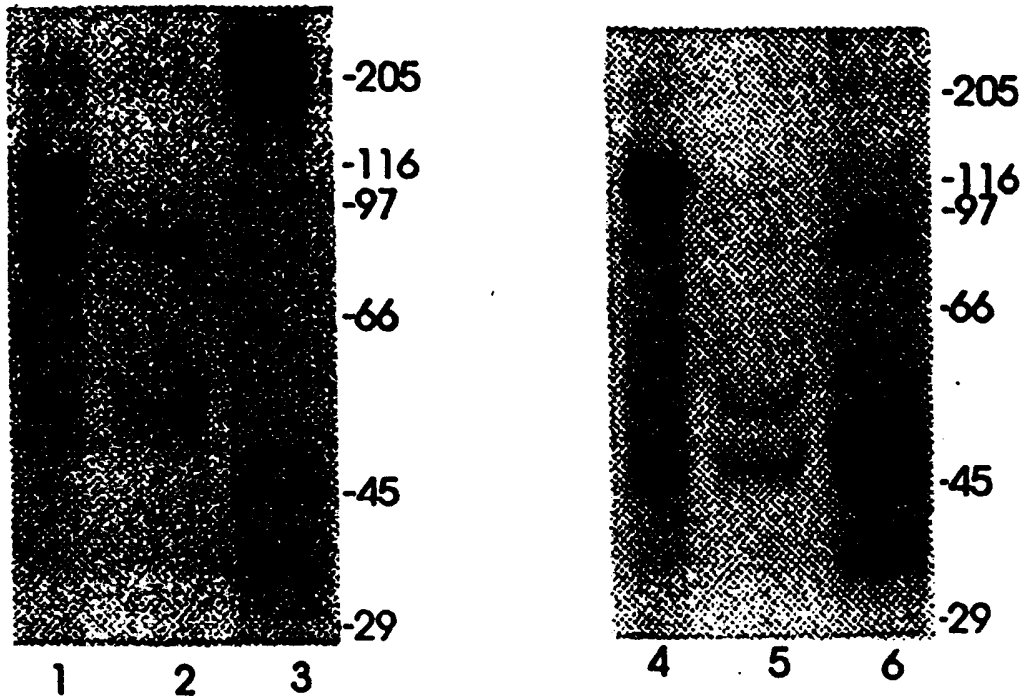
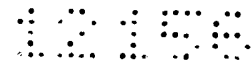
8. fejezet  
4.29. cikk  
-----  
M. K. Kft.  
Léte.

A meghatalmazott:

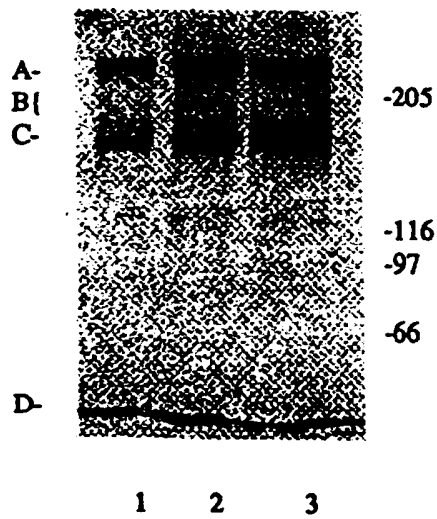
Szabadalmi Kft.  
Válas Györgyné dr.

szabadalmi ügyvivő

199500185

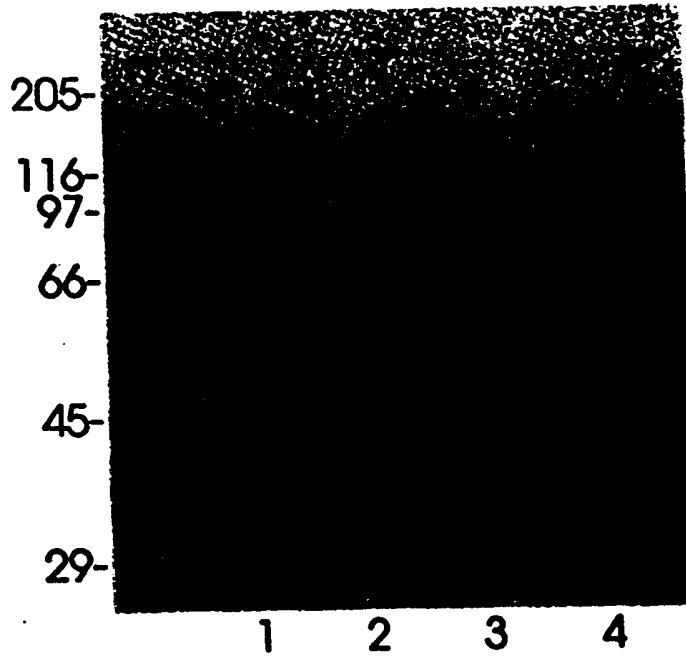


1. ábra

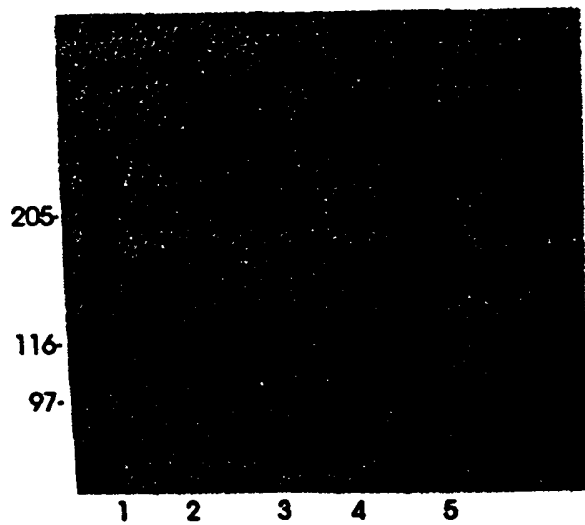


2. ábra

12 Kft.  
Véha



3. ábra

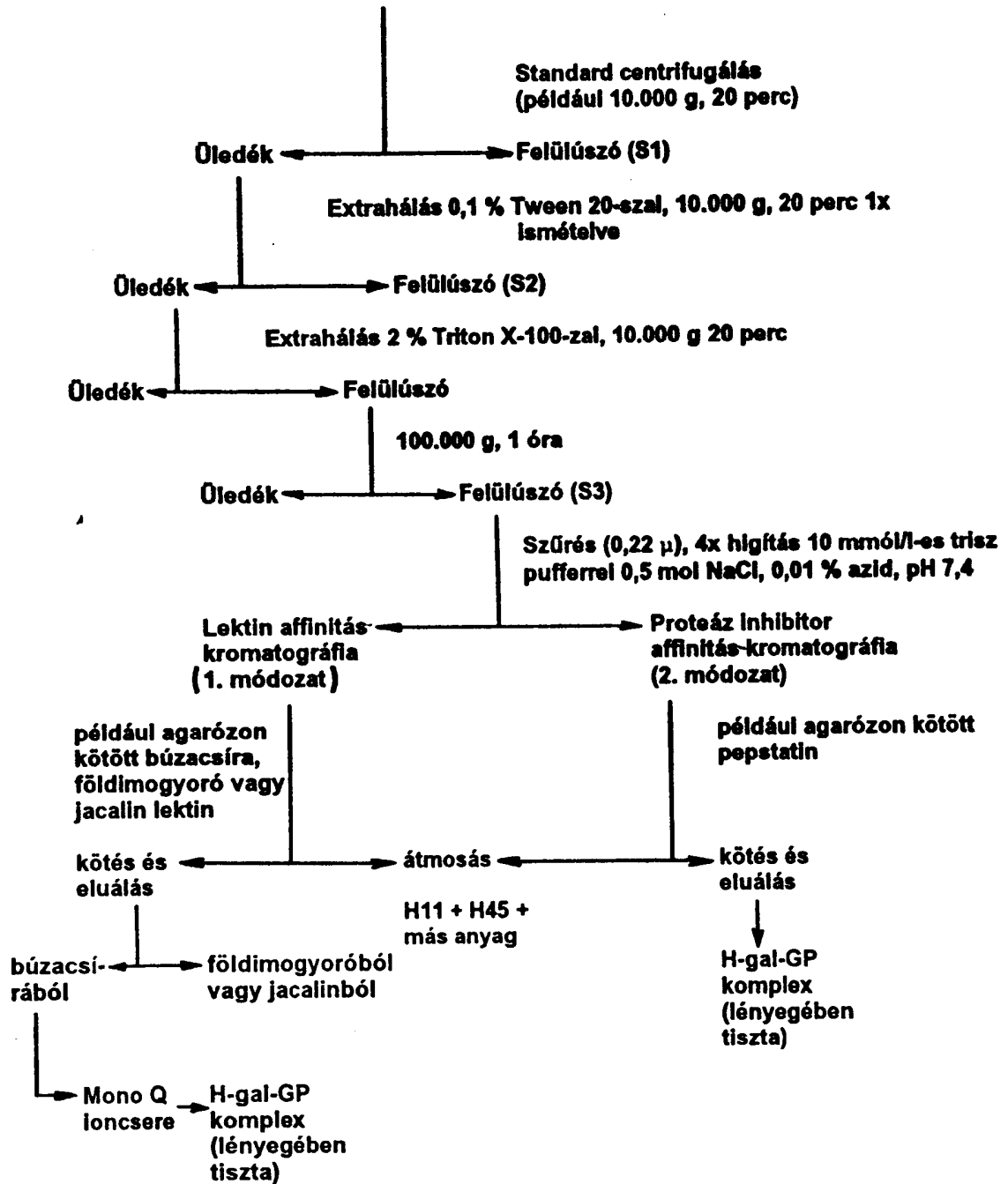


6. ábra

Szabó  
Válasz  
Kft.

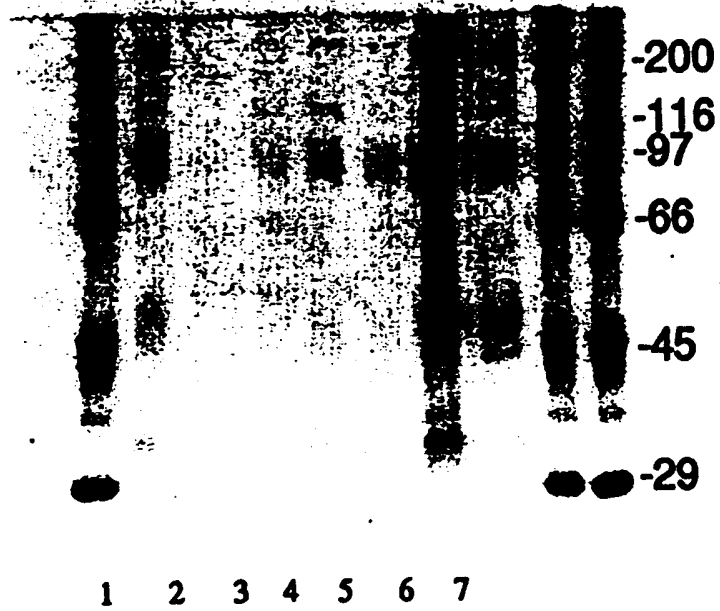
A H-gal-GP komplex előállítására szolgáló két módszer folyamatábrája

Kifejlett Haemonchus homogenizátuma PBS-ben + proteáz inhibitorok

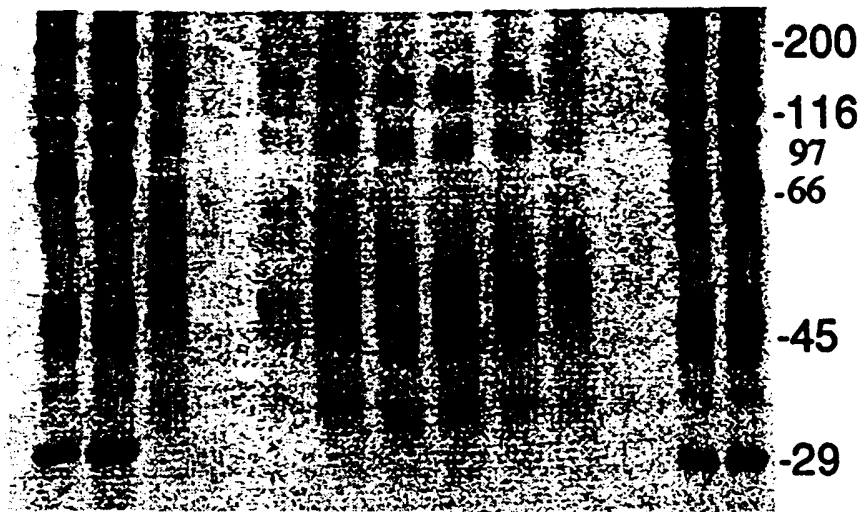


4. ábra

*Válasz*

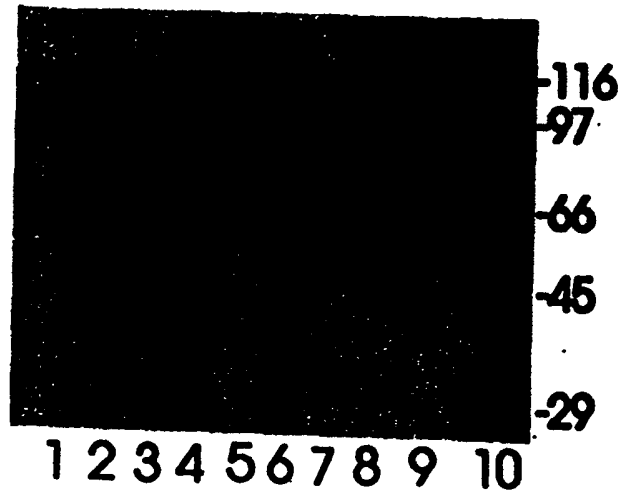


5A ábra



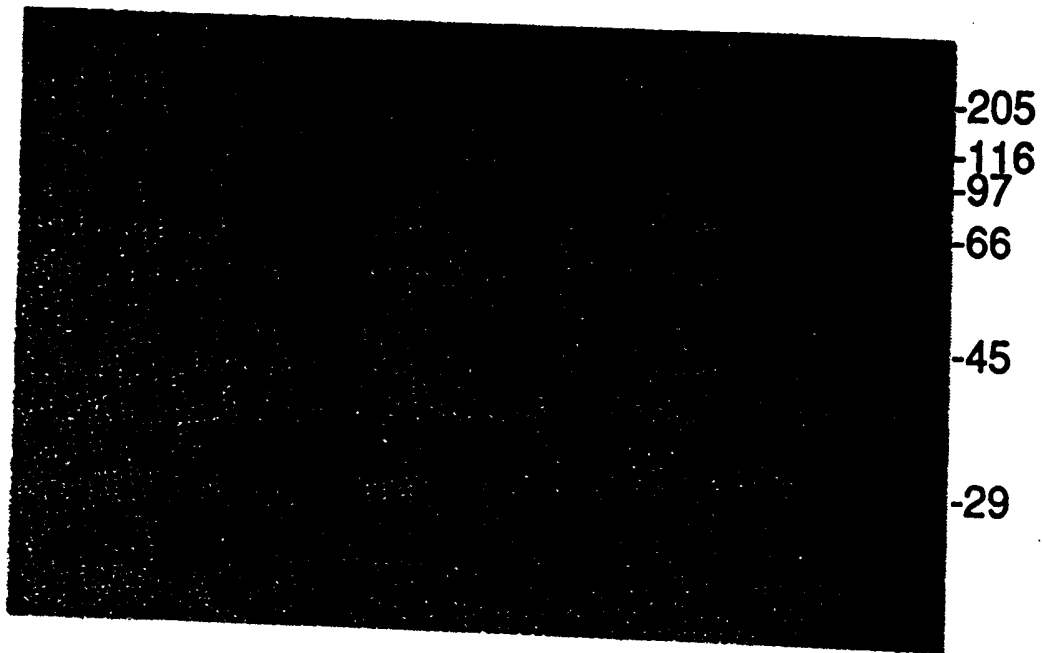
5B ábra

Szabó  
Véha



7. ábra

FIG. 12



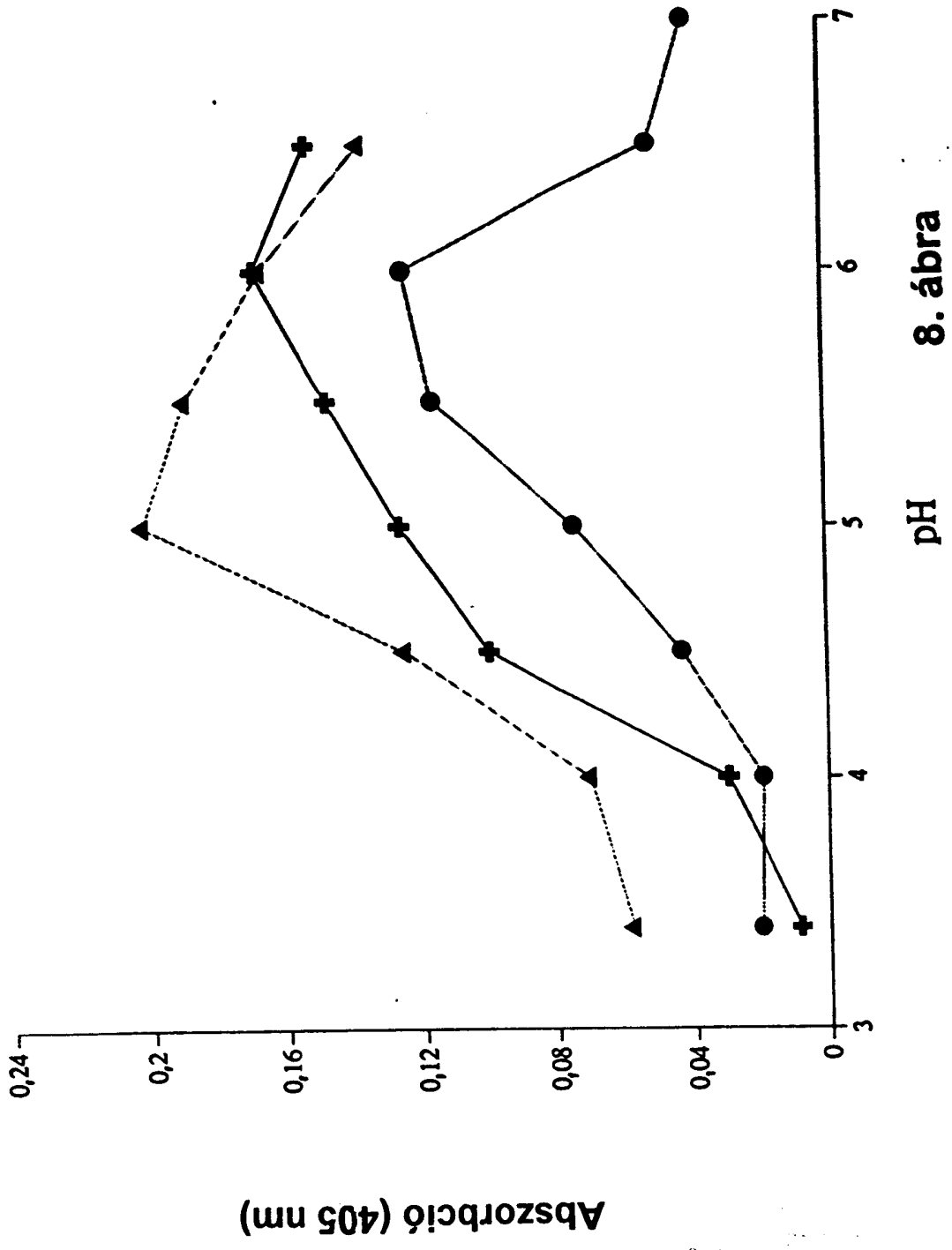
1 2 3 4 5

12. ábra

Szabó

la Kft.

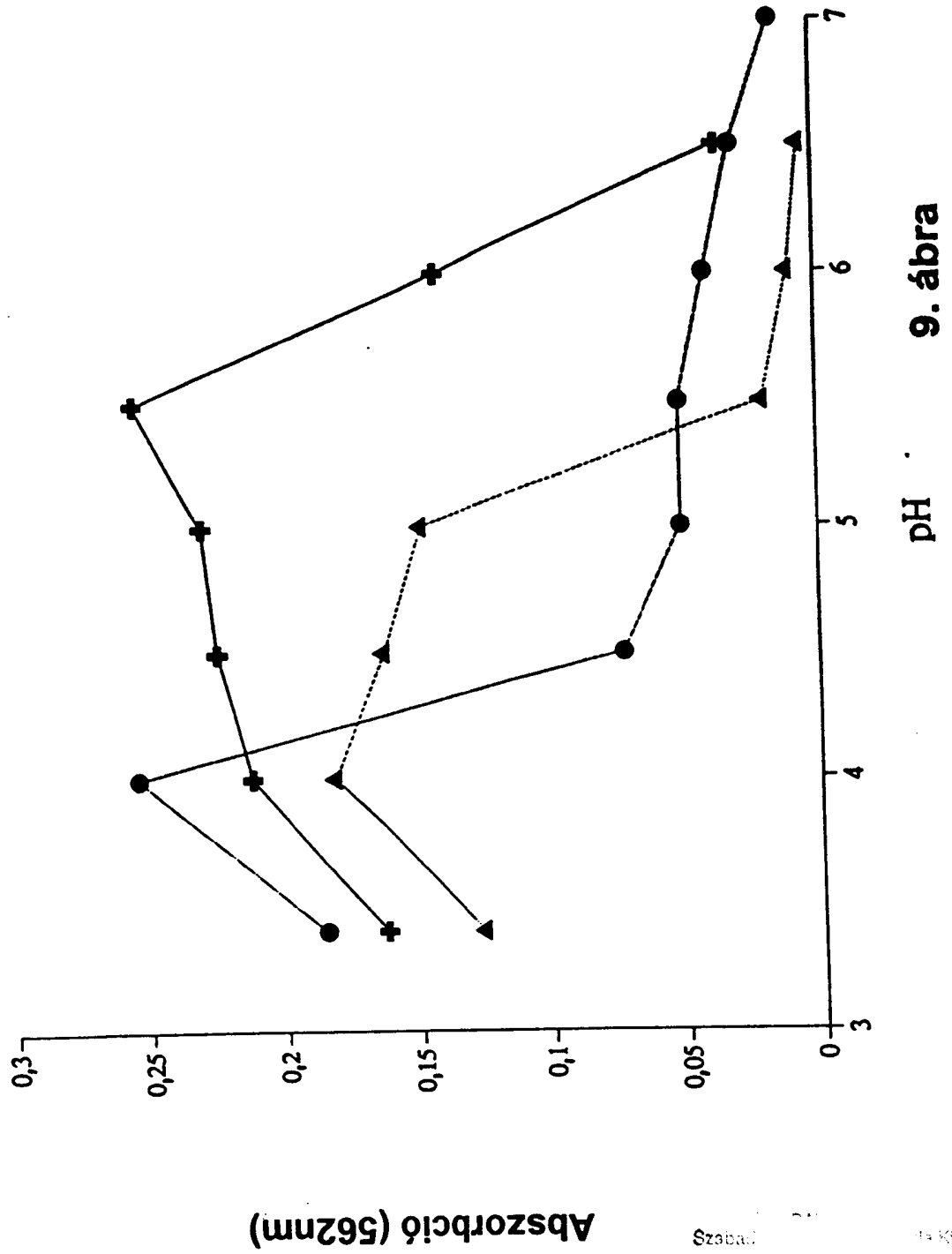
Válasz



8. ábra pH

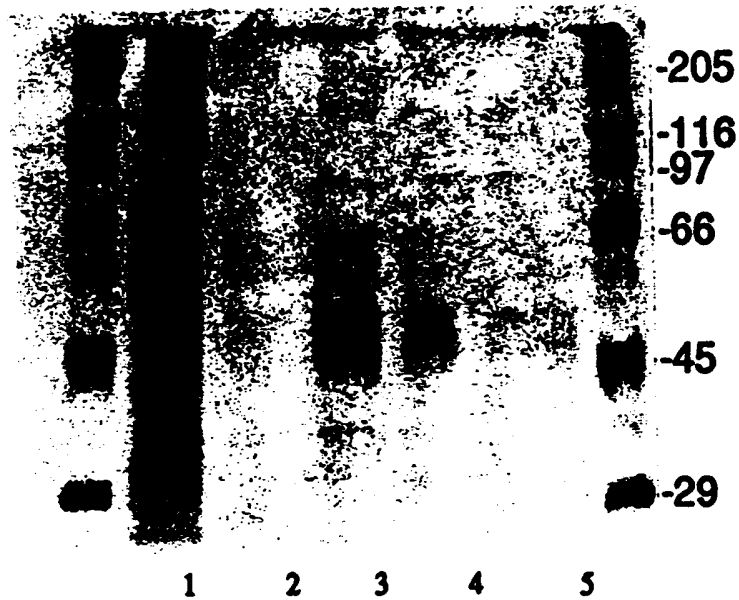
Abszorbcio (405 nm)

Szoba:   
 Válasz   
 Kft.

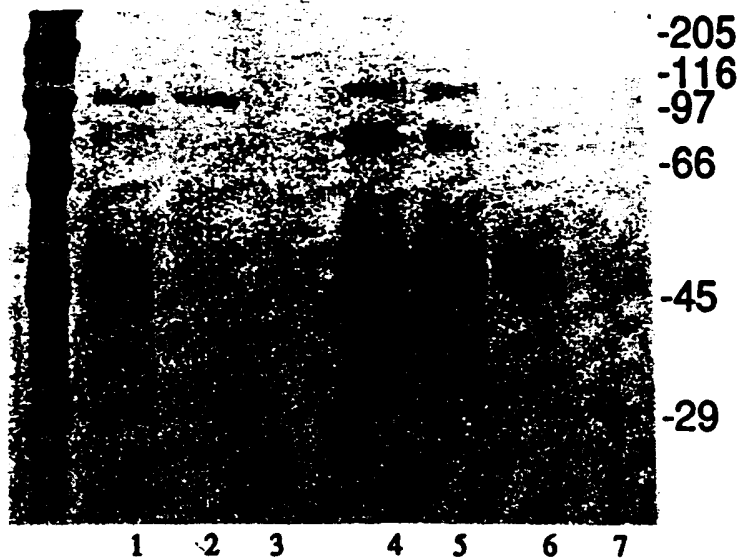


Szabó  
Véles

9. ábra



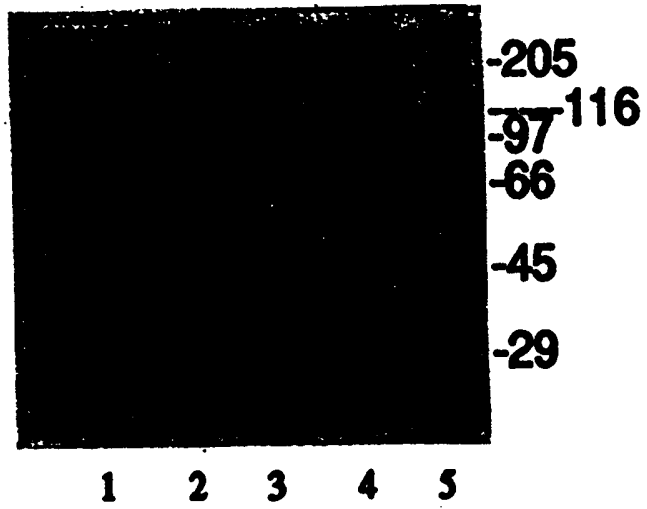
10. ábra



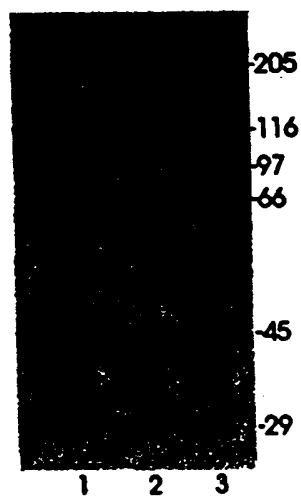
11. ábra

Szabó Kft.

Válasz



13 ábra



18. ábra

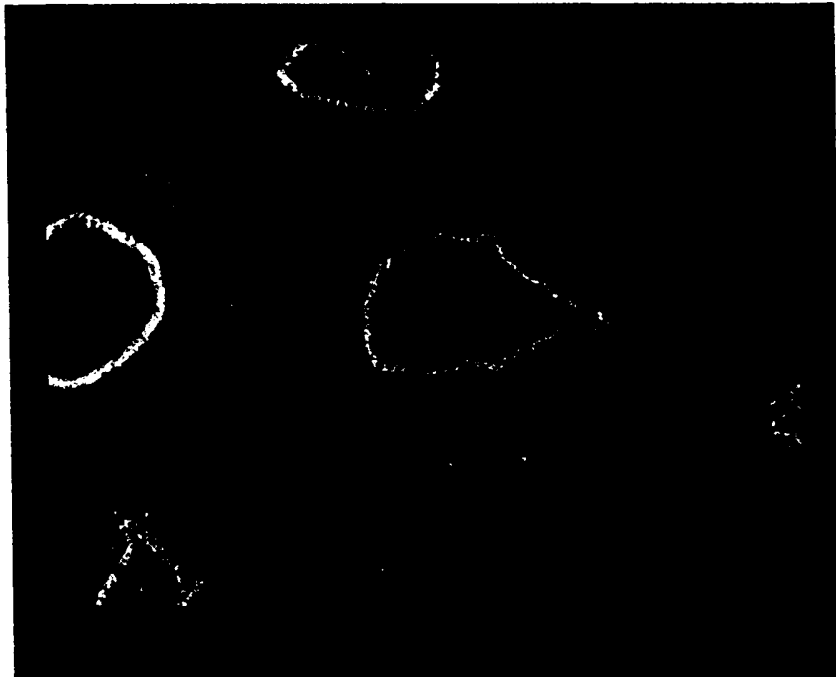
Szabad

to KIT.

Vélos d-



14. ábra



15. ábra

Szabasi

la Kft.

Válla

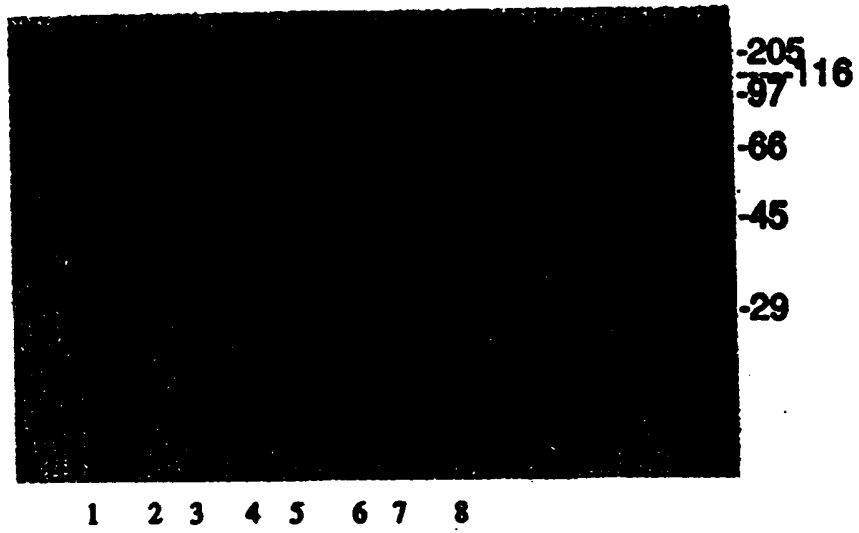


16. ábra

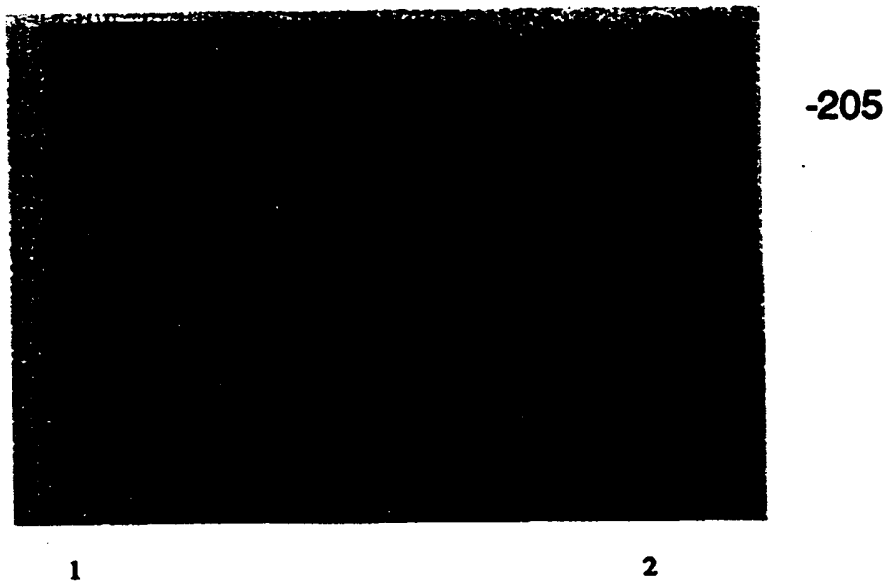


17. ábra

Válasz



19. ábra



21. ábra

Számad

to Kft.

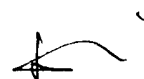
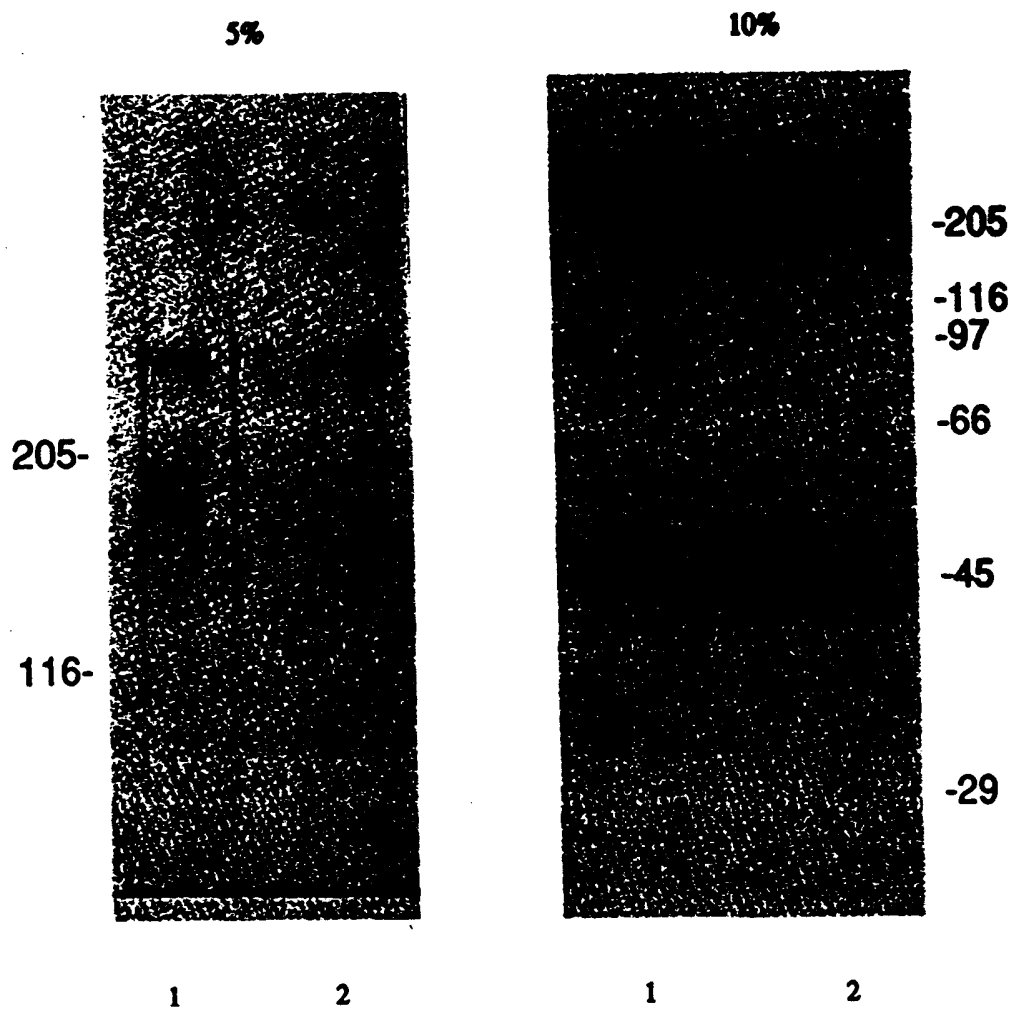
Uábe 

FIG. 20

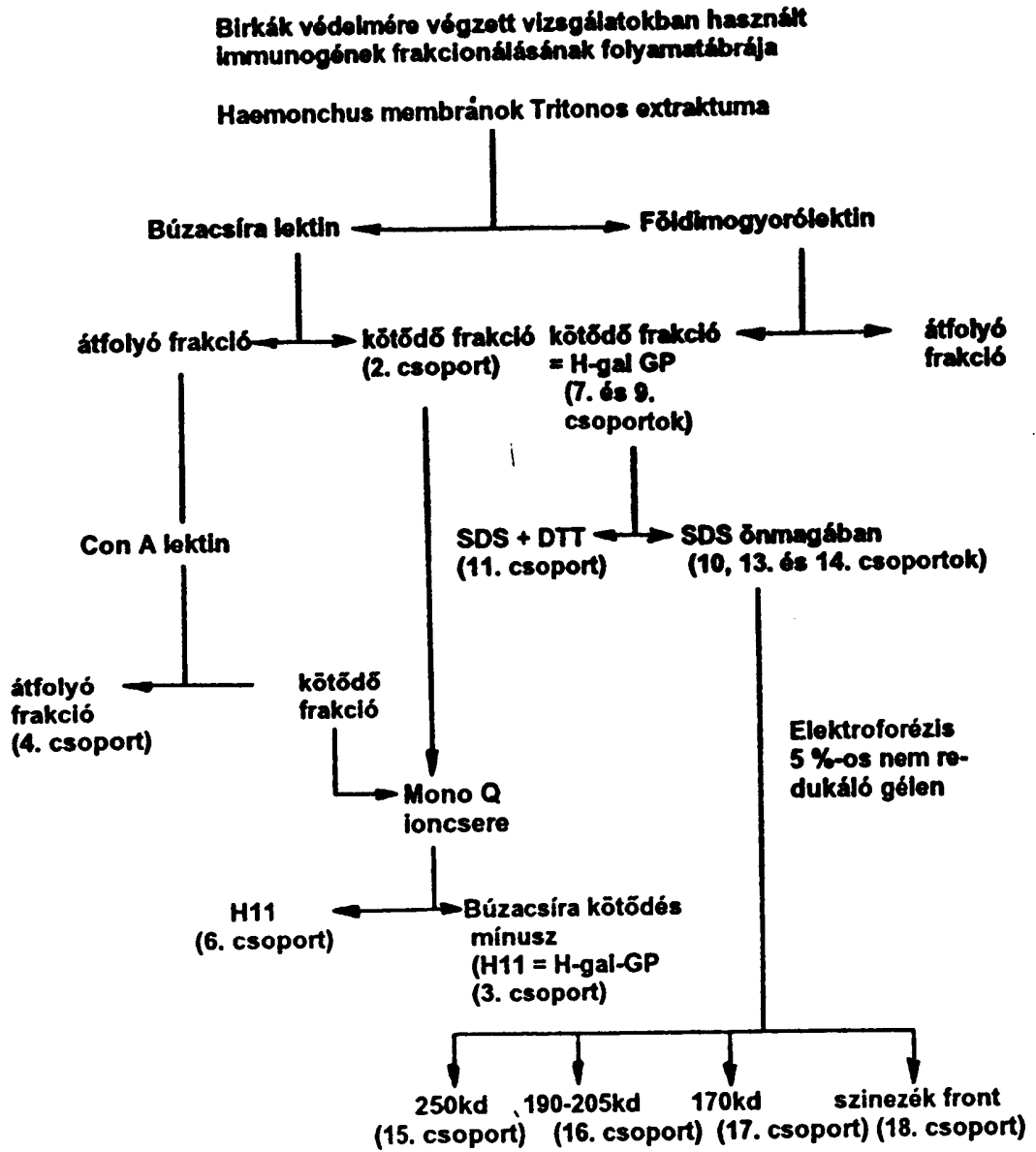


20. ábra

Szabó

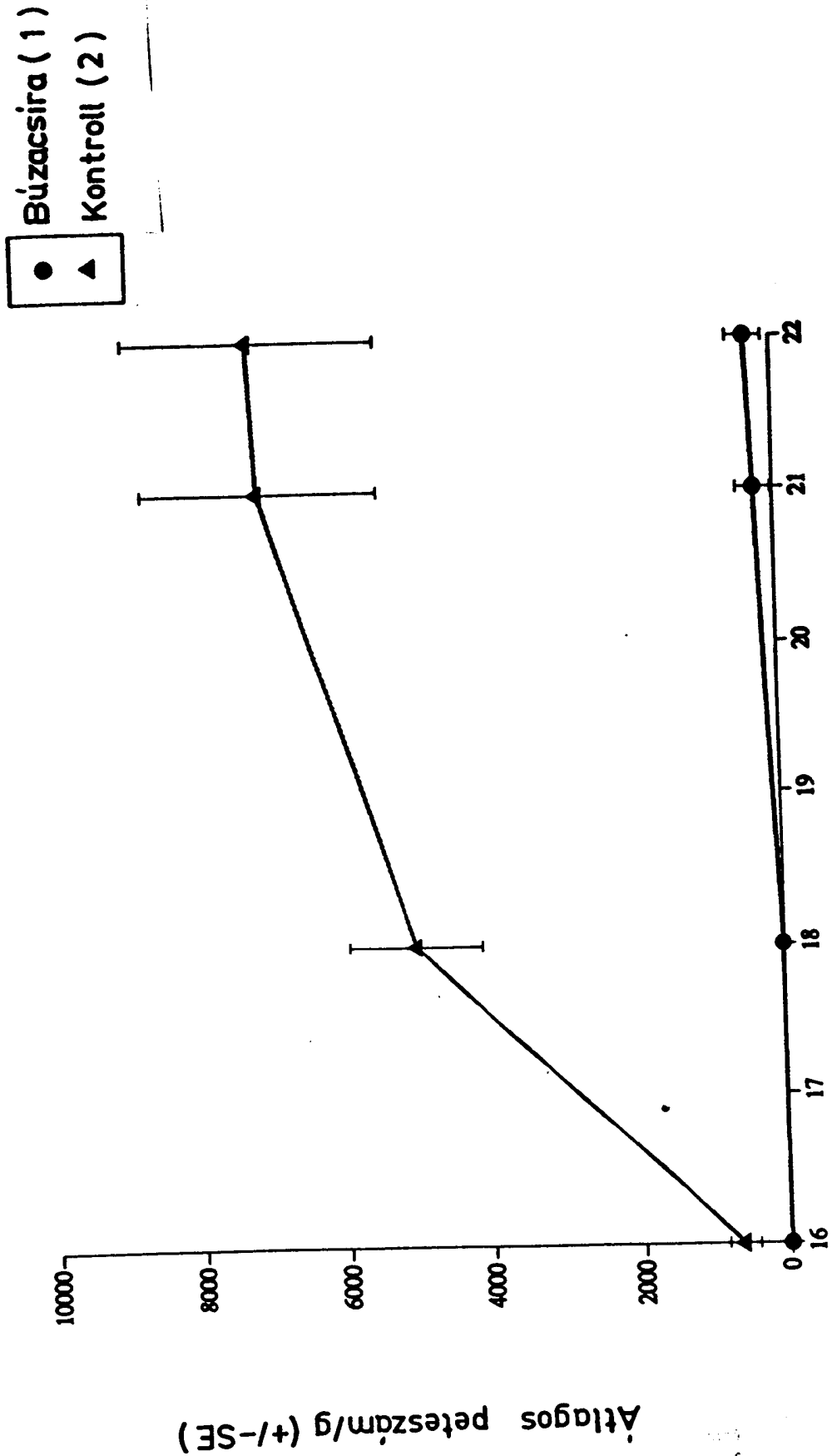
Dr. Klt.

Uőla



22. ábra

Válasz



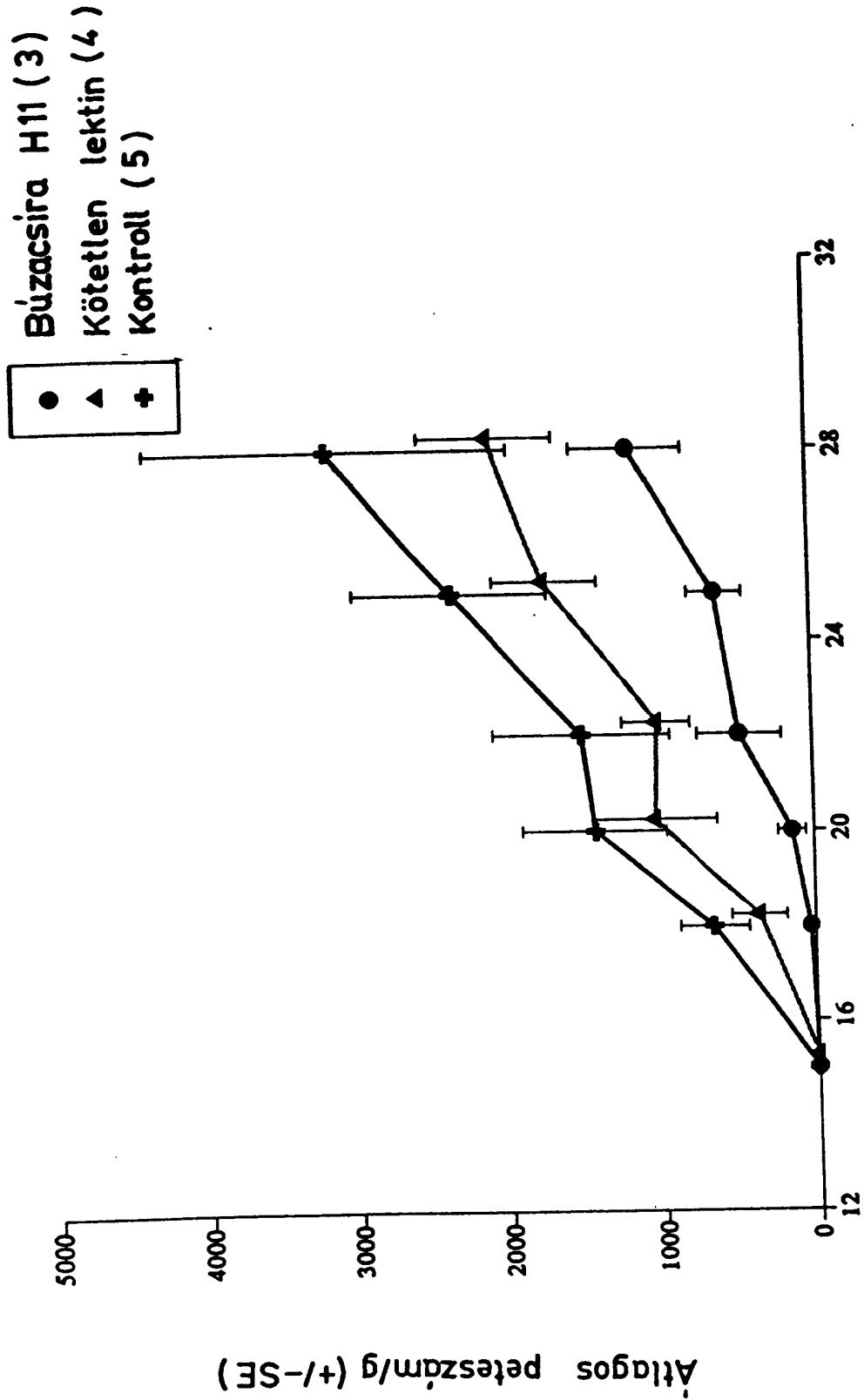
A fertőzést követő napok száma

23. ábra

Átlagos peteszám/g (+/-SE)

Válasz *[Signature]*

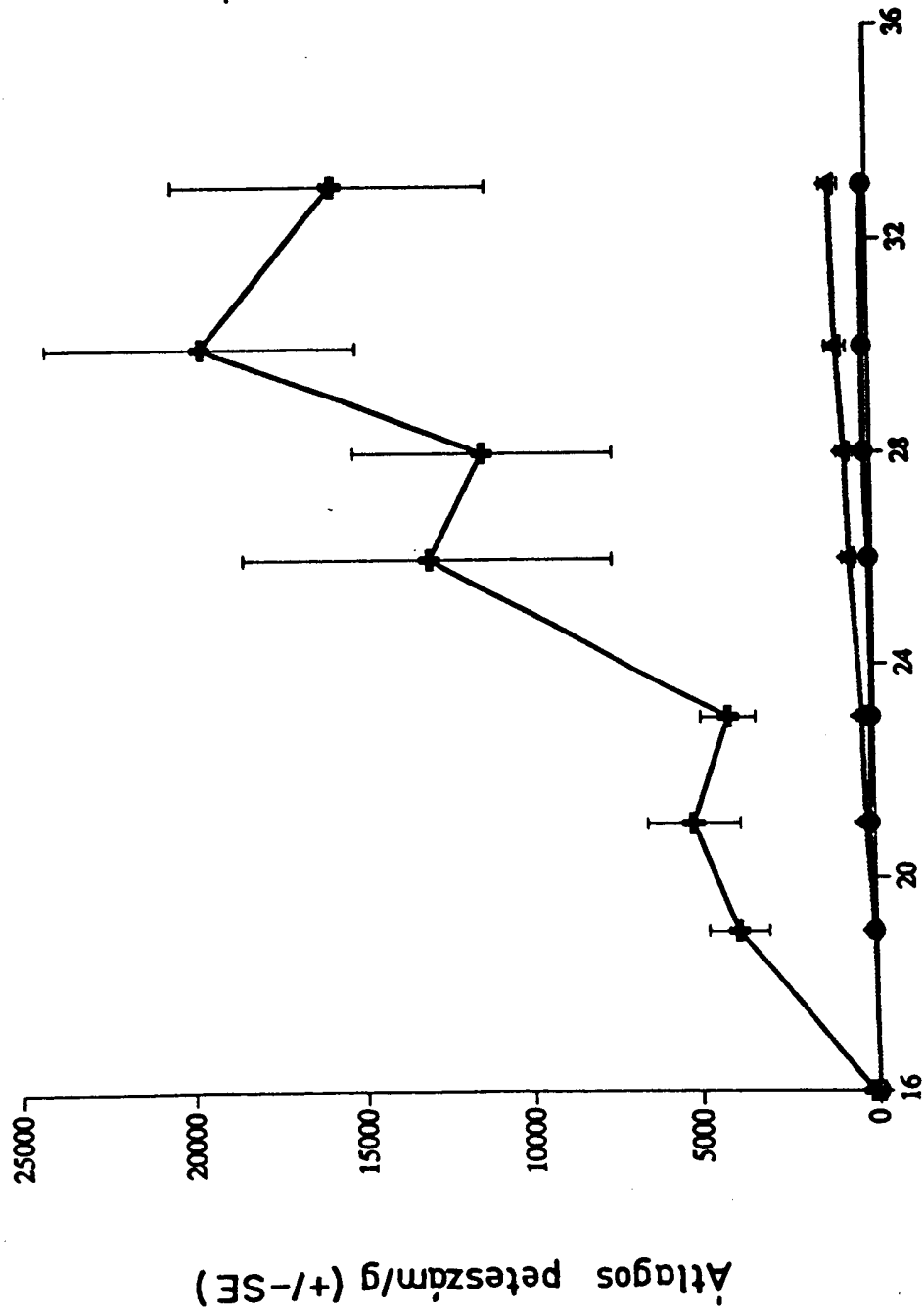
10 Kft.



A fertőzést követő napok száma  
24. ábra

Válasz  
Kft.

● H11 (6)  
 ▲ Földimogyoró (7)  
 + Kontrollok (8)



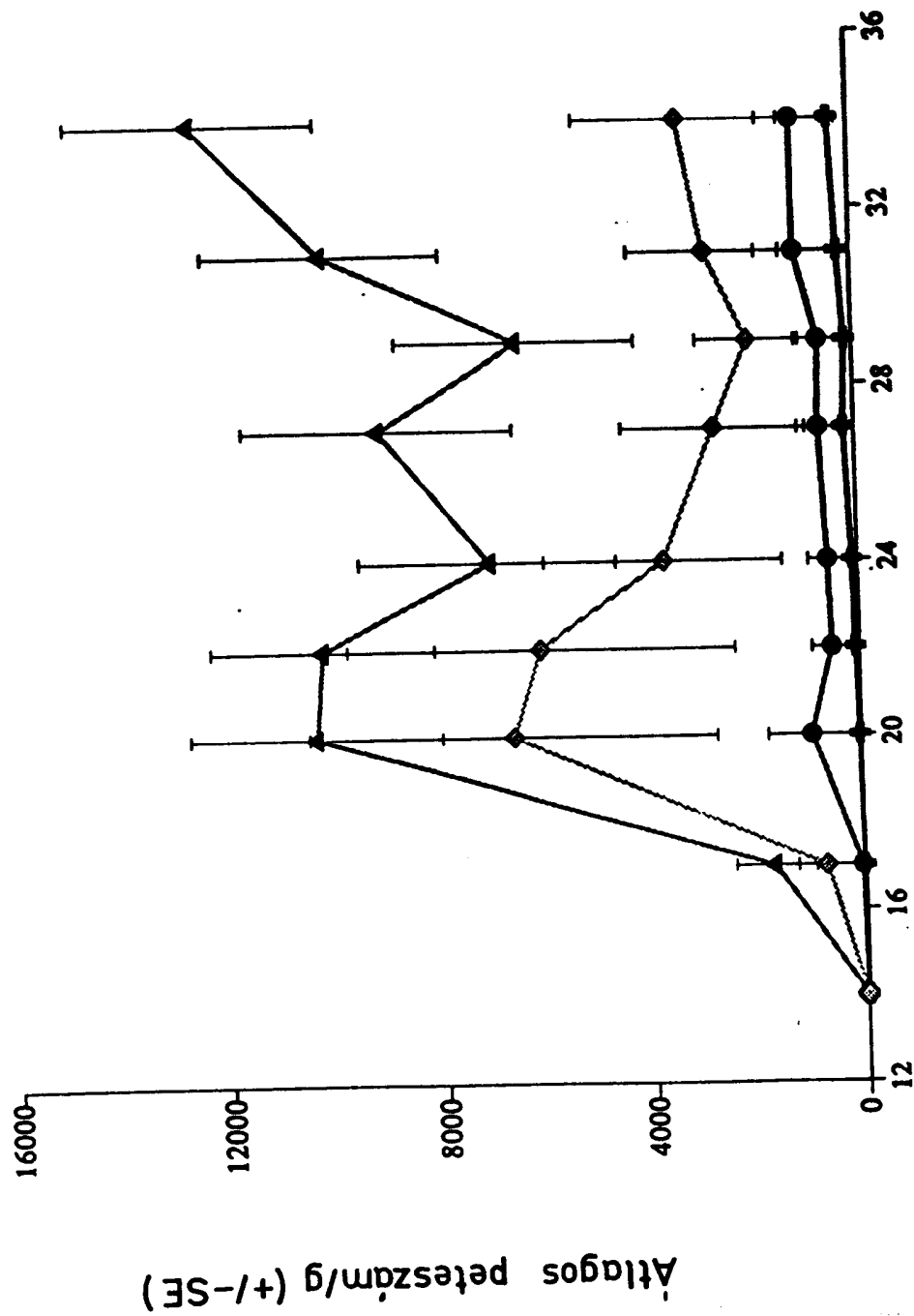
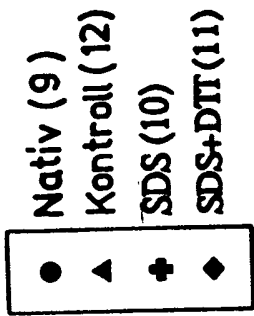
A fertőzést követő napok száma

25. ábra

Szabó

In Kft.

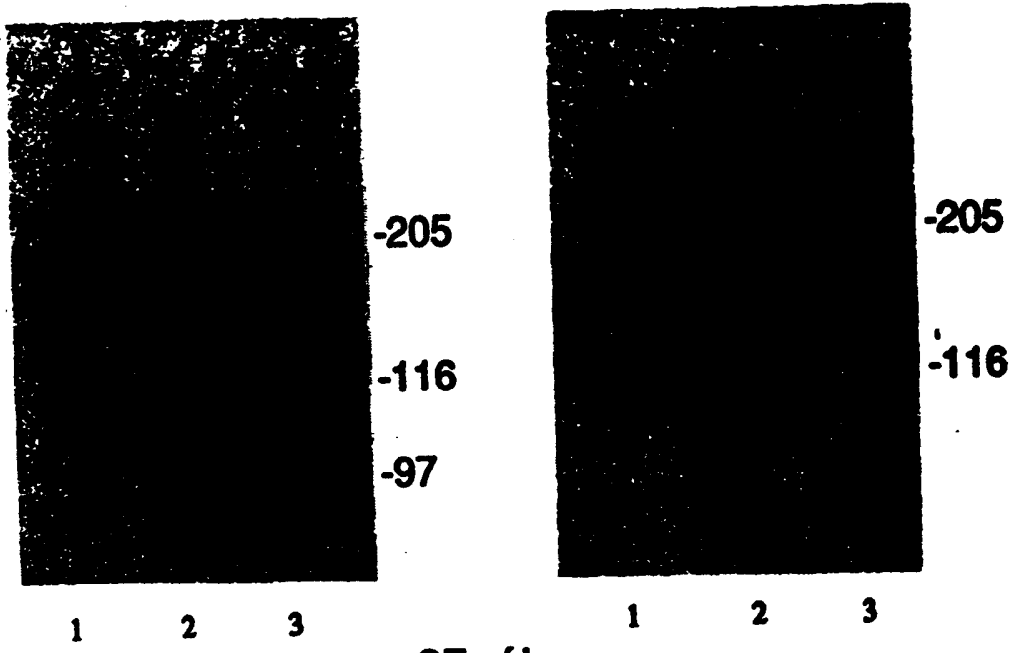
Válasz



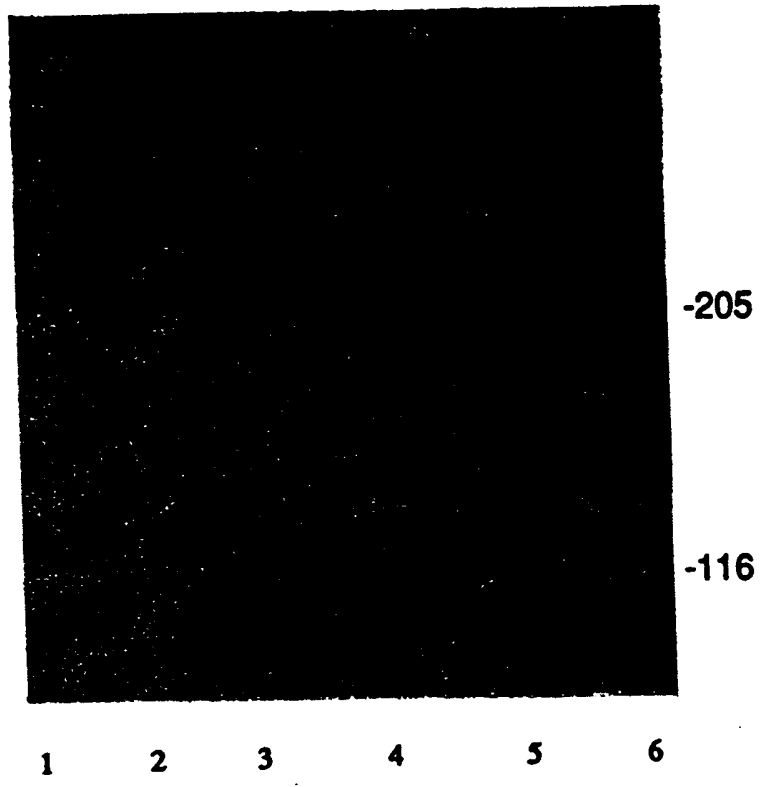
A provokálást követő napok száma

26. ábra

Válasz

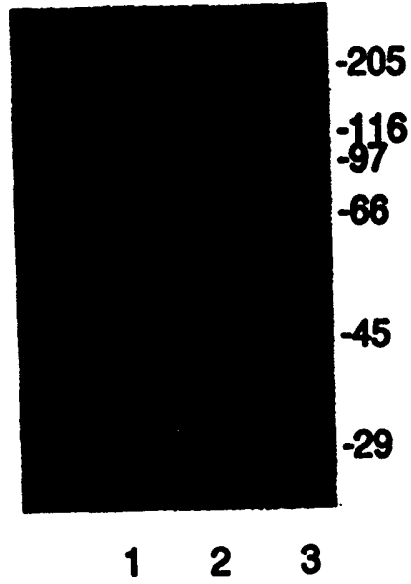


27. ábra

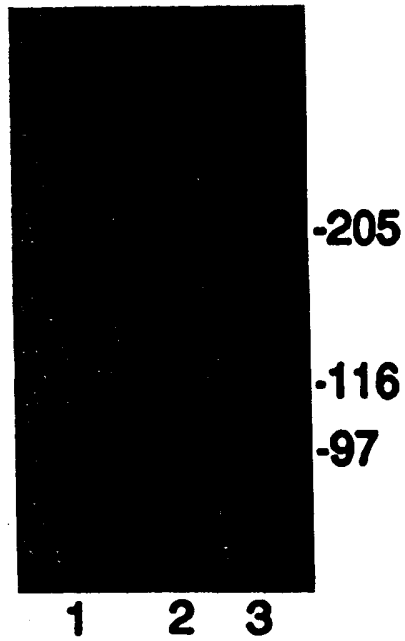


28. ábra

Véle f

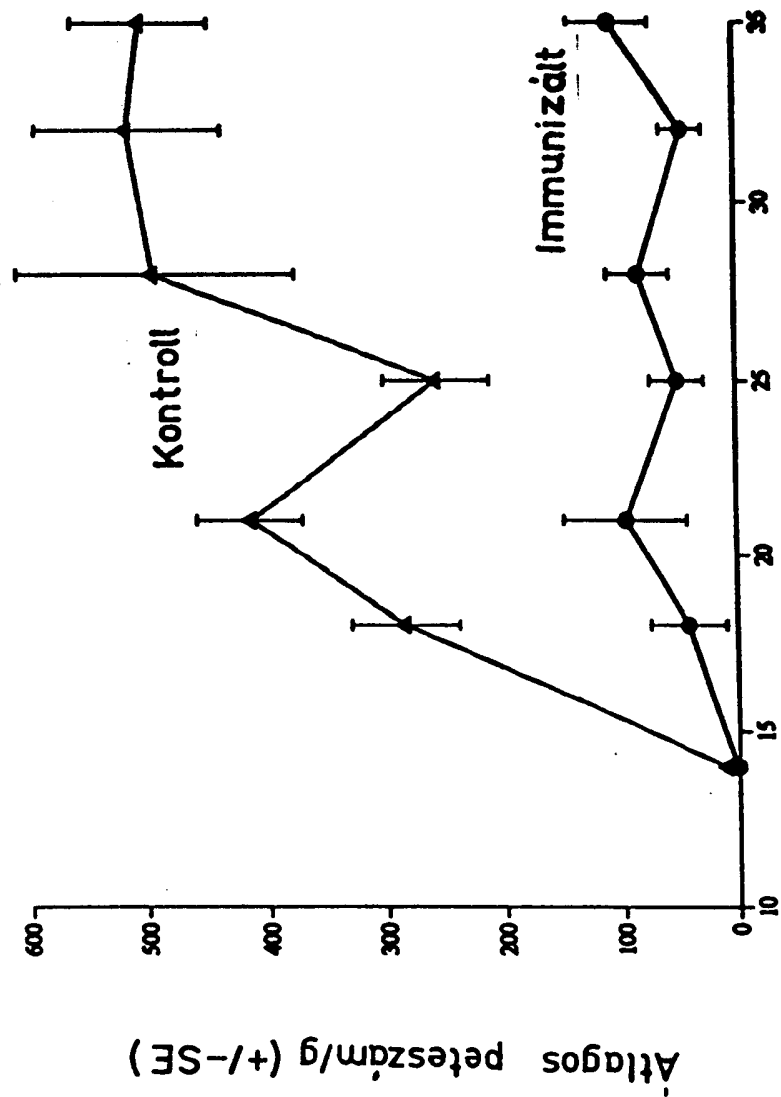


29. ábra



31. ábra

Szám: *Uéls* 15 Kft. *[Signature]*



A provokálást követő napok száma  
30. ábra

Dr. K. H. Válos



32. ábra

Stábor

12. Kft.

Uéls *[signature]*





35. ábra

Uéba *[Signature]* in Kft.