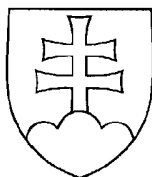


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: 563-94
(22) Dátum podania: 13.05.1994
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 93201401.2
(32) Dátum priority: 17.05.1993
(33) Krajina priority: EP
(40) Dátum zverejnenia: 11.07.1995
(45) Dátum zverejnenia udelenia
vo Vestníku: 12.02.2001
(86) Číslo PCT:

(11) Číslo dokumentu:

281 324

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl⁷:

C 12P 21/02
A 61K 39/09

(73) Majiteľ patentu: AKZO NOBEL N. V., Arnhem, NL;

(72) Pôvodca vynálezu: Jacobs Antonius Arnoldus Christiaan, Kessel, NL;

(74) Zástupca: Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov vynálezu: **Polypeptid zo *Streptococcus suis*, vakcína, spôsob výroby vakcíny a protilátky**

(57) Anotácia:

Je opísaný polypeptid zo *Streptococcus suis* s molekulovou hmotnosťou približne 54 000, schopný vyvolať tvorbu neutralizačných protilátok proti *Streptococcus suis*. Polypeptid je možné použiť na výrobu vakcíny proti infekcii vyvolanej *Streptococcus suis*. Ďalej je opísaný spôsob výroby tejto vakcíny a príslušná protilátka.

Oblasť techniky

Vynález sa týka polypeptidu zo *Streptococcus suis*, vakcíny na ochranu proti infekcii *Streptococcus suis* pri ošipáných, protilátok, ktoré reagujú s polypeptidom *Streptococcus suis* a spôsobu výroby týchto protilátok.

Doterajší stav techniky

Streptococcus suis bol identifikovaný ako hlavná príčina infekčného ochorenia ošipáných, ktoré je charakterizované artritídou, septikémiou, meningitídou, perikarditídou, endokarditídou, polyserozitídou a/alebo pneumóliou (Clifton-Handley, F. A., Br. Vet. Journ. 139:1 až 5 1983), Vecht a ďalší, Vet. Quarterly 7: 315 až 321 (1985), Windsor R. S.: Vet. Rec. 101 : 378 až 379 (1977), Higgins a ďalší: Can. J. Vet. Res. 54 : 170 až 173 (1990), Devriese a ďalší: Vet. Rec. 127 : 68 (1990).

Chorobnosť je zvlášť vysoká pri prasiatkach medzi 3 až 12 týždňami veku (Windsor R. S. a Elliot S. D., J. Hyg. Camb. 75 : 69 až 78 (1975), Guise a ďalší: Vet. Rec. 117 : 43 až 44 (1985), Hoffman L. J. a Henderson L. M. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians 28 Ann. Proc. 201 až 210 (1985). Keď sa ochorením môžu nakaziť ošipané akéhokoľvek veku, mortalita ošipáných starších než 14 týždňov je nízka (Guise a ďalší: Vet. Rec. 117 : 43 až 44 (1985), Hoffman L. J. a Henderson L. M.: L. M. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians 28 Ann. Proc.: 201 až 210 (1985).

Z času na čas sa vyskytujú také prípady, pri ktorých uvedený mikroorganizmus vyvolá ochorenie aj pri iných živočíšnych druhov alebo pri človeku (Devriese a ďalší: Vet. Rec. 127 : 68 (1990), Hommez a ďalší: Vet. Rec. 123 : 626 až 627 (1988), Arends a ďalší: Rev. Infect. Dis. 10: 131 až 137 (1988), Gottschalk a ďalší: J. Clin. Microbiol. 27: 2633 až 2636 (1989), Arends J. P. a Zanen H. C.: Rev. Infect. Dis. 10: 131 až 137 (1988)). K infekcii v týchto prípadoch obvykle dochádza poranením kože.

Ochorenie *Streptococcus suis* bolo prvýkrát opísané v Holandsku (DeMoor C. E.: Antonie van Leeuwenhoek 29 : 272 až 280 (1963)). Od vtedy podal rad výskumných pracovníkov správu o výskyte tejto choroby v ďalších európskych krajinách a tiež v Kanade, v USA a v Austrálii (Sanford E. a Tilker M. E.: J. Am. Vet. Med. Assoc. 23: 5 až 97 (1982), Perch a ďalší: J. Clin. Microbiol. 17: 993 až 996 (1983), Larson D. J. a Kott B.: Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians 28 Ann. Proc.: 121 až 130 (1985), Guise a ďalší: Vet. Rec. 117 : 43 až 44 (1985), Clifton-Handley F. A.: Br. Vet. Journ. 139: 1 až 5 (1983)).

Kmene *Streptococcus suis* boli rozdelené na veľké množstvo odlišných sérotypov.

Stanovenie sérotypov je založené na kapsulárnom polysacharidovom antigéne (Koehne a ďalší, Am. J. Vet. Res. 40: 1640 až 1641 (1979), Perch a ďalší, J. Clin. Microbiol. 17 : 993 až 996 (1983)).

Až dosiaľ bolo na celom svete preukázaných 29 rôznych sérotypov.

Určité sérotypy však v niektorých krajinách prevažujú. V škandinávskych krajinách prevažuje sérotyp 7, zatiaľ čo v Rakúsku sa najčastejšie vyskytuje sérotyp 9. Najrozšírenejším sérotypom po celom svete je sérotyp 2 (Gogolewski a ďalší, Aust. Vet. J. 67: 202 až 204 (1987), Boetner a ďalší, Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 95: 233 až 239 (1987).

Málo je dosiaľ známe o patogenézii, faktoroch virulencie alebo protektívnych antigénoch *Streptococcus suis*.

Neexistuje preto žiadne pravidlo, aké faktory sú potrebné na účinnú vakcináciu proti patogénu.

Jednou z bežných ciest na výrobu vakcíny proti bakteriálnemu ochoreniu je produkcia a skúšky s vakcínou, pripravených z celých buniek.

Tento postup bol použitý v prípade *Streptococcus suis* a ukázalo sa, že vakcína z celých buniek môže zaistiť účinnú ochranu ošipáných proti napadnutiu homológnyim organizmom (Holt a ďalší, Res. Vet. Sci. 48: 23 až 27 (1990)).

Zdá sa však pravdepodobné (Kebede a ďalší, Vet. Microbiol. 22: 249 až 257 (1990)), že ochrana získaná pri použití prípravkov z celých buniek je špecifická pre použitý serotyp. Ďalšími všeobecnými a dobre známymi nevýhodami vakcín z celých buniek sú a) nežiaduce reakcie v mieste a v blízkosti miesta injekcie a b) veľké množstvo nešpecifickej bielkoviny, ktorá je podaná v porovnaní s množstvom materiálu, ktorý skutočne vyvoláva ochranu.

Vzhľadom na skutočnosť, že v súčasnosti je na báze polysacharidového obalu známych už 29 odlišných sérotypov *Streptococcus suis* je zrejme, že by vakcíny s použitím celých buniek mali obsahovať rad sérotypov na dosiahnutie spektra ochrany.

Takáto vakcína bola pripravená na ochranu ľudí proti pneumólii vyvolanej streptokokmi (Boulois G. J.: Journ. Gen. Microbiol. 138: 249 až 259 (1992).

Táto vakcína obsahuje 23 polysacharidov z najčastejšie sa vyskytujúcich sérotypov. Vakcína však má okrem svojej zložitosti ešte ďalšie podstatné nevýhody vzhľadom na nízky stupeň imunogenity kapsulárnych polysacharidov.

Z tohto dôvodu boli vyvíjané snahy stanoviť určujúce faktory, ktoré pravdepodobne hrajú úlohu v patogenézii ochorenia *Streptococcus suis*.

Boli opísané hemaglutiníny a fibrie ako potenciálne virulencie, ale ich presná úloha alebo funkcia, pokiaľ ide o patogenézu, nie je známa a zodpovedajúce molekuly alebo bielkoviny neboli identifikované. (Jacques a ďalší, J. Bacteriol. 172: 2833 až 2838 (1990), Gottschalk a ďalší, J. Clin. Microbiol. 28: 2156 až 2158 (1990)).

Až dosiaľ boli považované za potenciálne faktory virulencie štyri bielkoviny:

- bielkovina s molekulovou hmotnosťou 44 000 (Gottschalk a ďalší, Vet. Microb. 30: 59 až 71 (1992)).
- bielkovina s molekulovou hmotnosťou 94 000 (Holt a ďalší, J. Comp. Path. 1003: 85 až 94 (1990)),
- bielkovina s molekulovou hmotnosťou 110 000 (extracelulárny faktor), (Vecht a ďalší, Infect. Immun. 59: 3156 až 3162 (1991), Vecht a ďalší, Infect. Immun. 60: 550 až 556 (1992), Smith a Vecht, PCT-patentová prihláška WO 92/16630)),
- bielkovina s molekulovou hmotnosťou 136 000 (Mura-minidase Released Protein), Vecht a ďalší, Infect. Immun. 59: 3156 až 3162 (1991), Vecht a ďalší, Infect. Immun. 60: 550 až 556 (1992), Smith a Vecht: PCT-patentová prihláška WO 92/16630).

Bielkovina s molekulovou hmotnosťou 44 000 bola nájdená v patogénnom kmeni *Streptococcus suis*, sérotyp 2 a bolo preukázané, že nie je prítomná v nepatogénnom mutante tohto kmeňa. Antiséra, produkované proti mutantu, neobsahujúce túto bielkovinu s molekulovou hmotnosťou 44 000 neboli dostatočné na dosiahnutie úplnej ochrany proti pôvodnému kmeňu. Bielkovina sa teda zúčastňuje vzniku virulencie.

Antisérum produkované králikom proti bielkovine s molekulovou hmotnosťou 94 000 zo *Streptococcus suis*, sérotyp 2 zaisťuje pri myšiach ochranu proti infekcii homológnyim kmeňom.

Bielkoviny s molekulovou hmotnosťou 110 000 a 136 000 sú prítomné vo vysoko patogénnych kmeňoch a nie je možné ich preukázať v nepatogénnych kmeňoch, pričom bielkovina s molekulovou hmotnosťou 110 000 nie je prítomná pri kmeňoch s nízkou patogenitou.

To by mohlo ukazovať na skutočnosť, že bielkoviny s molekulovou hmotnosťou 110 000 a 136 000 sa zúčastňujú patogenézy. Na druhej strane neboli zatiaľ uverejnené žiadne správy o výsledkoch pokusov na izolátoch týchto bielikovín v uvedenom zmysle.

Je teda možné uzavrieť, že zatiaľ pokiaľ ide o potenciálne faktory virulencie, len bielkoviny s molekulovou hmotnosťou 44 000 a 94 000 preukázateľne hrajú úlohu v ochrane proti sérotypu 2. Túto ochranu bolo možné preukázať len pri myšiach a pri infekcii homológym kmeňom.

Okrem toho bola zatiaľ prítomnosť štyroch uvedených bielikovín preukázaná len v kmeňoch *Streptococcus suis*, sérotyp 2.

Ako už bolo uvedené, je vzhľadom na veľký počet rôznych sérotypov zrejme, že by antigén, nezávislý od sérotypu a poskytujúci sérologicky skríženú ochranu bol najvýhodnejším základom na vakcínu. Takýto antigén však dosiaľ nebol pre *Streptococcus suis* opísaný.

Podstata vynálezu

Teraz bolo neočakávane zistené, že niektoré kmene *Streptococcus suis* vylučujú polypeptid s molekulovou hmotnosťou približne 54 000, ktorý môže byť aktivovaný tiolom a inhibovaný cholesterolom a má hemolytickú účinnosť.

Všetkým hemolytickým toxínom je spoločný fenomén poškodzovania buniek cicavcov rozrušením integrity membrány a/alebo jej funkcie. Toto rozrušenie je zrejme dôsledkom tvorby pôrovitej štruktúry oligomérnymi formami toxínu, hneď ako prenikne do bunkovej membrány.

Bolo preukázané, že hemolytický polypeptid podľa vynálezu je toxín aktivovaný tiolom. Toxíny aktivované tioly sú účinné len v redukovanom stave a oxidáciou prechodne strácajú účinnosť (Smyth C. J. a Duncan J. L.: *Bacterial Toxins and Cell Membranes* Jeljaszewicz J. and Wadstrom T. (eds.) Londýn, Academic Press: 129 až 183 (1978)).

Napriek tomu, že úloha tiolovej skupiny zatiaľ nie je zrejmalá, predpokladá sa, že ide o dôležitú časť motívu sekvencie, ktorá je podstatná pre vznik poškodenia membrán.

Mechanizmus cytolytického účinku niektorých skupín hemolyzínu predpokladá väzbu hemolytického polypeptidu na cholesterol v membráne cicavčej bunky. Hneď, ako je bielkovina naviazaná na bunku, vstupuje do dvojitej vrstvy lipidov. Potom sa vytvorí oligomérené hemolyzínové komplex, o ktorých sa predpokladá, že sú príčinou vzniku transmembránových pórov.

Bolo preukázané, že hemolytická účinnosť polypeptidu podľa vynálezu patrí do skupiny hemolyzínov, ktorú je možné inhibovať pôsobením cholesterolu. Cholesterol zrejme hrá kľúčovú úlohu pri väzbe hemolyzínu na cieľové bunky. Bol navrhnutý rad modelov, v ktorých je cholesterol primárnym miestom väzby toxínu v bunke. Voľný cholesterol je účinným inhibítorom cytolytickej účinnosti, čo môže byť vysvetlené tak, že v prípade, že je miesto väzby sterolu na toxín obsadené (voľným) cholesterolom, nemôže sa už ďalej viazať na cholesterol, viazaný na membránu (Boulnois a ďalší, *Mol. Microbiol.* 5: 2611 až 2616 (1991)).

Pre hemolytický peptid podľa vynálezu bola stanovená molekulová hmotnosť 54 000. Táto molekulová hmotnosť bola stanovená bežnými postupmi s použitím elektroforézy

na polyakrylamidovom géli, ako je opísané v príklade II. Dráha C na obr. 1 znázorňuje čistený polypeptid, ohraničený značiacimi molekulami (dráhy A a D).

Hemolytický polypeptid z jedného kmeňa *Streptococcus suis*, kmeň P1/7, bol ďalej charakterizovaný stanovením svojho N-terminálneho reťazca aminokyselín. Reťazec č. 1 je uvedeným N-terminálnym reťazcom tohto polypeptidu. Hemolytické polypeptidy je možné izolovať z niektorých, ale nie zo všetkých kmeňov *Streptococcus suis*. Môžu sa taktiež vyskytovať pre určité modifikácie v nukleových kyselinách génov pre hemolytické polypeptidy z rôznych kmeňov *Streptococcus suis*. Tieto modifikácie nemusia mať žiadny vplyv na reťazec aminokyselín zodpovedajúceho polypeptidu v prípade, že modifikácia je taká, že vzniká nový triplet, ktorý je kódom pre tú istú aminokyselinu. K tomu dochádza napríklad v prípade, že je G v triplete CTG pre leucín nahradené C, takže vzniká iný triplet, ktorý je taktiež kódom pre leucín. Ale v prípade, ak by došlo k náhrade T s použitím C, bol by nový triplet kódom pre prolín namiesto pre leucín. To by už viedlo k variácii v reťazci aminokyselín hemolytického polypeptidu.

Variácie v reťazci aminokyselín môžu byť dôsledkom náhrady jednej alebo väčšieho počtu aminokyselín ich funkčnými ekvivalentmi alebo vzácnejšie zavedením STOP-kodónu alebo v prípade vypustenia/zaradenia do nukleového reťazca môže dôjsť k vypusteniu alebo zaradeniu niektorej aminokyseliny navyše do reťazca aminokyselín. Často je možné pozorovať náhradu určitej aminokyseliny jej funkčným ekvivalentom. Príklady boli opísané v Neurath a ďalší, *The Proteins*, Academic Press, New York (1979), str. 14, obr. 6, ide okrem iného o náhradu alanínu serínom, Ala/Ser alebo Val/Ile, Asp/Glu a podobne. Okrem týchto variácií, pri ktorých dochádza k zaradeniu funkčného ekvivalentu pôvodnej aminokyseliny, môže dochádzať aj k variáciám, v ktorých je aminokyselina nahradená inou aminokyselinou, ktorá však nie je jej funkčným ekvivalentom. Táto modifikácia sa však od predchádzajúcej líši len tým, že môže vzniknúť bielkovina s miernou modifikáciou vo svojom priestorovom rozložení.

Je samozrejme, že variácie reťazca nukleových kyselín v kódovom reťazci pre hemolytický polypeptid, pri ktorých dochádza k takým variáciám v reťazci aminokyselín, pri ktorých je imunogénna účinnosť polypeptidu zachovaná, patria taktiež do rozsahu podstaty vynálezu.

Podstata vynálezu tvorí aj vakcína schopná zaistiť ochranu ošpaných proti infekcii *Streptococcus suis*, ktorá obsahuje uvedený hemolytický polypeptid alebo jeho časť, schopnú vyvolať imunologickú odpoveď na podanie hemolytického polypeptidu *Streptococcus suis*. Takúto vakcínu je možné získať napríklad s použitím syntetického polypeptidu, napodobujúceho polypeptid podľa vynálezu alebo jeho časť, schopnú vyvolať imunologickú odpoveď proti hemolytickému polypeptidu *Streptococcus suis*.

Ďalším možným spôsobom získania takejto vakcíny je biochemické čistenie hemolytického polypeptidu z bakteriálnej kultúry. Toto je možné dosiahnuť napríklad odstredením baktérií a použitím filtrácie na stĺpci gélu na oddelenie hemolytického polypeptidu od zvyšných zložiek. Ďalšie čistenie možno uskutočniť napríklad selektívnym zrážaním s použitím síranu amónneho s následným odstredením a rozpustením usadeniny vo vhodnom pufrí.

Vakcínu uvedeného typu je možné získať aj molekulárnym klonovaním. S použitím tohto postupu je možné klonovať reťazec nukleovej kyseliny, ktorá je kódom pre polypeptid podľa vynálezu alebo časť tohto reťazca, schopnú vyvolať imunologickú odpoveď proti hemolytickému polypeptidu *Streptococcus suis* vo vektore pre expresiu a potom

dosiahnuť expresiu vo vhodnom systéme pre expresiu. Produkt expresie je potom možné použiť ako vakcínu. Možnými systémami pre expresiu sú baktérie, kvasinky, huby a ďalšie systémy na báze buniek hmyzu a cicavcov.

Ďalším spôsobom získania polypeptidu je klonovanie genetickej informácie pre polypeptid vo vhodnom vírusovom vektore a využitie hostiteľskej bunky vírusu na expresiu bielkoviny. Takýto systémom môže byť napríklad vírus ovčích kiahní v kombinácii s bunkou cicavca, citlivou na polypeptid alebo baculovírus a bunky *Spodoptera frugiperda*. Čistené alebo surové lyzáty buniek obsahujúce polypeptid, produkovaný expresiou, je potom možné použiť ako východiskový materiál pre vakcínu.

Ďalšia možnosť spočíva vo využití vírusov, ktorých hostiteľom je ošipaná, napríklad vírusu Live Recombinant Carrier. LRC je vírus, v ktorom bola klonovaná doplnková genetická informácia. Živočíchym infikovaným týmto rekombinantným vírusom budú produkovať imunogénnu odpoveď nielen proti imunogénom vo vektorovom víruse, ale aj proti imunogénnej časti alebo častiam polypeptidu alebo polypeptidov, pre ktoré bol klonovaný v rekombinantnom víruse genetický kód.

Vírus, ktorý je zvlášť vhodným materiálom, je vírus LRC, z organizmov odlišných od ošipaných, je *Pseudorabies*. Tento vírus bol už s úspechom použitý ako LRC, napríklad na kombinovanú vakcináciu proti pseudorabies a proti cholere ošipaných.

Vo výhodnom uskutočnení obsahuje vakcína podľa vynálezu ešte ďalšie imunogény *Streptococcus suis*.

Bolo zistené, že antiséra proti *Streptococcus suis*, serotyp 2 - hemolytickému polypeptidu sú reaktívne s hemolyzínmi všetkých kmeňov *Streptococcus suis*, ktoré hemolyziny vytvárajú bez ohľadu na ich sérotypy.

Túto reaktivitu nebolo možné preukázať pre uvedené polypeptidy *Streptococcus suis* s molekulovými hmotnosťami 44 000, 94 000, 110 000 a 136 000.

Bez ohľadu na túto skutočnosť, má vakcína podľa vynálezu, ktorá navyše obsahuje ešte jeden z týchto polypeptidov alebo akýkoľvek iný imunogén *Streptococcus suis* ešte lepšiu účinnosť. Táto vyššia účinnosť môže byť napríklad dôsledkom synergného účinku. Mohla by teda byť dosiahnutá ešte účinnejšia vakcína s použitím nižšieho množstva antigénu.

V ešte výhodnejšom uskutočnení vakcína obsahuje podľa vynálezu aj nosič, viazaný na polypeptid podľa vynálezu. Ako nosiče je možné použiť rôzne molekuly, napríklad haemokyanín (Keyhole Limpet Haemocyanin), sérový albumín hovädzieho dobytku alebo tiež zložitejšie molekuly cukrov.

V ešte výhodnejšom uskutočnení obsahuje vakcína podľa vynálezu kapsulárny polysacharid, viazaný na polypeptid podľa vynálezu.

Postupy pre kovalentnú väzbu polypeptidu na uhľohydráty boli opísané napríklad v Dick W. E. a Beurt M. Contrib. Microbiol. Immunol. 10: 48 až 114 (1989).

Je zrejme, že použitie typov nosičov alebo ďalších spôsobov väzby polypeptidu na uhľohydrát taktiež patrí do rozsahu vynálezu.

Podľa ďalšieho možného uskutočnenia môže vakcína podľa vynálezu obsahovať antigény ďalších, pre ošipané antigénnych organizmov a vírusov. Takýmito organizmami a vírusmi sú napríklad *Actinobacillus pleuropneumoniae*, vírus pseudorabies, vírus chrípky ošipaných, vírus prenosnej gastroenteritídy, rotavírus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida* a *Bordetella bronchiseptica*.

Vakcína podľa vynálezu môže vo výhodnom uskutočnení taktiež obsahovať pomocný prostriedok. Pomocné prostriedky sú všeobecne látky, ktoré zvyšujú imunologickú odpoveď hostiteľa nešpecifickým spôsobom. V danej oblasti techniky je známy celý rad rôznych prostriedkov tohto typu. Príkladom môže byť Freundov kompletný a nekompletný pomocný prostriedok, vitamín E, neiónové blokované polyméry, muramylidipeptidy, Quill A^R, minerálne oleje, ako Bayol^R alebo Markol^R, rastlinné oleje a niektoré z homopolymérov, ako Carbopol^R alebo Diluvac^R Forte.

Vakcína môže tiež obsahovať takzvaný „nosič“. Ide o látku, ku ktorej polypeptid prilípa bez toho, aby bol na ňu kovalentne viazaný. Často používanými nosičmi sú napríklad hydroxid hlinitý, fosfát alebo oxid hlinitý, oxid kremičitý, kaolín a bentonit.

Špecifickým nosičom, v ktorom je antigén čiastočne zapuzdrený, je prostriedok ISCOM podľa EP 109 942, EP 180 564 a EP 242 380.

Okrem toho vakcína môže obsahovať ešte jedno alebo väčší počet zmáčadiel alebo emulgátorov, ako sú napríklad Spal alebo Tween.

Vakcína sa ešte často mieša so stabilizátormi, napríklad na ochranu citlivých polypeptidov, ktoré by mohli podľahnúť degradácii, na predĺženie skladovateľnosti vakcíny alebo na ľahšiu lyofilizáciu. Vhodnými stabilizátormi sú napríklad SPGA (Bovarnik a ďalší, J. Bacteriology 59: 509 (1950)), uhľohydráty, ako sorbitol, mannitol, trehalóza, škrob, sacharóza, dextrans alebo glukóza, ďalej bielkoviny, ako albumín alebo kazeín alebo degradačné produkty týchto látok a tiež aj pufré, napríklad fosforečnany alkalických kovov. Okrem toho môže byť vakcína uvedená do suspenzie vo fyziologicky prijateľnom riedidle.

Je samozrejmé, že je možné pridávať ešte iné pomocné látky, nosné prostredie, riedidlá, emulgátory alebo stabilizátory pre polypeptidy bez odchylenia sa od zmyslu vynálezu.

Podľa ďalšieho možného uskutočnenia sa používajú protilátky, monošpecificky reaktívne s polypeptidom podľa vynálezu alebo jeho antigénnej časti na dosiahnutie pasívnej imunity.

Monošpecifické protilátky sú protilátky, ktoré sú špecificky schopné reagovať s polypeptidom podľa vynálezu s molekulovou hmotnosťou 54 000 alebo s jeho antigénnou časťou bez toho, aby pritom reagovali s ostatnými antigénmi *Streptococcus suis*.

Protilátky proti patogénom je možné s úspechom použiť na dosiahnutie pasívnej imunizácie. Výhoda tohto spôsobu liečenia spočíva v tom, že protilátky sú k dispozícii v okamihu vzniku infekcie. To znamená, že nedochádza k strate času čakaním na aktiváciu imunologického systému hostiteľa tak, aby došlo k tvorbe dostatočného množstva protilátky na obranu organizmu. Zvlášť v prípade, keď k infekcii už došlo a ochorenie postupuje, dochádza podaním protilátok okamžite k vyličeniu živočicha a k odstráneniu toxínov a patogénnych organizmov. Vakcína, schopná chrániť ošipané proti ochoreniu po infekcii *Streptococcus suis* a obsahujúca protilátky proti hemolytickému polypeptidu teda taktiež tvorí súčasť podstaty vynálezu.

Podľa vynálezu je taktiež možné vyrobiť vakcínu, schopnú chrániť cicavcov proti infekcii *Streptococcus suis*. Postup spočíva v tom, že sa polypeptid podľa vynálezu spracuje spolu s farmaceutickým nosičom, pomocnými látkami alebo riedidlom.

Praktické uskutočnenie vynálezu bude vysvetlené nasledujúcimi príkladmi.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad I

Bakteriálne kmene

Streptococcus suis, typ 2, kmene P1/7 a 688/9 boli dané Dr. T. Alexandrom, University of Cambridge, UK. Typ 2, kmene 4005, D282, 3921, 3977, 3889 a T15 boli získané od Dr. U. Vechta, CDI-DLO, Lelystad, Holandsko. Typ 7, kmene 10 681, 10 727 a 14 391 boli získané od Dr. B. Nielsen, Intervet Scandinavia, Kodaň, Dánsko. Referenčné kmene 1 až 22 boli získané od Dr. J. Henrichsena, Statens Serum Institute, Kodaň, Dánsko.

Kmeň B10, sérotyp 1, je izolát zo súčasnosti, získaný od „Gezondheidsdienst voor dieren, Oost-Nederland“, Deventer, Holandsko.

Kmene NV92109, sérotyp 8, 22089, sérotyp 9 a 220891, sérotyp 14 sú izoláty zo súčasnosti a boli získané od chorých ošipaných.

Bakteriálne kultúry

Bakteriálne kmene boli naočkované na agar s ovčou krvou a pestované 24 hodín pri teplote 37 °C. Na stanovenie produkcie hemolyzínu bolo niekoľko kolónií naočkovaných do 100 ml bujónu Todd Hewitt (Difco) a pestovaných pri teplote 37 °C až do skončenia exponenciálnej fázy rastu (zvyčajne 5 až 6 hodín). Potom boli bunky oddelené odstredení pri 10 000 g počas 10 minút a supernatant bol uložený až do použitia pri teplote -20 °C.

Skúška na inhibíciu hemolyzínu

Na titráciu séra na schopnosť spôsobiť inhibíciu hemolyzínu bolo pripravené sériové riedenie séra (vždy dvojnásobné riedenie, 75 mikrolitrov) vo vyhlbeniach titračných platní s použitím fyziologického roztoku chloridu sodného s 10 mM tris pufru s pH 7,4 ako riedidla. Potom bolo do každého vyhlbenia pridaných 75 µl roztoku hemolyzínu, ktorý obsahoval vždy 25 hemolyzínových jednotiek. Po inkubácii vzoriek pri teplote 20 °C počas 10 minút bolo do každého vyhlbenia pridaných ešte 150 µl 2 % suspenzie konských erytrocytov a skúška bola skončená tak, ako bolo uvedené pre titráciu hemolytickej účinnosti. Titer bol definovaný ako najväčšie zriedenie, pri ktorého použití je ešte možné dosiahnuť 50 % inhibíciu hemolýzy. Schopnosť špecifického séra ošipaných P399 proti čistenému hemolyzínu (odvodenému od *Streptococcus suis*, typ 2) spôsobiť inhibíciu hemolytického účinku pri kmeňoch rôznych sérotypov bola skúšaná vždy v jedinom vyhlbení s použitím 75 mikrolitrov séra P399, vopred zriedeného 1 : 128 a 75 mikrolitrov nezriedeného supernatantu kultúr rôznych kmeňov. Skúška potom bola skončená uvedeným spôsobom. Preimúne sérum taktiež vopred zriedené 1 : 128 bolo použité ako kontrola (maximálna hemolýza). Skríženú neutralizáciu bolo možné pozorovať v prípadoch, keď sérum P399 spôsobilo inhibíciu hemolýzy na viac než 50 % v porovnaní s preimúnnym sérom. Vzorky s titrom pre hemolýzu nižším než je hodnota 24, neposkytovali pri tejto skúške žiadne výsledky vzhľadom na to, že maximálna hemolýza (preimúne sérum) nedosahovala dvojnásobok hodnoty pozadia (sérum P399).

Príklad II

Čistenie hemolyzínu

250 ml kultúry kmeňa P1/7, pestovanej cez noc bolo ďalej pestovaných za anaerobných podmienok 6 hodín v 12 litroch Todd Hewittovho roztoku pri teplote 37 °C a potom boli bunky tohto kmeňa oddelené kontinuálnym odstredení. Supernatant kultúry bol ochladený na teplotu 4 °C a potom sa nechal prejsť filtrom 0,8 µm a bol zahustený na 150 ml na filtroch PTGG 10 000 NMWL. Po prechode filtrom s priemerom otvorov 0,2 µm boli podiely roztoku po 1,0 ml nanesené na gél Superose-12 vo filtračnom stĺpci (FPLC, Pharmacia) a stĺpec bol vymývaný roztokom chloridu sodného s fosfátovým pufrum s pH 7,2 s obsahom 0,5 M NaCl. Boli odobrané frakcie po 0,5 ml a analyzované na SDS-PAGE a bol vykonaný imunoblot a test na hemolýzu. Najvyššiu hemolytickú účinnosť bolo možné preukázať vo frakciách 35 až 45, ako je zrejme z obr. 2. Analýzou rôznych frakcií zo stĺpca SDS-PAGE a imunoblotovou reakciou bolo možné preukázať, že hemolytická účinnosť putuje spoločne s antigénom s molekulovou hmotnosťou približne 54 000, ako je zrejme z obr. 3. Hemolytické frakcie 35 až 45 boli spojené a malé množstvo prítomných nečistôt bolo odstránených selektívnym zrážaním s použitím 50 % síranu amónneho v priebehu troch hodín pri teplote 4 °C. Po odstredení bola usadenina znova uvedená do suspenzie v 20 ml chloridu sodného so 40 mM fosfátového pufru s pH 7,2. Ako výsledná látka bol získaný polypeptid, ktorý mal po prechode stĺpcom SDS-PAGE molekulovú hmotnosť približne 54 000 pri farbení modrou Coomassie brilliant, ako je zrejme z obr. 1, špecifická účinnosť bola po redukcii beta-merkaptóetanolom v hemolytických jednotkách približne $0,7 \times 10^6$ /mg.

Stanovenie bielkoviny

Koncentrácia bielkoviny bola meraná spôsobom podľa publikácie Lowry a ďalší, J. Biol. Chem. 193: 265 až 275 (1951) s použitím sérového albumínu hovädzieho dobytky ako štandardu.

SDS-PAGE a Western blot

SDS-PAGE na 9 % géloch a príprava vzorky boli uskutočnené v podstate podľa publikácie Laemmli U. K., Nature 227: 689 až 685 (1970). Po elektroforéze boli peptidy sfarbené modrou Coomassie brilliant R250 alebo bol vykonaný elektroblot s použitím membrány Immobilon PVDF. V prípade blotu boli ako sondy použité polyklonálne králičie sérum R2089 alebo polyklonálne myšie sérum M189 (opísané v odstavci Antiséra). Po premytí boli viazané protilátky vizualizované s použitím konjugátu peroxidázy a kozieho antiséra proti králičím tkanivám alebo konjugátu s kozími protilátkami proti myším tkanivám, ako substrát bol použitý v oboch prípadoch diaminobenzidín.

Hemolytická účinnosť po rôznom spracovaní

Na každé spracovanie bolo použitých 0,5 ml čisteného hemolyzínu v roztoku chloridu sodného so 40 mM fosfátovým pufrum s pH 7,2 pri titri 2⁷.

- Vplyv teploty bol meraný po indukcii hemolyzínu pri rôznych teplotách v rozmedzí -20, 4, 20, 37 a 100 °C.

- Vplyv proteínázy K bol meraný tak, že bolo 5 mikrolitrov koncentrovaného roztoku enzýmu (2 mg/ml) pridaných k 0,5 ml roztoku hemolyzínu a zmes bola inkubovaná 10 mi-

nút pri teplote 20 °C. Potom bola meraná zvyšná hemolytická účinnosť.

- Vplyv redukcie beta-merkaptetoanolom bol meraný tak, že bolo pridaných 5 mikrolitrov roztoku beta-merkaptetoanolu s koncentráciou 10 % objemových k 0,5 ml roztoku hemolyzínu a zmes bola inkubovaná 10 minút pri teplote 20 °C, potom bola meraná hemolytická účinnosť.

- Vplyv oxidácie peroxidom vodíka bol meraný tak, že bolo pridaných 5 mikrolitrov 10 % roztoku peroxidu k 0,5 ml roztoku hemolyzínu a potom bola zmes inkubovaná 10 minút pri teplote 20 °C, potom bola meraná akákoľvek zvyšná hemolytická účinnosť.

- Vplyv alkylácie akékoľvek tiolovej skupiny pôsobením TLCK (N- α -p-tosyl-L-lyzínchlorometylketón, Sigma) bol stanovený pridaním 5 mikrolitrov 10 % roztoku TLCK k 0,5 ml roztoku hemolyzínu s následnou inkubáciou 10 minút pri teplote 20 °C. Potom bola meraná akákoľvek zvyšná účinnosť skúškou na hemolyzín.

- Vplyv cholesterolu bol skúšaný pridaním 10 mikrolitrov 5 % cholesterolu (v 10 % etanole) k 0,5 ml roztoku hemolyzínu, potom bola reakčná zmes inkubovaná celkom 10 minút pri teplote 20 °C, potom bola meraná akákoľvek zvyšná hemolytická účinnosť.

- Reverzibilná redukcia po určitom spracovaní bola meraná tak, že k časti reakčnej zmesi bol pridaný prebytok beta-merkaptetoanolu v konečnej koncentrácii 2 %, potom bola zmes inkubovaná 10 minút pri teplote 20 °C a potom bola meraná zvyšná hemolytická účinnosť.

Účinok rôzneho spracovania na hemolytickú účinnosť je zhrnutý v tabuľke 1. Výsledky ukazujú, že hemolyzín je tepelne labilný, stiepi sa proteinázou K, oxiduje sa peroxidom vodíka a je možné ho alkylovať pôsobením TLCK. Okrem toho dochádza k inhibícii jeho hemolytickej účinnosti pôsobením cholesterolu. Po inkubácii s beta-merkaptetoanolom bolo možné preukázať zvýšenie účinnosti a po pridaní beta-merkaptetoanolu k prípravku oxidovanému peroxidom vodíka, došlo k obnoveniu hemolytickej účinnosti. Po pridaní prebytku beta-merkaptetoanolu k prípravku po pôsobení TLCK došlo k čiastočnému obnoveniu účinnosti. Toto čiastočné obnovenie účinnosti by zrejme bolo možné vysvetliť prítomnosťou oxidovaných tiolových skupín, ktoré nereagovali s TLCK. Účinok teploty a cholesterolu nebolo možné pridaním beta-merkaptetoanolu zrušiť.

V podvojných vzoroch, v ktorých bolo vynechané reakčné činidlo alebo hemolyzín nebolo možné pri skúškach vzoriek preukázať žiadny vplyv na hemolytickú účinnosť alebo žiadny vplyv reakčných činidiel bez hemolyzínu na erytrocyty.

Vníímavosť erytrocytov rôznych druhov na hemolyzín

Bola skúmaná vnímavosť erytrocytov z rôznych živočíšnych druhov, ako je človek, hovädzí dobytok, moriak, holub, myš, kurča, morča, králik, mačka a ošípaná, použitý bol redukovaný (0,1 % beta-merkaptetoanol) prípravok čisteného hemolyzínu s titrom 2^8 . Skúšky boli vykonávané tak, ako bolo opísané pri titracii hemolytickej účinnosti. Podľa výsledkov týchto skúšok boli všetky druhy erytrocytov rovnako citlivé na pôsobenie hemolyzínu. Titer sa menil v rozmedzí 2^7 (myš, mačka, moriak) až 2^{10} (človek).

N-terminálny reťazec aminokyselín

Prvých 16 zvyškov aminokyselín čisteného hemolyzínu, získaného z kmeňa P1/7 bolo stanovených pomocou automatizovanej Edmanovej degradácie, výsledky sú ďalej uvedené ako reťazec aminokyselín 1.

Prevaha molekúl hemolyzínu u rôznych kmeňov *Streptococcus suis*

Všetky dostupné kmene včítane kmeňov so sérotypmi 1 až 22 boli pestované v živnom prostredí Todd Hewitt až do skončenia exponenciálnej rastovej fázy (5 až 6 hodín). Potom boli bunky oddelené odstredením. Prítomnosť molekúl hemolyzínu v supernatante kultúry bola preukázaná skúškou na hemolyzín a pomocou imunoblotovej reakcie. Vefa, ale nie všetky kmene produkovali rôzne množstvo hemolyzínu v supernatante svojich kultúr, ako je zrejmé z tabuľky 2.

Všetky hemolytické vzorky včítane vzoriek s nízkou účinnosťou boli inhibované pôsobením cholesterolu a peroxidu vodíka. Okrem toho pridaním prebytku beta-merkaptetoanolu k vzorkám oxidovaným peroxidom vodíka k úplnému návratu hemolytickej účinnosti.

Je teda možné uzavrieť, že väčšina kmeňov produkovala hemolyzín v supernatante kultúry, nebolo možné preukázať žiadne známky produkcie odlišných hemolyzínov.

Príklad III

Vakcíny

Z kmeňa P1/7 boli pripravené štyri vakcíny na báze čisteného hemolyzínu koncentrovaného supernatantu kultúry alebo na báze spojených frakcií 19 až 31 zo stĺpca Superose-12 okrem toho, bola vyrobená vakcína ako placebo.

Na porovnanie bola pripravená vakcína na báze čisteného EF a ďalšia vakcína bola pripravená z kmeňa B10 z koncentrovaného supernatantu kultúry.

Vakcína bola pripravená nasledujúcim spôsobom

Čistený hemolyzín s obsahom 40 mikrogramov bielkoviny bol v pomere 1 : 1 zmiešaný s pomocným prostriedkom Diluac Forte[®] za vzniku homogénnej emulzie. Táto vakcína bola označená VAC-SLY.

V prípade vakcíny obsahujúcej koncentrovaný supernatant bola časť koncentráty PTCG s obsahom 1,9 mg bielkoviny/ml zmiešaná v pomere 1 : 1 s pomocným prostriedkom Diluac Forte až do vzniku homogénnej suspenzie. Táto vakcína bola označená VAC-CCS.

Tretia vakcína bola pripravená zmiešaním spojených a koncentrovaných frakcií 19 až 31 zo stĺpca Superose-12, obsahujúcich 2 mg bielkoviny/ml v pomere 1 : 1 s pomocným prostriedkom Diluac Forte za vzniku homogénnej suspenzie. Frakcie 19 až 31 z uvedeného stĺpca obsahovali väčšinu extracelulárne produkovaných bielkovín kmeňa P1/7 *Streptococcus suis*, boli však v podstate zbavené hemolyzínu. Táto vakcína bola označená VAC-SCF.

Štvrtá vakcína bola pripravená filtráciou supernatantu kultúry cez filter s priemerom otvorov 0,2 mikrometre s následným zrážaním síranom amónnym, nasýteným na 60 % počas 16 hodín pri teplote 0 °C. Po odstredení bola vytvorená usadenina znova uvedená do suspenzie v PBS za vzniku vzorky, ktorá bola približne 100-krát koncentrovanejšia v porovnaní so supernatantom kultúry.

Vakcína, použitá ako placebo, bola pripravená rovnakým spôsobom ako bolo uvedené s tým rozdielom, že roztok antigénu bol nahradený fyziologickým roztokom chlóridu sodného so 40 mM fosfátovým pufróm s pH 7,2.

Kmeň B10 bol použitý na prípravu vakcíny vyžrážaním síranom amónnym, nasýteným na 60 % počas 16 hodín pri teplote 0 °C, ako bolo opísané.

Vakcína EF bola získaná po chromatografii s hydrofóbnou interakciou (Phenyl Sepharose, vysoký stupeň substitúcie) s použitím supernatantu kultúry kmeňa P1/7 a klesajúceho gradientu síranu amónneho. Vzorka EF po skončení čistenia (dialýza a riedenie) obsahovala približne 150 mikrogramov EF/ml. Podľa SDS-PAGE a farbenia Coomassieovou modrou mala vzorka čistotu vyššiu než 95 %.

Antisérum

Špecifické polyklonálne sérum ošipaných (P399) proti čistenému hemolyzínu bolo získané nasledujúcim spôsobom.

Ošipaná vo veku 4 týždne bola imunizovaná vnútrovalovo (krk) s použitím 2 ml vakcíny VAC-SLY. Po dvoch týždňoch bolo vykonané preočkovanie rovnakým množstvom vakcíny, podanej rovnakým spôsobom. Po ďalších dvoch týždňoch bola odobratá krv, ktorá potom bola skladovaná až do použitia pri teplote -20 °C.

Skúška na očkovanie myši

Myšie kmene Balb-c vo veku 4 týždňov boli rozdelené do 4 skupín a očkované podkožným podaním vakcíny, a to 0,5 ml vakcíny VAC-CCS, VAC-SCF, VAC-SLY alebo placebo. Po dvoch týždňoch boli zvieratá preočkované rovnakým spôsobom. Po ďalších dvoch týždňoch bolo intraperitoneálne podaných 0,5 ml 6 hodín starých kultúr kmeňa P1/7 v Todd-Hewittovom živnom prostredí obsahujúcom 4×10^9 CFU/ml. Potom bola zaznamenaná počas 7 dní mortalita myši.

Výsledky

Myši, ktorým bolo podané placebo, uhynuli do troch dní, zatiaľ čo myši, očkované vakcínami VAC-CCS a VAC-SLY boli celkom chránené, ako je zrejme z tabuľky 3. Vakcína VAC-SCF poskytovala len čiastočnú ochranu. Táto vakcína obsahovala väčšinu extracelulárne produkovaných antigénov kmeňa P1/7, ale bola v podstate zbavená hemolyzínu.

Záver

Z toho, čo bolo uvedené, je možné uzavrieť, že vakcína, obsahujúca čistený hemolyzín podľa vynálezu chráni myši pred infekciou. Z toho vyplýva, že hemolyzín je faktorom, určujúcim virulenciu a že neutralizácia tohto jediného faktora virulencie stačí na ochranu myši proti zhubným účinkom infekcie *Streptococcus suis*, typ 2.

Pokus s heterológnu ochranou myši

K pokusu boli použité myši kmeňa Balb/c vo veku štyroch týždňov (Iffa Credo).

Usporiadanie pokusu

Skupiny 30 myši (2 x 15) boli očkované raz podkožnou dávkou 0,4 ml vakcíny alebo neboli vôbec očkované (jedna skupina 30 myši), ako je zrejme z tabuľky 6. Štyri týždne po očkovaní bolo polovici myši v skupine intraperitoneálne podaných 0,5 ml 6 hodín starej kultúry kmeňa B10 (typ 1), druhej polovici myši bolo podané rovnaké množstvo kultúry kmeňa P1/7 (typ 2).

Mortalita myši bola zaznamenaná v priebehu 7 dní. Kmeň B10 je pre myši menej patogénny (mortalita približ-

ne 20 %) než kmeň P1/7 (mortalita 100 %). Z tohto dôvodu bol v skupine, ktorej bola podaná kultúra kmeňa B10, zaznamenaný aj počet myši, pri ktorých došlo k prejavom ochorenia. Tesne pred podaním kultúr boli odobraté vzorky krvi a zmes sér bola podrobená imunoblotovej skúške.

Výsledky

Pri skúške na hemolyzín mal supernatant kultúry kmeňa B10 (sérotyp 1) hemolytickú účinnosť $2^{9,5}$, zatiaľ čo supernatant z kultúry kmeňa P1/7 (sérotyp 2) mal túto účinnosť veľkosti 2^7 . To znamená, že kmeň B10 produkoval približne 5x vyššie množstvo hemolytickej účinnosti než kmeň P1/7.

Na základe SDS-PAGE a farbenia Coomassieovou modrou je zrejme, že oba koncentrované supernatanty kultúr kmeňov B10 a P1/7 obsahovali bielkovinu s molekulovou hmotnosťou 54 000 (SLY) a že koncentrovaný supernatant kultúry kmeňa B10 obsahoval väčšie množstvo tejto bielkoviny, čo je v súlade s jeho vyššou účinnosťou. Čistený EF neobsahoval žiadnu bielkovinu s molekulovou hmotnosťou 54 000.

Po podaní kultúry patogénnych kmeňov sa ukázalo, že obe vakcíny, obsahujúce supernatant kultúry vyvolávali homológnu ochranu myši, ako je zrejme z tabuľky 6. V prípade, že boli vzorky sér zo skupín po ich zliatí skúšané imunoblotovou technikou s použitím supernatantu kultúry kmeňa P1/7 alebo B10 ako antigénu, bolo možné preukázať, že obe vakcíny na báze supernatantu kultúr vyvolávali tvorbu protilátok proti SLY, ako je zrejme z tabuľky 6. V prípade protilátok proti supernatantu kultúry B10 bolo možné preukázať silnejšiu reakciu než v prípade kmeňa P1/7. Pri heterológnych skúškach imunoblotovou technikou (supernatant proti B10 a supernatant P1/7 alebo supernatant proti P1/7 a supernatant B10) bolo zrejme, že antigén s molekulovou hmotnosťou 54 000 je hlavným alebo jediným reaktívnym antigénom.

Myši očkované čisteným EF neboli ani po podaní vysokých dávok chránené proti heterológnej alebo homológnej infekcii napriek tomu, že došlo k tvorbe protilátok, ako je zrejme z tabuľky 6.

Záver

Obe vakcíny na báze supernatantu kultúr poskytovali homológnu a heterológnu ochranu očkovaným myšiam. Skutočnosť, že antigén s molekulovou hmotnosťou 54 000 je jediným alebo aspoň hlavným reaktívnym antigénom pri heterológnej imunoblotovej skúške jasne preukazuje, že SLY je faktorom, ktorým je možné pri myšiach dosiahnuť skríženú ochranu.

Očkovanie ošipaných

Vakcíny VAC-SLY, VAC-SCF a placebo boli pripravené uvedeným spôsobom.

Vakcína VAC-SLY obsahovala 20 mikrogramov/ml čisteného hemolyzínu v pomocnom prostriedku Diluac Forte. Vakcína VAC-SCF obsahovala 2 mg bielkoviny/ml, išlo o väčšinu extracelulárne produkovanej bielkoviny *Streptococcus suis* v pomocnom prostriedku Diluac Forte, vakcína však bola v podstate zbavená hemolyzínu.

Deväť ošipaných vo veku 4 týždňov bolo rozdelených do troch skupín po tri ošipané a skupiny potom boli očkované vnútrovalovo do krku vždy 2 ml vakcíny VAC-SLY, VAC-SCF alebo placebo. Dva týždne po prvom očkovaní boli zvieratá preočkované rovnakým spôsobom s použitím

toho istého množstva vakcín. Dva týždne po preočkovaní bolo zvieratám vnútrožilovo podaných 0,5 ml 6 hodín starej kultúry kmeňa P1/7 v Todd Hewittovom roztoku, materiál obsahoval 4×10^9 CFU/ml (4). Tesne pred prvým očkovaním a pred vnútrožilovým podaním kultúry, boli odobraté vzorky krvi, sérum bolo uložené pri teplote -20°C až do použitia.

Opätovná izolácia baktérií

Z uhynutých zvierat bolo odobraté tkanivo mozgu, pľúc a tarzu, pokiaľ možno z najpostihnutejších častí. Bakteriálny rast bol hodnotený stupnicou 0, 1, 2, 3 a 4 podľa intenzity rastu.

Výsledky

Po podaní kultúry patogénneho mikroorganizmu sa u ošipaných očkovaných placebom objavili závažné klinické príznaky a to zápal kĺbov, vysoká teplota a chorobný vzhľad. Pri dvoch z troch ošipaných očkovaných placebom došlo k rozvoju neurologických príznakov, ktoré boli tak závažné, že zvieratá bolo nutné usmrtiť. Pri zvieratách očkovaných vakcínou VAC-SCF sa vyvinuli rovnaké klinické príznaky ako pri kontrolách, ale v menšom rozsahu. Pri jednej ošipanej z tejto skupiny došlo k rozvoju neurologických príznakov a zviera muselo byť usmrtené. Zvieratá očkované vakcínou VAC-SLY boli postihnuté najmenej. Prejavili sa len mierne príznaky ochorenia, ktoré zmizli rýchlejšie než prejavy ochorenia v ostatných skupinách. Výsledky klinických pozorovaní sú zhrnuté v tabuľke 4. Ako je zrejme z tabuľky 5, bolo možné pri nekropsii ošipaných očkovaných placebom, pozorovať ťažkú polyartritídu, zasiahnutá bola väčšina kĺbov. Pri ošipaných očkovaných vakcínou VAC-SCF došlo taktiež k polyartritíde, ale v menšom rozsahu, zatiaľ čo väčšina kĺbov pri ošipaných, očkovaných vakcínou VAC-SLY mala normálny vzhľad, ako je zrejme z tabuľky 5.

Streptococcus suis bol opätovne izolovaný pri dvoch z troch ošipaných, očkovaných placebom, a to z rôznych tkanív a tiež pri všetkých ošipaných, očkovaných vakcínou VAC-SCF, ale mikroorganizmus nebol izolovaný pri žiadnej ošipanej, očkovaných vakcínou VAC-SLY. Údaje uvádzajúce relatívne množstvo baktérii, reizolovaných z celkového množstva zvierat v každej skupine sú zhrnuté v tabuľke 5.

Histologické skúmanie vzoriek mozgu (tabuľka 5) preukázalo meningitis pri dvoch ošipaných očkovaných vakcínou VAC-SCF a pri dvoch ošipaných očkovaných placebom.

Záver

Aj napriek tomu, že sa pri ošipaných očkovaných vakcínou VAC-SLY objavili v priebehu niekoľkých dní klinické príznaky, boli tieto príznaky menej závažné a mali kratšie trvanie v porovnaní s prejavmi, ktoré sa vyvinuli pri ošipaných po vakcinácii vakcínou VAC-SCF alebo placebom. Pri nekropsii bol zápal kĺbov menej častý a menej závažný pri ošipaných očkovaných vakcínou VAC-SLY v porovnaní so zvieratami očkovanými vakcínou VAC-SCF alebo placebom. Okrem toho sa pri dvoch ošipaných po vakcinácii pomocou vakcíny VAC-SCF a pri dvoch ošipaných očkovaných placebom vyvinula meningitis, zatiaľ čo pri žiadnej z ošipaných očkovaných vakcínou VAC-SLY k prejavom meningitídy nedošlo. Okrem toho boli pľúca, kľby a mozgové tkanivo ošipaných očkovaných vakcínou

VAC-SLY zrejme sterilné, zatiaľ čo z väčšiny týchto orgánov pri oboch ostatných skupinách bol reizolovaný *Streptococcus suis*, typ 2. Pri imunoblotovej skúške reagovali séra ošipaných očkovaných vakcínou VAC-SLY (odobraté v deň podania kultúry patogénu) s pásom pre jediný antigén s molekulovou hmotnosťou 54 000 v celom supernatante kultúry, čo potvrdzuje, že hemolyzín je imunogénny a že použitý hemolyzín bol vysoko čistý.

Výsledky preukazujú, že hemolyzín *Streptococcus suis* je dôležitý faktor a že neutralizácia tohto faktora je dostatočná na ochranu ošipaných pred nepriaznivými vplyvmi infekcie *Streptococcus suis* a na zabránenie prieniku baktérií do rôznych orgánov a tkanív.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obr. 1 je v dráhe A pri elektroforéze na SDS-PAGE znázornené značenie zlúčeninou s nízkou molekulovou hmotnosťou, v dráhe B je nanosený koncentrovaný supernatant kultúry, v dráhe C čistený hemolyzín *Streptococcus suis* s v dráhe D sú uložené značiace látky s vysokou molekulovou hmotnosťou. Gél bol farbený brilliantovou modrou Coomassie. Číslovanie na pravej a ľavej strane označuje molekulovú hmotnosť značiacich bielkovín.

Na obr. 2 je znázornené správanie emulzie koncentrovaného supernatantu kultúry *Streptococcus suis*, typ 2, kmeň P1/7 po chromatografii na Superose-12. Plná čiara: absorpcia pri 280 nm, prerušovaná čiara: titer hemolyzínu.

Na obr. 3 je znázornený Western blot značiacich bielkovín (dráha A), koncentrovaný supernatant kultúry kmeňa P1/7 (dráha B) a frakcia zo stĺpca Superose-12 (dráhy C-N). Dráha C: frakcia 15, dráha D: frakcia 18, dráha E: frakcia 20, dráha F: frakcia 23, dráha G: frakcia 26, dráha H: frakcia 28, dráha I: frakcia 30, dráha J: frakcia 32, dráha K: frakcia 34, dráha L: frakcia 36, dráha M: frakcia 38, dráha N: frakcia 40.

Značiace bielkoviny (dráha A) boli farbené s použitím brilliantovej modrej Coomassie. Pre antigény *Streptococcus suis* (dráhy B-N) bolo ako sonda použité králičie sérum a potom bolo vykonané farbenie použitím konjugátu kozieho séra proti králičím tkanivám a diaminobenzidínu ako substrátu. Molekulová hmotnosť značiacich bielkovín je uvedená na ľavej strane.

Zoznam reťazcov

- 1) všeobecná informácia
 - i) prihlasovateľ
 - A) meno: AKZO N. V.,
 - B) ulica: Velperweg 76
 - C) mesto: Arnhem
 - E) štát: Holandsko
 - F) poštový kód (ZIP): 6824 BM
 - G) telefón: 04120-66381
 - H) telefax: 04120-50592
 - I) telex: 37503 akpha nl
 - ii) názov vynálezu: Vakcína proti infekcii *Streptococcus suis*
 - iii) počet reťazcov: 1
 - iv) forma odpočítaná počítačom:
 - A) typ prostredia: Floppy disk
 - B) počítač: IBM PC-kompatibilný
 - C) operačný systém: PC-DOS/MS-DOS
 - D) softvér: Patentln Release 1,0, verzia 1,25 (EPO)
- 2) informácie pre reťazec č. 1
 - i) vlastnosti reťazca

- A) dĺžka: 16 aminokyselín
- B) typ: aminokyseliny
- D) topológia: lineárna
- ii) typ molekuly: bielkovina
- iii) hypotetický reťazec: 0
- v) typ fragmentu: N-terminálny
- vi) pôvodný zdroj:
 - A) organizmus: *Streptococcus suis*
 - B) kmeň: P1/7
- C) jednotlivý izolát
- vii) použitý zdroj:
 - B) klon:
 - xi) opis reťazca č. 1:

Asp	Ser	Lys	Gln	Asp	Ile	Asn	Gln	Tyr	Phe	Gln	Ser	Leu	Thr	Tyr	Glu
1			5						10						15

kmeň	sero- typ	refer. kmeň (R)	feno- typ ^a	2log titer hemo- lyzín ^b	inhib. hemo- lyzín 0,1% cholest. ^b	reverz. inakt. oz/red. ^b	inhib. hemo- lyzín P399 ^b sérum	prítomn. materiá- lu mol. 54 000 v. imunobl. ^b
14391	7			2	ND	ND	ND	-
14636	8	R		5	+	+	+	-
NV92109	8			3	+	+	+	-
22083	9	R		0	ND	ND	ND	-
220891KH	9			3	+	+	+	-
4417	10	R		2	+	+	+	+
12814	11	R		2	+	+	+	-
8830	12	R		0	ND	ND	ND	-
10581	13	R		2	+	+	+	-
13730	14	R		6	+	+	+	+
220891GV	14			6	+	+	+	+
7639	15	R		6	+	+	+	+
2726	16	R		0	ND	ND	ND	-
93A	17	R		4	+	+	+	-
N777	18	R		6	+	+	+	+
42A	19	R		9	+	+	+	+
865192	20	R		0	ND	ND	ND	-
14A	21	R		0	ND	ND	ND	-
88/1861	22	R		2	+	+	+	-

Vysvetlivky k tabuľke 2:

- ^a Pre kmene typu 2 sú fenotypy opísané v publikácii Vecht a ďalší (26, 27).
- ^b Titrácia hemolytickej účinnosti, jej inhibícia 0,1 % cholesterolom, reverzibilná inaktivácia tejto účinnosti inkubáciou s peroxidom vodíka a beta-merkaptetoanólom a jej inhibícia špecifickým sérom ošpaných P399 a tiež imunoblotová skúška s použitím špecifického vyššieho séra M189 boli vykonávané podľa odseku Materiály a metódy.
- C_# = test bol vykonávaný, ale výsledok nebol získaný vzhľadom na príliš nízku hemolytickú účinnosť.
- ^dND = nebolo stanovené.

Tabuľka 1

Účinnosť čisteného hemolyzínu po rôznom spracovaní

spracovanie	čas spracovania	2 log titra hemolyzínu	2 log titra hemolyzínu po pridaní 2% merkap- toetanolu
-20 °C	7 dní	7	ND ^a
4 °C	7 dní	6	ND
20 °C	7 dní	3	ND
37 °C	7 dní	0	0
100 °C	5 min.	0	0
20 °C	10 min.	7	ND
proteínáza K 20 µg/ml	10 min. 20 °C	0	ND
beta-merkapto- etanol 0,1%	10 min. 20 °C	12	ND
H ₂ O ₂ 0,1%	10 min. 20 °C	0	12
TLCX 0,1%	10 min. 20 °C	2	6
cholesterol 0,1%	10 min. 20 °C	0	0

ND^a = nebolo stanovené

Tabuľka 2

Prevalencia molekúl s účinkom hemolyzínu v supernatantoch kultúry rôznych kmeňov *Streptococcus suis*

kmeň	sero- typ	refer. kmeň (R)	feno- typ ^a	2log titer hemo- lyzín ^b	inhib. hemo- lyzín 0,1% cholest. ^b	reverz. inakt. oz/red. ^b	inhib. hemo- lyzín P399 ^b sérum	prítomn. materiá- lu mol. 54 000 v. imunobl. ^b
5428	1	R		5	+	+	+	+
RS2651	1/2	R		6	+	+	+	+
R735	2	R	MRP ⁺ EF ⁻	5	+	+	+	+
P1/7	2		MRP ⁺ EF ⁺	8	+	+	+	+
688/9	2		MRP ⁺ EF ⁺	6	+	+	+	+
4005	2		MRP ⁺ EF ⁺	7	+	+	+	+
D282	2		MRP ⁺ EF ⁺	5	+	+	+	+
3921	2		MRP ⁺ EF ⁻	4	+	+	# ^c	-
3977	2		MRP ⁺ EF ⁻	2	+	+	#	-
5889	2		MRP ⁺ EF ⁻	6	+	+	+	-
T-15	2		MRP ⁺ EF ⁻	6	+	+	+	-
4961	3	R		0	ND ^d	ND	ND	+
6407	4	R		4	+	+	+	-
11538	5	R		4	+	+	#	-
2524	6	R		2	+	+	#	-
8074	7	R		0	ND	ND	ND	-
10681	7			0	ND	ND	ND	-
10727	7			0	ND	ND	ND	-

Tabuľka 3

Účinnosť imunizácie rôznymi vakcínami na čas prežitia myši po intraperitoneálnom podaní *Streptococcus suis*, kmeň P1/7

vakcína	čas prežitia
VAC-CCS ^a	9/9
VAC-SCF ^b	6/10
VAC-SLY ^c	10/10
Placebo	0/10

- ^a Vakcína s obsahom koncentrovaného supernatantu kultúry.
- ^b Vakcína s obsahom frakcií 19 až 31 zo stĺpca Superosy.
- ^c Vakcína s obsahom čisteného suilyzínu.

Tabuľka 4

Klinické hodnotenie v deň podania antigénu a 1 až 7 dní po ňom

vakcína	Klinické hodnotenie v dňoch po anitgéne							celkom	
	0	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5	6		7
VAC-SLY	0	3,7	3	1,7	0,8	0,3	0,3	0,3	10,2
VAC-SCF	0	4,7	4,2	5,5	5,5	5	4,7	4,7	34,3
Placebo	0	5,7	5,8	6	7,8	7,7	7,3	7,7	48

^a Hodnotenie v dňoch 1 až 4 je priemerom z dvoch hodnotení, dopoludnia a odopoludnia.

Tabuľka 5

Klinické príznaky v deň disekcie, makroskopické pozorovania pri disekcii, reizolácia a počet prípadov meningitídy

Vakcína	disekcia počet dní po antigéne	celkové hodnotenie artritídy	celkové hodnotenie reizolácie	počet príznakov meningitídy
VAC-SLY	7	3,5	0	0
VAC-SCF	7	8	7	2
Placebo	4	12	9	2

Výsledky pokusu, pri ktorom boli skupiny 15 myši očkované jedným podkožným podaním 0,4 ml rôznych vakcín v pomocnom prostriedku GNE. 4 týždne po očkovaní bolo intraperitoneálne podaných 0,5 ml 6 hodín starej kultúry kmeňa P1/7 alebo B10 s obsahom 3×10^9 baktérií/ml. Pred podaním bola odobratá krv a sérum bolo skúšané imunoblotom na protilátky proti SLY alebo EF s použitím supernatantu kultúr P1/7 alebo B10 ako antigénu, sú uvedené v tabuľke 6.

Tabuľka 6

vakcína	mortalita obsa- hom	mortalita po P1/7	výsledky po B10 mortalita	prítom- nosť index ^a 3 dni po po- daní	prítom- nosť SLY ^b	prítom- nosť tilátok proti SLY ^c P1/7	prítom- nosť tilátok proti EF ^c B10	prítom- nosť tilátok proti P1/7	prítom- nosť tilátok proti B10
B10 sup.	4	1	3	++	++	+++	-	-	-
P1/7 sup.	9	0	0	+	+	++	++	+	-
P1/7 EF	14	1	17	-	-	-	+++	+	-
kontroly	15	3	21	-	-	-	-	-	-

^a (počet uhynutých myši x 3) + (počet chorých myši x 1)

^b Prítomnosť vo vakcíne s použitím SDS-PAGE a farbiva Coomassie

^c Prítomnosť v spojenom sére imunoblotom s použitím antigénu zo supernatantu kultúry.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polypeptid zo *Streptococcus suis*, vyznačujúci sa tým, že má molekulovú hmotnosť približne 54 000, je aktivovaný tiolom a je možné ho inhibovať cholesterolom a v natívnej forme má hemolytickú účinnosť alebo časť tohto polypeptidu, ktorá je schopná vyvolať imunologickú odpoveď proti tomuto polypeptidu.

2. Polypeptid podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že jeho N-terminálny reťazec aminokyselín je Asp-Ser-Lys-Gln-Asp-Ile-Asn-Gln-Tyr-Phe-Gln-Ser-Leu-Thr-Tyr-Glu alebo časť tohto polypeptidu.

3. Vakcína na ochranu ošipáných proti infekcii *Streptococcus suis*, vyznačujúca sa tým, že obsahuje polypeptid podľa nárokov 1 alebo 2.

4. Vakcína podľa nároku 3, vyznačujúca sa tým, že navyše obsahuje ešte iný imunogén zo *Streptococcus suis*.

5. Vakcína podľa nárokov 3 a 4, vyznačujúca sa tým, že polypeptid je viazaný na nosič.

6. Vakcína podľa nároku 5, vyznačujúca sa tým, že ako nosič obsahuje kapsulárny polysacharid.

7. Vakcína podľa nárokov 3 až 6, vyznačujúca sa tým, že obsahuje ešte pomocný prostriedok.

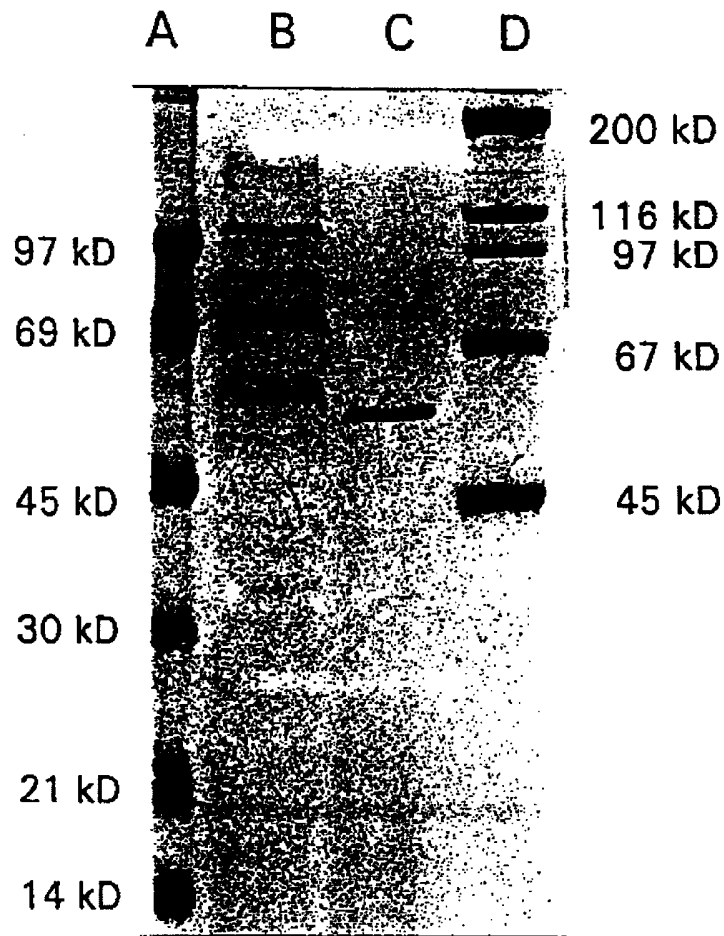
8. Vakcína podľa nárokov 3 až 7, vyznačujúca sa tým, že obsahuje ďalší imunogén odvodený od vírusu alebo mikroorganizmu, patogénneho pre ošipané.

9. Vakcína podľa nároku 8, vyznačujúca sa tým, že ako ďalší imunogén obsahuje imunogénnu látku zo skupiny *Actinobacillus pleuropneumoniae*, vírus pseudorabies, vírus chrípky ošipáných, parvovírus ošipáných, vírus gastroenteritídy, rotavírus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida* alebo *Bordetella bronchiseptica*.

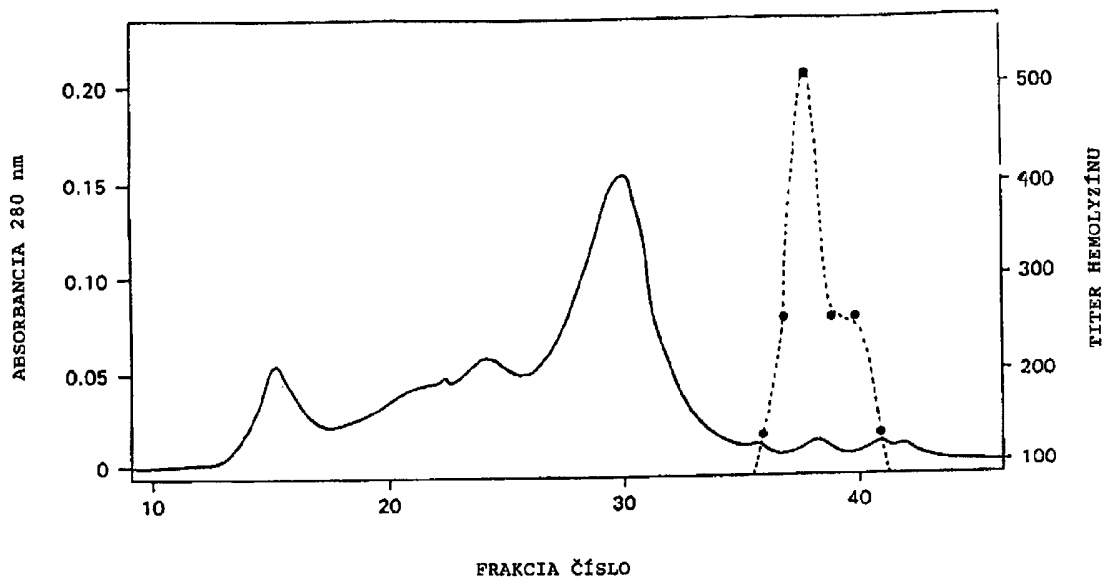
10. Protilátky, monošpecificky reaktívne s polypeptidom podľa nárokov 1 a 2.

11. Spôsob výroby vakcíny schopnej chrániť cicavcov proti infekcii *Streptococcus suis*, vyznačujúci sa tým, že sa zmieša polypeptid podľa nárokov 1 a 2 s farmaceuticky prijateľným nosičom, pomocnou látkou alebo riedidlom.

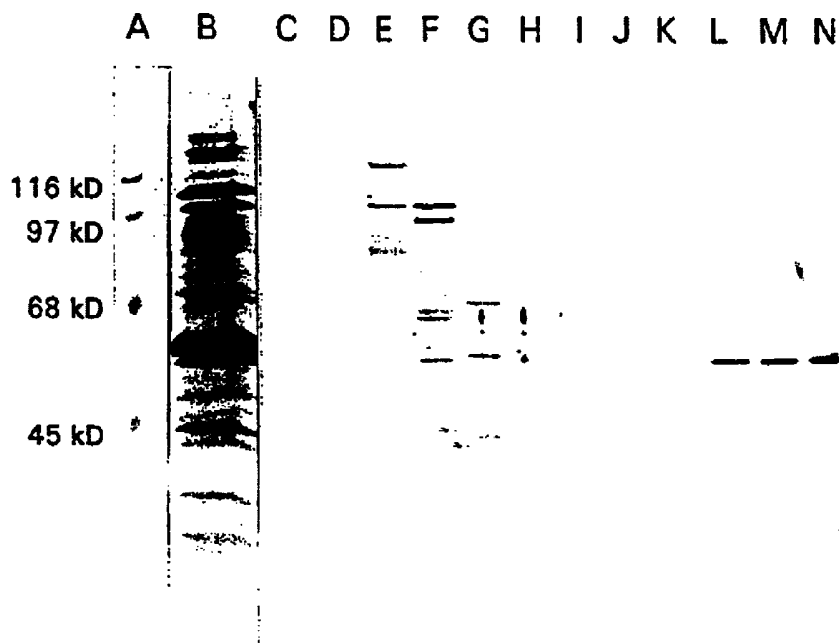
3 výkresy



Obr.1



Obr.2



Obr.3