(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

219 535 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 02492
(22) A bejelentés napja: 1992. 03. 05.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
9104596.3 1991. 03. 05. GB
9121208.4 1991. 10. 04. GB
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/GB 92/00387
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/15689

(40) A közzététel napja: 1995. 01. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2001. 05. 28.

(51) Int. Cl.[7]

C 12 N 15/74
C 12 N 1/21
A 61 K 39/112

(72) Feltalálók:
Charles, Ian George, Beckenham, Kent (GB)
Chatfield, Steven Neville, Beckenham, Kent (GB)
Fairweather, Neil Fraser, Beckenham, Kent (GB)

(73) Szabadalmas:
The Wellcome Foundation Ltd., London (GB)

(74) Képviselő:
DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54)

Rekombináns proteineket expresszáló, attenuált baktériumokat tartalmazó vakcinák

KIVONAT

A találmány tárgya gyógyászatilag elfogadható hordozót vagy oldószert, és hatóanyagként, attenuált baktériumot tartalmazó vakcina, amelyben a baktérium egy patogén organizmus antigéndeterminánsát tartalmazó heterológ fehérjét kódoló DNS-szekvenciát és ahhoz működőképesen kapcsolva egy anaerob körülményekkel indukálható aktivitású promotert tartalmaz. Egy alkalmas promoter a nirB promoter. A találmány tárgyát képezik továbbá a vakcinák előállítására szolgáló attenuált, előnyösen *Salmonella* baktériumok, továbbá eljárások a vakcinák előállítására.

A találmány szerinti vakcinák alkalmazhatók emberi vagy állati gazdaszervezet mikroorganizmus általi fertőzésével szembeni profilaktikus kezelésére.

HU 219 535 B

A találmány tárgyát heterológ fehérjéket expresszálni képes, attenuált (legyengített, ártalmatlanított) baktériumokat tartalmazó vakcinák képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá a vakcinák előállítására szolgáló baktériumok, továbbá eljárások a vakcinák előállítására.

A találmány szerinti vakcinák előnyösen alkalmazhatók mikroorganizmus általi fertőzésével szembeni profilaktikus kezelésére.

A Salmonella virulens törzsei attenuálhatók oly módon, hogy az in vivo túléléshez és növekedéshez szükséges génekbe specifikus mutációkat viszünk be. Az önállóan fennmaradni képes, klinikailag jelentéktelen fertőzéseket okozó attenuált variánsokat potenciális élő, orális vakcináknak tekinthetjük a Salmonella okozta fertőzésekkel szemben. A Ty21a a Salmonella typhi egy attenuált variánsa, amely a galE-ben, illetve más, ismeretlen attenuáló lézióban tartalmaz mutációkat, és amelyet számos országban élő, orális, tifoid vakcinaként való bevezetés céljából licencáltak.

Újabban genetikailag definiált Salmonella törzseket vizsgáltak, amelyek egyedi, specifikus mutációkat hordoznak különböző génekben, azzal a céllal, hogy különböző célfajokban kísérleti orális vakcinaként alkalmazzák őket. Például a Salmonella aro mutánsairól, amelyek számos aromás vegyületre nézve auxotrófok, kimutatták, hogy hatékony orális vakcinák egerekben, birkákban, szarvasmarhákban, csirkékben, és a legújabb eredmények szerint attenuáltnak és immunogénnek bizonyultak önkéntesekben is. A Salmonella dupla aro mutánsait az EP–A–0322237 számú leírásban közlik. A Salmonella cya crp dupla mutánsai szintén hatékony orális vakcinák.

Amellett, hogy önmagukban vakcinák szalmonellózissal szemben, az attenuált Salmonellákat a nyálkahártya-immunrendszer („mucosal immune system") heterológ antigénjei hordozóiként is figyelembe vehetjük. Ez azért van, mert a Salmonellákat szájon át juttathatjuk be, és hatékony immunogének, ezért képesek a szisztémás és lokális sejtes és antitestválaszok serkentésére. A baktériumokból, vírusokból és parazitákból származó heterológ antigéneket Salmonella vakcinák segítségével juttathatjuk be a gazdaszervezetbe.

Ezeknek az élő vakcináknak az antigének bejuttatására való használatában egy komoly hátrány az idegen antigének in vivo való expressziójának stabilitásához kötődik. Egy idegen fehérje szabályozatlan expressziója baktériumokban egy több példányban előforduló plazmidról általában azt eredményezi, hogy a plazmid vagy az expresszált gén gyorsan elvész a sejtekből. Ezt a problémát ellenőrzés alatt tarthatjuk fermentorokban, oly módon, hogy indukálható promoterrendszereket alkalmazunk, azaz például a trp vagy lac rendszert, amelyek lehetővé teszik, hogy a gén szabályozottan expresszálódjon, amikor a megfelelő mennyiségű biomasszát elértük. Természetesen ezek a promoterek nem indukálhatók kívülről beadott indukálószerekkel, például PP-vel vagy IPTG-vel akkor, ha a baktériumokat a vakcinálás után, önkorlátozott körülmények között a gazdaszervezet szöveteiben növesztjük.

Élő bakteriális vektorokkal végzett vakcinálás során megfigyelt in vivo plazmidstabilitásról számos kutató számolt be [Maskell et al., Microb. Path., 2, 295–305 (1987); Nakayama et al., Bio/Technology 6, 693–697 (1988); Tite et al., Immunology, 70, 540–546 (1990)]. Számos megközelítést kipróbáltak azzal a céllal, hogy megoldják a problémát, beleértve az integrációs rendszerek alkalmazását a heterológ antigén bakteriális kromoszómáról való expressziója céljából [Hone et al., Microbiol. Path., 5, 407–418 (1988); Strugnell et al., Gene, 88, 57–63 (1990)]. Ez a megközelítés azonban csak bizonyos antigének esetében használható, mivel az expressziós szint gyakran nagyon alacsony [Maskell et al. (1990)]. Nakayama és munkatársai azt a megoldást ismertették, mely szerint egy esszenciális gént kötnek az expressziós plazmidhoz, hogy az *in vivo* expressziót stabilizálják. Jóllehet ez egy nagyon hatékony megközelítési mód, mégsem előzi meg azt, hogy plazmidmentes variánsok keletkezzenek, hanem csak azt biztosítja, hogy ne legyenek képesek túlélni az adott környezetet. Egy idegen antigénnek egy Salmonella vakcina törzsben való stabil, de konstitutív magas szintű expressziója lelassíthatja a növekedés sebességét, és ennélfogva potenciálisan érintheti az élő vakcina immunogenicitását.

A találmány tárgyát képezi tehát egy gyógyászatilag elfogadható hordozót vagy oldószert, és hatóanyagként, attenuált baktérium*ot tartalmazó vakcina, amelyben a baktérium egy patogén organizmus antigéndeterminánsát tartalmazó heterológ fehérjét kódoló DNS-szekvenciát és ahhoz működőképesen kapcsolva egy anaerob körülményekkel indukálható aktivitású promotert tartalmaz.* Így a heterológ fehérjék stabil expresszióját kaphatjuk in vivo. Az attenuált baktériumot ennélfogva vakcinaként használhatjuk. Bármelyik megfelelő baktérium használható, például egy Gram-negatív baktérium is. Néhány Gram-negatív baktérium, például a Salmonella képes behatolni az eukariótasejtekbe és ott növekedni, és *megtelepedni* a nyálkahártyával borított felszíneken.

Az attenuált baktériumot ennélfogva a Salmonella, Bordetella, Vibrio, Haemophilus, Neisseria és Yersinia nemzetségek közül választhatjuk. Egy másik módszer szerint az attenuált baktérium lehet egy attenuált enterotoxigén Escherichia coli törzs. Főleg az alábbi fajok említhetők: Salmonella typhi – a humán tífusz okozója; Salmonella typhimurium – a szalmonellózis okozója számos állatfajban; Salmonella enteritidis – az ételmérgezés okozója emberekben; Salmonella choleraesuis – a szalmonellózis okozója sertésekben; Bordetella pertussis – a szamárköhögés okozója; Haemophilus influenzae – az agyhártyagyulladás okozója; Neisseria gonorrhoeae – a gonorrea okozója; és a Yersinia – az ételmérgezés egyik okozója.

A baktérium attenuációját okozhatja egy nem revertáló mutáció a baktérium aromás aminosav bioszintézis-útjában szereplő egyik génben egy nem revertáló mutáció. Legalább tíz gén játszik szerepet a korizmát bioszintézisében, amely az aromás aminosavak bioszintézisútjában az egyik elágazási pont. Ezek közül számos a baktérium kromoszómájának nagyon eltérő pontján található, például az aroA (5-enol-piruvil-sikimát-3-

foszfát szintetáz), az aroD (3-dihidrokinát-dehidratáz) és az aroE (sikimát-dehidrogenáz). A mutáció tehát az aroA, aroC, aroD és aroE génekben fordulhat elő.

Azonban egy attenuált baktérium előnyösen egy-egy nem revertáló mutációt hordoz az aromás aminosav bioszintézisútjában szereplő két különböző génben. Ezeket a baktériumokat az EP–A–0322237 számú szabadalmi bejelentésben közlik. A megfelelő kettős mutánsok az aroA aroC, az aroA aroD és az aroA aroE mutáns baktériumok. Azonban azok a baktériumok is hasznosak, amelyek az aroA, aroC, aroD és aroE génekben levő mutációkat más kombinációban tartalmazzák. Különösen előnyösek a Salmonella dupla aro mutánsai, például a Salmonella typhi vagy a Salmonella typhimurium dupla aro mutánsai, főleg az aroA aroC, aroA aroD és az aroA aroE mutációk.

Egy másik módszer szerint az attenuált baktérium egy nem revertáló mutációt hordoz egy olyan génben, amely egy vagy több más gén (EP–A–0400958) szabályozásában játszik szerepet. A mutáció előnyösen az ompR génben vagy más, a szabályozásban szerepet játszó génben fordul elő. Számos más gén létezik, amelyek a szabályozásban játszanak szerepet, és amelyekről közismert, hogy a környezeti hatásokra reagálnak [Ronson et al., Cell, 49, 579–581].

Az attenuált baktériumoknak ez a típusa egy második mutációt hordozhat egy második génben. A második gén előnyösen egy olyan enzimet kódol, amely egy esszenciális bioszintézisútban szerepel, különösen azok a gének érdekesek, amelyek az aromás vegyületek bioszintézisének prekorizmátútjában szerepelnek. A második mutáció tehát előnyösen az aroA, aroC vagy aroD génben van.

Az attenuált baktérium egy másik típusa az, amelyben az attenuációt egy nem revertáló mutáció okozza a baktérium egy olyan DNS-ében, amely egy, környezeti stresszre válaszként termelődő fehérjét kódol, vagy a baktérium egy olyan fehérjét kódoló DNS-ében, amely fehérje egy, a környezeti stresszhatásokra adott válaszként keletkező fehérjét kódoló DNS expresszióját szabályozza. Ilyen baktériumokat a WO 91/15572 számú szabadalmi bejelentésben ismertetnek. A nem revertáló mutáció lehet deléció, inszerció, inverzió vagy szubsztitúció. Egy deléciós mutációt transzpozon segítségével hozhatunk létre.

A környezeti stresszhatásra adott válaszként keletkező fehérjék lehetnek például a hősokkfehérjék (amelyek akkor keletkeznek, ha a hőmérsékletet 42 °C fölé emeljük); a tápanyag-megvonási fehérjék (amelyek akkor keletkeznek, ha lényeges tápanyagok, például a foszfátok vagy a nitrogén szintje az alá süllyed, ami a mikroorganizmus túléléséhez szükséges); toxikusstressz-fehérjék (amelyek toxikus vegyületekre, például festékekre, savakra, esetleg növényi exudátumokra adott válaszként keletkeznek) vagy metabolikus rombolási fehérjék (amelyek fluktuációkra, például a mikroorganizmus ozmoregulációját érintő ionszint változására vagy A-vitamin- vagy kofaktorszint változására adott válaszként keletkeznek).

Egy hősokkfehérje előnyösen az a fehérje, amelyet a htrA gén kódol, és deqP-ként is ismerik. Más fehérjéket olyan gének kódolnak, amelyekről ismert, hogy a stresszválaszokban játszanak szerepet, ilyen például a grpE, groEL, (mopA), dnaK, groES, lon és dnaJ. Számos más fehérje ismert, amelyeket olyan gének kódolnak, amelyekről köztudott, hogy környezeti stresszhatásokra adott válaszként indukálódnak [Ronson et al., Cell, 49, 579–581]. Ezek közül az alábbiakat említhetjük meg: az Escherichia coli ntrB/ntrC rendszere, amely a nitrogénéhezés hatására adott válaszként indukálódik, és pozitívan szabályozza a glnA és nifLA géneket [Buck et al., Nature, 320, 374–378 (1986); Hirschman et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 82, 7525 (1985); Nixon et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 83, 7850–7854 (1986); Reitzer and Magansanik, Cell, 45, 785 (1986)]; az Escherichia coli phoR/phoB rendszere, amely a foszfátéhezésre adott válaszként indukálódik [Makino et al., Journal of Molecular Biology, 192, 549–556 (1986b)]; az Escherichia coli cpxA/sfrA rendszere, amely a festékekre és más toxikus vegyületekre adott válaszként indukálódik [Albin et al., Journal of Biological Chemistry, 261, 4698 (1986); Drury et al., Journal of Biological Chemistry, 260, 4236–4272 (1985)]. Egy analóg rendszer a Rhizobiumban a dctB/dctD, amely a 4C-disz-karbonsavakért felelős [Ronson et al., Journal of Bacteriology, 169, 2424; Cell, 49, 579–581 (1987)]. Egy ilyen típusú virulenciarendszert írtak le Agrobacteriumban. Ez a virA/virG rendszer, amely a növényi exudátumokra adott válaszként indukálódik [leRoux et al., EMBO J., 6, 849–856 (1987); Stachel and Zambryski, Am. J. Vet. Res., 45, 59–66 (1986); Winnans et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 83, 8278 (1986)]. Hasonlóképpen a bvgC-bvgA rendszer a Bordetella pertussisban (korábban vir néven volt ismert) szabályozza a virulenciadeterminánsok termelődését a Mg^{2+}-ionokra és a nikotinsavszintre adott válaszként [Arico et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86, 6671–6675 (1989)].

Egy élő vakcina formájában való alkalmazáshoz az kell, hogy az attenuált baktérium ne revertáljon a virulens állapotba. Annak a valószínűségét, hogy ez egy mutációval egy adott DNS-szekvencián megtörténik, alacsonynak gondolják. Annak a valószínűségét azonban, hogy egy olyan baktériumban, amelynek az attenuált állapotát két különböző DNS-szakaszon keletkező mutáció okozza, elhanyagolhatónak tartják. Egy előnyös attenuált baktérium ennélfogva az, amelyikben az attenuációt egyrészt 1. egy olyan DNS-szekvenciában létrehozott mutáció okozza, amely környezeti stresszhatásra válaszul termelődő fehérjét kódol, vagy egy olyan fehérjét kódoló DNS-szekvenciában létrehozott mutáció, amely fehérje egy, környezeti stresszhatásokra adott válaszként keletkező fehérjét kódoló DNS-nek az expresszióját szabályozza, másrészt 2. egy további mutáció egy második DNS-szekvenciában.

A második DNS-szekvencia előnyösen egy olyan enzimet kódol, amely egy létfontosságú auxotrófia bioszintézisútban szerepel, illetve egy olyan szekvencia, amelynek terméke szabályozza az ozmotikusan reagáló gének szabályozását, azaz például az ompR-t [Infect

and Immun., 2136–2140 (1989)]. A legelőnyösebb, ha a mutáció egy olyan DNS-szekvenciában van, amely az aromás aminosavak bioszintézisében játszik szerepet, pontosabban az aroA, aroC vagy aroD szekvenciákat kódoló DNS-szekvenciákban.

Az attenuált baktériumokat előállíthatjuk oly módon is, hogy egy mutációt juttatunk be a DNS-szekvenciába, a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerek alkalmazásával [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982)]. A nem revertáló mutációkat úgy hozhatjuk létre, hogy egy hibrid transzpozont, a TnphoA-t bejuttatjuk például a Salmonella typhimurium törzsekbe. A TnphoA képes enzimatikusan aktív fehérjefúziókat létrehozni az alkalikus foszfatáz és a periplazmatikus vagy membránfehérjék között. A TnphoA transzpozon egy kanamicinrezisztenciát kódoló gént hordoz. A transzduktánsokat azon az alapon választjuk ki, hogy a megfelelő szelekciós táptalajon növesztve kanamicinrezisztensek.

Az egyéb módszerek közé tartozik például a DNS-szekvencia klónozása egy vektorba, például egy plazmidba vagy kozmidba, egy szelekciós genetikai bélyeg beépítése a klónozott DNS-szekvenciába, aminek eredménye az említett gén inaktiválása. Egy, az inaktivált DNS-t hordozó plazmidot és egy másik szelektálható genetikai bélyeget ismert módszerekkel lehet bejuttatni egy szervezetbe [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982)]. Ezután a megfelelő szelekciós módszerek alkalmazásával lehetséges annak a mutánsnak az azonosítása, amelyben az inaktivált DNS-szekvencia rekombinálódik a mikroorganizmus kromoszómájába, és a vad típusú DNS-szekvenciát működésképtelenné teszi, egy allélcsere néven ismert folyamatban. Pontosabban, a használt vektor előnyösen instabil a mikroorganizmusban, és spontán módon elvész belőle. A plazmidon levő mutált DNS-szekvencia és a vad típusú szekvencia genetikai cross-over esemény révén cserélődhet ki. A további módszerek eliminálják az idegen DNS bejuttatását a vakcinatörzsekbe a mutáció helyén, valamint az antibiotikumrezisztencia-markerek bejuttatását a törzsekbe.

A heterológ antigén, amelyet az attenuált baktérium expresszálni képes, tartalmaz egy patogén szervezetből származó antigéndeterminánst. Az antigén származhat vírusból, baktériumból, gombából, élesztőből vagy parazitából. A heterológ fehérje ennélfogva tipikusan egy olyan antigénszekvenciát tartalmaz, amely egy vírusból, baktériumból, gombából, élesztőből vagy parazitából származik. Még pontosabban, az antigénszekvencia származhat egy humán immundeficiencia-vírusból (HIV), például a HIV–1-ből vagy a HIV–2-ből, a hepatitis A vagy a hepatitis B vírusból, a 2-es vagy 14-es típusú humán rhinovírusból, a herpesz szimplex vírusból, a 2-es vagy 3-as típusú poliovírusból, a száj és körömfájás vírusából, az influenzavírusból, a coxsackie vírusból, a CD4 sejtfelszíni antigénből és a Chlamydia trachomatisból. Az antigén tartalmazhatja HIV-ből, például a HIV-1-ből vagy a HIV–2-ből származó CD4 receptorkötési helyet. Más hasznos antigén lehet az Escherichia coli hőre érzékeny toxin B alegysége (LT–B), az Escherichia coli K88 antigének, a B. pertussisból származó P.69 fehérje, a tetanusz toxin C fragmentje és a mételyekből, mikoplazmákból, orsógilisztákból, galandféregből, veszettségvírusból és rotavírusból.

A heterológ fehérjék expressziójának szabályozásában egy előnyösen használható promoter a nirB promoter. A nirB promotert Escherichia coliból izolálták, ahol is egy olyan operon expresszióját szabályozza, amelyben megtalálható a nitritreduktáz (nirB) gén [Jayaraman et al., Journal of Molecular Biology, 196, 781–788 (1987)], valamint a nirD, nirC és a cysG gén [Peakmen et al., European Journal of Biochemistry, 191, 315–323 (1990)]. Ezt a nitrit, valamint a környezet oxigéntenziója szabályozza, és akkor válik aktívvá, ha megfosztjuk az oxigéntől [Cole, Biochim. Biophys. Acta, 162, 356–368 (1968)]. Az anaerobiózisra adott választ az FNR fehérjén keresztül szabályozza, amely transzkripciós aktivátorként működik, egy olyan mechanizmus szerint, amely számos anaerob légzési génben azonos.

Deléciós és mutációs elemzés segítségével izolálták a promoternek azt a részét, amely egyedül felelős az anaerobiózisért, és más, anaerob módon szabályozott promoterekkel való összehasonlítás alapján egy konszenzus FNR-kötő helyet sikerült azonosítani [Bell et al., Nucleic Acids Research, 17, 3865–3874 (1989); Jayaraman et al., Nucleic Acids Research, 17, 135–145 (1989)]. Azt is igazolták, hogy a feltételezett FNR-kötő hely és a –10 homológiarégió közötti távolság fontos [Bell et al., Molec. Microbiol., 4, 1753–1763 (1990)]. Ennélfogva előnyös, ha a nirB gén promoterének csak azt a részét használjuk, amely az anaerobiózisért felelős. A továbbiakban ha a nirB promoterre hivatkozunk, akkor vagy a promotert magát, vagy annak egy olyan részét vagy származékát értjük, amely képes egy kódolószekvencia expresszióját elősegíteni anaerob körülmények között. Az általunk használt szekvenciát, amely a nirB promotert tartalmazza, az alábbiakban mutatjuk be:

AATTCAGGTAAATTTGATGTACATCAAATG-GTACC CCTTGCTGAATCGTTAAGGTAGGCGGT-AGGGCC

Egy, a találmány szerinti megoldásban alkalmazott attenuált baktériumot úgy állíthatunk elő, hogy egy attenuált baktériumot egy olyan DNS-konstrukcióval transzformálunk, amely egy anaerob körülmények által indukált promotert tartalmaz, azaz például a nirB promotert, amelyet működés szempontjából hozzákapcsolunk egy olyan DNS-szekvenciához, amely egy heterológ fehérjét kódol. Bármelyik megfelelő transzformációs technika alkalmazható, ilyen például az elektroporáció. Ily módon kaphatunk egy olyan attenuált baktériumot, amely képes a baktérium számára idegen (heterológ) fehérjét expresszálni. Az attenuált baktérium tenyészetét aerob körülmények között tenyészthetjük. Így elegendő mennyiséget állíthatunk elő a baktériumból, amelyet azután vakcinaként formulázhatunk, oly

módon, hogy a heterológ fehérje minimális mennyiségben expresszálódjon.

A DNS-konstrukció tipikusan egy replikálódó expressziós vektor, amely a nirB promotert egy heterológ fehérjét kódoló DNS-szekvenciához funkcionálisan kapcsolódva tartalmazza. A nirB promotert beépíthetjük egy expressziós vektorba, amely már tartalmazza a heterológ fehérjét kódoló gént. A beépítés pedig a fehérje expresszióját szabályozó promoter helyére történik. Az expressziós vektornak természetesen kompatibilisnek kell lennie az attenuált baktériummal, amelybe beépítik.

Az expressziós vektort a megfelelő transzkripciós és transzlációs szabályozóelemekkel látjuk el, beleértve a nirB promoter mellett egy transzkripciós terminációs helyet, valamint egy transzlációs start- és stopkodont. Megfelelő riboszomális kötőhelyet is tartalmaz. A vektor tipikusan egy replikációs origót, és ha szükséges, akkor egy szelektálható gént, például antibiotikumrezisztencia-gént tartalmaz. A vektor lehet egy plazmid.

A vakcinát előnyösen liofilezett formában állítjuk elő, például kapszulában, a betegnek orális úton való beadás céljára. Az ilyen kapszulákat elláthatjuk bélben oldható bevonattal. Például ilyen az Eudragate „S", az Eudragate „L", a cellulóz-acetát, a cellulóz-ftalát vagy a hidroxi-metil-cellulóz. Ezeket a kapszulákat vagy az adott formában használjuk, vagy egy más módszer szerint a liofilezett anyagot az eredeti formára hozzuk felhasználás előtt, például szuszpenziót készítünk belőle. Az eredeti formára való hozást előnyösen egy megfelelő pH-jú pufferben végezzük, hogy biztosítsuk a szervezetek életképességét. Abból a célból, hogy megvédjük az attenuált baktériumokat és a vakcinát a gyomorsavtól, előnyösen egy nátrium-bikarbonát-preparátumot adunk be a betegnek, valahányszor a vakcinát beadjuk. Egy másik módszer szerint a vakcinát készíthetjük parenterális beadás, intranazális beadás vagy emlőmirigyen keresztül történő beadás céljára.

A találmány szerinti attenuált baktériumot használhatjuk egy gazdaszervezet megelőző kezelésére, főleg ember kezelésére, de lehetséges állatok kezelése is. Egy mikroorganizmus, főleg egy patogén által okozott fertőzés ennélfogva megelőzhető, ha egy, a találmány szerinti attenuált baktériumból elegendő mennyiséget adunk be. A baktérium ezután expresszál egy heterológ fehérjét, amely képes antitestek termelődését indukálni a mikroorganizmus ellen. Az alkalmazott dózis mérete számos faktortól függ, beleértve a gazdaszervezet méretét, súlyát, a formulázott vakcina típusát, valamint a heterológ fehérje természetét. Az attenuált Salmonella typhi esetében az orális adagolás céljára dózisonként 10^9–10^{11} Salmonella typhi mikroorganizmus elegendő egy 70 kg-os felnőtt gazdaszervezet számára.

A továbbiakban következő példa a találmány illusztrálására szolgál. Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékletben megadott ábrákat.

Az 1–4. ábrákon a Salmonella typhimurium izolátumoknak azt a képességét látjuk, hogy mennyire képesek in vivo növekedni BALB/c egerekben a májban, a lépben, a Peyer-plakkokban valamint a mezenteriális nyirokcsomókban. Az x tengelyen a fertőzés után eltelt napok, az y tengelyen a szervekben növekedő szervezetek száma látható 10-es alapú logaritmusban ábrázolva, a háromszög jelzi a BRD509 izolátumot, a négyzet jelzi a BRD847 izolátumot, a körülmény jelzi a BRD743 izolátumot, a folyamatos vonal jelzi, ha nem adtunk ampicillint, a szaggatott vonal jelzi, ha adtunk ampicillint.

Az 5. ábrán az egérszérumban mérhető antitetanusz toxin C fragment titere látható. Az x tengelyen az egerek fertőzésére használt baktériumok típusa látható. A dózisok számát zárójelben mutatjuk. Az y tengelyen a 492 nm-en mért abszorbancia látható.

Példa

A pTETnir15 plazmid készítése

A pTETnir15 expressziós plazmidot a pTETtac115 plazmidból készítjük [Makoff et al., Nucleic Acids Research, 17, 10191–10202 (1989)], oly módon, hogy a lacI gént és a tac promotert tartalmazó EcoRI-ApaI régiót (1354 bp) az alábbi oligonukleotid-párral cseréljük ki:

1-es oligo: 5'-AATTCAGGTAAATTTGATGTACATCAAATGGTACCCCTTGCTGAATCGTTAAGGTAGG CGGTAGGGCC-3'

2-es oligo: 3'-GTCCATTTAAACTACATGTAG TTTACCATGGGGAACGACTTAGCAATTCCATCCGCCATC-5'

Az oligonukleotidokat egy Pharmacia Gene Assembler berendezéssel szintetizáljuk, majd a keletkező plazmid szekvenciáját meghatározzuk [Makeoff et al., Bio/Technology 7, 1043–1046 (1989)].

A pTETnir15 plazmidot hordozó SL1334 AroA aroD készítése

Abból a célból, hogy olyan Salmonella vakcinatörzset állítsunk elő, amely a tetanusz toxin C fragmentjét expresszálja a nirB promoter szabályozásával, egy közbenső törzset, a Salmonella typhimurium LB5010 (r–m+) törzset [Bullas and Ryo, Journal of Bacteriology, 156, 471–474 (1983)] transzformáljuk a pTETnir15 plazmiddal. A C fragmentet expresszáló telepeket antibiotikumszelekcióval mutatjuk ki, majd telepimmunblottal, antitetanusz toxin C fragment szérum alkalmazásával. A telepeket éjszakán át növesztjük nitrocellulóz-szűrőlapokon aerob körülmények között, majd anaerob körülmények biztosításával indukáljuk négy órával az immunblot elvégzése előtt. Egy olyan törzset, amely stabilan expresszálta a C fragmentet, használunk a plazmid-DNS izolálására. Ezzel a plazmiddal transzformáljuk a Salmonella typhimurium SL1344 aroA aroD törzs egyik, BRD509 jelű izolátumát elektroporációval. Egy olyan törzset, amely stabilan expresszálja a C fragmentet (az előzőkben leírt módon immunblottal ellenőrizve) választunk ki az in vivo vizsgálatokhoz, és BRD 847 jelzéssel látjuk el.

A BRD743 és a BRD847 in vivo kinetikájának összehasonlítása

A BRD743 (a pTET85-öt hordozó BRD509) és a BRD847 törzsek azon képességét hasonlítjuk össze, hogy miképpen növekednek in vivo BALB/c egereknek szájon át való beadás után. A pTET85 plazmidot a pTETtac115 plazmidból állítjuk elő [Makeoff et al.,

Nucleic Acids Research, 17, 10191–10202 (1989)], oly módon, hogy a lacI gént hordozó 1,2 kb méretű EcoRI fragmentet kivágjuk. Ennek eredménye a C fragment konstitutív expressziója Salmonella törzsekben. A baktériumok számát meghatározzuk a májban, a lépben, a Peyer-plakkokban, valamint a mezenteriális nyirokcsomókban. Az egerekből izolált baktériumoknál megvizsgáljuk azt is, hogy mennyire képesek olyan lemezeken növekedni, amelyek indikátorként ampicillint tartalmaznak, hogy meghatározzuk azt, hogy a szervezetek hány százalékban tartották meg a C fragmentet expresszáló plazmidot. Az eredmények az 1–4. ábrákon láthatók.

Ha kiinduláshoz hasonló számú (5×10^9) mikroorganizmussal fertőzzük az egereket, akkor azt találjuk, hogy mind a BRD743, mind a BRD847 képes elszaporodni és fennmaradni az összes rágcsálószövetben, de alacsonyabb szinten, mint a BRD509. Az érdekes jelenség azonban az, hogy a BRD743 mikroorganizmussal fertőzött egerekből kapott ampicillinrezisztens mikroorganizmusok száma gyorsan csökken, és a 14. napon kinyert mikroorganizmusok mind ampicillinérzékenyek voltak. Ez azt mutatja, hogy az in vivo szelekció eredményeképpen gyorsan elvész a pTET85 a Salmonella vakcinatörzsből. Ezzel szemben a BRD847 esetében az ampicillin nélkül és ampicillinnel kapott telepszámok lényegében azonosak voltak abban az időszakban, amikor a fertőzéseket követtük. Ez a pTETnir15 pluszelőnyét igazolja a Salmonella typhimurium vakcinatörzsben, olyan szervezeteket eredményezve, amelyek képesek in vivo expresszálni a C fragmentet egy hosszabb időtartam során, aminek egyenes következménye az immunogenitásban jelentkezik.

A BALB/c egerek immunizálása pTET85 plazmidot (BRD743) vagy pTETnir15 plazmidot (BRD847) hordozó Salmonella törzsekkel

Húsz egérből álló csoportokat inkubálunk orálisan egerenként 5×10^9 sejttel, a BRD743, a BRD847 vagy a BRD509 törzsekkel. A 25. napon mindegyik egérből szérumot veszünk, és ELISA-val elemezzük az antitetanuszantitesteket bennük. Mindegyik BRD847-tel vakcinált egérben kimutatható az anti-C fragment a 25. napon, míg a BRD743-mal vagy BRD509-cel vakcinált egerekben nem (5. ábra). A 25. napon minden egyes csoportból tíz egérnek adunk még egy orális oltást hasonló mennyiségű homológ mikroorganizmussal. Az ezekből az egerekből a 46. napon vett szérum ELISA-elemzése azt mutatja, hogy az anti-C fragmentválaszok felerősödtek a BRD743 és BRD847 mikroorganizmusokkal oltott csoportokban. A BRD847-tel erősített egereknél a titerek sokkal magasabbak, mint a BRD743-mal erősített egereknél. Az orálisan BRD509-cel erősített egerek nem voltak képesek a C fragment ellen kimutatható antitestet termelni.

BRD847-tel és BRD743-mal orálisan immunizált egerek tetanusz toxinnal való ingerlése

Az orálisan BRD743, BRD847 és BRD509 törzsekkel orálisan vakcinált egerek tetanusztoxin-ingerléssel szembeni immunitását megvizsgáljuk az immunizálótörzs egy vagy két dózisa után. Húsz egérből álló csoportok egyetlen orális dózist kaptak (5×10^9 mikroorganizmus), tíz egérből álló csoportok a 25. napon 50 50%-os letális tetanuszdózissal ingerlünk (lásd az 1. táblázatot). A BRD847-tel vakcinált egerek teljes védelmet mutattak egyetlen orális dózis után, míg a BRD743-mal vakcinált törzsek csak részleges védelmet mutattak (2/10) túlélő). A megmaradó, tíz egérből álló csoportok a 25. napon egy második dózist kaptak a mikroorganizmusból (5×10^9), és a 46. napon lettek ingerelve (az 1. dózis után). Ismét a BRD743-mal immunizált egerek mutattak teljes védelmet a tetanusz toxinnal szemben, míg a BRD743-mal immunizált egereknél csak részleges védelem volt tapasztalható (5/10). Az egy vagy két BRD509 dózissal immunizált egerek a tetanusz toxinnal való ingerlés után mind elpusztultak. A BRD743 hatékony egyszeres dózisú orális vakcina tetanusztoxin-ingerlés ellen egerekben. Az egércsoportokat azután is ingereltük tetanusz toxinnal, miután 1-2 intravénás dózist kaptak (105 mikroorganizmus) a BRD847 és BRD743 törzsből. Mindegyik egér teljes védelmet mutatott a tetanusz toxinnal való ingerlésre a vakcinatörzzsel való 1-2 dózis után.

1. táblázat

Egerek orális immunizálása tetanusz ellen Salmonella typhimurium SL1344 aroA aroD pTET85 és Salmonella typhimurium SL1344 aroA aroD pTETnir15 felhasználásával

Vakcina	Dózis	Dózisok száma	A tetanusz-ingerlést túlélő egerek száma
SL 1344 aroA aroD	$8{,}6 \times 10^9$	1	0/10
(BRD509)	$7{,}4 \times 10^9$	2	0/10
SL1344 aroA aroD	$6{,}4 \times 10^9$	1	2/10
pTET85 (BRD743)	$9{,}2 \times 10^9$	2	5/10
SL1344 aroA aroD	$9{,}5 \times 10^9$	1	10/10
pTETnir15 (BRD847)	$7{,}5 \times 10^9$	2	9/9

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Gyógyászatilag elfogadható hordozót vagy oldószert, és hatóanyagként, attenuált baktériumot tartalmazó vakcina, *azzal jellemezve,* hogy a baktérium egy patogén organizmus antigéndeterminánsát tartalmazó heterológ fehérjét kódoló DNS-szekvenciát és ahhoz működőképesen kapcsolva egy anaerob körülményekkel indukálható aktivitású promotert tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti vakcina, *azzal jellemezve,* hogy baktériumként egy attenuált *Salmonella* törzset tartalmaz.

3. A 2. igénypont szerinti vakcina, *azzal jellemezve,* hogy baktériumként *Salmonella typhi* vagy *Salmonella typhimurium* egy attenuált törzsét tartalmazza.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti vakcina, *azzal jellemezve,* hogy aromás aminosavak bioszin-

tetikus reakcióútjának egyik génjében létrehozott, nem revertáló mutáció következményeképpen létrejött attenuációval jellemezhető baktériumtörzset tartalmaz.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti vakcina, *azzal jellemezve,* hogy egy, környezeti stresszhatásokra adott válaszként termelődő fehérjét vagy ilyen fehérjét kódoló DNS expresszióját szabályozó fehérjét kódoló baktérium-DNS-ben létrehozott nem revertáló mutáció következményeképpen létrejött attenuációval jellemezhető baktériumtörzset tartalmaz.

6. A 4. igénypont szerinti vakcina, *azzal jellemezve,* hogy az aromás aminosavak bioszintetikus reakcióútjának két különböző génjében egy nem revertáló mutációt hordozó attenuált baktériumot tartalmaz.

7. A 6. igénypont szerinti vakcina, *azzal jellemezve,* hogy egy aroA aroC, aroA aroD vagy aroA aroE mutáns attenuált baktériumot tartalmaz.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti vakcina, *azzal jellemezve,* hogy promoterként a *nirB* promotert tartalmazó attenuált baktériumot tartalmaz.

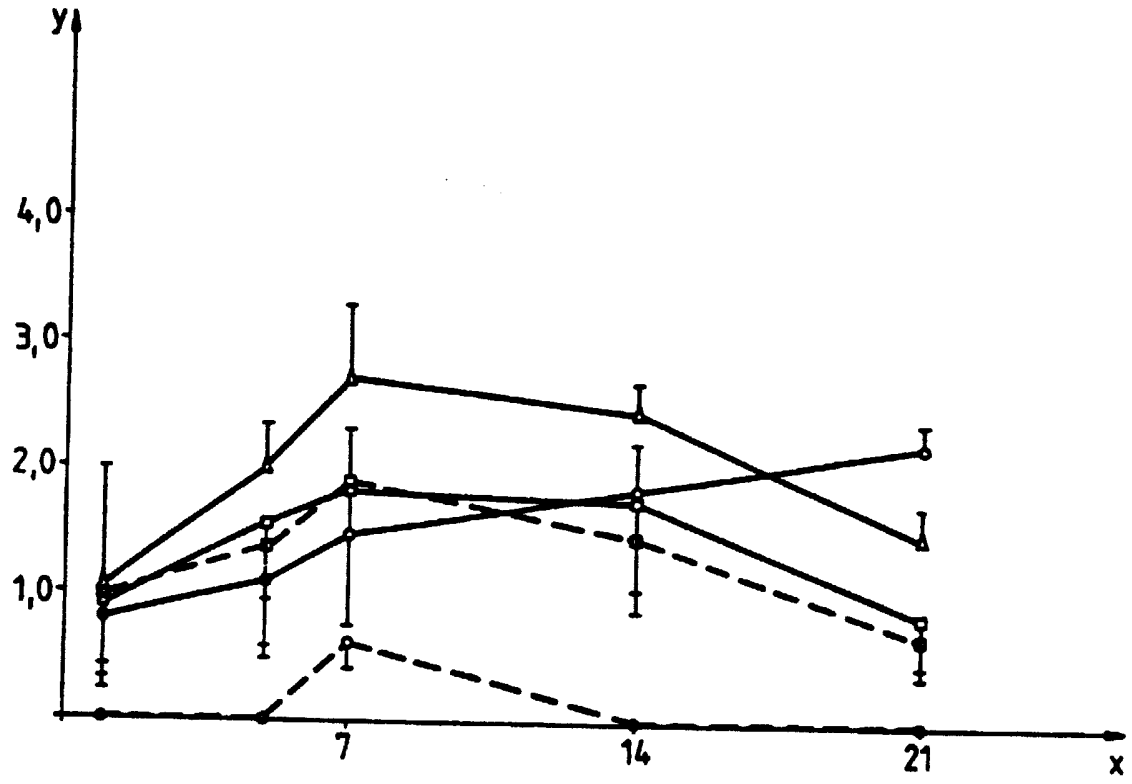
9. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti vakcina, *azzal jellemezve,* hogy heterológ fehérjét kódoló szekvenciaként egy vírusból, baktériumból, gombából, élesztőből vagy parazitából származó antigénszekvenciát kódoló szekvenciát tartalmazó attenuált baktériumot tartalmaz.

10. A 9. igénypont szerinti vakcina, *azzal jellemezve,* hogy a heterológ fehérjét kódoló szekvenciaként a *Bordetella pertussis*ból származó P.69 fehérjét vagy a tetanusz C fragmentumot kódoló szekvenciát tartalmazó attenuált baktériumot tartalmaz.

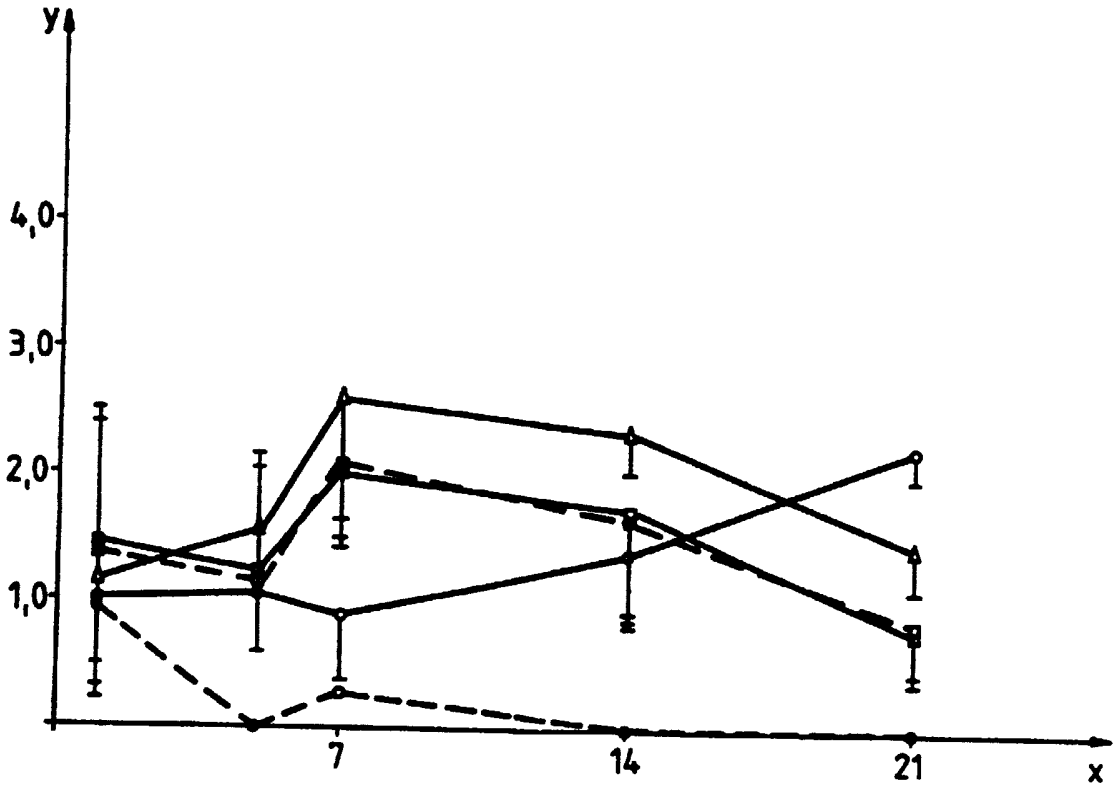
11. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerint meghatározott attenuált baktérium, *azzal jellemezve,* hogy emberi vagy állati gazdaszervezet mikroorganizmus általi fertőzésével szembeni profilaktikus kezelési eljárásban való alkalmazásra szolgál.

12. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerint meghatározott attenuált *Salmonella* baktérium, *azzal jellemezve,* hogy vakcinában való alkalmazásra szolgál.

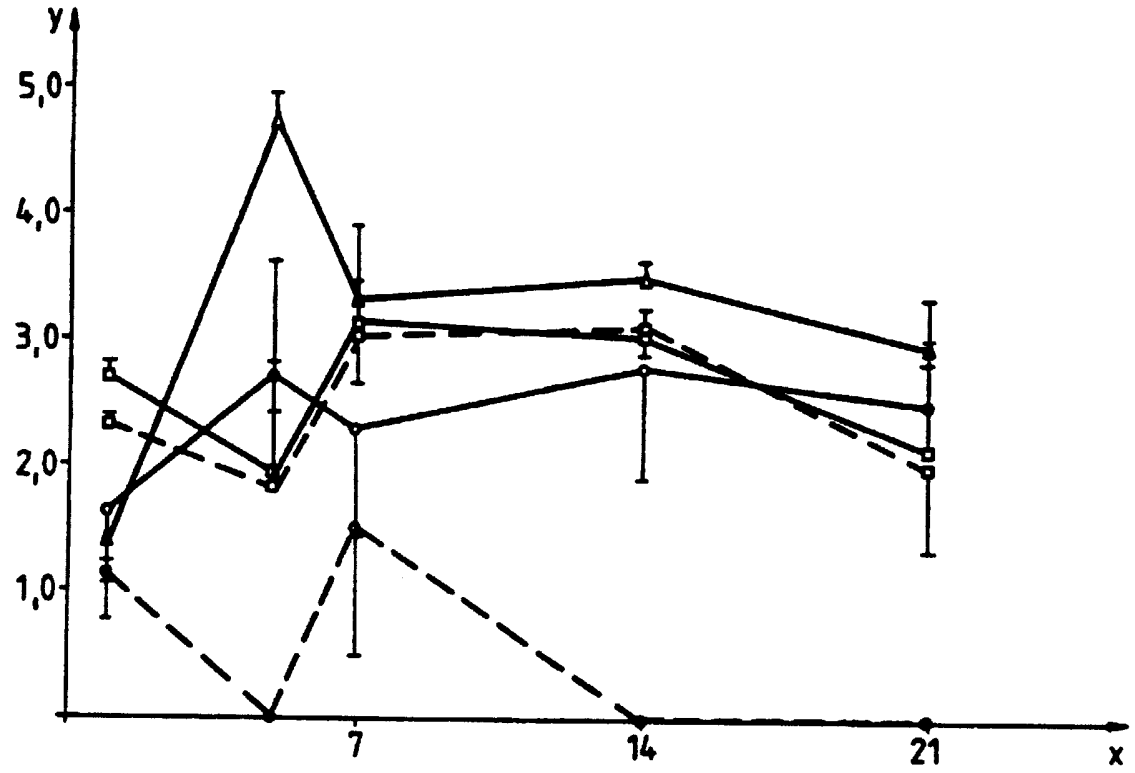
13. Eljárás attenuált baktériumot tartalmazó vakcina előállítására, *azzal jellemezve,* hogy az 1–12. igénypontok bármelyike szerint meghatározott baktériumot és gyógyászatilag elfogadható hordozót vagy oldószert összekeverünk.



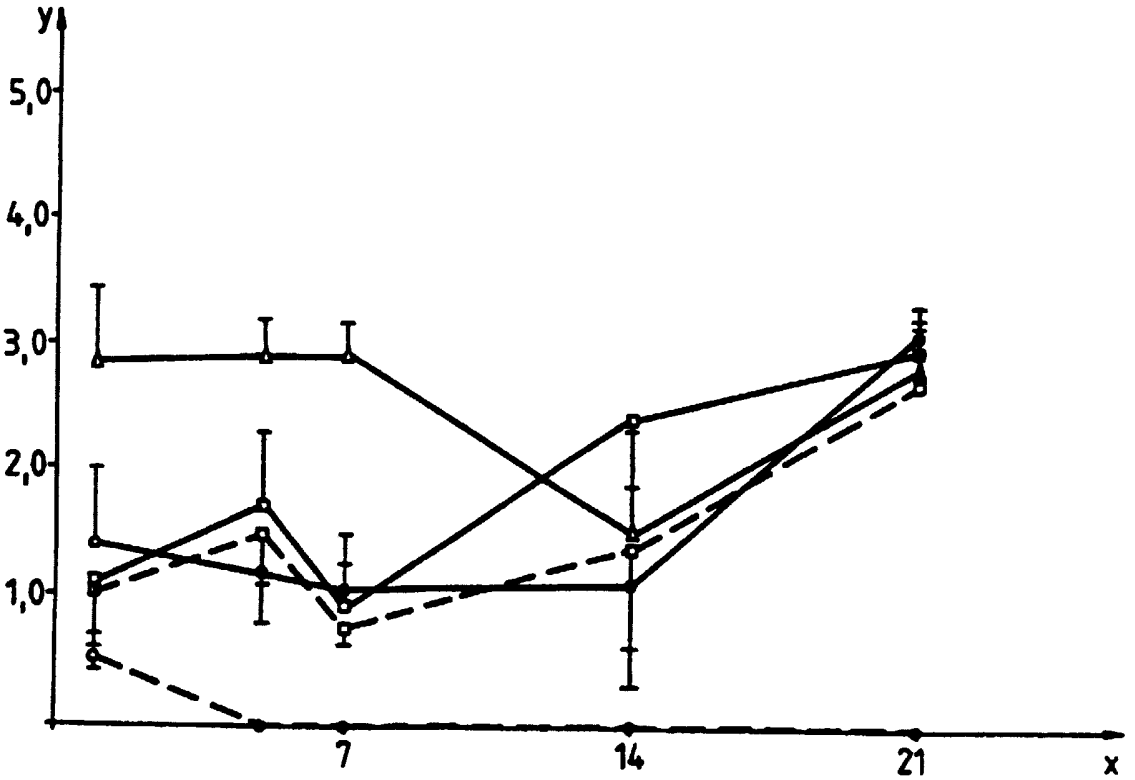
1. ábra



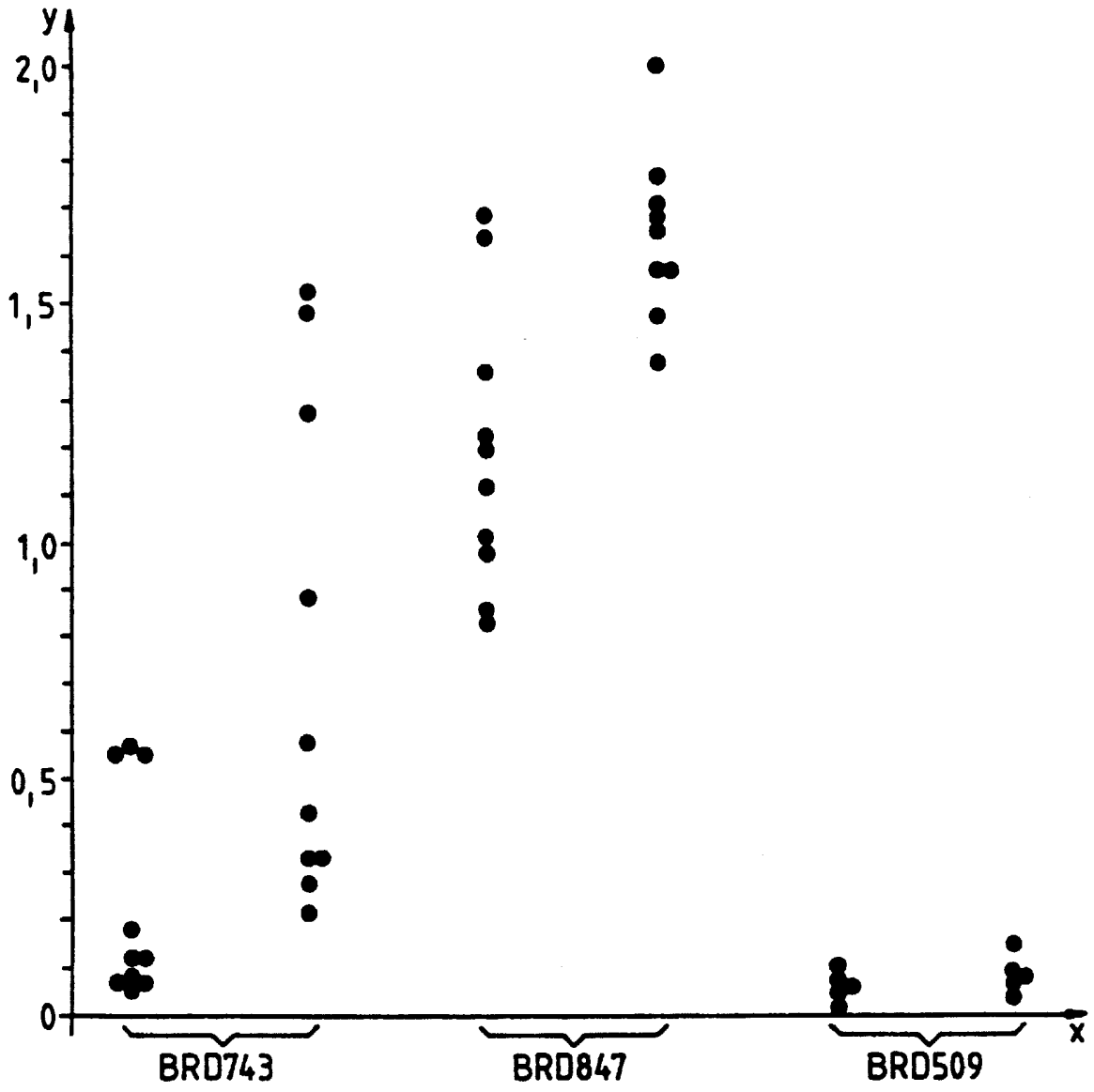
2. ábra



3. ábra



4. ábra



5. ábra

Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Törőcsik Zsuzsanna főosztályvezető-helyettes
Windor Bt., Budapest