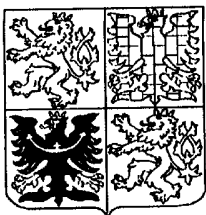


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 20.07.93
(32) 21.07.92, 19.08.92
(31) 92/9215505, 92/9217635
(33) GB, GB
(40) 13.09.95

(21) 144-95

(13) A3

6(51)

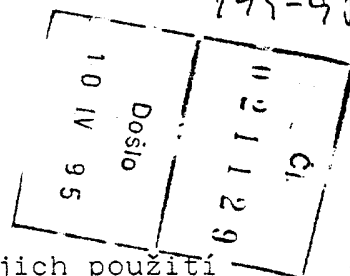
A 61 K 39/00
C 07 K 2/00
C 12 N 9/64
C 12 N 15/12

(71) MALLINCKRODT VETERINARY, Inc., Mundelein, IL,
US;

(72) Smith William David, Edinburgh, GB;
Smith Stuart Kevin, Edinburgh, GB;
Murray Jacqueline, S.E. Bellevue, WA, US;
Lidell Susan, Edinburgh, GB;
Knox David Patrick, East Lothian, GB;

(54) Ochranné antigeny nebo fragmenty antigenů,
jejich použití pro výrobu vakcíny, vakcína
s jejich obsahem a způsob její výroby

(57) Řešení se týká nových antigenů metazoických parazitů, ko-
dových nukleových kyselin pro tyto antigeny a jejich použi-
tí při potlačování chorob, způsobených hlísty a dalšími
metazoickými parazity, například arthropody u domácích
zvířat. Řešení se zvláště týká antigenů, antigenních
fragmentů, složek, prekurzorů, funkčně ekvivalentních de-
rivátů, analogů a variant těchto antigenů s ochranným anti-
genním účinkem proti alespoň jednomu metazoickému
parazitu. Tyto antigeny jsou schopné se vázat na pepstatin a
v nativní formě tvoří integrální bílkovinu nebo bílkovinný
komplex membrány. Řešení se týká také vakcíny s obsahem
těchto antigenů.



Ochranné antigeny nebo fragmenty antigenů, jejich použití pro výrobu vakcíny, vakcína s jejich obsahem a způsob její výroby

Oblast techniky

Vynález se týká nových antigenů metazoických parazitů a jejich použití k léčení chorob, způsobených hlísty a dalšími metazoickými parazity, zvláště hlísty a parazity ze skupiny arthropodů u domácích zvířat.

Dosavadní stav techniky

Každý druh domácích zvířat může trpět chorobami, které jsou způsobeny různými parazity, včetně řady čeledí hlístů a arthropodů. Řada těchto onemocnění má velkou ekonomickou závažnost. Jde například o haemonchosu, způsobenou hlístem *Haemonchus contortus*, který parazituje v různých částech zažívací soustavy přežvýkavců, včetně ovcí, od abomasum až do pravého žaludku. Mladí i dospělí jedinci *Haemonchus* se živí krví tak, že jejich ústní část se přisaje na malé krevní cévy v žaludeční sliznici. Ovce, v nichž žije velké množství těchto parazitů, ztrácejí velké množství krve, což vede k chudokrevnosti, celkově zhoršenému zdravotnímu stavu a často k uhynutí. *Haemonchosa* je častější v tropických a subtropických oblastech vzhledem k tomu, že neparazitická stadia *H. contortus* žijí na pastvinách a vzhledem k nízkým teplotám často nepřežijí zimní období v mírném pásu.

Z hospodářského hlediska mají velký význam také paraziti ze skupiny nematodů, kteří se neživí krví. Například jde o parazity *Ostertagia ostertagi* a *Ostertagia* (*Teladorsagia*) *circumcincta* (*O. circumcincta* byla v současné době

reklasifikována jako *T. circumcincta*, přestože nový název ještě není příliš rozšířen). Skot a ovce po infekci *O. oster-tagi* a *O. circumcincta* této chorobě často podléhají a *ostertagiosa* představuje v současné době jednu z nejzávažnějších infekcí hlísty v hospodářských chovech.

Dalšími parazitickými červi hospodářského významu jsou různé čeledi hlístů, jako *Trichostrongylus*, *Nematodirus*, *Dictyocaulus*, *Cooperia*, *Ascaris*, *Dirofilaria*, *Trichuris*, *Strongylus*, *Fasciola*, *Oesophafostomum*, *Bunostomum* a *Metastrongylus*. Kromě hospodářských zvířat, domácích zvířat, může dojít také k infekci lidí, tyto infekce mohou být smrtelné a infekce hlísty tedy představuje závažný problém celosvětového významu.

Dalšími významnými metazoickými parazity jsou různé čeledi arthropodů, zvláště někteří pavouci a různé čeledi hmyzů, zejména ektoparaziti, živící se například krví (jako *exopterygota* a *endopterygota*), *Lucinia* a klíšata.

Zvláště je nutno uvést klíšata čeledi *Boophilus* spp, *Amblyomma* spp, *Argas* spp, *Rhipicephalus* spp, *Hyalomma* spp, *Ornithodoros* spp, *Dermacentor* spp, *Ixodes* spp, mouchy, zvláště *Lucilia*, mouchy, které ssají, například *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, a *Cochliomyia* spp, dále *Haematopinus eurysternus*, *Linognathus vittuli*, *Solenopotes capillatus*, *Linognathus ovillus*, a *Menacanthus* spp, mûry, jako *Psoroptes* spp, *Demodex* spp, *Sarcoptes* spp, *Chorioptes* spp, *Psorergates* spp, *Dermanyssus* spp, *Ornithonyssus* spp,

Otodectes spp a Notoedres spp, dřepčící, například Ctenocephalides canis a C. felis, dále ještě Melophagus ovinus nebo Cimex spp.

Kromě vlastních parazitických účinků může ještě řada arthropodů, kteří se živí krví, přenášet různé pathogeny, například pathogenní prvoky nebo viry a způsobit tak další choroby. Chovatelé jsou každoročně podstatně poškozováni arthropody, který ssají krev a onemocněními, která tyto paraziti přenášejí.

Potlačení parazitů ze skupiny hlístů a arthropodů u pasoucích se stád je především možno použít anthelmintik, endectosidů a/nebo insekticidních látek ve spojení s dalšími opatřeními, týkajícími se způsobu pastvy. Tyto postupy jsou však často nedostatečné především proto, že účinné látky je nutno podávat často a pak také proto, že v poslední době jsou paraziti stále odolnější proti účinným látkám, mimoto je velmi nesnadné provést příslušná opatření u pasoucího se stáda.

Z tohoto důvodu byly vyvíjeny snahy potlačit parazitární choroby u domácích zvířat imunologickými postupy. S velmi malými výjimkami (například v případě Dictyocaulus viviparus u skotu) bylo prokázáno, že je to velmi obtížné a až dosud neexistují běžně dodávané vakcíny v případě nematodů, žijících v zažívací soustavě přežvýkavců včetně Haemonchus a Ostertagia a také v případě nejčastějších parazitárních arthropodů.

V posledních letech se však objevily zprávy o nových bílkovinách, které byly izolovány z Haemonchus a které by mohly být ochrannými antigeny nejen proti Haemonchus, nýbrž také proti celé řadě příbuzných endoparazitů u domácích

zvířat, jak je zřejmé ze souhrnné publikace Emery a Wagland 1991 Parasitology Today 7, 347 - 349.

Contortin, polymerní extracelulární bílkovina šroubovicového tvaru, spojená s vnitřním povrchem střeva *Haemonchus contortus* byla poprvé popsána v publikaci Munn Tissue and Cell, 1977, 9, 23 - 34, a bylo prokázáno, že v případě, že je tato bílkovina podána ve formě surového extraktu ve vysokých dávkách několika miligramů, je schopna chránit jehňata proti haemonchóse podle Muss 1987, Parasitology 94, 385 - 397. Vzhledem k tomu, že bylo nutno použít vysoké dávky a vzhledem k malé čistotě injekčních prostředků nebylo zcela jasné, zda ochrana v těchto případech byla vyvolána contortinem jako takovým nebo jinými antigeny, které byly ve vakcíně přítomny jako nečistota. V dalších pokusech se prokázalo, že ovce, imunizované takovými prostředky s obsahem contortinu vytvářely také protilátky proti dubletu bílkoviny střevní membrány, H110D. Později se prokázalo, že ovce, chráněné malými dávkami několika set mikrogramů vysoce čištěného H110D byly v podstatě imunní proti haemonchóse (Munn, WO 88/00835 a Munn a Smith WO 90/11086). H110D nyní představuje nejslibnější vakcínu proti *Haemonchus*. Byla objevena ještě třetí bílkovina ze střevní membrány *Haemonchus* s antigenními vlastnostmi a byla označena H45 (Munna Smith WO 90/11086).

V literatuře jsou popsány také méně úspěšné pokusy identifikovat ochranné antigeny z *Haemonchus* a dalších čeledí hlístů. Například z dospělých jedinců *Haemonchus* byl izolován glykoprotein membrány s molekulovou hmotností 45 000. Tento materiál poskytoval přibližně 50% ochranu při použití jako imunogenní látka u morčat, infikovaných tímto parazitem, pokud jde o snížení počtu hlístů (Sharp, Wagland a Cobon WO 92/13889). Účinek této látky u ovcí nebyl popsán.

Nebylo také popsáno místo, v němž se u hlísta tento antigen nachází a nebylo tedy prokázáno, že by mohlo jít o povrchový materiál z vnitřního povrchu střeva. Bylo uváděno, že surové frakce extraktů membrány *Haemonchus*, které téměř určitě obsahovaly H110D snižovaly počet vajíček a počet hlístů o 88 a 75 %, přestože nejsou uváděny žádné informace, týkající se variací v těchto hodnotách. *Haemonchus contortus* přirozeně neparazituje na morčatech. Místo přežívání po několik týdnů, tak jako tomu je u přirozeného hostitele, kterým je ovce, probíhá infekce u morčat často pouze rudimentárně, takže dochází k vypuzení téměř všech hlístů do 5 až 7 dnů po infekci, to znamená daleko dříve, než dosáhnou dospělosti (Wagland, Abeydeera, Rothwell a Ouwerkerk 1989, International Journal of Parasitology, 19, 301 - 305). V případě pokusu na morčatech, tak jak je popsán ve WO 92/13889 byla zvířata usmrcena 5 nebo 6 dnů po infekci, takže jakýkoliv rozdíl mezi očkovanými zvířaty a kontrolními zvířaty odrážel pouze urychlení vypuzení hlístů o jeden, nebo dva dny. Tento velmi malý rozdíl kontrastuje s účinky, které budou dále popsány a byly popsány také ve svrchu uvedených přihláškách WO 88/00835 a WO 90/11086 a vzbuzuje pochybnosti, zda uvedené laboratorní zvíře je pro tento účel vhodné. Tato pochybnost bude dále zdůrazněna v průběhu přihlášky na základě pokusů, při nichž bylo prokázáno, že ta frakce extraktu membrány *Haemonchus*, která se váže na lectin z pšeničného klíčku je schopna vysoce chránit ovce, avšak podle WO 92/13889 v podstatě obdobný prostředek neměl vůbec žádný účinek při stejných pokusech u morčat.

V patentové přihlášce WO 89/00163 se popisuje klonování a exprese genu, který je kódovým řetězcem pro bílkovinu z *Trichostrongylus colubriformis* s molekulovou hmotností 41 000, jde o parazita z téže taxonomické skupiny, jako

Haemonchus, parazitujícího v tenkém střevě ovce. Bílkovina nebyla charakterizována, uvádí se, že při vakcinaci ovcí bílkoviny rekombinantního organismu, u něhož dochází k expresi genu došlo ke snížení počtu vajíček i počtu hlístů po napadení Haemonchus ve srovnání s kontrolními ovci, avšak snížení nebylo statisticky významné a pokud by nedošlo ke zvýšení účinku, nebyl by popsán stupeň ochrany prakticky využitelný.

V poslední době byla z *Haemonchus contortus* izolována proteáza cysteinu a kódový gen pro tuto proteázu byl klonován a došlo k jeho expresi podle publikace Cox, Pratt, Hageman a Boisvenue, 1990, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 41, 25 až 34. Tato proteáza má molekulovou hmotnost 35 000, jak bylo prokázáno elektroforézou na SDS-PAGE za redukčních podmínek, identifikována byla také více glykosylovaná forma s molekulovou hmotností 37 000. Bylo uváděno, že tato proteáza, která rozkládá fibrinogen, pravděpodobně brání srážení krve hostitele v průběhu příjmu potravy *Haemonchus*, což pravděpodobně má usnadnit příjem potravy parazitem a stravení krve. Bylo popisováno, že ovce, jimž bylo opakovaně injekčně podáno několik set mikrogramů frakce, obohacená o nativní proteázu cysteinu, byly chráněny proti *Haemonchus* vzhledem k tomu, že u nich došlo ke snížení počtu vajíček ve výkalech a také ke snížení počtu hlístů ve srovnání s kontrolními ovci po zatížení 2500 larvami *Haemonchus* podle Boisvenue, Stiff, Tonkinson, Cox a Hageman, 1990, *Proceedings of the VIIth International Congress of Parasitology*, str. 475. Avšak podrobnosti, které byly o těchto pokusech popsány v US patentových spisech č. 408 339 a 487 181 prokazují, že rozdíly v počtu hlístů a vajíček u očkovaných a kontrolních skupin byly pouze hraniční a nebyly statisticky významné.

Z třetího stadia larev *Haemonchus* byla získána a čištěna proteáza s molekulovou hmotností 44 000 podle Gamble,

Purcell a Fetterer, 1989, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 33, 49 - 58. Tato proteáza, která byla definována jako metalloproteáza a k jejíž inhibici nedochází působením pepstatinu zprostředkovává ecdysi a nebyla podrobaná zkouškám na ochranný účinek. V publikaci Maki a Yanagisawawa, *Journal of Helminthology*, 1986, 60, 31 - 37, se popisuje účinnost karboxyl (aspartyl) a thiolproteázy u dospělých jedinců *Schistosoma mansoni*, *Dirofilaria immitis*, *Angiostrongylus cantonensis* a *Ascaris suum*. Avšak tyto účinky nebyly frakcionovány nebo charakterizovány, není uvedena molekulová hmotnost uvedených látek a nebylo zkoumáno, zda by mohlo jít o protektivní antigeny.

Ze třetího stádia larev *O. circumcincta* byl izolován glykoprotein s molekulovou hmotností 31 000 podle publikace McGillivery, Young, Riffkin a Adler, 1989, *International Journal for Parasitology*, 19, 473 - 478. Ovce, imunizované touto látkou byly částečně chráněny proti infekci uvedeným parazitem podle WO 91/01150.

Z produktů sekrece a exkrece *T. colubriformis* byly izolovány dvě bílkoviny s nízkou molekulovou hmotností 11 000 a 17 000 podle Savin a další, 1990, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 41, 167 - 176, Dolpheide a další, 1991, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 45, 101 - 108. Uvádí se nízký nebo variabilní stupeň ochrany v případě, že se rekombinantní formy těchto antigenů použijí k imunizaci ovcí proti napadení parazitem *T. colubriformis* (Emery and Wagland 1991).

Pokud jde o parazity ze skupiny arthropodů, obsahuje literatura několik málo údajů o navrhovaných vakcínách, které se soustředí zejména na *Boophilus microplus* u skotu. Například Johnson a další, 1986 uvádějí, že ochranné antigeny proti *B. microplus* je možno nalézt jak v rozpustné, tak

v nerozpustné frakci extraktů z dospělých samic podle Johnson a další, 1986, Int. J. Parasitol., 16(1) :27 - 34. Vzhledem k tomu se později objevily v literatuře návrhy očkovat skot při použití antigenů z těchto extraktů, zejména ze střeva a larev a ze slinných žláz, tyto postupy pro dospělé jedince i pro larvy byly popsány v Willadsen a další, 1989, Int. J. Parasitol., 18(2) : 183 - 189, Wong a další, 1990, Parasite Immunology, 12: 75 - 83, Jackson a další, 1990, Parasite Immunology, 12: 141 - 151.

Existuje však trvalá potřeba nalézt nové a zlepšené vakcíny proti metazoickým parazitům, zejména by mělo jít o vakcíny, použitelné proti široké škále čeledí hlístů a/nebo arthropodů.

Vynález si klade za úkol nalézt nové antigeny, vhodné pro použití ve vakcinách proti metazoickým parazitům, zejména jako ochranné imunogenní látky při potlačování chorob, způsobených hlísty a dalšími metazoickými parazity.

Podstata vynálezu

Vynález je založen na zjištění, že střevo *H. contortus* obsahuje proteolyticky účinný glykoproteinový komplex, který byl nazván H-gal-GP (glykoprotein s obsahem galaktosy z *Haemonchus*) a který je schopen poskytnout imunitu proti *Haemonchus* a příbuzným parazitům. Glykoproteinové komplexy, analogické H-gal-GP a označené Oo-gal-GP a Oc-gal-GP byly izolovány z extraktů *Ostertagia ostertagi* a *Ostertagia circumcincta* a podobnou proteolytickou účinnost bylo možno pozorovat i u dalších hlístů, například *Trichostrongylus*. Takové komplexy, uvolněné z membrán, v nichž jsou integrovány, například při použití smáčedel, jako je Triton X-100, jsou nové a je možno je použít při výrobě vakcín proti infekcím hlísty. Enzymy, přítomné u hlístů je možno prokázat

i u jiných druhů metazoických parazitů, například u larev masařek.

Podle jednoho provedení vynálezu tvoří podstatu vynálezu ochranný antigen metazoických parazitů nebo antigenní fragmenty, složky nebo prekursory těchto antigenů a také jejich funkční ekvivalentní deriváty, analogy nebo varianty s protektivním antigenním účinkem proti jednomu nebo většímu počtu metazoických parazitů, přičemž uvedený antigen

- a) má proteolytickou účinnost,
- b) v nativní formě jde o bílkovinu nebo bílkovinný komplex, integrální s membránou a přítomný v hraniční oblasti řasinkových buněk střeva parazita,
- c) je schopen vázat pepstatin a
- d) je schopen vázat lektin z pšeničného klíčku a lektiny se specifícností pro beta-vázaný N-acetylgalaktosamin.

Podstatu vynálezu tvoří také ochranné antigeny a antigenní fragmenty, složky nebo prekursory a funkčně ekvivalentní deriváty, analogy nebo varianty těchto antigenů pro použití ke stimulaci imunní odpovědi proti metazoickým parazitům u lidí i u živočichů, odlišných od člověka, s výhodou u ssavců a zvláště u přežvýkavců.

Prekursorem antigenu může být větší bílkovina, která po zpracování, například proteolytickým štěpením uvolní vlastní antigen. Takové prekursory mohou mít formu zymogenů, to znamená neúčinných prekursorů enzymů, které jsou aktivovány proteolytickým štěpením, jde například o analogii se systémem pepsin/pepsinogen nebo o analogii se známými zymogeny, účastnícími se složitých reakcí při srážení krve.

Nové antigeny podle vynálezu nejsou rozpoznávány sérem živočichů s přirozenou imunitou. Jinak řečeno, tyto antigeny nejsou za běžných podmínek v nativní formě dostupné pro imunitní systém infikovaného hostitele a jsou označovány za "skryté", "uzavřené" nebo "kryptické" antigeny.

Pokud jde o charakteristickou vazbu nových antigenů podle vynálezu na lektin, bylo možno prokázat vazbu na Con A a na lektiny z Lotus a z hrášku, což prokazuje přítomnost zbytků mannosy a/nebo fukosy. Některé lektiny vázány nejsou, například jde o lektiny z Datura a Bandeiraea, což ukazuje na nepřítomnost struktur, obsahujících N-acetylglukosamin, avšak vyjádřená je vazba na lektiny se specifícností pro N-acetylgalaktosamin, zejména na beta-vázaný N-acetylgalaktosamin, zvláště jde o lektiny z burských oříšků a jacalinu.

Pokud jde o proteolytickou účinnost, bylo možno ji prokázat u běžných substrátů pro proteázy, jako jsou azokollagen, azokasein, hemoglobin, a želatina, mimoto byla prokázána také specifická účinnost, obdobná účinnosti aspartylproteinázy a neutrální endopeptidázy. Například účinnost, podobná účinnosti aspartylproteinázy byla prokázána pro vzorky H-a O-gal-GP a u některých hlístů, například u Trichostrongylus. Účinnost podobnou účinnosti neutrální endopeptidázy je možno prokázat v extraktech s obsahem antigenů podle vynálezu. Mimoto, pokud jde o specifický antigen H-gal-GP, předběžné údaje o řetězci nukleotidů z klonu cDNA, který je kódem pro složku H-gal-GP prokazují podstatnou homologii se známými neutrálními endopeptidázami.

Vynález tedy rovněž zahrnuje ochranné antigeny meta-zoických parazitů, nebo jejich antigenní fragmenty, složky nebo prekursory a funkčně ekvivalentní deriváty, analogy nebo varianty těchto látek s ochranným antigenním účinkem

proti jednomu nebo většímu počtu metazoických parazitů, tento antigen má účinnost typu aspartyl proteinázy a/nebo neutrální endopeptidázy a v nativní formě běží o integrální protein nebo proteinový komplex membrány.

Další hlavní vlastností antigenů podle vynálezu je skutečnost, že tyto látky jsou schopné se vázat na pepstatin. Pepstatin je látka, která je známá jako inhibitor aspartylproteáz a bylo také uváděno, že je schopna se vázat na metalloendopeptidázy membrán včetně neutrální endopeptidázy.

Bylo prokázáno, že proteolytickou účinnost *Haemonchus*, *Ostertagia* a *Trichostrongylus* je možno inhibovat působením pepstatinu. Podstatu vynálezu tvoří také ochranné antigeny, antigenní fragmenty, jejich složky nebo prekurzory proti metazoickým parazitům a také jejich funkčně ekvivalentní deriváty, analogy nebo varianty s ochrannou antigenní účinností proti jednomu nebo většímu počtu metazoických parazitů, znakem těchto antigenů je schopnost se vázat na pepstatin, v nativní formě jsou tyto antigeny integrálními bílkovinami nebo bílkovinnými komplexy membrán.

Pokusy se stanovením isoelektrického bodu prokázaly, že isoelektrický bod pI pro antigeny typu glykoproteinů podle vynálezu leží přibližně v oblasti pH 2 až 7,5.

Sledování elektroforézou na polyakrylamidovém gelu, PAGE, bylo prováděno při použití antigenů podle vynálezu a bylo prokázáno, že tyto antigeny se chovají odlišně na redukujících a neredukujících gelech. Při provádění elektroforézy opakovaně za redukčních podmínek dochází k tomu, že

Široké pásy, získané elektroforézou na neredukujících gelech se rozpadají na menší pásy. Jak bude dále podrobněji uvedeno, že možno proteolytickou a ochrannou účinnost antigenu připsat bílkovinám v jednotlivých nebo složených pásech, přestože materiál z některých pásů může mít vyšší účinnost než z jiných pásů. Je možné, že antigeny podle vynálezu představují komplexy většího počtu enzymů.

V případě antigenu H-gal-GP, jsou výsledky elektroforézy PAGE podrobněji popsány v příkladu 1. Výhodná podskupina antigenů podle vynálezu je tvořena antigeny a jejich fragmenty nebo složkami, tak jak jsou popsány v příkladu 1 a také jejich funkčními ekvivalenty, deriváty, analogy a variantami včetně analogů z jiných rodů nebo čeledí. Výhodnými antigeny podle vynálezu tedy mohou být antigeny, které lze izolovat z *Haemonchus* nebo z jiných rodů metazoických parazitů, přičemž tyto antigeny mají při elektroforéze na SDS-PAGE molekulové hmotnosti, tak jak jsou uvedeny v tabulce 1.

V případě antigenu H-gal-GP, bylo prokázáno, že ochranná účinnost antigenu je spojena s některými složkami pásů bílkoviny, tak jak bude podrobněji dále popsáno v pokusu 5 v příkladu 7.

Podstatu vynálezu tvoří také ochranné antigeny metazoických parazitů nebo jejich antigenní fragmenty, složky nebo prekursorů a také funkčně ekvivalentní deriváty, analogy nebo varianty s ochrannou antigenní účinností proti jednomu nebo většímu počtu metazoických parazitů, tyto antigeny tvoří část integrálních bílkovin nebo bílkovinných komplexů membrán ve střevě čeledi *Haemonchus*, mají molekulovou hmotnost přibližně 190 000 až 205 000 při stanovení elektroforézou na SDS-PAGE na 5% gelu za neredukujících

podmínek nebo molekulovou hmotnost 35 000 nebo 45 000 až 50 000, při stanovení elektroforézou na SDS-PAGE na 10% gelu za neredukujících podmínek.

Z metazoických parazitů je v průběhu přihlášky věnována zvláštní pozornost hlístů a arthropodům a ze druhé skupiny zvláště sajícímu hmyzu, zejména na hospodářských zvířatech. Z uvedených parazitů je soustředěna pozornost zejména na různé čeledi, které již byly svrchu uvedeny.

Pod pojmem "ochranný antigen" se rozumí takové entity, které jsou schopné vyvolat u hostitele odpověď imunitního systému, která vede k jeho ochraně, to znamená, že vede ke vzniku efektorových molekul, protilátek nebo buněk, které poškozují, působí inhibici nebo uhynutí parazita a tím "chrání" hostitele před klinickým onemocněním nebo subklinickým onemocněním a před ztrátou produktivity. Taková ochranná odpověď se obvykle projevuje tvorbou protilátek, schopných způsobit inhibici metabolických funkcí parazita nebo vede ke snížení produkce vajíček a/nebo k uhynutí parazitujícího organismu.

V případě určitých metazoických parazitů, zejména hlístů a těch ektoparazitů, kteří se živí krví hostitele, jako jsou vši nebo roztoči i těch parazitů, kteří se živí tkáněmi hostitele alespoň po určitou dobu, jako je masařka, střeček, zákoška svrabová, larvy střečka, bodalky a klíště, může ochranná imunologická odpověď hostitele vést k uhynutí, zeslabení a/nebo vypuzení parazita z infikovaného živočicha. Jinak řečeno, zátěž parazitickým organismem se snižuje a infikovaný živočich se účinně brání svou vlastní imunologickou odpovědí. V některých jiných případech však je možno pozorovat "epidemiologický" účinek, při němž hostitel nemá bezprostřední výhody ze své vlastní imunologické odpovědi. Například v případě, že parazit žije na

imunizovaném hostiteli, může dojít ke snížení počtu parazitů nebo k zeslabení parazitů v dané oblasti, takže později vznikají příznivější podmínky pro celá stáda. V případě, že se imunizace provádí po několik let po sobě, dojde celkově ke snížení ohrožení parazity. To platí zvláště pro ekto-parazity z čeledi arthropoda, jako jsou klíšťata a mouchy, vzhledem k tomu, že tento typ parazitů může rychle měnit své hostitele. Tímto způsobem inhibiční protilátky, přijaté parazitem ve formě potravy mohou vyvolat svůj účinek po opuštění hostitele parazitem, avšak tím, že parazit je usmrčen, zeslaben nebo je snížena jeho schopnost rozmnožování, může dojít k ochraně jiných hostitelů z téže skupiny živočichů.

Jak bude dále podrobněji popsáno, byla pro antigeny podle vynálezu prokázána ochranná imunogenní účinnost. Dále bylo prokázáno, že tato ochranná účinnost přetrvává i po denaturaci antigenů, například disociací a/nebo redukcí. Jak již rovněž bylo svrchu uvedeno, zvláště vysokou účinnost mají zejména některé složky antigenního komplexu H-gal-GP z *Haemonchus*.

Podle vynálezu je možno využít antigen metazoických parazitů, tak jak byl svrchu definován a také jeho složky, fragmenty, prekursory, funkčně ekvivalentní deriváty, analogy nebo varianty s ochrannou antigenní účinností proti jednomu nebo většímu počtu metazoických parazitů k výrobě vakcíny, kterou je možno zesílit imunologickou odpověď proti metazoickým parazitům u lidí i jiných živočichů, s výhodou savců a zvláště přežvýkavců.

Podstatu vynálezu tvoří také vakcína, určená ke stimulaci imunologické odpovědi proti metazoickým parazitům u lidí i u jiných živočichů, s výhodou ssavců, tato vakcína obsahuje jeden nebo větší počet svrchu uvedených antigenů

nebo jejich složek, fragmentů, prekursorů, funkčně ekvivalentních derivátů nebo jejich analogů a variant s ochrannou antigenní účinností proti jednomu nebo většímu počtu metazoických parazitů, mimoto vakcína obsahuje farmaceutický nosič nebo ředidlo. Při podání této vakcíny člověku nebo jiným živočichům, s výhodou ssavcům dochází ke stimulaci imunologické odpovědi těchto živočichů proti metazoickým parazitům.

Jak již bylo svrchu uvedeno, do rozsahu vynálezu spadají také funkčně ekvivalentní deriváty, analogy a varianty nového antigenního glykoproteinu. Pod pojmem "funkční ekvivalent" se rozumí bílkoviny, které jsou příbuzné nebo jsou odvozeny od přírodních bílkovinných enzymů, přičemž řetězec aminokyselin těchto látek je modifikován tak, jedna nebo větší počet aminokyselin jsou nahrazeny jinou aminokyselinou, přidány a/nebo vypuštěny, mimoto může jít o řetězec, v nichž byly některé aminokyseliny chemicky modifikovány, například deglykosylací nebo glykosylací, které si však zachovávají schopnost vyvolat u hostitele tvorbu ochranných protilátek a/nebo funkční imunitu proti parazitům. Takové funkčně ekvivalentní varianty se mohou vyskytovat jako přírodní biologické variace nebo je možno je připravit známými postupy. Například funkčně ekvivalentní rekombinantní bílkoviny mohou být připraveny známými postupy, jako jsou cílené vyvolání mutace, náhodné vyvolání mutace nebo enzymatické štěpení a/nebo vazba nukleových kyselin. Jak bude dále podrobněji rozvedeno v příkladové části přihlášky na analogických antigenních komplexech H-gal-GP a O-gal-GP, takové funkčně ekvivalentní analogy se mohou vyskytovat u různých čeledí parazitů.

Antigeny podle vynálezu je možno získat z celé řady čeledí metazoických parazitů, včetně například nematodů

Haemonchus, Ostertagia a Trichostrongylus. (Aby nedošlo k omylu, pojem "Ostertagia", tak jak je v průběhu přihlášky užíván, zahrnuje také čeleď Teladorsagié sp.). Výhodné jsou antigeny, označované jako antigeny "se širokým spektrem", které jsou schopné stimulovat ochrannou odpověď hostitele nejen proti parazitu, z nějž byly izolovány, nýbrž také proti řadě dalších parazitů. Například glykoproteinový komplex H-gal-GP z Haemonchus může vyvolat obrannou reakci a ochranu proti různým čeledím nematodů Ostertagia a obráceně.

Jak již bylo uvedeno, jednou z cest, jimiž mohou antigeny podle vynálezu vyvolat obrannou reakci hostitele je vznik inhibičních protilátek, které způsobují inhibici růstu, rozmnožování a/nebo vývoje parazita. Takové protilátky a jejich fragmenty, schopné se vázat na antigen (například $F(ab)_2$, Fab a Fv, to znamená fragmenty z "variabilní" oblasti protilátky, které obsahují místo pro vazbu antigenu), které mohou být monoklonální nebo polyklonální, tvoří rovněž součást podstaty vynálezu stejně jako vakcíny, které tyto látky obsahují, součást podstaty vynálezu tvoří také použití těchto protilátek pro výrobu vakcíny k imunizaci hostitele proti parazitům. Tyto inhibiční protilátky je možno získat při použití idiotypických protilátek. Naproti tomu antiidiotypické protilátky je možno ve vakcínách použít jako imunogenní látky.

Antigeny podle vynálezu je možno připravit extrakcí z parazitů, například z hlístů při použití běžných biochemických a laboratorních technik, jako jsou homogenizace celého parazita nebo pouze jeho střeva s následnou izolací požadovaného enzymu některým z běžných čistících postupů, například odstředěním, selektivním srážením, chromatografií a podobně. Ve výhodném provedení způsobu podle vynálezu se

využívá skutečnosti, že cílové molekuly mají zvláště selektivní schopnost vazby při použití afinitní chromatografie, v níž se specifické vazné látky immobilizují na matici v pevné fázi.

Podstatu vynálezu tvoří také způsob výroby vakcíny pro použití při imunizaci lidí i jiných živočichů, s výhodou ssavců proti infekci metazoickými parazity, postup spočívá v tom, že se z parazita připraví extrakt, obsahující alespoň jeden ochranný antigen ve svrchu uvedeném významu, tento antigen se čistí vazbou na immobilizovanou fázi se specifickým vazným partnerem pro tento antigen s následnou elucí antigenu z immobilizované fáze. Vhodným specifickým vazným partnerem mohou být například analogy substrátu, jako inhibitor pepstatin a specifické oligosacharidy typu lektinů, například ty, které jsou schopny se specificky vázat na galaktosu, zejména jde o N-acetyl-galaktosamin, vázaný v poloze beta.

V průběhu řady pokusů bylo prokázáno, že některé lektiny jsou zvláště vhodnými látkami pro použití jako vazné látky při afinitní chromatografii pro identifikaci glykoproteinů s potenciálním ochranným antigenním účinkem na povrchu vnitřní stěny střeva parazita.

Podstatu vynálezu tvoří také způsob identifikace ochranných antigenů u parazitů, postup spočívá v tom, že se integrální frakce membrány parazita podrobí afinitní chromatografii při použití immobilizované fáze, v níž jsou vázány jeden nebo větší počet lektinů se specifícností pro N-acetyl-galaktosamin.

Takovými lektiny jsou s výhodou lektiny z arašídů nebo z jacalinu nebo jiné lektiny se specifícností pro N-acetyl-galaktosamin, vázaný v poloze beta.

Integrální frakci membrány parazitů je možno snadno připravit při použití postupů, které se v oboru běžně užívají, jde například o extrakci smáčedlem, například prostředkem Triton X-100.

Postupy, založené na afinitní chromatografii jsou rovněž v oboru známé a mohou zahrnovat systémy, prováděné po vsázkách nebo při použití sloupce. Je možno použít celou řadu pevných fází, na něž mohou být lektiny vázány, například gely, jako agarosu nebo sepharosu. Běžně se dodávají například agarosové kuličky s navázaným arašídovým nebo jacalinovým lektinem (Vector Laboratories).

Antigeny je možno připravit také s použitím rekombinantní DNA při použití běžně užívaných postupů, tak jak byly popsány například v publikaci Sambrook a další, 1989, Molecular Cloning, a laboratory manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Press.

Molekuly nukleových kyselin, obsahující kódový nukleotidový řetězec pro antigeny podle vynálezu tvoří rovněž součást podstaty vynálezu.

Předběžné sledování řetězců klonů, které odpovídají antigenu H-gal-GP již bylo provedeno. Řetězec jednoho z těchto klonů, který byl označen HG3, je znázorněn na obr. 33, jde o řetězec č. 1. Tento řetězec vykazuje podstatnou homologii řetězce s řetězcí známých neutrálních enzymů ssavců, endopeptidáz, jak je možno prokázat srovnáním příslušných řetězců aminokyselin, které je provedeno na obr. 34 (řetězec č. 2).

Výhodná molekula nukleové kyseliny podle vynálezu tedy obsahuje jeden nebo větší počet nukleotidových řetězců,

které v podstatě odpovídají celému řetězci nebo části nukleotidového řetězce č. 1, tak jak je znázorněn na obr. 33 nebo může jít o řetězec, který je degenerovaným řetězcem nebo v podstatě homologním řetězcem nebo který s uvedeným řetězcem hybridizuje.

Molekuly nukleových kyselin podle vynálezu mohou být molekuly DNA, cDNA nebo RNA s jednoduchým nebo dvojitým řetězcem, s výhodou jde o DNA a řetězce zahrnují degenerované, v podstatě homologní a hybridizující řetězce, schopné být kódovým řetězcem pro příslušný antigen nebo jeho fragment. Pod pojmem "v podstatě homologní" se rozumí řetězce s alespoň 60 %, s výhodou nejméně 70 nebo 80 % homologie řetězce. Hybridizující řetězce, spadající do rozsahu vynálezu jsou takové řetězce, které jsou schopné se vázat za neomezujících podmínek (6 x SSC/50% formamid při teplotě místnosti) a které se vymývají za mírně omezujících podmínek (2 x SSC, teplota místnosti, výhodněji 2 x SSC, 42 °C) nebo za vysoce omezujících podmínek, například 2 x SSC a 65 °C, kde SSC obsahuje 0,15 M NaCl a 0,015 M citrátu sodného o pH 2, může však také jít o řetězce, které hybridizují za svrchu uvedených podmínek na základě degenerace genetického kódu.

Deriváty nukleotidových řetězců, schopné být kódovými řetězci pro antigenně účinné antigeny nebo varianty antigenů podle vynálezu je možno připravit postupy, které jsou v oboru běžně prováděny.

Antigeny podle vynálezu je možno připravit v rekombinantní formě expresí v hostitelské buňce, která obsahuje rekombinantní molekulu DNA s nukleotidovým řetězcem, tak jak byl svrchu široce definován, operativně vázaným na řetězce pro řízení exprese nebo je možno použít

prostředku nebo vektoru pro klonování rekombinantní DNA s obsahem molekuly takové DNA. Syntetické polypeptidy, k jejichž expresi dochází za těchto podmínek tvoří rovněž součást podstaty vynálezu (pojem "polypeptid", tak jak je v průběhu přihlášky užíván, zahrnuje bílkoviny i peptidové řetězce kratšího typu).

Antigen, k jehož expresi tímto způsobem došlo, může být složeným polypeptidem, který obsahuje celý antigen nebo část antigenu podle vynálezu a mimoto další polypeptid, pro nějž je kódem rekombinantní molekula DNA. Může jít například o beta-galaktosidázu, glutathion-S-transferázu, antigen hepatitidy z jádra viru nebo jakýkoliv jiný polypeptid, který se v oboru běžně užívá pro tvorbu složených bílkovin.

Vynález se týká také vektorů pro klonování a expresi, které obsahují kódovou DNA pro antigen podle vynálezu a způsobů výroby molekul rekombinantních nukleových kyselin podle vynálezu, postup spočívá v tom, že se kódový nukleotidový řetězec pro antigen uloží do nukleové kyseliny jako do vektoru, například do DNA. Tyto vektory pro expresi obsahují příslušné řídicí řetězce, například řídicí prvky pro translaci (jako kodony pro počátek a konec, místa pro vazbu ribosomů) a řídicí prvky pro transkripci (například oblastí promotor-operátor, terminační stop-řetězce), vázané ve správném čtecím rámci na molekulu nukleové kyseliny podle vynálezu.

Vektory podle vynálezu mohou zahrnovat plasmidy a viry (včetně bakteriofágu a eukaryotických virů) tak, jak je v oboru doloženo a je možno dosáhnout jejich exprese v různých systémech pro expresi, které jsou rovněž v oboru známy a které byly v oboru podrobně popsány. Z vhodných virových

vektorů je možno uvést baculovirus a také adenovirus a viry vaccinia. Řada dalších virových vektorů již byla v oboru popsána.

Pro uložení těchto vektorů do prokaryotických nebo eukaryotických buněk pro expresi nebo do zárodečné buněčné linie nebo do somatických buněk k vytvoření transgenických organismů byla popsána řada postupů. Vhodné postupy pro transformaci a transfekci je tedy možno nalézt v literatuře.

Podstatu vynálezu tvoří rovněž prokaryotické nebo eukaryotické hostitelské buňky po transformaci nebo transfekci, které obsahují molekulu nikleové kyseliny podle vynálezu. Z těchto hostitelských buněk je možno uvést prokaryotické buňky, jako *E. coli*, eukaryotické buňky, jako kvasinky nebo buněčný systém baculovirus-hmyzí buňky, transformovaný buněčný materiál ssavců a také transgenické živočichy a rostliny. Zvláště je nutno uvést transgenické nematody, například podle publikace Fire, 1986, EMBO J., 5, 2673, kde je podrobně popsán transgenický systém pro nematoda *Caenorhabditis*.

Vynález se také týká způsobu výroby antigenu podle vynálezu. Tento postup spočívá v tom, že se pěstuje hostitelská buňka, obsahující kódovou molekulu nukleové kyseliny pro celý antigen nebo pro jeho část za podmínek, při nichž dochází k expresi a vzniklý antigen se izoluje.

Antigeny podle vynálezu a jejich funkčně ekvivalentní varianty je možno připravit také chemicky, například dobře známou syntézou na pevné fázi podle Merrifielda.

Ve vodě rozpustné deriváty nových antigenů, tak jak byly svrchu popsány, tvoří rovněž součást podstaty vynálezu. Tyto rozpustné formy je možno získat proteolytickým štěpením,

například při použití enzymu elastázy. Obecně se rozštěpením antigenu působením enzymu získají dvě frakce, a to frakce, rozpustná ve smáčedlech, která zůstává spojena s membránou a ve vodě rozpustná frakce.

Vakcínu je možno připravit ze svrchu uvedených materiálů běžnými postupy. Pběvyklé vakcíny mohou obsahovat jeden nebo větší počet antigenů nebo jednu nebo větší počet protiláték podle vynálezu, popřípadě spolu s jedním nebo větším počtem vhodných pomocných prostředků, jako jsou hydroxid hlinitý, saponin, quil A, nebo čistší formy, jako muramyl-dipeptid, minerální nebo rostlinné oleje, Novasomy, neiontové sledové kopolymery nebo DEAE dextran spolu s jedním nebo větším počtem farmaceutických nosičů nebo ředidel. Vhodné nosiče zahrnují kapalná prostředí, jako fyziologický roztok chloridu sodného a další prostředí, vhodná pro aplikaci peptidů nebo polypeptidů živočichům nebo lidem. Vakcína může obsahovat ještě další složky, jako konzervační činidla.

Vakcína však může obsahovat také buněčný materiál viru nebo hostitele, například i mikroorganismus, může jít o virus vaccinia, adenovirus nebo o Salmonelly, tyto organismy mohou být živé, usmrcené nebo atenuované a budou obsahovat molekulu nukleové kyseliny, například molekulu DNA podle vynálezu pro stimulaci imunologické odpovědi proti polypeptidům, pro něž je kódem uložená molekula nukleové kyseliny.

Vakcínu je možno podávat jakýmkoliv z běžných způsobů, například perorálně nebo parenterálně, například nitrosvalově, popřípadě v intervalech, je například možno podat dvě injekce v intervalech 7 až 35 dnů.

Podle vynálezu je možno antigeny použít i v kombinaci s dalšími ochrannými antigeny, získanými z téže nebo

z odlišné čeledi parazitů. Vakcína podle vynálezu tedy může obsahovat jeden nebo větší počet svrchu definovaných antigenů, například H-gal-GP spolu s antigeny H110D a H45, které byly svrchu rovněž uvedeny. Taková kombinovaná vakcína může obsahovat menší množství různých antigenů než vakcína, obsahující pouze jediný antigen.

Vakcínu je možno použít u lidí i u jiných živočichů, zejména u psů, koček a domácích zvířat, zvláště přežvýkavců. Zvláště vhodné je podávání ovcím, skotu, vepřům, kozám, a jelenům.

Vynález bude dále podrobněji popsán v souvislosti s antigeny z *H. contortus*, *O. ostertagi* a *O. circumcincta*, tyto antigeny budou označovány H-gal-GP, Oo-gal-GP a Oc-gal-GP. Skutečnost, že právě tyto antigeny budou podrobněji popsány, to neznamena, že vynález má být na tyto látky omezen, avšak použití těchto antigenů a/nebo jejich složek pro výrobu vakcín a také tyto látky jako takové představují zvláště výhodné provedení vynálezu.

Bílkovina H-gal-GP je integrální bílkovina membrány na hranici řasinkového epitelu, který se nachází ve vnitřním průsvitu střeva *Haemonchus*. Tato bílkovina je glykosylována a selektivně se váže na lektiny, které jsou specifické pro N-acetylgalaktosamin. Bílkovina má proteázovou účinnost, kterou je možno inhibovat působením pepstatinu, specifického inhibitoru aspartyl proteázy. Za redukujících podmínek se tato bílkovina pohybuje na SDS-polyakrylamidovém gelu ve formě osmi hlavních pásů. Z uvedených důvodů byla označena jako glykoproteinový komplex s obsahem galaktosy z *Haemonchus*, H-gal-GP.

Vynález bude dále popsán v souvislosti s přiloženými výkresy.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je znázorněno srovnání elektroforézy na SDS-PAGE pro H-gal-GP, H110D a H-45, stanovení bylo provedeno vždy na 10% akrylamidovém gelu.

Dráhy 1 až 3 a 4 až 6	neredukující a redukující vzorky.
Dráhy 1 a 4	frakce, obohacená směsí komplexu H11 a H-45.
Dráhy 2 a 5	komplex H-45.
Dráhy 3 a 6	H-gal-GP.

V dráze 3 byly stanoveny pásy pro N-terminální řetězce aminokyselin s molekulovou hmotností 47 000 a 50 000.

Na obr. 2 je znázorněna elektroforéza na SDS-PAGE pro H-gal-GP, stanovení bylo provedeno na 5% gelech za neredukujících podmínek. Do každé dráhy byl nanesen jiný vzorek H-gal-GP. Písmena označují pásy, které byly izolovány pro antigen při pokusu na ovčích, jde o pokus 5 z příkladu 7, jehož výsledek je uveden na obr. 22:

A = 230 000 pro skupinu 15.

B = 190 až 205 000 difuzní pás pro skupinu 16.

C = 170 000 pro skupinu 17.

D = čelo barviva pro skupinu 18.

Na obr. 3 je znázorněna analýza hlavního pásu pro H-gal-GP za redukujících podmínek po předchozí izolaci za neredukujících podmínek.

Dráha 1	H-gal-GP	
Dráha 2	230 000	pásky s touto zjevnou molekulovou
Dráha 3	170 000	hmotností byly vyříznuty z 5% ne-
Dráha 4	čelo barviva	redukujícího gelu (například z
		obr. 2) a znovu podrobeny elektro-
		foréze za redukujících podmínek.

V dráze 3 byl stanoven N-terminální řetězec aminokyselín v pásech s molekulovou hmotností 45 000 a 48 000.

Na obr. 4 je znázorněno schematicky provedení tří postupů pro přípravu komplexu H-gal-GP.

Na obr. 5 je znázorněn výsledek elektroforézy na 10% redukujícím gelu SDS-PAGE pro frakce, získané následující chromatografií komplexu H-gal-GP na iontoměniči Mono Q:

a) Výchozí materiál, izolovaný s použitím lektinu z arašídů:

dráha 1	výchozí materiál, nanesený na sloupec
dráha 2	nenavázaná frakce
dráhy 3 až 5	materiál po eluci 140 mM NaCl
dráhy 6 a 7	materiál po eluci 400 mM NaCl,

b) výchozí materiál, izolovaný s použitím jacalinového lektinu:

dráha 1	výchozí materiál, nanesený na sloupec,
dráha 2	nenavázaná frakce,
dráhy 3 až 5	materiál po eluci 140 mM NaCl,
dráhy 6 a 7	materiál po eluci 400 mM NaCl,

- dráha 8 materiál po eluci 500 mM NaCl,
dráha 9 materiál po eluci 1M NaCl.

Na obr. 6 je znázorněno srovnání elektroforézy na SDS-PAGE pro složky extraktu membrán *H. contortus* prostředkem Triton X-100 po vazbě na lektiny z arašídů, *Vicia*, *Lotus*, sojové boby nebo *Dolichos*.

Stejně velké podíly extraktu v prostředku Triton X-100 membrán *H. contortus* procházely sloupcem s obsahem přebytku následujících lektinů, vázaných na agarosu.

- 1) lektin z arašídů
- 2) lektin z *Vicia villosa*,
- 3) lektin z *Lotus tetranoglobulus*,
- 4) lektin ze sojových bobů nebo
- 5) lektin z *Dolichos biflorus*.

Navázaný materiál byl získán elucí příslušným cukrem, jak je zřejmé z tabulky 2 a pak byl nanesen bez redukce na 5% akrylamidový gel, dráhy byly číslovány stejným způsobem jako svrchu.

Na obr. 7 je znázorněna vazba složek H-gal-GP na biotinylované lektiny. H-gal-GP byl podroben elektroforéze na 10% gelech za redukčních podmínek, načež byl uskutečněn blot na membránu typu immobilon. Blot byl rozřezán na číslované proužky, které pak byly inkubovány s následujícími biotinylovanými lektiny: 1) žádný lektin (negativní kontrola), 2) lektin z concanavalinu A, 3) lektin z čočky, 4) lektin z pšeničných klíčků, 5) arašídový lektin, 6) jacalinový lektin, 7) lektin ze sojových bobů, 8) sukcinylovaný lektin z pšeničných klíčků, 9) lektin z *Helix pomatia*. Proužek 10 byl zbarven modří Coomassie pro barvení bílkovin.

Na obr. 8 je znázorněno optimální pH při použití Azocaseinu jako substrátu. Na ose úseček je znázorněno pH, na ose pořadnic absorbance při 405 nm. Křivky jsou označeny ● H-gal-GP, ▲ Oc-gal-GP, + Oo-gal-GP.

Na obr. 9 je znázorněno optimální pH při použití hemoglobinu jako substrátu. Na ose úseček je znázorněno pH, na ose pořadnic absorbance při 562 nm. Křivky jsou označeny: ● H-gal-GP, ▲ Oc-gal-GP, + Oo-gal-GP.

Na obr. 10 je znázorněna vazba komplexu H-gal-GP na lektin z arašídů při použití 10% gelu za redukujících podmínek:

dráha 1 extrakt S4 z Haemonchus, nanesený na sloupec s lektinem z arašídů,

dráhy 2 až 5 frakce vrcholu, který byl ze sloupce eluován při použití 0,3M galaktosy.

Na obr. 11 je znázorněna vazba komplexu H-gal-GP na jacalinový lektin při použití 10% gelu za redukujících podmínek:

dráha 1 materiál, nanesený na sloupec s obsahem jacalinového lektinu (frakce Haemonchus S3, která byla navázána a vymyta z lektinu z pšeničných klíčků),

dráha 2 nenavázaná frakce, obohacená o H110D,

dráhy 4 až 7 frakce vrcholu, který byl ze sloupce vymyt při použití 0,8 M galaktosy.

Poznámka: Hlavní pás ve výchozím materiálu je H110D. Tento materiál se neváže na jacalinový lektin a je tedy možno jej za uvedených podmínek odlišit jako materiál s o něco nižší molekulovou hmotností než 130 000 pro H-gal-GP.

Na obr. 12 je znázorněna selektivní vazba H-gal-GP na agarosu s pepstatinem, byl užit 10% gel za neredukujících podmínek,

- | | |
|---------|---|
| dráha 1 | Haemonchus S3, nanesený na agarosu s pepstatinem při nízkém pH 5,5, |
| dráha 2 | nenavázaný materiál, bohatý na H11OD, |
| dráha 3 | materiál, vymytý při pH 8,5, |
| dráha 4 | materiál po eluci 1% SDS o pH 7,4, |
| dráha 5 | H-gal-GP (pozitivní kontrola). |

Na obr. 13 je znázorněna selektivní vazba H-gal-GP na agarosu s pepstatinem včetně pásů s molekulovou hmotností 47 000 a 50 000 (immunoblot z 10% gelu za neredukujících podmínek, jako sonda bylo užito sérum proti H-gal-GP)

- | | |
|---------|---|
| dráha 1 | nenavázaný materiál, bohatý na H11OD, |
| dráha 2 | materiál, vymytý při pH 8,5, |
| dráha 3 | materiál po eluci 1% SDS o pH 7,4, |
| dráha 4 | materiál, ještě vázaný na agarosu s pepstatinem po eluci 1% roztokem SDS (materiál byl uvolněn vyjmutím agarosy ze sloupce a poškozením agarosy s pufrům pro SDS-PAGE s obsahem SDS a DTT), |
| dráha 5 | H-gal-GP (pozitivní kontrola). |

Na obr. 14 je znázorněn kryostatický řez *H. contortus*, barvený fluorescenčně značeným arašídovým lektinem.

Na obr. 15 jsou znázorněny kryostatické řezy *H. contortus*, barvené fluorescenčně značeným lektinem z pšeničných klíčků.

Na obr. 16 jsou znázorněny kryostatické řezy *H. contortus*, barvené pomocí séra proti H-gal-GP.

Na obr. 17 jsou znázorněny kryostatické řezy *H. contortus*, izolovaného z ovčí, imunizovaných s použitím H-gal-GP a barveného antiserem, specifickým pro ovčí imunoglobulin.

Na obr. 18 je znázorněna distribuce H-gal-GP v extraktech membrán *H. contortus*, které byly získány s použitím PBS (S1), Tween (S2) a Tritonu X-100 (S3).

Ve drahách 3, 2 a 1 jsou výsledky extraktů v PBS, Tween a Triton X-100 pro stejný vzorek hlístů. Vzorky byly redukovány, podrobeny elektroforéze na 10% gelech, pak byl uskutečněn blot a vzorky byly zpracovány jodistanem k denaturaci uhlohydrátů, jako sonda bylo použito antiserum proti H-gal-GP.

Na obr. 19 je znázorněna vazba H-gal-GP a H110D na lektin z pšeničných klíčků při použití 10% gelu za redukujících podmínek:

dráha 1 extrakt S3 *Haemonchus* po nanesení na sloupec

dráhy 2 až 8 postupné frakce, obohacené o H110D a H-gal-GP,
vymyté v rozsahu vrcholu při použití 0,5 M
N-acetylglukosaminu.

Na obr. 20 je znázorněna vazba H-gal-GP na agarosu s pepstatinem při použití 5% nebo 10% akrylamidových gelů za neredukujících podmínek:

- dráha 1 H-gal-GP po nanesení na sloupec agarosy s
 pepstatinem,
- dráha 2 materiál po desorpci ze sloupce pomocí 1% SDS
 v 10 mM tris-HCl s 50 mM NaCl o pH 8,0.

Na obr. 21 je znázorněna analýza hydrolytické účinnosti H-gal-GP při použití gelu jako substrátu. V horní části je možno pozorovat zbytek 7,5% neredukujícího akrylamidového gelu s obsahem 0,1 % želatiny jako substrátu.

- dráha 1 H-gal-GP, předem inkubovaný s pepstatinem,
- dráha 2 H-gal-GP bez předběžného zpracování.

Na obr. 22 je znázorněna frakcionace imunogenů při pokusech na vakcinaci ovcí způsobem podle příkladu 7.

Na obr. 23 jsou znázorněny výsledky pokusu 1, z příkladu 7. Je uvedeno průměrné množství vajíček ve výkalech při použití ● lektinu z pšeničných klíčků (1), ▲ u kontrol (2). Na ose úseček jsou znázorněny dny po infekci, na ose pořadnic průměrný počet vajíček/g výkalů ± střední chyba.

Na obr. 24 jsou znázorněny výsledků polusu 2 z příkladu 7. Opět je uvedeno průměrné množství vajíček ve výkalech při použití ● lektinu z pšeničných klíčků, materiál je zbaven H11 (S), ▲ materiálu bez vazby na lektin (4), + kontrola (5). Na ose úseček jsou znázorněny dny po infekci, na ose pořadnic je uveden střední počet vajíček/g výkalů ± střední chyba.

Na obr. 25 jsou znázorněny výsledky pokusu 3 z příkladu 7. Opět je uvedeno průměrné množství vajíček ve výkalech pro ● H110D (6), ▲ při použití arašídového lektinu (7),

a u kontrol (8). Na ose úseček jsou uvedeny dny po infekci, na ose pořadnic je uveden průměrný počet vajíček/g výkalů $\pm$ střední chyba.

Na obr. 26 jsou znázorněny výsledky pokusu 4. Opět je uvedeno průměrné množství vajíček ve výkalech pro ● nativní vzorek (9), ▲ u kontrol (12), + SDS (10), ◆ SDS-DTT (11). Na ose úseček jsou uvedeny dny po infekci, na ose pořadnic průměrný počet vajíček/g výkalů $\pm$ střední chyba.

Na obr. 27 je znázorněna podobnost mezi H-gal-GP a ekvivalentními bílkovinami z *O. circumcincta* a *O. ostertagi*. Vzorky byly podrobeny elektroforéze na 5% neredukujícím akrylamidovém gelu a pak byl proveden blot pomocí membrány immobilon. V blotu na levé straně byl jako sonda použit biotinylovaný arašídový lektin, v blotu na pravé straně bylo použito sérum proti H-gal-GP. Blot, v němž bylo jako sonda použito antisérum, byl předem inkubován s 50 mM jodistanem k denaturaci potenciálních epitopů uhlohydrátů, které by mohly být příčinou zkřížené reakce. Žádné zabarvení nebylo možno pozorovat na kontrolním blotu, který byl inkubován v přítomnosti normálního séra.

dráha 1 H-gal-GP

dráha 2 Oc-gal-GP,

dráha 3 Oo-gal-GP.

Na obr. 28 je znázorněna vazba Oc-gal-GP na agarosu s pepstatinem.

Stejná množství uvedené látky byla přidána do zkumavek, obsahujících agarosové kuličky, vázané na pepstatin, arašídový lektin nebo lektin z *Dolichos* a zkumavky byly uloženy

3 hodiny při teplotě 4 °C za opatrného míchání. Pak byly kuličky odstředěny a supernatanty byly uchovány. Po trojím promytí byly kuličky povařeny v co nejmenším množství pufru pro vzorky SDS-PAGE a směs byla znovu odstředěna. Supernatanty z tohoto stupně, obsahující materiál, původně vázaný na agarosu a původní supernatanty byly nanесeny na 5% neredukující gely SDS-PAGE, pak byl proveden blot při použití membrány immobilon, jako sonda byl použit biotinylovaný arašídový lektin.

Výsledky prokázaly, že Oc-gal-GP se váže specificky na arašídový lektin a na agarosu s pepstatinem, avšak neváže se na agarosu s jiným vazným materiálem, například na lektin z Dolichos:

- dráha 1 nenavázaný materiál z Dolichos,
- dráha 2 materiál, vázaný na Dolichos,
- dráha 3 materiál, nenavázaný na lektin z arašídů,
- dráha 4 materiál, vázaný na lektin z arašídů,
- dráha 5 materiál nenavázaný na pepstatin,
- dráha 6 materiál, vázaný na pepstatin.

Na obr. 29 je znázorněna elektroforéza na 10% akrylamidovém gelu SDS-PAGE za redukujících podmínek pro antigen, integrálně vázaný na membránu *O. circumcincta*, který byl v následujících pokusech použit pro imunisaci.

- dráha 1 extrakt S3 membrán z celých hlístů *O. circumcincta* při použití Tritonu X-100,
- dráha 2 frakce S3, která se váže na ConA a byla užita imunizací ovcí v pokusu 1, příkladu 8,

dráha 3 frakce S3, která se neváže na ConA.

Ve zbývajících dráze je možno pozorovat látky, užité k označení molekulové hmotnosti.

Na obr. 30 jsou znázorněny průměrné počty vajíček ve výkalech ovcí po zatížení 5000 larvami *O. circumcincta*, výsledky jsou uvedeny pro kontrolní ovce a pro ovce, imunizované na concanavalin A (ConA) vázanou frakcí integrálních bílkovin membrány *O. circumcincta*. Na ose úseček jsou znázorněny dny po aplikaci vajíček, na ose pořadnic je uveden průměrný počet vajíček/g výkalů $\pm$ střední chyba.

Na obr. 31 je znázorněn výsledek blotů, k němuž byla užita frakce z příkladu 8, vázaná na ConA po elektroforéze na 5% akrylamidovém gelu za neredukujících podmínek. Ve frakci z pokusu 1 byla prokázána přítomnost Oc-gal-GP.

Dráha 1 ConA S3 frakce *O. circumcincta*, jako sonda byl užít arašídový lektin,

dráha 2 značení molekulové hmotnosti,

dráha 3 ConA S3 frakce *O. circumcincta*, jako sonda byl použit lektin ConA.

Na obr. 32 je znázorněno fluorescenční barvení kryostatických řezů normálních dospělých jedinců *O. circumcincta* při použití fluoresceinu, konjugovaného s arašídovým lektinem.

Na obr. 33 je znázorněn řetězec nukleotidů pro klon HG3.

Na obr. 34 je znázorněn odvozený řetězec aminokyselin pro klon HG3 a jeho srovnání s lidským řetězcem pro neutrální

aminopeptidázu. Oba řetězce jsou odvozeny od cDNA. Oba řetězce obsahují 33 % totožných aminokyselin, úroveň podobnosti je 65 %. Srovnání obou řetězců bylo uskutečněno při použití programu BESTFIT (University of Wisconsin zkušební balíček GCG).

Na obr. 35 je znázorněn výsledek zkoušky southern blot, prokazující hybridizaci klonu HG11 na DNA genomu, odvozenou od různých metazoických parazitů po rozštěpení enzymem EcoRI. Hybridizace byla uskutečněna za mírně omezujících podmínek,

- dráha 1 Haemonchus
- dráha 2 Lucilia
- dráha 3 Nematodirus
- dráha 4 Boophilus.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Popis a biochemická charakterizace komplexu H-gal-GP

1) Elektroforéza na SDS-PAGE

Komplex H-gal-GP, užitý pro tuto analýzu byl izolován z extraktu Tritonem H-100 z dospělých jedinců Haemonchus (jak bude dále vysvětleno v příkladu 2 a znázorněno na obr. 4), byla uskutečněna afinitní chromatografie při použití arašídového lektinu po odstranění solí a po koncentraci chromatografií na iontoměničích Mono Q (Pharmacia). Byly uchovány frakce, které byly vymyty v rozmezí koncentrací 100

a 350 mM NaCl. Typický výtěžek byl přibližně 2 % celkové bílkoviny z extraktu v Tritonu X-100, což znamená přibližně 200 mikrogramů bílkoviny na 1 g hlístů.

V případě, že byl komplex H-gal-GP podroben elektroforéze na 7,5% nebo 10% gelu bez redukce, byla získána skupina polypeptidů s molekulovou hmotností 200 000 nebo vyšší spolu se světleji se barvícím párem pásů s molekulovou hmotností přibližně 47 000 a 50 000, jak je zřejmé z obr. 1, dráha 3. V případě, že koncentrace akrylamidu byla snížena na 5 %, rozdělil se materiál s vyšší molekulovou hmotností na dva hlavní pásy s molekulovou hmotností přibližně 230 000 a 170 000, jak je zřejmé z obr. 2. Mimoto je možno pozorovat slabší pás polypeptidu s molekulovou hmotností 205 000 a difusní zabarvenou oblast (obr. 2). Nejmenší polypeptidy, které bylo možno pozorovat na obr. 1 ve dráze 3, zůstaly nerozděleny v blízkosti čela barviva.

Za redukujících podmínek se nefrakcionovaný komplex H-gal-GP na 10% akrylamidovém gelu rozdělil na přibližně osm pásů. Většina bílkoviny se nahromadila ve třech pásech s molekulovou hmotností 45 000 až 50 000, avšak slabší pásy bylo možno pozorovat při molekulových hmotnostech 33 000, 35 000, 37 000, 90 000 a 130 000, jak je zřejmé z dráhy 6 na obr. 1.

Další analýza materiálu za neredukujících podmínek, na peptidech, shrnutých v tabulce 1, byla provedena tak, že tři hlavní pásy byly z 5% neredukujících gelů vyříznuty, to znamená pás o molekulové hmotnosti 230 000, 170 000 a čelo barviva například na obr. 2 a po elektroeluci a zahuštění byla znovu provedena elektroforesa na 10% akrylamidovém gelu za redukujících podmínek, jak je zřejmé z obr. 3. Pás s molekulovou hmotností 170 000 se zřejmě rozdělil na dvě silně se barvící složky s molekulovou hmotností 45 000

a 48 000, jak je zřejmé z dráhy 3 na obr. 3. Největší pás s molekulovou hmotností 230 000 byl složitější a rozdělil se na pět složek s molekulovou hmotností přibližně 130 000, 90 000, 48 000, 40 000 a 33 000, jak je zřejmé z dráhy 2 na obr. 3. Pásky v blízkosti čela barviva se rozdělily na tři složky s molekulovou hmotností přibližně 50 000, 47 000 a 35 000, jak je zřejmé z dráhy 4 na obr. 3. První dva z těchto pásů byly popsány také ve dráze 3 na obr. 1, kde byl celý komplex H-gal-GP podroben elektroforéze na 7,5% nebo 10% gelu bez redukce.

Bílkoviny ze svrchu uvedených pásů představují složky H-gal-GP podle vynálezu.

T a b u l k a 1

Zjevná molekulová hmotnost v tisících pro polypeptidy H-gal-GP za redukujících a neredukujících podmínek

složky, vizualizované za neredukčních podmínek		dělení po elektroeluci za redukujících podmínek	
10% gel	5% gel	10% gel	
	(230 ^{xx}	=	130, 90, 48, 40, 33
	(		
	(205) ^{xx})		
200-205	= (190-200): ^{xx})		
	(		
	(170 ^{xx}	=	48 ^x , 45 ^x ,
50 ^x)			
)			
47 ^x)	čelo barviva ^{xx}	=	50 ^x , 47 ^x , 35
)			
35)			

- x Byl stanoven N-terminální řetězec aminokyselin pro uvedené polypeptidy.
- xx Materiál z těchto pásů byl použit k imunizaci ovcí v pokusu 5 v příkladu 7. Polypeptidy s molekulovou hmotností 205 000 a 190 až 200 000 byly použity společně v jediné frakci.

Je tedy zřejmé, že komplex H-gal-GP je tvořen alespoň deseti odlišnými složkami, stejně jako materiál s molekulovou hmotností 205 000 a 190 až 200 000, získaný za neredukujících podmínek.

- 2) N-terminální řetězec aminokyselin pro čtyři ze svrchu uvedených pásů

Gely, obsahující dráhy, totožné s drahami č. 3 na obr. 3 a č. 3 na obr. 1, byly připraveny a byl proveden blot při použití membrán (ProBlott - Applied Biosystems). Po zbarvení modří Coomassie, byly proužky s obsahem párů polypeptidů, identifikovaných na obr. 1 a 3 vyříznuty z membrán a byl stanoven N-terminální řetězec aminokyselin při použití zařízení pro analýzu peptidových řetězců, Applied Biosystems Model 477A Peptide sequencer, čímž bylo možno prokázat přítomnost následujících řetězců:

Obr. 3, dráha 3, molekulová hmotnost 45 000:

Val-Asp-Asn-Val-Phe-?-Pro-Asn-Val-Gly-Leu (řetězce č. 3 a 4)

molekulová hmotnost 48 000:

Val-Glu-Arg-Thr-Asp-Ala-Arg-Met-Asn- (a -Glu- nebo -Asn-)
(řetězce č. 5 a 6)

obr. 1, dráha 3, molekulová hmotnost 47 000:

Val-Phe-Pro-His-Pro-Ile-Tyr-Asp-Tyr-Gln (řetězec č. 7)

molekulová hmotnost 50 000:

Ala-?-Gln-Thr-Val-Phe-Pro-His-Lys (řetězec č. 8).

Při rešerších na počítači nebylo možno prokázat žádnou podstatnou homologii se známými řetězci, získanými z různých zdrojů.

3) Chromatografie na iontoměniči

Komplex H-gal-GP v 10 mM Tris-HCl o pH 7,4 s obsahem 0,1 % objemové Tritonu X-100, byl navázán na iontoměnič Mono Q a iontoměnič byl uveden do rovnovážného stavu v tomto pufru. Většina komplexu H-gal-GP se ze sloupce vymývá v rozmezí 140 a 400 mM NaCl, jak je zřejmé z obr. 5a a 5b. Není možno prokázat rozdělení na složky v tomto rozmezí koncentrací chloridu sodného ani v případě, že se koncentrace soli zvyšuje po malých podílech.

4) Vazba na lektin

a) za nativních podmínek

Komplex H-gal-GP je možno izolovat afinitní chromatografií z extraktů membrán *Haemonchus* v Tritonu X-100 při použití různých lektinů, vázaných na pevnou fázi, například na agarové kuličky, jak je znázorněno na obr. 10 a 11 a popsáno v příkladu 2.

Stanovená relativní afinita nativního komplexu H-gal-GP pro některé lektiny je shrnuta v tabulce 2. S výjimkou *Dolichos biflorus* si lektin se specifícností

pro N-acetylgalaktosamin uchovávají selektivitu pro H-gal-GP. Negativní výsledek pro Dolichos je pravděpodobně důkazem toho, že v tomto případě je afinita specifická pro N-acetylgalaktosaminy, vázané v poloze beta a nikoliv v poloze alfa.

Skutečnost, že lektiny ConA, lektin z hrášku a Lotusu rovněž zadržují komplex H-gal-GP prokazuje, že tento materiál obsahuje glykoproteiny s mannosou a/nebo fukosou, kdežto negativní výsledky s Datura a Bandeiraea napovídají přítomnost struktur bez N-acetylglukosaminu, jak je zřejmé z tabulky 2. Avšak všechny lektiny, které nejsou schopné zadržet H-gal-GP, jsou schopné se na tuto látku vázat a nemají žádnou rozdílnou afinitu pro složky této látky, jak je zřejmé z obr. 6.

b) za disociovaných a redukujících podmínek

Aby bylo možno stanovit, které složky H-gal-GP jsou glykosylovány, byl komplex redukován a disociován elektroforézou na SDS-PAGE a pak byl uskutečněn blot na membránu, přičemž jako sondy byly použity biotinylované lektiny. Výsledky, které jsou znázorněny na obr. 7 prokazují, že některé typy lektinu, například lektin z čočky, jsou schopné se vázat na většinu vzniklých pásů, kdežto jiné typy lektinů, například arašídový lektin, lektin z Helix pomatia a sukci-nylovaný lektin z pšeničných klíčků, jsou daleko selektivnějšími látkami. Všechny lektiny s výjimkou lektinu ze sojových bobů se silně vázaly na pás s molekulovou hmotností 130 000 a na o něco menší složku, takže je pravděpodobné, že v této oblasti se může vytvořit dublet. Některé lektiny a to zejména lektin z čočky, conA a lektin z pšeničných klíčků zabarvují difuzní oblast v rozsahu složky s molekulovou hmotností 90 000. Další lektiny, zvláště lektin z

pšeničných klíčků, arašídový lektin, jacalinový lektin, sukcinylovaný lektin z pšeničných klíčků a lektin z *Helix pomatia*, reagují difuzním způsobem s glykoproteinem s molekulovou hmotností 60 000 tak, že vzniká slabé zbarvení modří Coomassie. Lektin ConA, jacalinový lektin, lektin z pšeničných klíčků a lektin z čočky jsou rovněž schopné se vázat velmi silně na pás s molekulovou hmotností 50 000, kdežto pás s molekulovou hmotností 47 000 je možno zviditelnit pouze při použití lektinu z čočky.

T a b u l k a 2

Relativní afinita různých lektinů, vázaných na agarosu, pro
H-gal-GP, H110D nebo H45.

lektin	specifičnost cukru	relativní afinita vazby H-gal-GP H110D H45	cukr, užitý k eluci sloupce
Concanavalin A	alfa-D-mann, alfa-D-glc	+++ +++ +++	0,5M methylmannosid
pšeničné klíčky (Triticum vulg.)	(D-glc-NCac) ₂ , NeuNAc	+++ + ?	0,5 M N-acetylglukosamin
hrách (Pisium sativum)	alfa-D-mann	+++ ++ ?	0,2M methylaminosid + 0,2M methylglukosid
arašídý (Arachis hypogea)	beta-D-gal-(1-3)- -D-gal NAc	+++ - -	0,5M galaktosa
jacalin (Artocarpus integrifolia)	beta-D-gal(1-3)-D- -gal NAc	+++ - -	0,8M galaktosa
sojové boby (Glycine max)	terminálně alfa,beta-vázaný	++ - -	0,2M N-acetylgalaktosamin

Tabulka 2 -pokračování

lektin	specifičnost cukru	relativní afinita vazby			cukr, užitý k eluci
		H-gal-GP	H110D	H45	
vicia villosa	beta-D-gal(1-3)-				
	-D-gal NAc +				
	alfa,beta-terminálně				
	vázaný gal NAc	+	-	-	0,2M N-acetylglaktosamin
Lotus tetragonobulus	alfa-L-fukosa	+	-	-	0,1M L-fukosa
Dolichos biflorus	alfa-D-gal NAc	-	-	-	0,2M acetylglaktosamin
Datura stramonium	beta-D-glc(1-4)-				
	-D-glc NAc	-	-	-	0,5M N-acetylglukosamin
Bandeiraea (Griffonia)	alfa-D-glc NAc				
simplicifolia	beta-D-glc NAc	-	-	-	0,2M acetylglukosamin

5) Účinnost proteázy

Komplex H-gal-GP má proteázovou účinnost s optimem pH v rozmezí 4,0 nebo 6,0 v případě, že se jako substrát užíje azokasein nebo hemoglobin, jak je zřejmé z obr. 7 a 8. Tato účinnost je inhibována pepstatinem, který se silně váže na H-gal-GP. Tuto poslední vlastnost je možno využít k obohacení komplexu H-gal-GP afinitní chromatografií.

6) Isoelektrický bod

Isoelektrický bod pro komplex H-gal-GP byl stanoven pomocí předem vytvořeného lineárního gradientu pH v rozmezí 2 až 9 v průtokovém zařízení Miniphor. Většina komplexu byla vymyta při pH 2 až 7,3. Toto široké rozmezí je typické pro glykoproteiny, v nichž variabilní uhlohydrátové zbytky způsobují heterogenitu náboje molekul.

Dva postupy pro výrobu komplexu H-gal-GP z *H. contortus*

Tyto postupy jsou znázorněny na schematu na obr. 4 a budou podrobněji popsány v příkladech 2 a 3.

Extrakt z membrán *Haemonchus* (S3) s použitím smáčedla byl připraven v postatě způsobem podle mezinárodní patnetové přihlášky WO90/11086 (Munn a Smith).

Příklad 2

Dospělí jedinci *Haemonchus contortus* byli homogenizováni při teplotě 4 °C v acetátovém pufru nebo ve fyziologickém roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrem v kyselém nebo neutrálním prostředí, obsahujícím 1 mM EDTA a 1 mM

PMFS jako inhibitory proteázy. Homogenát byl odstředěn 20 minut při 10 000 g za obvyklých podmínek a vzniklá usazenina byla extrahována 0,1% prostředkem Tween 20 a znovu odstředěna. Tento postup byl opakován a získaná usazenina byla extrahována 2% prostředkem Triton X-100 a odstředěna za běžných podmínek. Supernatant byl odstředěn na ultraodstředivce 1 hodinu při 100 000 g a tento supernatant (S3) se pak nechal projít filtrem s průměrem otvorů 0,22 mikrometrů a pak byl 4x zředěn pufrém, k ředění byl použit pufr 10 mM Tris-HCl s obsahem 0,5 M NaCl, 0,01 % NaN_3 při pH 7,4.

Takto získaný zředěný supernatant S3 byl podroben afinitní chromatografií při použití různých lektinů, vázaných na agarosové kuličky. Po nanesení zředěného supernatantu na sloupec byl sloupec promyt několika objemy pufru a pak byl materiál, vázaný na lektin vymýván při použití příslušného cukru.

Relativní množství vázaného H-gal-GP bylo pro jedenáct různých lektinů stanoveno vizuálně na gelech SDS-PAGE, jak je popsáno na obr. 6. Výsledky, uvedené v tabulce 2 prokazují, že se několik lektinů vázalo na H-gal-GP, avšak specificky se vázaly pouze ty lektiny, které byly specifické pro N-acetylgalaktosamin, fázaný v poloze beta a z těchto lektinů se nejúčinněji vázal lektin z arašídů a z jacalinu. Nebylo možno prokázat oddělení složek H-gal-GP v případě žádného z lektinů, jak je zřejmé z obr. 6.

Při použití lektinu z arašídů nebo z jacalinu procházely bílkoviny H110D a H45 spolu s ostatními materiály sloupcem, kdežto komplex H-gal-GP zůstal vázán ve sloupci. Tento komplex pak bylo možno vymýt v podstatě v čisté formě při použití 0,3 nebo 0,8 M galaktosy ze sloupců s lektinem z arašídů i jacalinu, jak je zřejmé z obr. 10 a 11.

Při použití lektinu z pšeničných klíčků bylo dosaženo podobných výsledků při eluci 0,5 M N-acetylglukosaminem až na to, že určitý podíl H110D zůstal navázán a pak byl vymýván spolu s komplexem H-gal-GP (jde o materiál, který je možno pozorovat ve dráze 1 na obr. 11 po nanesení na sloupec s lektinem z jacalinu).

Příklad 3

Průkaz, že pepstatin je specifickou a avidní vaznou látkou pro H-gal-GP

Supernatant S3 byl nanesen při nízkém pH v pufru s vysokou iontovou silou, 20 mM octanu sodného s 1 M NaCl o pH 5,5 na sloupec, obsahující pepstatin, vázaný na agarosové kuličky. Většina polypeptidů včetně H110D se na tuto matici nevázala (dráha 1 a 2 na obr. 12). Po promytí sloupce několika objemy uvedeného pufru bylo možno vymýt malé množství H-gal-GP a dalších volně vázaných materiálů při zvýšení pH na 8,5. V případě, že sloupec byl pak vymýván puftrem s nízkou koncentrací smáčedla s vysokým nábojem (například při použití 1% dodecylsírany sodného, SDS), byl profil vymývaných polypeptidů velmi podobný H-gal-GP, přestože dvojice pásů, obvykle pozorovaná při molekulové hmotnosti 45 000 na 10% neredukujících gelech byla menší (dráha 4 na obr. 12). V případě, že byl materiál ze sloupce vyjmut a podíly agarosy byly inkubovány s 5% SDS v přítomnosti dithiothreitolu DTT, bylo možno vymýt frakci, obohacenou o tyto chybějící pásy, což znamená, že retence těchto materiálů byla velmi pevná, jak je zřejmé z dráhy 4 na obr. 13. Nebylo možno prokázat žádnou účinnost proteázy ve vymytém materiálu, což znamená, že enzym nebyl funkční v přítomnosti dodecylsírany sodného.

Kontrolní pokusy byly prováděny tak, že po promytí kyselinou svrchu uvedeným způsobem byla agarosa vyjmuta ze sloupce a promyta opakovaným odstředěním a znovu uvedením do suspenze v samotném pufru nebo v pufru s obsahem až 2 % deoxycholátu nebo až 0,1 % SDS. Při žádném z těchto zpracování nebylo možno z agarosy odstranit podstatnější množství H-gal-GP, což znamená, že nešlo pouze o fyzikální zachycení nerozpustné bílkoviny na vrcholu sloupce. Zjištění, že se H-gal-GP neváže na některé sloupce, obsahující konjugát lektinu a agarosy (tabulka 2 a dráha 5 na obr. 6) představuje další důkaz, že vazba na pepstatin-agarosu je specifická pro určité vazné látky.

Příklad 4

H-gal-GP je uložen na rozhraní vrstvy řasinkového epithelu na povrchu vnitřního průsvitu střeva *Haemonchus contortus*, kde je přítomen jako integrální glykoprotein membrány

a) Uložení na rozhraní řasinkového epithelu střeva

i) Kryostatické řezy dospělých jedinců *H. contortus* byly barveny řadou laktinů, značených fluorescenčními barvivy. Bylo prokázáno, že při použití lektinů z arašídů a z pšeničných klíčků se selektivně barví rozhraní řasinkového epithelu střeva, jak je zřejmé z obr. 14 a 15. Některé lektiny, například Con A barvily většinu struktur, kdežto jiné lektiny, například Ulex barvily jen malý podíl struktur nebo nebarvily žádné struktury. To prokazuje, že uvedené místo ve střevní stěně obsahuje vazná místa pro lektin z pšeničných klíčků a pro lektin z arašídů než jiné anatomické struktury *Haemonchus*. Vzhledem k tomu, že se na lektin z arašídů a pšeničných klíčků specificky váže právě H-gal-GP, nachází se tato látka pravděpodobně v uvedeném místě střeva.

ii) Kryostatické řezy dospělých jedinců *H. Contortus* byly inkubovány se sérem ovcí, imunizovaných při použití H-gal-GP ve Freundově úplném pomocném prostředí nebo se sérem kontrolních ovcí, jimž byl injekčně podán pouze uvedený pomocný prostředek (podrobnosti jsou uvedeny v příkladu 7, pokusy 3 a 4). Po důkladném promytí byly řezy inkubovány s koňskými protilátkami, specifickými pro ovčí imunoglobulin a konjugovanými s fluoresceinisothiokyanátem. Po dalším promytí byly řezy pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu.

Řezy, které byly inkubovány se sérem s protilátkami proti H-gal-GP měly specifickou fluorescenci v místě hraniční membrány řasinkových střevních buněk a také ve vrstvě pod pokožkou, jak je zřejmé z obr. 16. Žádné specifické zbarvení nebylo pozorováno v řezech, které byly inkubovány se sérem kontrolních ovcí. Tyto výsledky prokazují, že H-gal-GP je uložen v místě hraniční membrány řasinkového epitelu a v podkožní vrstvě *Haemonchus*.

iii) Kryostatické řezy byly připraveny z dospělých jedinců *Haemonchus*, izolovaných z ovcí, které byly imunizovány pomocí H-gal-GP ve Freundově úplném pomocném prostředí nebo z ovcí, jimž byl injekčně podán pouze pomocný prostředek, jak je podrobně uvedeno v příkladu 7, pokusy 3 a 4.

Řezy byly inkubovány s protilátkami, specifickými pro imunoglobulin ovce a konjugovanými s fluoresceinisothiokyanátem. Po důkladném promytí byly pak řezy pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem stejně jako svrchu.

U některých, avšak nikoliv u všech řezů z hlístů, kteří přežili imunizaci při použití H-gal-GP, bylo možno

prokázat specifickou fluorescenci. Tento jev byl ohraničen na membránu řasinkového epithelu střevních buněk, jak je zřejmé z obr. 17. Žádné zbarvení nebylo pozorováno u řezů *Haemonchus* z kontrolních ovcí.

Tyto výsledky prokazují, že u některých hlístů, kteří přežili imunizaci pomocí H-gal-GP, bylo možno pozorovat povlak ovčího imunoglobulinu na hraniční membráně střevního řasinkového epithelu. To znamená, že H-gal-GP musí být uložen právě v místě této membrány. Barvení ve vrstvě pod pokožkou, které bylo pozorováno v pokusech in vitro podle předchozího odstavce v tomto případě nebylo možno prokázat. Příčinou tohoto jevu je pravděpodobně skutečnost, že se in vivo imunoglobulin hostitele nedostává do styku s touto anatomickou částí parazita.

b) Integrální glykoprotein membrány

V případě, že bloty, zpracované působením jodistanu a obsahující extrakty z celých hlístů, získané pomocí PBS, Tween a Triton X-100 (to znamená S1, S2 a S3, tak jak je uvedeno na obr. 4), byly jako sondou zkoumány sérem proti H-gal-GP, získaným podle pokusu 3, bylo možno přítomnost H-gal-GP prokázat pouze v extraktu, který byl získán pomocí Tritonu X-100, jak je zřejmé z obr. 18. Tento výsledek, získaný poměrně citlivou zkouškou prokazuje, že H-gal-GP není přítomen jako rozpustná bílkovina cytoplasmy nebo jako periferní bílkovina membrány vzhledem k tomu, že je zapotřebí použít Triton X-100, aby bylo možno tuto bílkovinu z buněčné membrány uvolnit.

Tento výsledek spolu s výsledky pro vazbu lektinu z tabulky 2 prokazuje, že H-gal-GP je integrální glykoprotein membrány.

Příklad 5

Komplex H-gal-GP je odlišný od bílkovinného dubletu H110D (WO 90/11086), od bílkovinného komplexu H45 (WO90/11086), od bílkoviny membrány s molekulovou hmotností 45 000 (WO92/13889) i od fibrinolytické proteázy (EP-A-434909)

a) Rozdíly mezi komplexem H-gal-GP, H110D a bílkovinným komplexem H45

i) Vazba lektinu

Prokázaná relativní afinita komplexu H-gal-GP, H110D a komplexu H45 pro určité lektiny je shrnuta v tabulce 2. S výjimkou *Dolichos biflorus*, kde nebyla vůbec prokázána vazbam zadržovaly lektiny se specifíčností pro N-acetylga-laktosamin komplex H-gal-GP, avšak nikoliv H110D nebo komplex H45.

ii) Isoelektrický bod

Komplex H-gal-GP má nižší isoelektrický bod než H110D nebo komplex H45 a je možno jej od těchto látek oddělit chromatografií na iontoměniči. Například velmi malé množství komplexu H5 se váže na Mono Q v rovnovážné stavu s 10 mM tris-HCl o pH 7,4 s obsahem 0,1 % objemových TritonuX-100, což potvrzuje výsledky, popsané v publikaci Smith, Munn, Graham, Tavernor a Greenwood, *International Journal for Parasitology*, 1993, 23, 271 - 280. Malý podíl, který byl zadržen, bylo možno vymýt před H110D s použitím 50 mM NaCl. Veškerý H110D byl desorbován s použitím 200 mM NaCl, to znamená ještě před tím, než se počal ze sloupce vymývat největší podíl komplexu H-gal-GP.

iii) Profil SDS-PAGE

Dublet H110D, jehož molekulová hmotnost 110 000 zůstává nezměněna na redukujícím i neredukujícím materiálu, jak je zřejmé z obr. 1, dráhy 1 a 4, je zřetelně odlišný od komplexu H-gal-GP za obou podmínek, jak je zřejmé z obr. 1, dráhy 1 a 3 a pak 4 a 6. Avšak vzhledem k tomu, že redukční podmínky podstatně mění profil komplexu H45, jak je zřejmé z obr. 1, dráhy 2 a 5, je rozdíl mezi tímto komplexem a komplexem H-gal-GP více vyjádřen v případě, že se vzorky srovnávají za neredukujících podmínek (obr. 1, dráhy 2 a 3) a nikoliv za redukujících podmínek (obr. 1, dráhy 5 a 6).

iv) Vazba pepstatinu

Na agarosu s pepstatinem se neváže H110D ani H45, agarosa s pepstatinem je prostředí, k němuž se velmi silně váže komplex H-gal-GP, jak je zřejmé z obr. 12 a 13.

b) Rozdíly mezi komplexem H-gal-GP a bílkovinou membrány s molekulovou hmotností 45 000 (W092/13889)

i) Vazba lektinu

Za nativních podmínek se komplex H-gal-GP váže na lektin z pšeničných klíčků, jak je zřejmé z tabulky 2 a z obr. 19. Ochranné antigeny, popsané ve W092/13889 se na tento lektin neváží, tato vlastnost je specificky využívána pro čištění bílkoviny membrány s molekulovou hmotností 45 000.

ii) N-terminální řetězec aminokyselin

N-terminální řetězec aminokyselin, tak jak je uveden pro bílkovinu membrány s molekulovou hmotností 45 000 v

mezinárodní přihlášce W092/13889 pravděpodobně neobsahuje ekvivalentní údaje pro složky komplexu H-gal-GP s molekulovou hmotností 45 000, 47 000, 48 000 nebo 50 000, tak jak jsou popsány v části 2, příkladu 1.

iii) Ochranná schopnost denaturovaného antigenu

Komplex H-gal-GP si uchovává svou schopnost chránit ovce i po denaturaci po disociaci působením SDS a po redukci působením dithiothreitolu, jak je zřejmé z pokusů 4 a 5 v příkladu 7. Bílkovina membrány s molekulovou hmotností 45 000, popsaná v mezinárodní přihlášce W092/13889 ztrácí svou ochrannou schopnost jako antigen v případě, že byla zkoušena v denaturované formě na morčatech.

c) Rozdíly mezi komplexem H-gal-GP a fibrinolytickou proteázou

i) Specifičnost substrátu

V publikaci Cox, Pratt, Hageman a Boisvenue, Molecular and Biochemical Parasitology, 1990, 41, 25 - 34, se popisuje fibrinolytický proteáza z *Haemonchus* a autoři uvádějí, že tato látka je ochranným antigenem přesto, že uvádějí nepřesvědčivé údaje ze dvou pokusů na ovcích v malém měřítku, další údaje jsou uvedeny v EP č. 434 909 z roku 1990 (Cox G. N., Milhausen M. a Hageman R.). Komplex H-gal-GP neměl žádnou proteolytickou účinnost při zkouškách s použitím fibrinogenu, jak je zřejmé z tabulky 4 a z příkladu 6v).

ii) Rozpustnost

Fibrinolytická proteáza, popsaná ve svrchu uvedené publikaci byla získána tak, že jedinci *Haemonchus* byli extrahováni fyziologickým roztokem chloridu sodného. V těchto extraktech nebylo možno prokázat komplex H-gal-GP, který je možno získat z těchto parazitů pouze s použitím smáčdla, například Tritonu X-100, jak je zřejmé z obr. 4 a 5).

Příklad 6

H-gal-GP má vlastnosti aspartlyproteázy

i) Optimální pH

V předběžných pokusech bylo prokázáno, že komplex H-gal-GP, čištěný pomocí lektinu z arašídů hydrolyzuje přednostně azokasein v přítomnosti azokolagenu. Optimální pH pro tuto účinnost se pohybuje v rozmezí 4 až 9, jak bylo prokázáno při použití pufru s 0,1 M acetátem, fosfátem nebo Tris pufru, jak je zřejmé z obr. 8. Optimální účinnost byla prokázána pro rozmezí pH 4,5 až 6,5.

ii) Citlivost na inhibitory

Citlivost proteinázy na inhibitory byla zkoumána při použití čtyř různých vzorků H-gal-GP, čištěného pomocí lektinu z arašídů. Ve všech vzorcích bylo možno enzymatickou účinnost téměř úplně inhibovat působením pepstatinu, což ukazuje na to, že proteolýza byla skutečněna působením aspartylproteázy, jak je zřejmé z tabulky 3.

T a b u l k a 3

Citlivost H-gal-GP a ekvivalentních enzymů z *O. circumcincta* a *O. Ostertagi* na inhibitory

inhibitor	typ	zbývající účinnost v přítom- proteinázy nosti inhibitoru v %		
		H-gal-GP	Oc-gal-GP	Oo-gal-GP
PMSF	serin (thiol)	100	104	84
E64	thiol	87,8	101	101
1,10-fenantrolin	metallo	97	94	99
EDTA	metallo	97,8	ND	ND
pepstatin	karboxyl (aspartyl)	8,5	23	0

ND = nebylo stanoveno.

Výsledky jsou průměrem ze čtyř pozorování v případě H-gal-GP a ze dvou pozorování v obou zbývajících případech.

iii) Afinitní chromatografie na agarose s pepstatinem

H-gal-GP, čištěný podle části 1 příkladu 1 byl nanesen na sloupec agarosy s pepstatinem v rovnovážném stavu v pufru s 25 mM octanu sodného o pH 4,5 s obsahem 1 M NaCl a 0,1 % objemového redukováného Tritonu X-100 podle publikace Do a další, 1987, J. Biol. Chem., 262, 1037 - 1043. Při důkladném promývání v rozmezí pH 4,5 až 10 došlo k desorpci jen malého množství bílkoviny. Avšak při eluci s použitím 1% SDS došlo k desorpci většiny H-gal-GP, jak je zřejmé z obr. 20. H-gal-GP se neváže na agarosu, konjugovanou s vaznou

látkou, použitou jako negativní kontrola, například na lektin z Dolichos. Tyto výsledky spolu s výsledky z příkladu 3 prokazují, že H-gal-GP má silnou specifickou pro pepstatin, což je klasickou vlastností aspartylproteáz a v menším rozsahu membránových metalloendopeptidáz, jak je popsáno v publikaci Zoller H., 1990, Handbook of enzyme inhibitors, VCH, Weinheim, SRN). Profil H-gal-GP na 5% nebo 10% neredukujícím gelu se neměnil před vazbou nebo po vazbě na agarosu s pepstatinem, jak je zřejmé z obr. 20. Tento výsledek prokazuje, že H-gal-GP může být komplexem s větším počtem enzymů nebo směsí proteáz se schopností vázat pepstatin nebo směsí těchto enzymů a jejich prekursorů.

iv) Analýza na gelu

H-gal-GP byl předem inkubován v přítomnosti nebo v nepřítomnosti pepstatinu a pak byl materiál dělen na 7,5% gelech SDS-PAGE s obsahem 0,1 g želatiny na 100 ml za neredukčních podmínek. Po elektroforéze byl SDS vymyt přebytkem Tritonu X-100 a gely byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C ve fosfátovém pufru o pH 6,0. Oblasti, v nichž došlo k proteolýze, byly zviditelněny barvením modří Coomassie.

Výsledky byly variabilní, avšak v jednom případě byla proteolýza v korelaci s oběma hlavními pásy s vysokou molekulovou hmotností pro komplex H-gal-GP i pro menší složku s molekulovou hmotností přibližně 45 000. Všechny oblasti účinnosti byly citlivé na pepstatin. V jiném případě byla účinnost lokalizována pouze na pás komplexu s molekulovou hmotností 170 000 a bylo ji možno zřejmě inhibovat působením pepstatinu, jak je zřejmé z obr. 21. Tato proměnlivá vizualizace aspartylproteínáz byla již dříve popsána a je patrně způsobena poměrně malou afinitou pro želatinu jako substrát, jak bylo popsáno v publikaci Simkin K. G., Chapman C.R. a

Coles G. C., 1980, *Experimental Parasitology* 49, 281 -387. Je tedy pravděpodobné, že H-gal-GP má účinnost aspartyl-proteinázy, která je spojena se všemi pásy pro komplex, které je možno pozorovat za neredukujících podmínek.

v) Afinita H-gal-GP pro přírodní bílkoviny krve

H-gal-GP byl inkubován s fibrinogenem, albuminem, hemoglobinem a také s azokaseinem (ve všech případech v množství 1 mg/ml v pufru o pH 5,5) před srážením nerozštěpené bílkoviny přidáním stejného objemu 1 M roztoku kyseliny chloristé. Proteolýza byla sledována detekcí uvolněného dusíku z alfa-aminoskupin při použití ninhydrinové zkoušky podle publikace Mathews B. E., 1977, *Symposium of British Society of Parasitology*, 15, 103 - 119.

Výsledky prokazují, že H-gal-GP je zřetelně specifický pro hemoglobin, jak je zřejmé z tabulky 4 a že optimální pH pro tuto účinnost je 4,0, jak je zřejmé z obr. 9.

T a b u l k a 4

Afinita H-gal-GP pro přírodní bílkoviny krve a azokasein

substrát	Proteolýza (absorbance při 563 nm)
fibrinogen	0,00
hemoglobin	5,12
albumin	0,77
azokasein	0,55

vi) Inhibice proteolytické účinnosti H-gal-GP sérem
imunních ovcí

Sérum ovcí, imunizovaných H-gal-GP nebo pomocným prostředkem, tak jak je popsáno v pokusu 3 příkladu 7, bylo inkubováno se stejnými podíly H-gal-GP. Směsi pak byly analyzovány na proteolytickou účinnost při použití azokaseinu jako substrátu. Výsledky, které jsou uvedeny v tabulce 5 prokazují, že imunizace působením H-gal-GP vyvolává specifickou inhibiční odpověď, pravděpodobně na bázi protilátky, proti proteolytické účinnosti H-gal-GP.

T a b u l k a 5

Inhibice H-gal-GP sérem imunních ovcí

sérum	inhibice proteolýzy v %	
	pokus 1	pokus 2
kontrolní ovce	0	2
imunní ovce A	58	55
imunní ovce B	51	59

Příklad 7

Ovce, imunizované podáním H-gal-GP jsou chráněny proti napadení *Haemonchus contortus*

Byla provedena řada pokusů s různými frakcemi *H. contortus* s cílem dosáhnout ochrany. Na obr. 22 je znázorněn diagram, shrnující způsob přípravy imunogenů pro každou skupinu ovcí v pěti pokusech.

Provedení pokusu

Pět pokusů s imunizací a následným vystavením infekci bylo provedeno s použitím 19 skupin ovcí v časovém pořadí, které bude dále uvedeno. Zvířata ve všech pokusných skupinách byla vyvážena, pokud jde o pohlaví a hmotnost.

Každá skupina měla obsahovat šest nebo sedm zvířat, avšak jedna z ovcí ve skupinách 9 a 10 uhynula před vystavením infekci v důsledku močových kamenů. Antigeny, použité k imunizaci v každé skupině jsou shrnuty v tabulce 6 a na obr. 22. Každá ovce byla imunizována celkem ve třech časových intervalech stejnou dávkou bílkoviny nebo v případě všech kontrolních skupin podáním pomocného prostředku ve fyziologickém roztoku chloridu sodného a pak byly ovce vystaveny působení 5000 larev *H. contortus*. Vždy byl použit Freundův pomocný prostředek, očkovací materiál byl podán nitrosvalově v dávce 1 nebo 2 ml do každé zadní nohy. Věk ovcí a časový rozvrh pokusů se poněkud měnil v jednotlivých pokusech, jak je podrobně uvedeno v tabulce 7.

Pokus 1

Účelem tohoto pokusu bylo stanovit ochrannou schopnost frakce z extraktu membrán hlístů, získané působením Tritonu X-100, šlo o frakci, schopnou se vázat na lektin z pšeničných klíčků.

Tento imunogen byl vysoce účinný, pokud jde o potlačení množství vajíček ve výkalech, které je možno prokázat po podání larev ve srovnání s počtem u kontrolních ovcí, jak je zřejmé z obr. 23. Výkaly imunizované skupiny obsahovaly statisticky významně nižší množství živých hlístů než kontroly a i při porážce zůstal tento poměr zachován, přičemž

hodnoty poměr mezi hodnotami pro samce a samice je významně vyšší než týž poměr za běžných podmínek, jak je zřejmé z tabulky 6.

Tento výsledek je v kontrastu s výsledkem, který byl popsán v pokusu, uvedeném v přihlášce W092/13889, při tomto pokusu byla frakce, schopná se vázat na lektin z pšeničných klíčků jen málo účinná jako ochranná látka pro morčata. Tyto rozdíly mohou odrážet rozdíly mezi způsobem infekce, který byl použit nebo může být tento rozdíl způsoben skutečností, že v pokusech podle W092/13889 byl ve skutečnosti ochrannou složkou H110D, který se na lektin z pšeničných klíčků neváže, jak je zřejmé z obr. 19.

Skutečnost, že samice *Haemonchus* dříve podléhaly účinkům imunizace než samci, byla již dříve uváděna v jiných pokusech, například v publikaci Smith, 1993, Res. Vet. Sci., 54, 94 - 101, kde se popisuje rovněž vliv antigenu ze střevní membrány. Tento jev je pravděpodobně způsoben tím, že větší samice spotřebují rychleji větší množství krve než samci, takže se do jejich organismu dostává větší množství protilátek. Tyto jevy však mohou být způsobeny také tím, že vyšší anabolické požadavky samic, které kladou vajíčka, činí tyto samice zranitelnější v případě, že jsou blokovány enzymy, nutné pro výživu. Měření poměru samců a samic je tedy dalším užitečným parametrem při stanovení účinků, k nimž dochází při úspěšné imunizaci tímto způsobem.

Pokus 2

Vzhledem k tomu, že je známo, že frakce, která se váže na pšeničné klíčky a která byla užita ve skupině 1, obsahuje určité množství bílkoviny H110D, o níž již bylo prokázáno, že má vysoce ochranný účinek proti *Haemonchus* (Munn

a Smith, 1990), bylo hlavním cílem tohoto pokusu sledovat účinky frakce, která se váže na pšeničné klíčky a která byla předem zbavena H110D chromatografií na iontoměniči. Druhá skupina zvířat pak byla imunizována frakcí, která se neváže na lektin z pšeničných klíčků ani na lektin ConA (obr. 22), aby byl sledován současně i účinek neglykosylovaných bílkovin membrány.

U obou imunizovaných skupin bylo možno prokázat snížený počet vajíček než u kontrolních skupin, jak je zřejmé z obr. 24, avšak pouze v případě podávání materiálu, který se váže na pšeničné klíčky, bylo možno prokázat statisticky významný rozdíl ve všech dnech, v nichž byl proveden odběr. U žádné z imunizovaných skupin nebylo možno prokázat statisticky významný rozdíl oproti kontrolám, přestože při použití frakce, schopné se vázat na pšeničné klíčky, bylo prokázáno podstatně větší množství samců než samic hlístů, jak je zřejmé z tabulky 6.

Průměrný počet vajíček a hlístů u kontrolních ovcí byl v tomto pokusu podstatně nižší ve srovnání s kontrolními pokusy ve zbávajících čtyřech skupinách, jak je zřejmé z obr. 23, 24, 25 a 26 a z tabulky 6, přičemž dvě ovce měly velmi nízké hodnoty. Tyto velké variace, způsobené pravděpodobně použitím starších ovcí v tomto pokusu ztěžovaly zjištění statistické významnosti, takže by bylo zapotřebí celý pokus ještě jednou opakovat.

Pokus 3

V tomto pokusu bylo cílem zkoušky znovu prokázat účinnost frakce, která se váže na pšeničné klíčky, prosté H110D u mladších ovcí, které snáze podléhají infekci hlísty. Mezi tím bylo prokázáno, že uvedenou frakci je možno získat jedno-

dušším způsobem pomocí afinitní chromatografie s použitím lektinu z arašídů, jak je znázorněno na obr. 22 vzhledem k tomu, že uvedená vazná látka neváže prokazatelné množství H110D. Z tohoto důvodu byla v pokuse 3 srovnávána ochranná schopnost frakce, která se váže na lektin z arašídů (to znamená H-gal-GP) a H110D.

Počet vajíček ve výkalech byl v případě obou skupin imunizovaných ovcí podstatně snížen ve srovnání s počtem vajíček u kontrolních zvířat, jak je zřejmé z obr. 25, a současně bylo možno izolovat podstatně menší počet hlístů s výjimečně vysokým poměrem samců hlístů k samicím, jak je zřejmé z tabulky 6.

Bylo proto možno uzavřít, že H-gal-GP představuje ochranný antigen pro *Haemonchus*.

Pokus 4

Cílem tohoto pokusu bylo potvrdit výsledky, které byly získány v pokusech s ochrannou zvířat při použití nativního H-gal-GP a bylo také zapotřebí stanovit, zda si komplex podrží svoji ochrannou účinnost v disociované formě nebo v redukované a disociované formě.

Z tohoto důvodu byl podíl H-gal-GP disociován inkubací s 0,5% SDS (hmotnostní poměr SDS : bílkovina = 2,5 : 1) při teplotě 25 °C po dobu 1 hodina. Druhý stejně velký podíl byl denaturován disociací při použití stejného množství SDS v kombinaci s 2,5 mM dithiothreitem, DTT, jako redukčním činidlem, inkubace trvala 5 minut při teplotě 100 °C. Skupiny 10 a 11 byly imunizovány s použitím H-gal-GP, zpracovaného těmito postupy, skupině 9 byl podán stejný nezpracovaný podíl nativního H-gal-GP, jak je zřejmé z tabulky 6.

Mezi všemi třemi imunizovanými skupinami a kontrolami bylo možno pozorovat statisticky vysoce významné snížení počtu vajíček ve výkalech i počtu hlístů, přesto že tento účinek byl nejvíce vyznačen u nativní skupina a skupiny s SDS, jak je zřejmé z obr. 26 a z tabulky 6. Stejně jako v předchozích případech byly samice hlístů citlivější na účinky imunizace než samci. Bylo možno uzavřít, že ochranné epitopy H-gal-GP zůstaly neovlivněny disociací komplexu působením SDS i denaturací po disociaci SDS a redukci DTT. Tento výsledek kontrastoval s výsledkem, získaným při použití glykoproteinu membrány s molekulovou hmotností 45 000 z mezinárodní patentové přihlášky č. W092/13889, z výsledků vyplývá, že podjednotky polypeptidů ze skupiny H-gal-GP je možno podrobit zkouškám jednotlivě po jejich oddělení a extrakci z SDS-akrylamidových gelů.

Pokus 5

Výsledkem tohoto pokusu bylo vyzkoušet ochranný potenciál antigenu z různých polypeptidových podjednotek H-gal-GP, izolovaných pomocí neredukující elektroforézy na SDS-PAGE.

Skupiny 13 a 14 byly imunizovány při použití 500 a 200 mikrogramů komplexu H-gal-GP, předem disociovaného SDS naprosto stejným způsobem jako v pokusu 4. Skupiny 15 až 18 byly imunizovány jednotlivými složkami H-gal-GP po vyříznutí z 5% gelu po rozdělení komplexu pomocí SDS-PAGE za neredukujících podmínek, jak je znázorněno na obr. 22. Jak je znázorněno na obr. 2, byl skupině 15 injekčně podán materiál s molekulovou hmotností 230 000, skupině 16 byl podán materiál z difuzní oblasti s molekulovou hmotností 190 000 až 205 000, skupině 17 byl podán materiál s molekulovou hmotností 170 000 a skupině 18 byl podán materiál, putující společně s čelem barviva, jak je znázorněno na obr. 2. Řezy gelu s obsahem

příslušných pásů byly znovu uvedeny do suspenze ve vhodném objemu ředidla a homogenizovány se stejným objemem pomocného činidla. Množství frakcionovaného komplexu H-gal-GP bylo vypočítáno tak, že skupinám 15 až 18 byly podány dávky odpovídajícího polypeptidu, ekvivalentní množství, přítomnému v 500 mikrogramech H-gal-GP, to znamená, že množství bylo ekvivalentní množství, podanému skupině 13. Kontrolní skupina 19 byla imunizována pouze pomocným prostředkem.

S výjimkou jediného zvířete (ovce 4), byly proti infekci hlísty chráněny obě pozitivní kontrolní skupiny, které byly imunizovány podáním komplexu H-gal-GP, disociovaného působením SDS. Tuto skutečnost bylo možno prokázat sníženým množstvím vajíček ve výkalech a sníženým množstvím hlístů ve srovnání s kontrolními skupinami a také zvýšením podílu samců hlístů ve srovnání s počtem samic. V případě, že se ovce 4 z výpočtů vyjme, byl propočet ochrany pro skupinu 13 následující: počet hlístů 79 % a počet vajíček 87 % (jde o průměrný počet v průběhu dnů 18 až 35). Pro skupinu 14 byly ekvivalentní výsledky pro hlísty 70 % a pro počet vajíček ve výkalech 84 %. Z těchto výsledků bylo možno uzavřít, že nižší dávka, užitá pro imunizaci skupiny 14 nijak neovlivnila dosaženou ochranu, takže výsledek pro skupinu 13 byl obdobný jako výsledek, jehož bylo dosaženo svrchu v pokusu 4.

Daleko větší individuální variace bylo možno nalézt ve skupinách zvířat, které byly imunizovány různými podjednotkami z různých pásů komplexu H-gal-GP. I tyto výsledky však prokazují, že by chrany mohlo být dosaženo při použití podjednotek z pásů, které byly z gelu vyříznuty po rozdělení komplexů. Z použitých skupin byla nejlépe chráněna zvířata ze skupiny 16, jimž byl podán materiál z difuzního pásu v rozmezí molekulové hmotnosti 190 000 až 205 000 a zvířata ze skupiny 18, jimž byl podán materiál, putující společně s čelem barviva.

Ochrana pro nejlépe chráněnou skupinu, již byl podán materiál z určité podjednotky, je však méně reprodukovatelná než ochrana při imunizaci podáním celého komplexu. Tato skutečnost může být způsobena tím, že při elektroforetickém dělení může dojít k určitému poškození ochranných epitopů nebo tím, že je zapotřebí kombinace více než jedné podjednotky k dosažení stálé a reprodukovatelné ochrany.

Ze svrchu uvedených pěti pokusů je tedy možno uzavřít, že komplex H-gal-GP představuje nový antigenní komplex, jímž je možno vyvolat reprodukovatelným způsobem ochranu proti *Haemonchus*. Ochrany je možno dosáhnout při použití komplexu v nativním stavu, v disociovaném stavu a dokonce i v redukovaném a disociovaném stavu.

Výsledky z pokusů 1 až 4 jsou uvedeny v následující tabulce 6.

T a b u l k a 6

Ochrana ovčí v pokusech 1 až 4, počet hlístů a poměr samců a samic hlístů *Haemonchus*

pokus č.	skupina	n	antigen	dávka ^x	počet hlístů ± SE(průměr)	% samců
1	1	7	váže se na pšeničné klíč.	200	1086±326 ^a	62,3±1,9 ^a
	2	7	O (kontrola)	-	3068±416 ^b	48,6±1,5 ^b
	3	6	pšen.klíčky -H110D	140	1809±115 ^a	63,1±2,8 ^a
2	4	7	nenavázaný na lektin	140	1387±350 ^a	49,6±4,1 ^b
	5	7	O (kontrola)	-	1644±344 ^a	51,5±1,3 ^b
	6	7	H110D	100	518±133 ^a	66,8±5,4 ^a
3	7	7	vazba na arašídý (H-gal-GP)	200	1765±167 ^b	64,2±3,1 ^a
	8	7	O (kontrola)	-	3744±187 ^c	50,1±0,4 ^b
	9	5	nativní H-gal-GP	200	1052±424 ^a	75,5±6,2 ^a
	10	5	H-gal-GP+SDS	500	902±295 ^a	65,7±3,2 ^a
4	11	6	H-gal-GP+SDS+ +DTT	500	1466±476 ^a	70,6±5,4 ^a
	12	6	O (kontrola)	-	3705±627 ^b	56,1±5,4 ^b

Vysvětlivky k tabulce 6:

^x mikrogramy bílkoviny, podané ovčím při imunizaci.

a Věk v měsících při první injekci

b Týdny po první vakcinaci

c Týdny mezi třetí vakcinací a infekcí.

T a b u l k a 7

Rozdíly v provedení pokusů na ovčích

pokus č.	věk ovce ^a	další injekce ^b	interval infekcí ^c	před	doba usmrcení ^d
1	2	4 a 7	1		23
2	8	3 a 6	2		28
3	2	3 a 6	2		34
4	5	3 a 6	2		35
5	3	3 a 6	2		34 nebo 35

Vysvětlivky k tabulce 7:

a až c: jako v tabulce 6

d Doba je uvedena ve dnech po infekci.

Příklad 8

Ekvivalentní enzymy u čeledi Ostertagia

Extrakcí *Ostertagia circumcincta* nebo *Ostertagia ostertagi* způsobem, znázorněným na obr. 4 s následnou afinitní chromatografií s použitím lektinu z arašídů se získají bílkovinné komplexy, které jsou velmi podobné komplexu H-gal-GP, jak je možno usuzovat z jejich profilů na SDS-PAGE, které jsou znázorněny na obr. 27. Stejně jako H-gal-GP mají oba extrakty proteázovou účinnost proti azokaseinu a hemoglobinu ovčí, optimální pH je v rozmezí 4 až 6,0, jak je zřejmé z obr. 8 a 9, účinnost extraktů je možno specificky inhibovat pepstatinem, jak je zřejmé z tabulky 3.

Stejná množství Oc-gal-GP byla uložena do zkumavek, obsahujících agarosové kuličky, na něž byl vázán pepstatin, lektin z arašídů nebo lektin z dolichos a zkumavky byly jemně protřepávány 3 hodiny při teplotě 4 °C. Pak byly kuličky odstředěny a supernatanty s nenavázaným materiálem byly uchovány. Kuličky byly třikrát promyty, povařeny v co nejmenším objemu pufru pro elektroforézu na SDS-PAGE a znovu odstředěny. Supernatanty z tohoto stupně s obsahem materiálu, který se navázal na agarosové kuličky byly podrobeny elektroforéze na neredukujícím 5% gelu SDS-PAGE stejně jako supernatanty s nenavázaným materiálem, pak byl proveden blot na membránu imobilon, jako sonda byl použit biotinylovaný lektin z arašídů.

Výsledky, které jsou znázorněny na obr. 28, prokazují, že se Oc-gal-GP váže specificky na lektin z arašídů a na agarosu s pepstatinem vzhledem k tomu, že se neváže na agarosu s navázaným negativním kontrolním vazným materiálem, kterým je lektin z dolichos.

Sérum z ovcí, imunizovaných s použitím H-gal-GP podle pokusů 1 a 2 z příkladu 7 reaguje zkříženě s bílkovinnými epitopy komplexů z *Ostertagia*, jak je zřejmé z obr. 27.

Vcelku tyto výsledky prokazují, že *H. contortus*, *O. circumcincta* a *O. ostertagi* produkují příbuznou skupinu antigenně obdobných glykoproteinových komplexů s obsahem galaktosy, které mají proteázovou účinnost, kterou je možno inhibovat působením pepstatinu.

Další specifické výsledky budou uvedeny v následujících pokusech.

Pokus 1

Ovce, imunizované integrálními bílkovina membrány *Ostertagia circumcincta* jsou chráněny proti infekci těmito parazity

Byl proveden pokus, při němž byly ovce imunizovány frakcí integrálních bílkovin membrány *Ostertagia circumcincta*, schopnou se vázat na Concanavalin A (ConA) a pak byly ovce infikovány larvami uvedeného parazita a získaný stupeň ochrany byl měřen ve srovnání s kontrolní skupinou.

Příprava antigenu byla vždy uskutečněna v ledu při teplotě 4 °C, odstředění bylo prováděno vždy při 10 000 g po dobu 15 minut, není-li uvedeno jinak. Zmrazení jedinců *O. circumcincta* byli po rozmrazení homogenizováni v pufru (fyziologický roztok chloridu sodného s fosfátovým pufrem o pH 4, obsahující následující inhibitory proteázy: 1 mM EDTA, 1 mM PMSF a 1 mM N-ethylmaleimidu). Homogenát byl odstředěn a usazenina byla znovu uvedena do suspenze v pufru pro homogenizaci s obsahem 0,1 % objemových Tween 20. Tento postup byl ještě jednou opakován a promytá usazenina s obsahem

membrán hlístů byla znovu uvedena do suspenze a pak extrahována důkladným mísením 2 hodiny v homogenizačním pufru s obsahem 2 % Tritonu X-100, avšak bez EDTA. Extrakt byl znovu odstředěn a výsledný supernatant byl pak odstředěn v ultra-ostředivce při 100 000 g po dobu 1 hodiny. Tento supernatant, který je označován S3 (obr. 29, dráha 1) a obsahuje solubilizované integrační bílkoviny membrány byl zfiltrován přes filtr s průměrem otvorů 0,22 mikrometrů po čtyřnásobném zředění puftrem (10 mM Tris-HCl o pH 7,4 s obsahem 0,5 M NaCl a 0,01 g/100 ml NaN_3) a získaný materiál byl nanesen na sloupec ConA-agarosa. Nenavázaný materiál (obr. 29, dráhy 3 a 4) byl doložen a vázaná frakce byla po důkladném promytí sloupce eluována směsí 200 mM alfa-methylmannosidu a alfa-methylglukosidu (obr. 29, dráha 2). Tato frakce byla zbavena cukru a solí filtrací na gelu Sephadex G-25, (Pharmacia), pak byla koncentrována na sloupci iontomaniče Mono Q (Pharmacia), zředěná chladným fyziologickým roztokem s fosfátovým puftrem, PBS a emulgována spolu se stejným objemem Freundova úplného pomocného prostředku.

Čtrnáct kříženců ovcí (Suffold), které byly chovány na pastvě a ustájeny tak, aby byla vyloučena přítomnost parazitů ze skupiny nematodů, bylo rozděleno do dvou skupin s rovnovážným počtem jedinců jednotlivých pohlaví a s přibližně stejnou průměrnou hmotností, celkem bylo šest ovcí imunizováno a osm ovcí bylo kontrolních. V přibližně sedmi měsících věku bylo ovčím z imunizované skupiny injekčně podáno 100 mikrogramů antigenu, kontrolním ovčím byl podán pouze pomocný prostředek. Do každé zadní nohy v oblasti m.semimebranosus a m. semitendinosus bylo vstříknuto vždy 1 ml vakcíny. Každé skupině byly po 3 až 6 týdnech podány znovu stejné injekce. Dva týdny po poslední injekci bylo všem ovčím perorálně podáno 5 000 larev *O. circumcincta* ve třetím stadiu. Od druhého týdne po podání larev byl vždy

dvakrát týdně stanoven počet vajíček ve výkalech a pět týdnů po infekci byla zvířata usmrcena a byl stanoven celkový počet hlístů.

Počet vajíček ve výkalech byl u imunizovaných ovcí podstatně nižší než u kontrolních ovcí v průběhu celého pokusu, jak je zřejmé z tabulky 8 a z obr. 30. V průběhu 21 až 35 dnů bylo množství vajíček u imunizované skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou sníženo o více než 80 %.

Malé vzorky (5 až 10 %) obsahu abomasum a materiálu, rozštěpeného ze sliznice byly sledovány na přítomnost hlístů. Nebylo možno nalézt žádné larvy ve čtvrtém stadiu, u všech hlístů došlo k vývoji až do pátého stadia nebo do dospělosti. Celkový počet hlístů byl přibližně o 60 % nižší u imunizovaných ovcí, což znamená statisticky významný rozdíl, jak je zřejmé z následující tabulky 8.

T a b u l k a 8

Počet vajíček ve výkalech a celkový počet hlístů *Ostertagia* u imunizovaných a kontrolních ovcí

skupina	ovce	Dny po experimentální infekci							hlísti ^a
		14	18	21	25	28	32	35	
imunizované	1	0 ^b	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
	průměr	1,17	42,2	96,7	51,3	85,0	47,0	109,5	1616
kontroly	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	3202
	10	11	432	441	252	252	693	612	3993
	11	7	279	405	207	378	486	x	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
	průměr	9,62	283,5	414,0	256,5	493,0	514,1	502,7	3843
hodnota P		40,05	40,01	40,01	40,01	40,02	40,01	40,01	40,01

Vysvětlivky k tabulce 8:

a = celkový počet hlístů

b = počet vajíček/g výkalů

x = nebyl odebrán vzorek

P = statistická významnost rozdílu mezi průměrem pro imunizovanou a pro kontrolní skupinu při provádění T-testu.

Pokus 2

Důkaz, že ochranné antigeny zahrnují glykoproteinový komplex *Ostertagia circumcincta* s obsahem galaktosy (Oc-gal-GP)

- a) Frakce, schopná se vázat na ConA a užitá k imunizaci ovčí v pokusu 1 byla podrobena elektroforéze na 10% redukujících gelech SDS-PAGE a pak byl provedeno blot na membránu immobilon. Jako sonda byl užit biotinylovaný lektin z arašídů a ukázalo se, že tato vazná látka je specifická pro Oc-gal-GP, jak je zřejmé z obr. 28 a 29. Kladný výsledek (obr. 31) prokazuje, že Oc-gal-GP, byl přítomen v ochranném antigenu.
- b) Při přípravě Oc-gal-GP byly dospělí jedinci *O. circumcincta* zpracováni až do stádia S3 a tento materiál byl čerpán přes sloupec s obsahem lektinu z arašídů, vázaného na agarosu, jak je popsáno svrchu v pokusu 1. Sloupec byl promyt několika objemy pufru a pak byl vázaný materiál vymýván 0,5 M galaktosou, čímž byl získán Oc-gal-GP.

Bloty Oc-gal-GP byly připraveny svrchu uvedeným způsobem s tím rozdílem, že byly nejprve zpracovány jodistanem k rozrušení uhlohydrátových epitopů a ke snížení potenciálních zkřížených reakcí (Woodward, Young a

Bloodgood, 1985, Journal of immunological methods, 78, 143 - 153). Jako sonda pro bloty bylo užito imunní sérum z příkladu 8, pokus 1 nebo vzorek žaludeční šťávy ovcí, přirozeně imunních proti infekci *O. circumcincta* (Smith, Jackson, Jackson, a Williams, 1985, Journal of Comparative Pathology, 95: 235 - 275). Antiserum proti antigenu, schopnému se vázat na ConA z pokusu 1 reagovalo s Oc-gal-GP, avšak žádnou reakci nebylo možno pozorovat při použití žaludeční šťávy z přirozeně imunních živočichů. Tyto výsledky podporují pozorování v pokusu 2a) svrchu, že Oc-gal-GP se nachází ve frakci, schopné se vázat na ConA a užité k imunizaci ovcí, což současně prokazuje, že také Oc-gal-GP představuje "skrytý" antigen.

Pokus 3

Průkaz, že Oc-gal-GP je bílkovina střevní membrány

Byly připraveny kryostatické řezy *O. circumcincta* a tyto řezy byly zbarveny lectinem z arašídů, konjugovaným s fluoresceinem. Bylo možno pozorovat intenzivní fluorescenci v průběhu celého střeva, mimoto se o něco méně intenzivně zbarvily také dosud neidentifikované vnitřní struktury, jak je zřejmé z obr. 32. Vzhledem k tomu, že lektin z arašídů specificky váže Oc-gal-GP, je možno tento výsledek považovat za průkaz, že Oc-gal-GP je bílkovina střevní membrány.

Příklad 9

Ekvivalentní enzymy u čeledi *Trichostrongylus*

Proteolytická účinnost v extraktech dospělých jedinců *T. vitrinus* byla snížena o 40 % v přítomnosti pepstatinu.

Mimoto byla značně snížena v přítomnosti pepstatinu také účinnost proteolyticky účinného dubletu s molekulovou hmotností přibližně 205 000, vizualizovaného za neredukujících podmínek na gelu se želatinou. Tato pozorování prokazují, že *T. vitrinus* rovněž obsahuje aspartylproteinázu podobně jako čeledi *Haemonchus* a *Ostertagia*.

Příklad 10

Důkaz, že H-gal-GP obsahuje neutrální endopeptidázu

1. Detekce účinnosti, podobné neutrální endopeptidáze a spojené s H-gal-GP

Metody

Účinnost proteinázy byla stanovena mikrozkuškou při použití azokaseinu jako substrátu. H-gal-GP v množství přibližně 5 mikrogramů ve 20 mikrolitrech byl předem inkubován 30 minut při teplotě 37 °C spolu s 200 mikrolitry sterilního 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,0 bez obsahu inhibitoru (kontroly) nebo s obsahem inhibitoru až do konečné koncentrace 1 mM. Použité inhibitory byly připraveny jako 100 mM zásobní roztoky ve vodě s výjimkou 4-hydroxybenzoátu měďnatého (4HMB) a pepstatinu, tyto látky byly rozpuštěny v methanolu. Zkoumanými inhibitory byly dithiothreitol DTT, L-cystein, redukovaný glutathion, 4HMB, N-ethylmaleimid, EDTA, 1,10-fenanthrolin a pepstatin, (všechny Sigma). Po předběžné inkubaci bylo přidáno 20 mikrolitrů azokaseinu (5 mg/ml ve sterilní destilované vodě, Sigma) a reakční směsi byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C. Paralelní slepé zkoušky, obsahující sterilní vodu místo H-gal-GP, byly zařazeny pro každý zkoumaný inhibitor a všechny zkoušky byly uskutečněny ve dvojím provedení. Reakce byly zastaveny přidáním stejného objemu 1 M kyseliny chloristé (BDH chemicals) a uloženy na 15 minut

do ledu k vysrážení nerozštěpené bílkoviny, která pak byla usazena krátkým odstředěním při 11 000 g při použití mikroodstředivky. Hustota OD_{405} supernatantu byla stanovena pomocí analytického zařízení Monarch pro mikroodstředivky (Instrumentation Laboratory, Warrington, UK). Po odečtení příslušné slepé zkoušky byl stupeň inhibice vyjádřen v procentech jako zbývající účinnost ve srovnání s kontrolní reakcí.

2. Izolace a charakterizace klonů lambda gt11, jde o kódové klony pro neutrální endopeptidázu

1. Izolace poly(A)+mRNA z dospělých hlístů

Dospělí hlísti *H. contortus*, byli získáni z abomasum experimentálně infikovaných ovcí, materiál byl promyt fyziologickým roztokem chloridu sodného a velmi rychle zmrazen v kapalném dusíku. Zmrazení paraziti byli rozdrceni na jemný prášek při použití moždíře a tlouku, předem zchlazeného na -70°C a pak byl materiál rozpuštěn v 5 ml extrakčního pufru s obsahem 4 M fuanidinisoithiokyanátu, 25 mM citrátu sodného, 0,5 g/100 ml sarkosylu a 0,7 % objemových 2-merkapt ethanolu v destilované vodě. Po přidání 5 ml směsi fenolu a chloroformu byl roztok energicky míchán 5 minut a pak ještě 10 minut inkubován v ledu. Vodná a organická fáze byly od sebe odděleny odstředěním při 10 000 g a při teplotě 4°C po dobu 30 minut, vodná fáze byla oddělena a RNA byla vysrážena přidáním stejného objemu isopropanolu a chlazením na jednu hodinu na teplotu -20°C . RNA pak byla odstředěna, znovu rozpuštěna v pufru pro extrakci a pak znovu odstředěna svrchu uvedeným způsobem. Usazenina byla promyta 70% ethanolem, vysušena a rozpuštěna v 0,5 ml sterilní destilované vody.

Poly(A)+mRNA byla izolována chromatografií na oligo-dT-celulose způsobem podle publikace Efstratiadis a další, 1976, Cell, 7, 279 - 288. Materiál po chromatografii byl pak vysrážen ethanolem vysušen a znovu rozpuštěn v 10 až 20 mikrolitrech sterilní destilované vody.

2. Syntéza cDNA a příprava banky lambdagt11

Z 1 mikrogramu poly(A)+mRNA byla připravena cDNA s dvojitým řetězcem při použití příslušného balíčku (Amersham) podle návodu výrobce. Syntéza prvního řetězce byla uskutečněna při použití reverzní transkriptázy AMV a při použití náhodně zvolených hexanukleotidových primerů. Syntéza druhého řetězce byla uskutečněna při použití RNázy H a DNA polymerázy 1 z E. coli. Nakonec byla k vyplnění konců cDNA užita T4 DNA polymeráza. Pak byla cDNA navázána do bakteriofágu lambdagt11 při použití příslušného balíčku RPN 1280 (Amersham). Postup byl uskutečněn tak, že na směs cDNA byly navázány adaptorové řetězce pro EcoRI, nenavázané molekuly adaptoru byly ze směsi odstraněny filtrací na gelu a cDNA s řetězcem delším než 500 bp byla oddělena pro vazbu v lambdagt11. "Upravená" zakončení cDNA byla fosforylována reakcí s T4 polynukleotidkinázou a různá množství 100, 75 nebo 40 ng tohoto materiálu bylo navázáno do 1 mikrogramu lambdagt11. Vazné směsi byly inkubovány in vitro (Boehringer) a podíly byly naneseny na E. coli Y1090 v přítomnosti isopropylthiogalaktopyranosidu IPTG a 5-brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosidu X-gal ke stanovení rekombinačního titru. Při každé vazné reakci bylo získáno přibližně 2×10^5 rekombinantních fágů. Fágy, u nichž docházelo k expresi složek H-gal-GP, bylo možno oddělit sledováním imunitních reakcí při použití 10^5 rekombinantních fágů a ovčímho antiséra proti H-gal-GP, jak bude dále popsáno.

3. Imunologické zkoušky

Banka cDNA lambdagt11 byla nanesena na vrstvu buněk *E. coli* Y1090 v Petriho miskách s průměrem 90 mm při hustotě 1000 fágů na jednu plotnu s L-agarem a ampicilinem. Plotny byly inkubovány při teplotě 42 °C tak dlouho, až bylo možno pozorovat plaky, přibližně 4 hodiny, a pak byly překryty nitrocelulosovými filtry, předem nasycenými 10 mM IPTG a pak usušeny na vzduchu. Plotny s filtry byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C. Následujícího dne byly filtry odstraněny a důkladně promyty TBST (50 mM tris ve volné formě, 150 mM NaCl o pH 8,0 s obsahem 0,05 % objemových Tween-20) a pak byly blokovány inkubací 1 hodinu v 5% koňském séru v TBST. Pak byly filtry inkubovány s ovčím antisérem proti H-gal-GP, zředěným v poměru 1 : 500 v TBST s obsahem 5 % koňského séra, inkubace trvala 4 hodiny. Po dalším důkladném promytí TBST byly filtry inkubovány s koňským antisérem proti imunoglobulinu ovce, konjugovanými s peroxidázou (1:200 v TBST) celkem 2 hodiny a po promytí byl imunopositivní fág vizualizován inkubací s vyvíjecím roztokem DAB (10 mg diaminobenzidínhydrochloridu v 50 ml vody s obsahem 50 mikrolitrů 30% peroxidu vodíku (Sigma)). Imunopositivní plaky byly izolovány a znovu naneseny na plotnu, aby bylo možno získat čisté plaky postupnými opakovanými cykly, při nichž se provádí imunologická zkouška a vybrané fágy se znovu pěstují. Tímto způsobem bylo z množství 10^5 fágů získáno sedm pozitivních fágů, které byly dále analyzovány vymýváním protilátek.

4. Eluce protilátek

Rekombinantní fágy byly nanesena na plotny na *E. coli* Y1090 při hustotě 10^3 na plotnu s průměrem 90 mm a pak byly inkubovány 4 hodiny při teplotě 42 °C. Pak byly plotny překryty

nitrocelulosovými filtry, nasycenými IPTG a inkubovány přes noc při teplotě 37 °C. Pak byly filtry důkladně promyty TBST a pak inkubovány 4 hodiny s ovčím sérem proti H-gal-GP. Vázaná protilátka byla vymývána dvojím průchodem slučného pufru s obsahem 5 mM glycinu, 500 mM NaCl a 0,2 % Tween 20, pH 2,3, každý průchod trval 2 minuty. Získané 4 ml roztoku protilátky byly neutralizovány přidáním 200 mikrolitrů 1 M Tris-HCl o pH 7,4, pak byl roztok třikrát zředěn 5% koňským sérem v TBS (TBST bez Tween 20) a pak byla přes noc provedena inkubace s proužky pro Western blot H-gal-GP, oddělenými 7,5% SDA-PAGE. Následující promývání, inkubace s druhou protilátkou a vizualizace při použití roztoku DAB, byly provedeny svrchu uvedeným způsobem.

5. Amplifikace uložené cDNA v imunopositivním fágu pomocí PCR a Southern blot

Příslušná cDNA pro uložení byla získána v preparativních množstvích amplifikací pomocí PCR při použití primerů pro oblasti, sousedící s místem pro klonování EcoRI v lambda-gt11 podle Saiki a další, 1988, Science, 239, 487 - 491. Postup byl prováděn tak, že částice fágů byly promyty z izolovaných plaků do 50 mikrolitrů sterilní destilované vody v Eppendorfově zkumavce s objemem 0,5 ml. Po krátkém cyklu zmrazení a rozmrazení bylo 25 mikrolitrů supernatantu použito pro PCR-reakci podle svrchu uvedené publikace. Primery byly navázány při teplotě 55 °C. Produkty PCR byly frakcionovány na 0,8% agarosovém gelu nebo na 7,5% polyakrylamidovém gelu ve formě bloků a produkty byly vizualizovány barvením pomocí ethidiumbromidu na agarose nebo pomocí stříbra v případě polyakrylamidu.

Mimoto byly produkty amplifikace uložené cDNA pomocí PCR-reakce frakcionovány na agarosovém gelu a pak byl proveden

Southern blot na nylonové membráně (Hybond-N, Amersham) kapilárním přenosem podle publikace Maniatis a další, 1982, Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory. 100 ng DNA jako sonda pro blot bylo získáno PCR-amplifikací fágu HG3 svrchu uvedeným způsobem při značení digoxigeninem podle návodu výrobce při použití balíčků pro značení a detekci nukleových kyselin (Boehringer). Hybridizace byla prováděna za vysoce omezujících podmínek (5 x SSC, 0,5 g blokujícího činidla/100 ml, 0,1 g N-laurylsarkosinu/100 ml a 0,02 g SDS/100 ml v 50% formamidu) přes noci při teplotě 42 °C. DNA, použitá jako sonda, byla přidána v konečné koncentraci 25 ng/ml do hybridizačního roztoku. Po promytí za vysoce omezujících podmínek (konečné promytí 0,1 x SSC, 0,1% SDS po 15 minut při teplotě 65 °C), byla hybridizace vizualizována imunologickou detekcí při použití antidigoxigeninu, konjugovaného s alkalickou fosfatázou pomocí enzymaticky katalyzované barevné reakce (Boehringer).

6. Analýza řetězce

Řetězce uložené na cDNA po PCR-amplifikaci byly subklonovány ve vektoru PCR 1000 (In-Vitrogen) podle návodu výrobce. Řetězec DNA byl stanoven dideoxy reakcí na konci řetězce podle publikace Sanger a další, 1977, Proceedings of National Academy of Science 79, 5463 - 5467. Reakce ke stanovení řetězce byly provedeny při použití balíčků T7 pro analýzu řetězce (Pharmacia) a navázání primeru i ostatní reakce byly uskutečněny přesně podle návodu výrobce. Reakční produkty byly frakcionovány na 6% polyakrylovém gelu ve formě bloků s 50% močovinou, jako pufr pro vyvíjení byla užita směs tris, acetátu a EDTA a elektroforéza byla prováděna až 6 hodin při stálé hodnotě 50 W. Po elektroforéze byly bloky uloženy do směsi kyseliny octové, methanolu a vody v poměru

5 : 5 : 90 na 40 minut, pak byly usušeny na filtračním papíru Whatmna 31 a rozdělené fragmenty DNA pak byly identifikovány autoradiografií přes noc při teplotě místnosti. DNA a odvozený řetězec aminokyselin byly srovnávány s existujícími řetězci v databázích GENBANK a EMBL.

Výsledky

1. Neutrální endopeptidáza v H-gal-GP - biochemická detekce

Účinnost typu neutrální endopeptidázy byla v případě H-gal-GP prokazována citlivostí na inhibitory proteinázy při použití azokaseinu jako substrátu. Výsledky typické analýzy jsou uvedeny v tabulce 9.

T a b u l k a 9

Citlivost proteolýzy azokaseinu působením H-gal-GP při pH 7 na řadu inhibitorů proteinázy

inhibitor	zbývající účinnost %	
0 inhibitor (kontrola)	100	100
dithiothreitol	48	44
cystein	0	0
glutathion	87	85
4-hydroxybenzoát měďnatý	88	91
N-ethylmaleimid	74	77
EDTA	25	10
1,10-fenanthrolin	26	23
pepstatin	75	85

V tabulce 9 je inhibice vyjádřena v procentech účinnosti ve srovnání s kontrolami, při nichž nebyl užit žádný inhibitor. Uvedené výsledky ze dvou oddělených analýz byly provedeny na téže šarži H-gal-GP.

Enzymatická účinnost byla inhibována chelatačními činidly EDTA a 1,10-fenanthrolinem a také thiolovými reakčními činidly dithiothreitem a cysteinem. Účinnost byla jen málo ovlivněna působením 4-hydroxybenzoátu měďnatého, ethylmaleimidu, pepstatinu a glutathionu. Tento profil inhibice je v souladu s poznatky, dříve uvedenými pro neutrální endopeptidázy ssavců podle souhrnné publikace Kenny, 1977, *Proteinases in mammalian cells and tissues*, Ed: Barrett A.J., Elsevier.

2. Molekulová analýza H-gal-GP-positivních rekombinant fágu lambdagt11

Při imunologických zkouškách bylo z 10^5 rekombinantních labdagt11 získáno 7-imunopositivních fágů. Pokusy s elucí protilátek prokázaly, že jediná protilátka, kterou bylo možno vymýt z rekombinantního fágu a která byla označena HG3 zřetelně rozpoznávala H-gal-GP na proužcích Western blot, připravených z redukujících gelů SDS-PAGE. Protilátka, získaná z nerekombinantního lambdagt11 nerozpoznává složky H-gal-GP, což prokazuje specifčnost reakce s protilátkou HG3. Amplifikovaná uložená DNA z HG3, byla užita jako sonda pro Southern blot uložené DNA, amplifikované z ostatních imunopositivních plaků, přičemž při použití rekombinantní HG11 byl získán pozitivní hybridizační signál. Velikost cDNA pro HG3 a HG11 byla 212 bp a 1019 bp.

Byl stanoven úplný nukleotidový řetězec (obr. 33) a úplný řetězec aminokyselin (obr. 34) pro HG3. HG3 má 33%

totožnost a 65% podobnost s lidskou neutrální endopeptidázou, jde tedy o velmi významnou homologii. Analýza řetězce HG11 ještě pokračuje, avšak oblast, odpovídající HG3 již byla identifikována a prokazuje 96% totožnost na úrovni nukleotidů. Je tedy pravděpodobné, že HG11 je variantou HG3. Takové variace mohou vznikat v důsledku přítomnosti přírodních biologických variant mezi různými kmeny v různých životních stádiích životního cyklu hlístů. Mimoto mohou existovat vícečetné enzymatické formy (isoenzymy), k jejichž expresi může docházet odlišným způsobem v průběhu vývoje parazita nebo u kmenů odlišného původu.

Příklad 11

Průkaz existence kódových genů pro neutrální endopeptidázy u různých metazoických parazitů: hybridizace klonu HG11 na DNA genomu z metazoických parazitů, rozštěpenou EcoRI

Aby bylo možno připravit DNA z různých metazoických parazitů (*Haemonchus*, *Licilia*, *Nematodirus*, a *Boophilus*), byly vždy 2 g těchto živočichů velmi rychle zmrazeny v kapalném dusíku a pak byl materiál umlet v kapalném dusíku na jemný prášek. Tento prášek byl pomalu přidán ke 25 ml pufru (0,05 M tris-Hcl o pH 8,0, 0,1 M EDTA, 1 g Sarkosylu/100 ml, 0,05 mg/ml proteinázy K) a směs byla inkubována 2 hodiny při teplotě 65 °C. Pak byla suspenze dvakrát extrahována jedním objemem fenolu s chloroformem, pak ještě dvakrát dvěma objemy chloroformu a pak byl materiál vysrážen ethanolem. Sraženina byla uvedena do suspenze ve 20 ml pufru s obsahem Tris a EDTA (TE, pH 8,0) přes noc při teplotě 4 °C za protřepávání a pak byl materiál dialyzován dvakrát proti jednomu litru pufru TE. RNA byla odstraněna inkubací s RNázou A typ I, prostou DNázou (Sigma) v konečné koncentraci 20 mikrogramů/ml po dobu 1 hodina při teplotě 37 °C, pak byl materiál jednou

extrahován směsí fenolu a chloroformu, pak ještě jednou chloroformem a pak byl materiál vysrážen ethanolem stejným způsobem jako svrchu. Sraženina byla dvakrát promyta ethanolem s koncentrací 70 % objemových a pak byla znovu uvedena do suspenze v 1 ml pufru TE jako svrchu.

5 mikrogramů DNA genomu bylo rozštěpeno přes noc enzymem EcoRI při teplotě 37 °C a pak byla provedena elektroforéza, bylo užito vždy 5 mikrogramů materiálu v jedné dráze na gelu s obsahem 1 g agarosy na 100 ml v tris-acetátovém pufru. Pak byl gel použit pro zkoušku Southern blot kapilárním přenosem tak, jak je uvedeno v publikaci Maniatis a další, 1982, svrchu, při použití membrány Hybond-N (Amersham International). DNA byla fixována na membránu při použití ultrafialového světla podle doporučení výrobce.

Klon HG11 byl rozštěpen pomocí enzymů SacI a BamHI, materiál byl podroben elektroforéze a byl izolován fragment o velikosti 750 bp. Uložená část byla radioaktivně označena při použití ³²P-dCTP při použití zkušebního balíčku Nick Translation kit (Promega Biotech) podle návodu výrobce. Značená DNA byla oddělena od nevázaného označení chromatografií na sloupci.

Southern blot byl předem hybridizován v hybridizačním roztoku (6x SSC, 50% formamid, 5x Denhardtův roztok, 0,1 % SDS) celkem 3 hodiny při teplotě 28 °C a pak byl hybridizován při mírně vymezených podmínkách v přítomnosti radioaktivně značené sondy přes noc při teplotě 28 °C. Pak byl blot promýván 10 minut při teplotě místnosti, načež byl znovu 1 hodinu promýván při teplotě 42 °C, obojí promývání bylo provedeno při použití 2x SSC s 0,1 % SDS. Po autoradiografii byl blot inkubován celkem 30 minut při teplotě 42 °C v 0,4 N hydroxidu sodném, aby došlo k odstranění sondy. Odstranění

sondy pak bylo potvrzeno uložení výsledného vzorku přes noc do autoradiografického zařízení.

Pak byl blot znovu hybridizován za mírně řízených podmínek při použití téže sondy. Předběžná hybridizace a hybridizace byly prováděny svrchu uvedeným způsobem až na to, že postup byl prováděn při teplotě 24 °C. Vzorky byly promývány rovněž stejně jako svrchu, s tím rozdílem, že druhé promývání trvalo 30 minut při teplotě 24 °C.

Při provádění zkoušky Southern blot s použitím sondy HG11 je možno prokázat, že nejen dochází k vazbě na DNA z *Haemonchus*, nýbrž dochází k vazbě i na DNA jiných metazoických parazitů ze skupiny *Haemonchus*, *Lucilia*, *Nematodirus* a *Boophilus*, jak je zřejmé z drah 1 až 4 na obr. 35. Tuto skutečnost bylo možno potvrdit hybridizací za málo vymezených i za mírně řízených podmínek.

Zastupuje:

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Ochranný antigen metazoických parazitů nebo antigenní fragmenty, složky nebo prekursory tohoto antigenu a jeho funkčně ekvivalentní deriváty, analogy nebo varianty s ochranným antigenním účinkem proti jednomu nebo většímu počtu metazoických parazitů, antigen je schopný se vázat na pepstatin a v nativní formě jde o integrální bílkovinu nebo bílkovinný komplex membrány.

2. Antigen, antigenní fragment, složka, prekursor, funkčně ekvivalentní derivát, analog nebo varianta podle nároku 1, která

- a) má proteolytickou účinnost,
- b) v nativní formě je uložen v hraniční oblasti řasinkových buněk střeva parazita a
- c) je schopen se vázat na lektin z pšeničného klíčku a na lektiny se specifícností pro beta-vázaný N-acetylgalaktosamin.

3. Antigen, antigenní fragment, složka, prekursor, funkčně ekvivalentní derivát, analog nebo varianta podle nároku 1, v nativní formě schopný se vázat na lektiny Con A, lektin z hrášku, lotusu, Helix pomatia, arašídů a jacalínu.

4. Antigen, antigenní fragment, složka, prekursor, funkčně ekvivalentní derivát, analog nebo varianta podle některého z nároků 1 až 3 s účinností, podobnou aspartylproteínáza a/nebo neutrální endopeptidáze.

5. Antigen, antigenní fragment, složka, prekursor, funkčně ekvivalentní derivát, analog nebo varianta podle

některého z nároků 1 až 4, získatelný z hlístů rodu *Haemonchus*, *Ostertagia* a *Trichostrongylus*.

6. Antigen, antigenní fragment, složka, prekursor, funkčně ekvivalentní derivát, analog nebo varianta podle některého z nároků 1 až 5 s distribucí molekulové hmotnosti na SDS-PAGE podle tabulky 1.

7. Antigen, antigenní fragment, složka, prekursor, funkčně ekvivalentní derivát, analog nebo varianta podle některého z nároků 1 až 6, získatelný ze střeva čeledi *Haemonchus*, s molekulovou hmotností přibližně 190 000 až 205 000 při stanovení elektroforézou na SDS-PAGE na 5% gelu za neredukujících podmínek nebo s molekulovou hmotností 35 000 nebo 45 000 až 50 000 při stanovení elektroforézou na SDS-PAGE na 10% gelu za neredukujících podmínek.

8. Antigen, antigenní fragment, složka, prekursor, funkčně ekvivalentní derivát, analog nebo varianta podle některého z nároků 1 až 7 pro použití při stimulaci imunologické odpovědi proti metazoickým parazitům u člověka nebo jiných živočichů.

9. Použití antigenu metazoických parazitů a jeho složek, fragmentů, prekursorů, funkčně ekvivalentních derivátů, analogů nebo variant podle některého z nároku 1 až 7 pro výrobu vakcíny pro stimulaci imunologické odpovědi proti metazoickým parazitům u člověka nebo jiných živočichů.

10. Vakcína pro stimulaci imunologické odpovědi proti metazoickým parazitům u lidí i u jiných živočichů, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že obsahuje alespoň jeden antigen nebo jeho složku, fragment, prekursor, funkčně ekvivalentní derivát, analog nebo variantu podle některého z nároků 1 až

7 spolu s nosičem nebo ředidlem, přijatelným z farmaceutického hlediska.

11. Vakcína podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje alespoň jeden antigen, uvedený v nároku 10 spolu s alespoň jedním antigenem ze skupiny H110D, H45 a jejich složek.

12. Způsob stimulace imunologické odpovědi proti metazoickým parazitům u člověka nebo u jiných živočichů, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se podává vakcína podle nároku 10 nebo 11.

13. Protilátka nebo její fragment, schopný se vázat na antigen, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dochází k selektivní vazbě této protilátky na antigen, antigenní fragment, složku, prekursor, funkčně ekvivalentní derivát, analog nebo variantu podle některého z nároků 1 až 7 nebo na idiotyp protilátky, schopné vázat antigen.

14. Způsob výroby vakcíny pro použití při imunizaci lidí nebo jiných živočichů proti infekci metazoickými parazity, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se připraví extrakt parazita s obsahem alespoň jednoho ochranného antigenu podle některého z nároků 1 až 7, tento antigen se z extraktu čistí vazbou na imobilizovanou fázi s obsahem specifické vazné látky pro antigen a pak se antigen z imobilizované fáze vymývá.

15. Způsob identifikace ochranných antigenů v metazoických parazitech, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se frakce parazita, tvořící integrální část membrány podrobí afinitní chromatografii při použití imobilizované

fáze s jedním nebo větším počtem navázaných lektinů se specifícností pro N-acetylgalaktosamin.

16. Způsob podle nároku 14 nebo 15, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že specifickou vaznou látkou nebo lektinem je lektin z arašídů nebo jacalinu.

17. Molekula nukleové kyseliny s obsahem kódového nukleotidového řetězce pro antigen, antigenní fragment, složku, prekursor, funkčně ekvivalentní derivát, analog, nebo variantu antigenu podle některého z nároků 1 až 7.

18. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 17, obsahující alespoň jeden nukleotidový řetězec, který odpovídá části řetězce nebo celému nukleotidovému řetězci, znázorněnému na obr. 33 nebo řetězci, který je degenerován nebo je v podstatě homologní nebo je schopen hybridizace s uvedeným řetězcem.

19. Vektor pro expresi nebo klonování, obsahující molekulu nukleové kyseliny podle některého z nároků 17 a 18.

20. Hostitelská buňka nebo transgenický organismus, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje molekulu nukleové kyseliny podle nároku 17 nebo 18.

21. Způsob výroby antigenu, antigenního fragmentu, složky, prekursoru, funkčně ekvivalentního derivátu, analogu nebo varianty podle některého z nároků 1 až 7, v y z n a - č u j í c í s e t í m , že se pěstuje hostitelská buňka s obsahem kódové molekuly nukleové kyseliny pro celý antigen nebo jeho část a po expresi se antigen izoluje.

22. Ochranný antigen metazoických parazitů nebo jeho antigenní fragmenty, složky, prekursory, funkčně ekvivalentní deriváty, analogy nebo varianty s ochranným antigenním účinkem proti alespoň jednomu metazoickému parazitu, antigen má účinnost, podobnou účinnosti aspartylproteinázy a/nebo neutrální endopeptidázy a v nativní formě tvoří bílkovinu nebo bílkovinný komplex, integrální pro membránu.

23. Ochranný antigen metazoických parazitů nebo jeho antigenní fragmenty, složky, prekursory, funkčně ekvivalentní deriváty, analogy nebo varianty s ochranným antigenním účinkem proti alespoň jednomu metazoickému parazitu, antigen je částí nebo tvoří část integrální bílkoviny nebo bílkovinného komplexu membrány ze střeva čeledi Haemonchus, má molekulovou hmotnost přibližně 190 000 až 205 000 při stanovení elektroforézou na SDS-PAGE na 5% gelu za neredukujících podmínek nebo molekulovou hmotnost 35 000 nebo 45 000 až 50 000 při stanovení elektroforézou na SDS-PAGE na 10% gelu za neredukujících podmínek.

Zastupuje:

1/24

FIG. 1

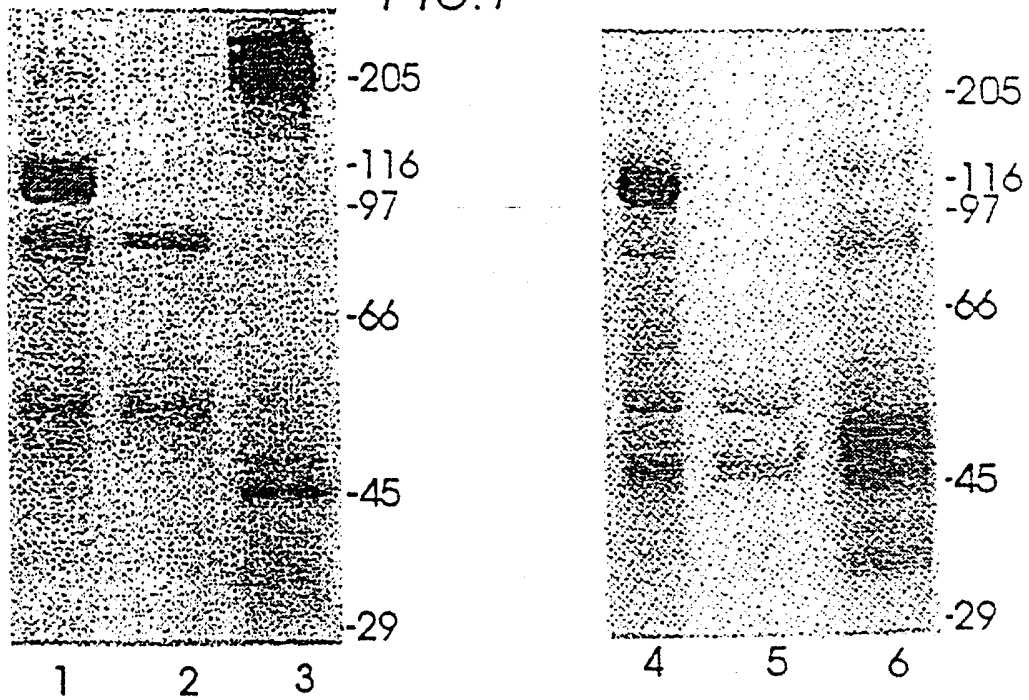
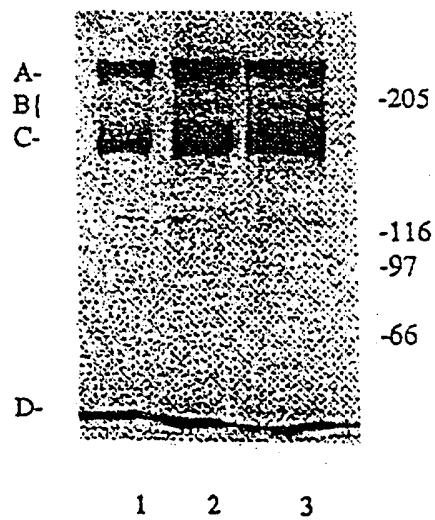


FIG. 2



2/24

FIG. 3

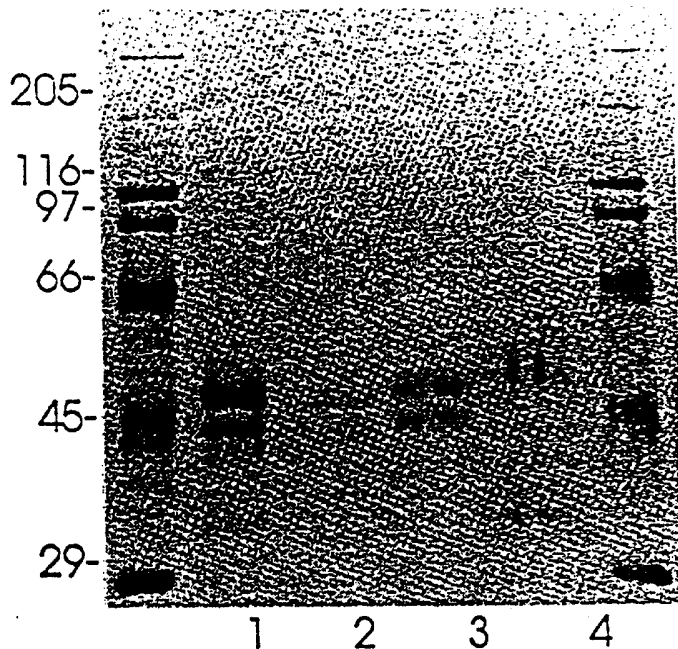
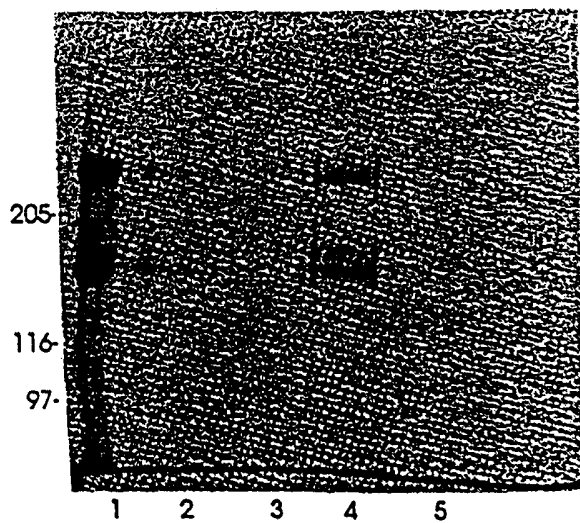
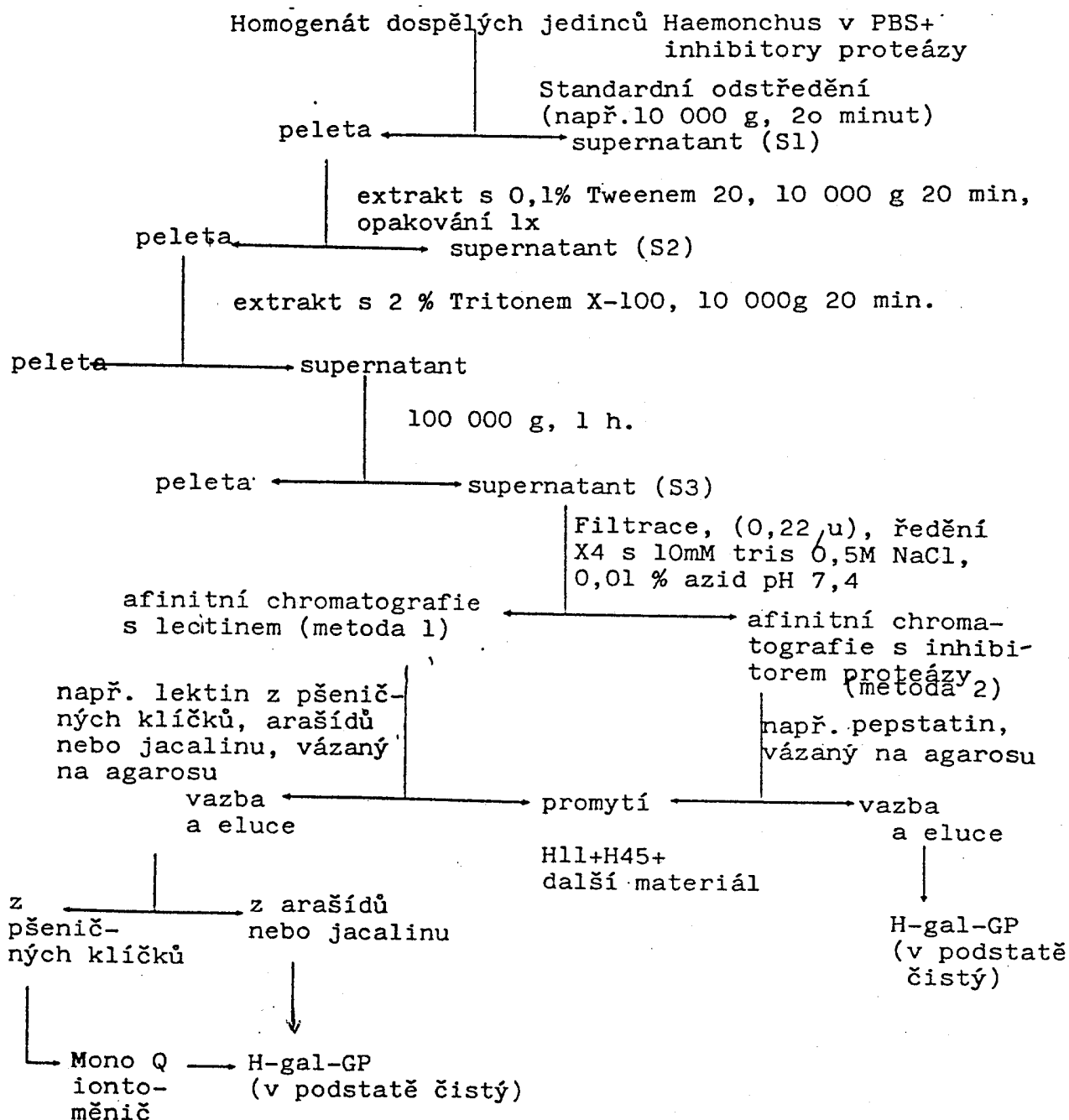


FIG. 6



3/24

FIG.4: Schematické znázornění dvou postupů pro přípravu komplexu H-gal-GP



4/24
FIG. 5a

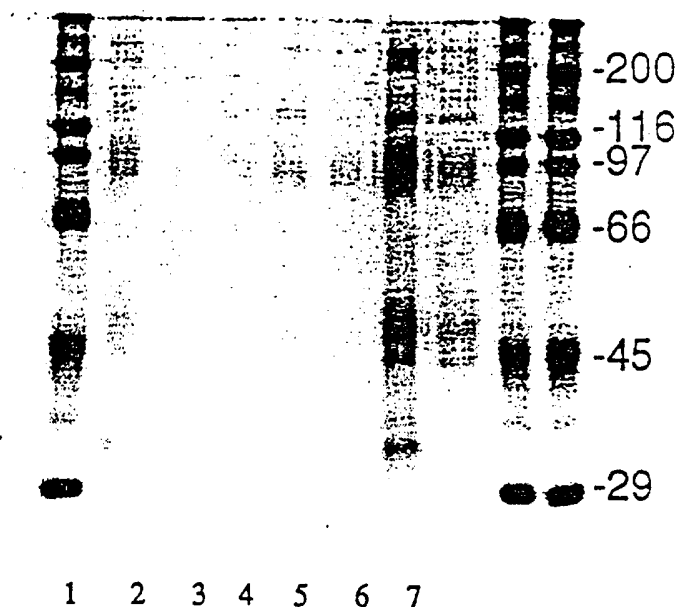
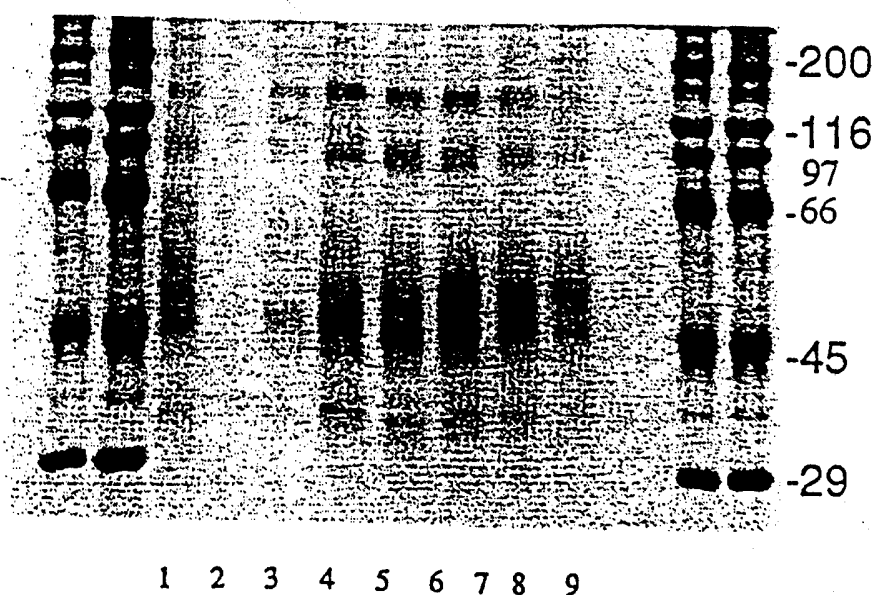


FIG. 5b



5/24

FIG. 7

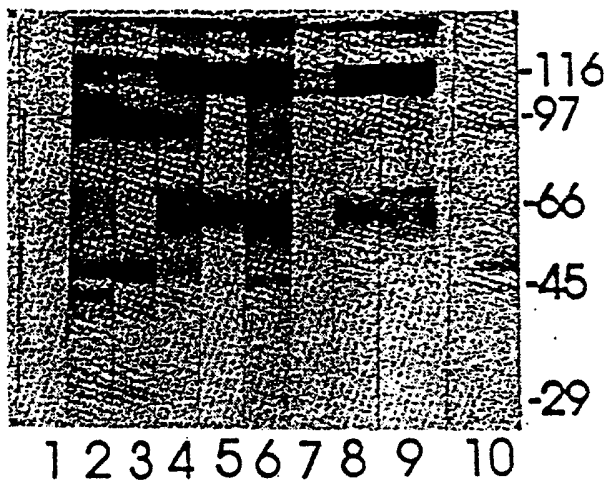
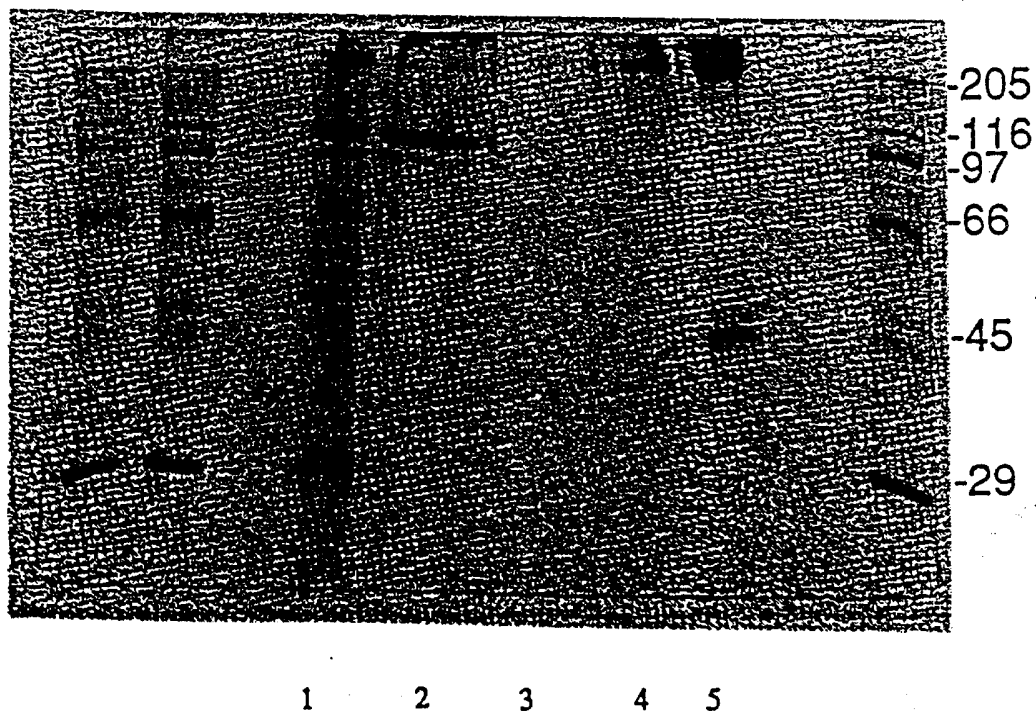
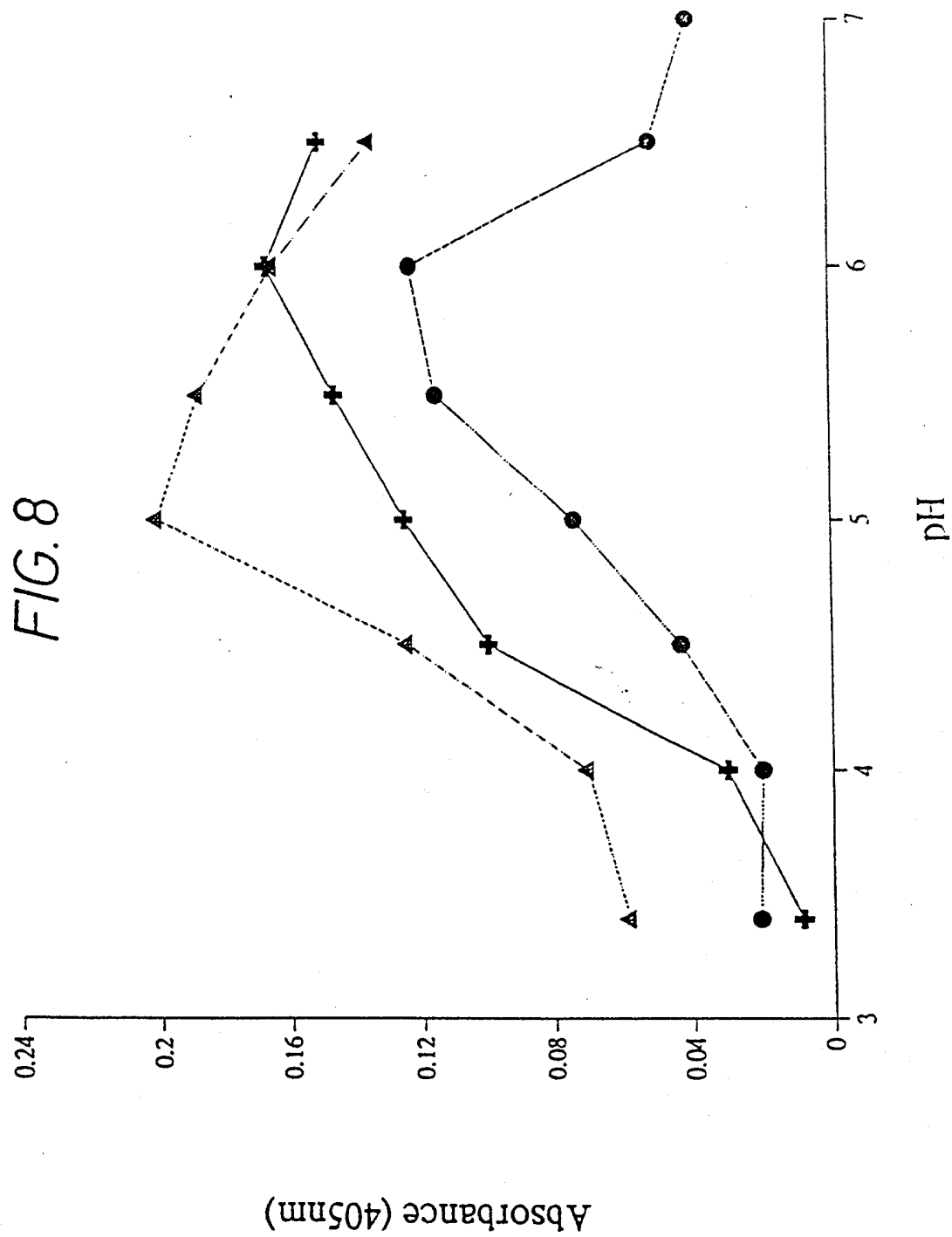


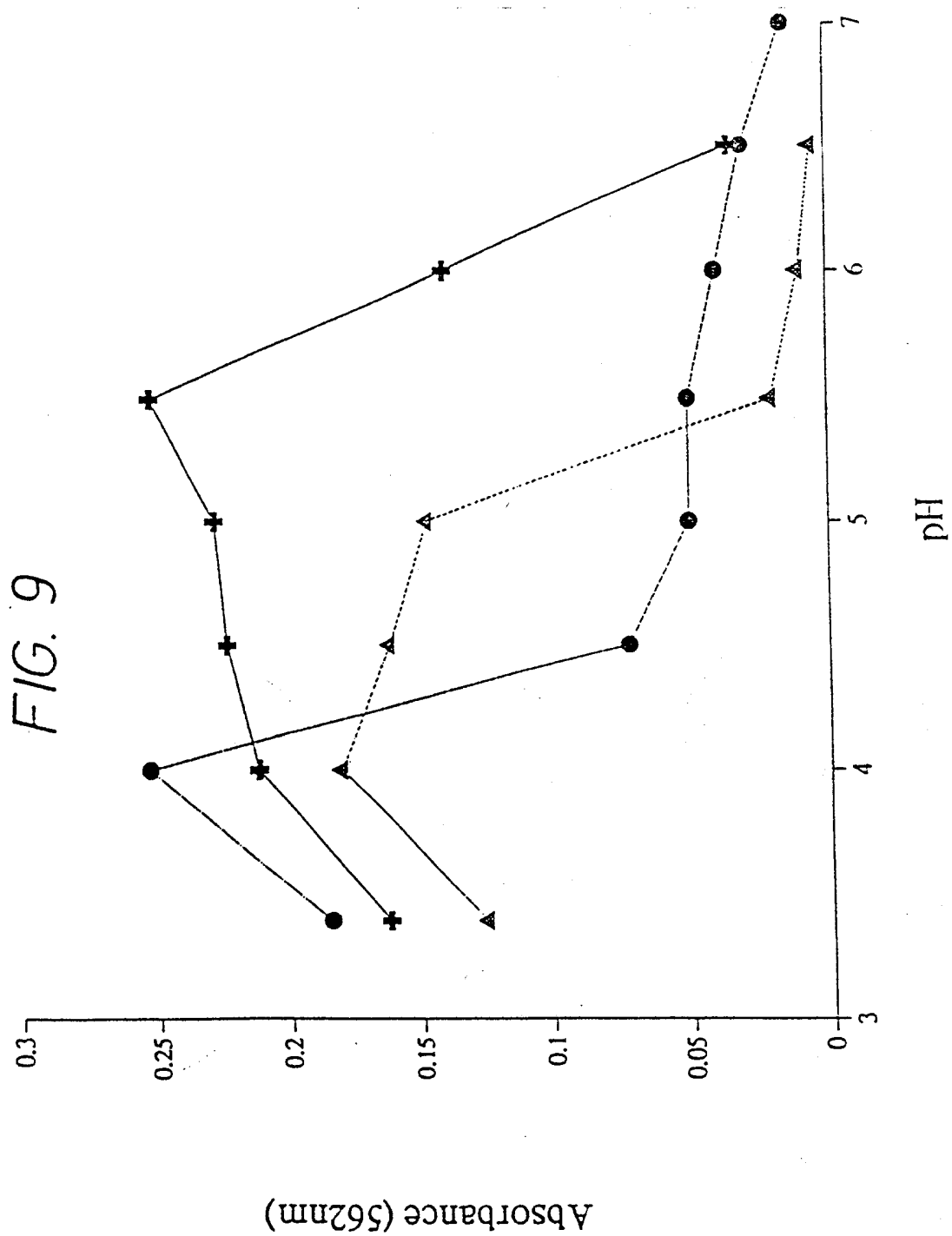
FIG. 12



6/24



7/24



8/24

FIG. 10

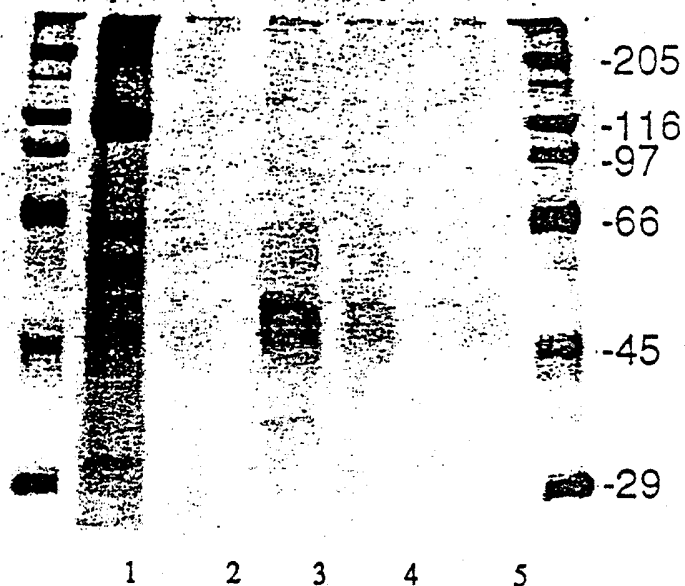
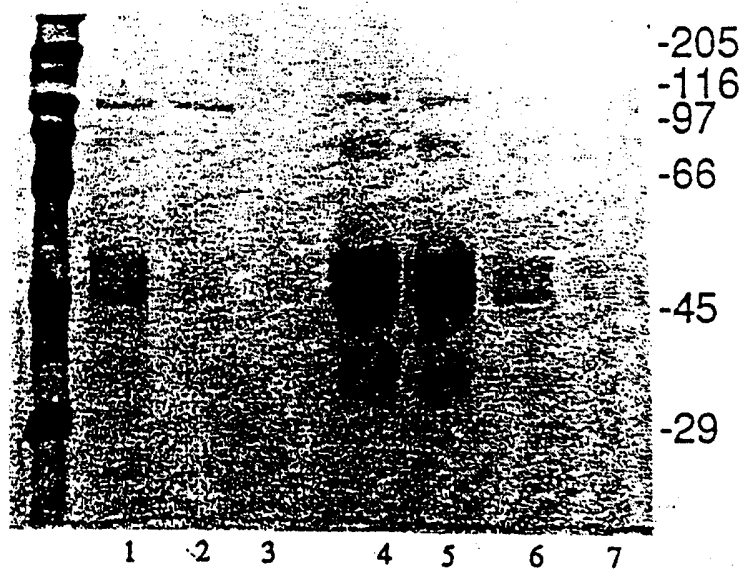


FIG. 11



9/24

FIG. 13

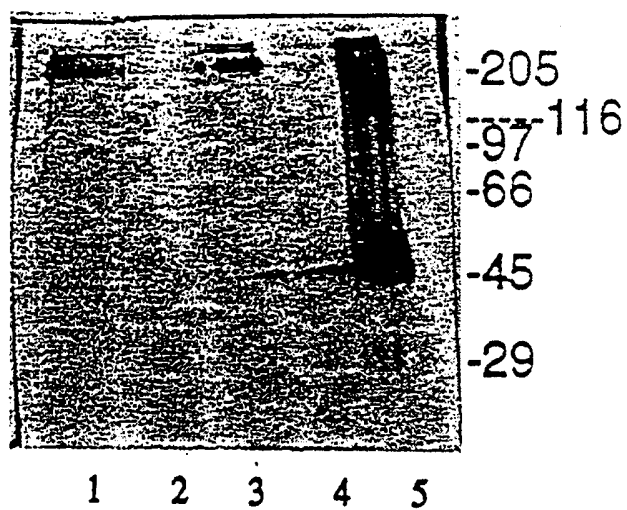
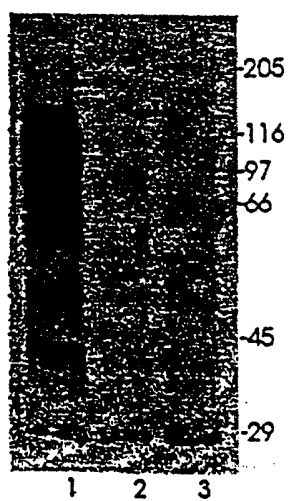


FIG. 18

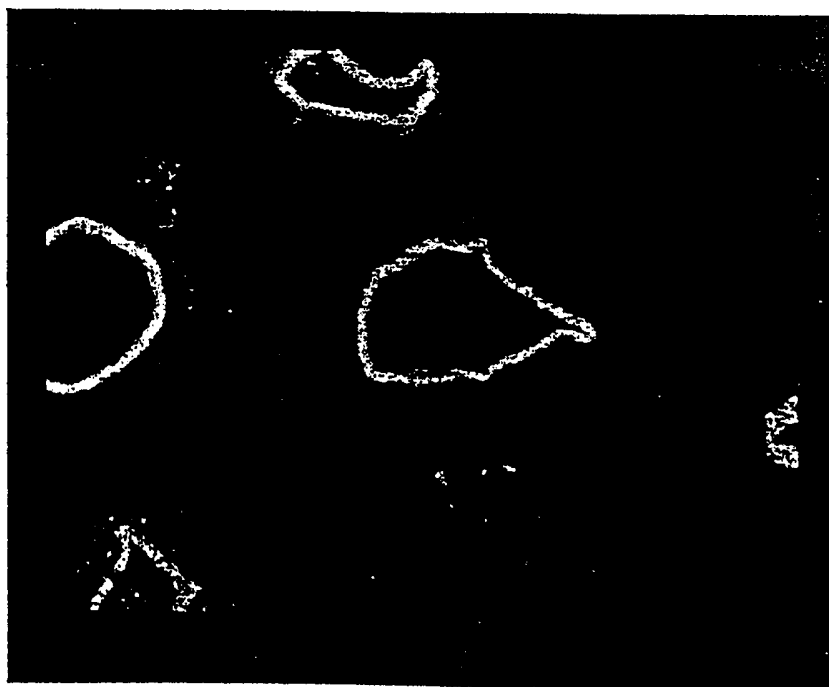


10/24

FIG.14.



FIG.15.



11/24

FIG.16.

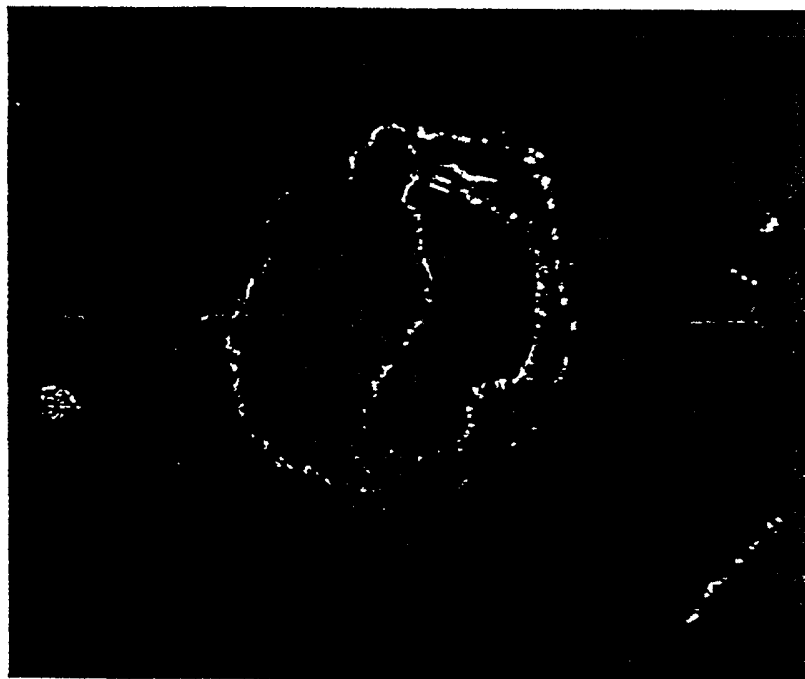
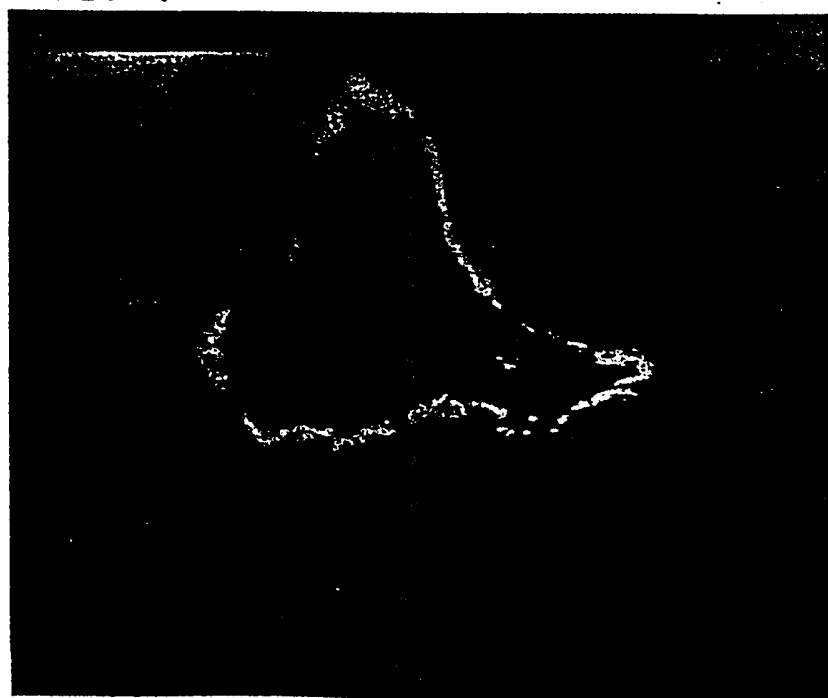


FIG.17.



12/24

FIG. 19

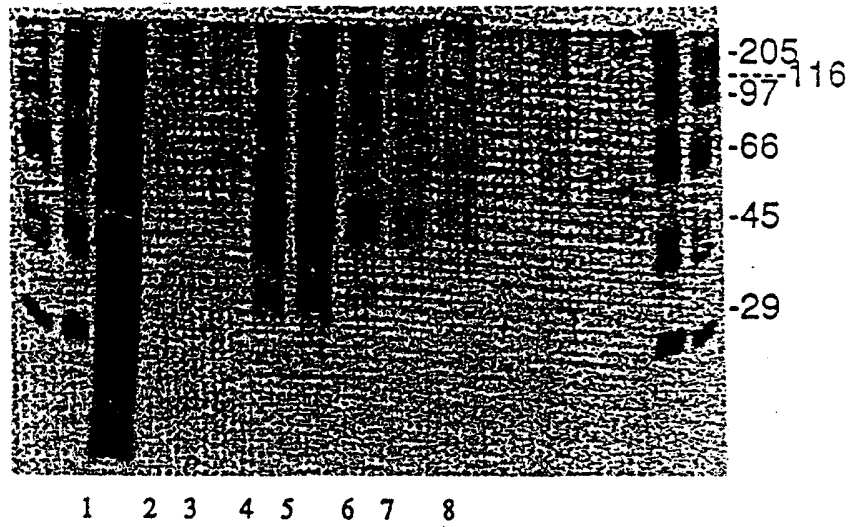
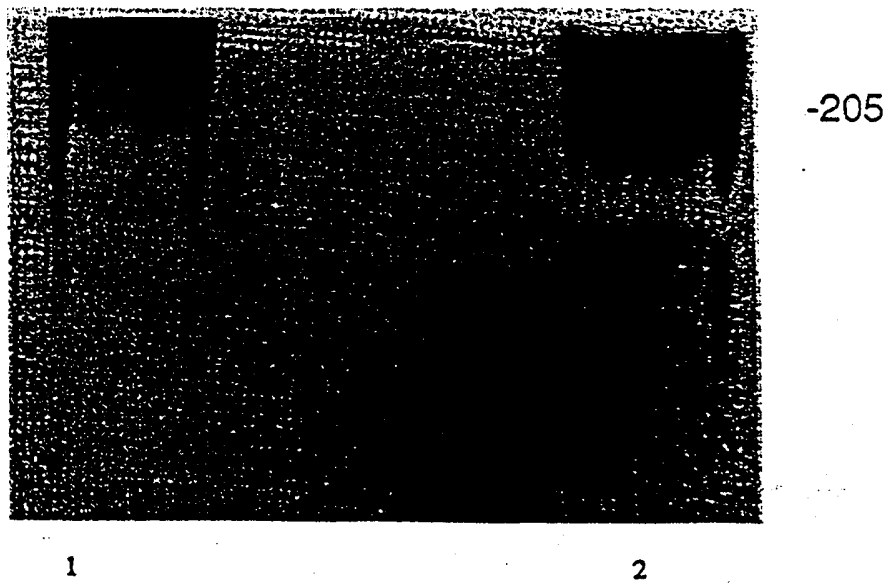


FIG. 21



13/24

FIG. 20

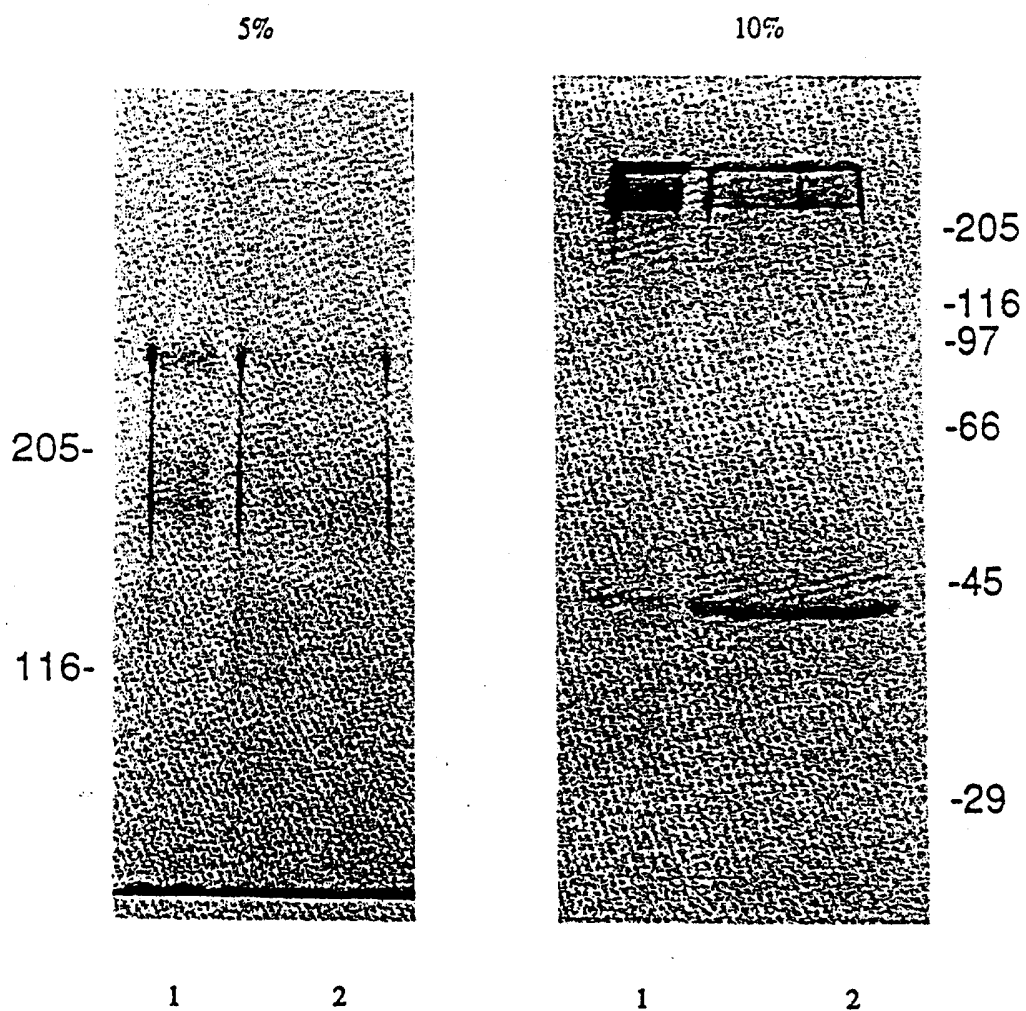
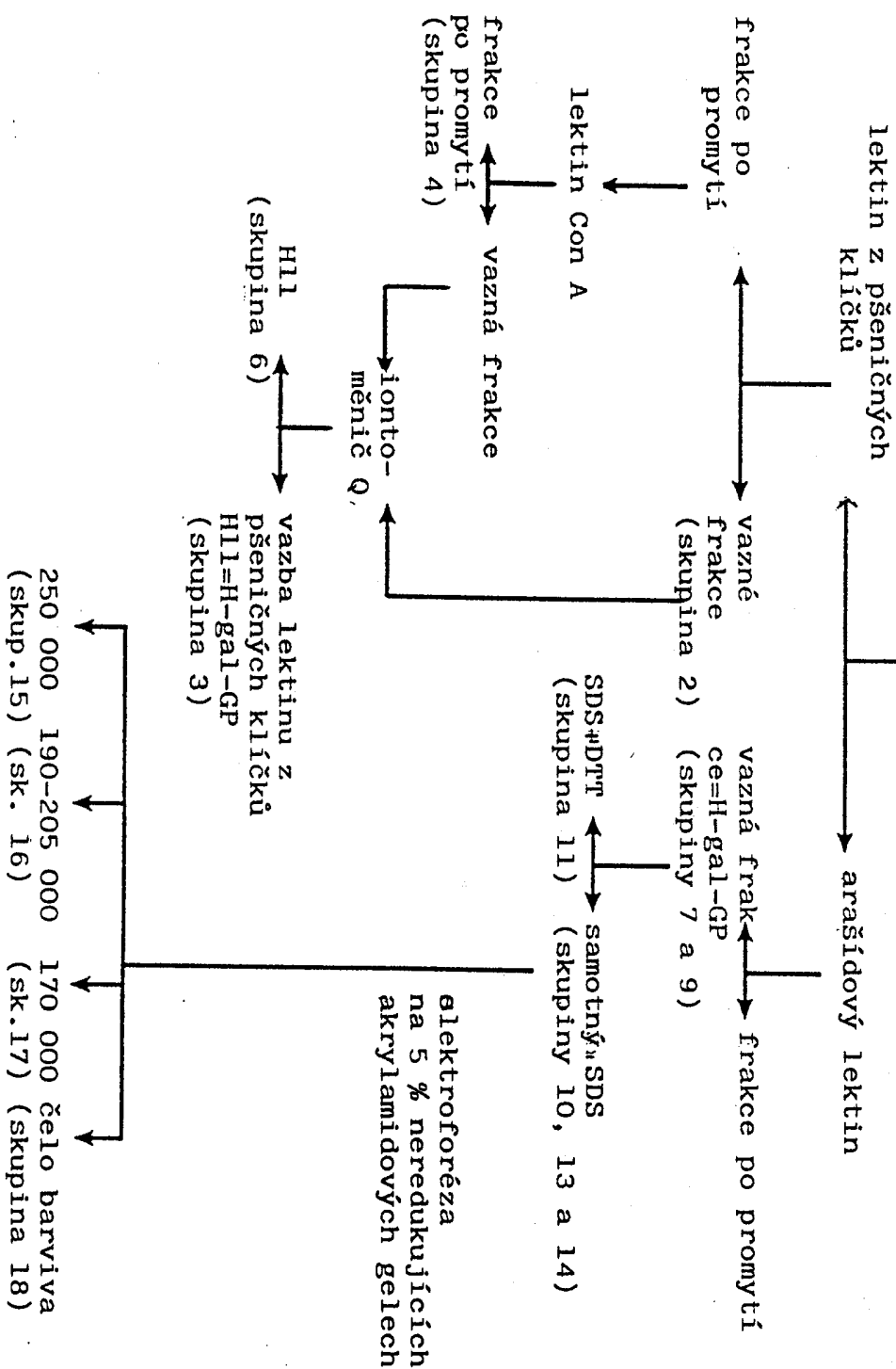


FIG.22

Fraciacione imunogenů užitých k vakcinaci ovčí

Tritonový extrakt membrán Haemonchus



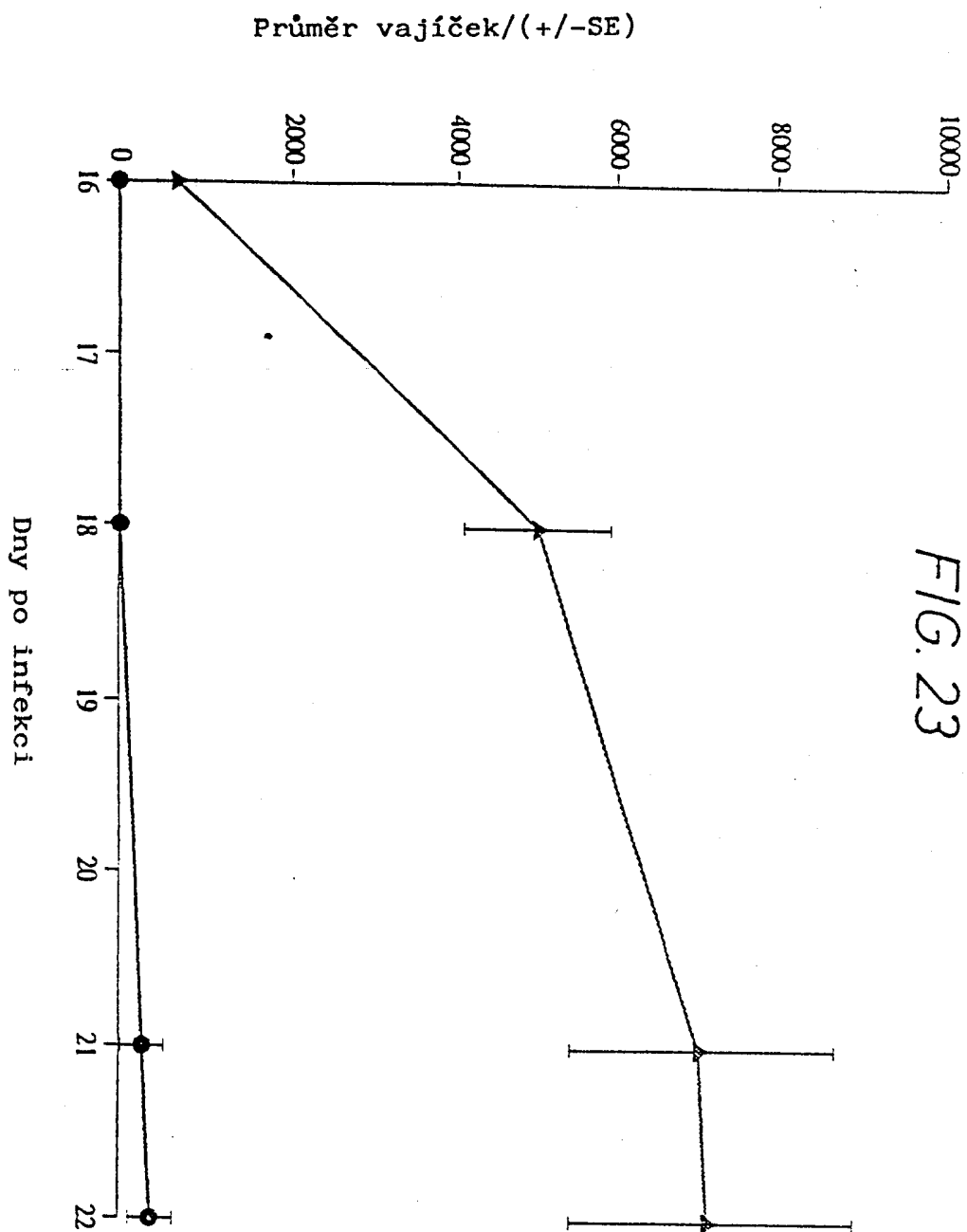
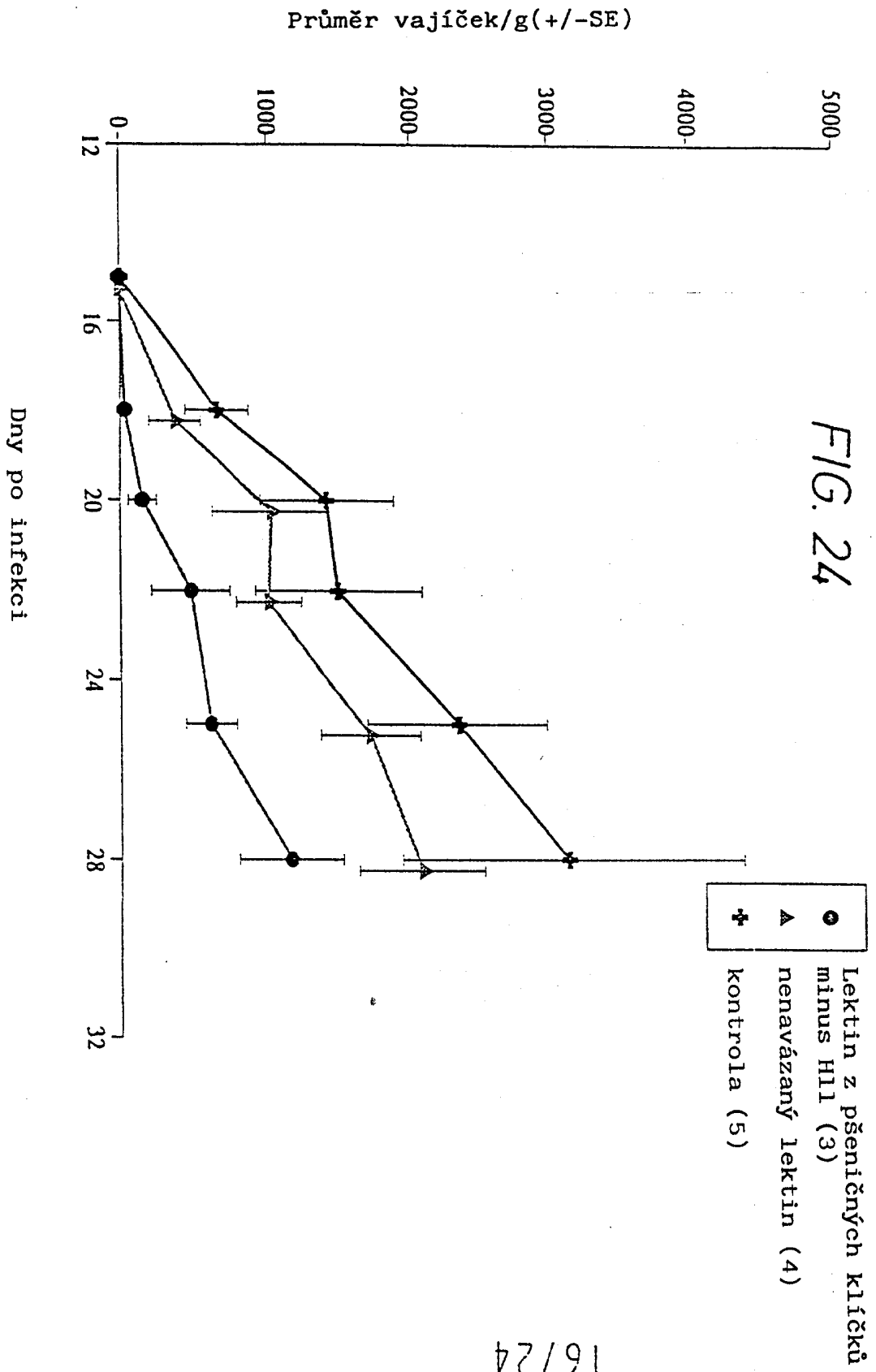
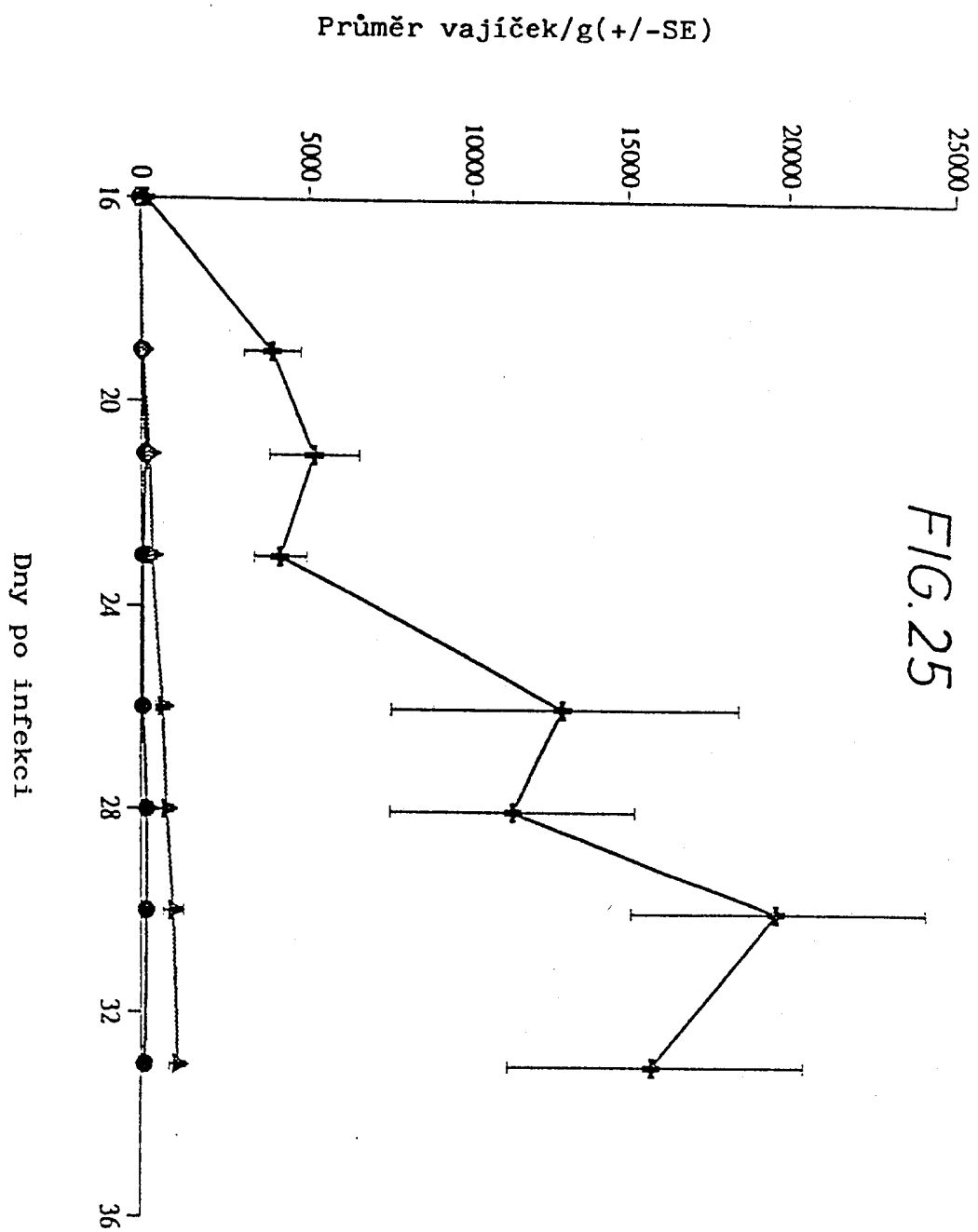


FIG. 23

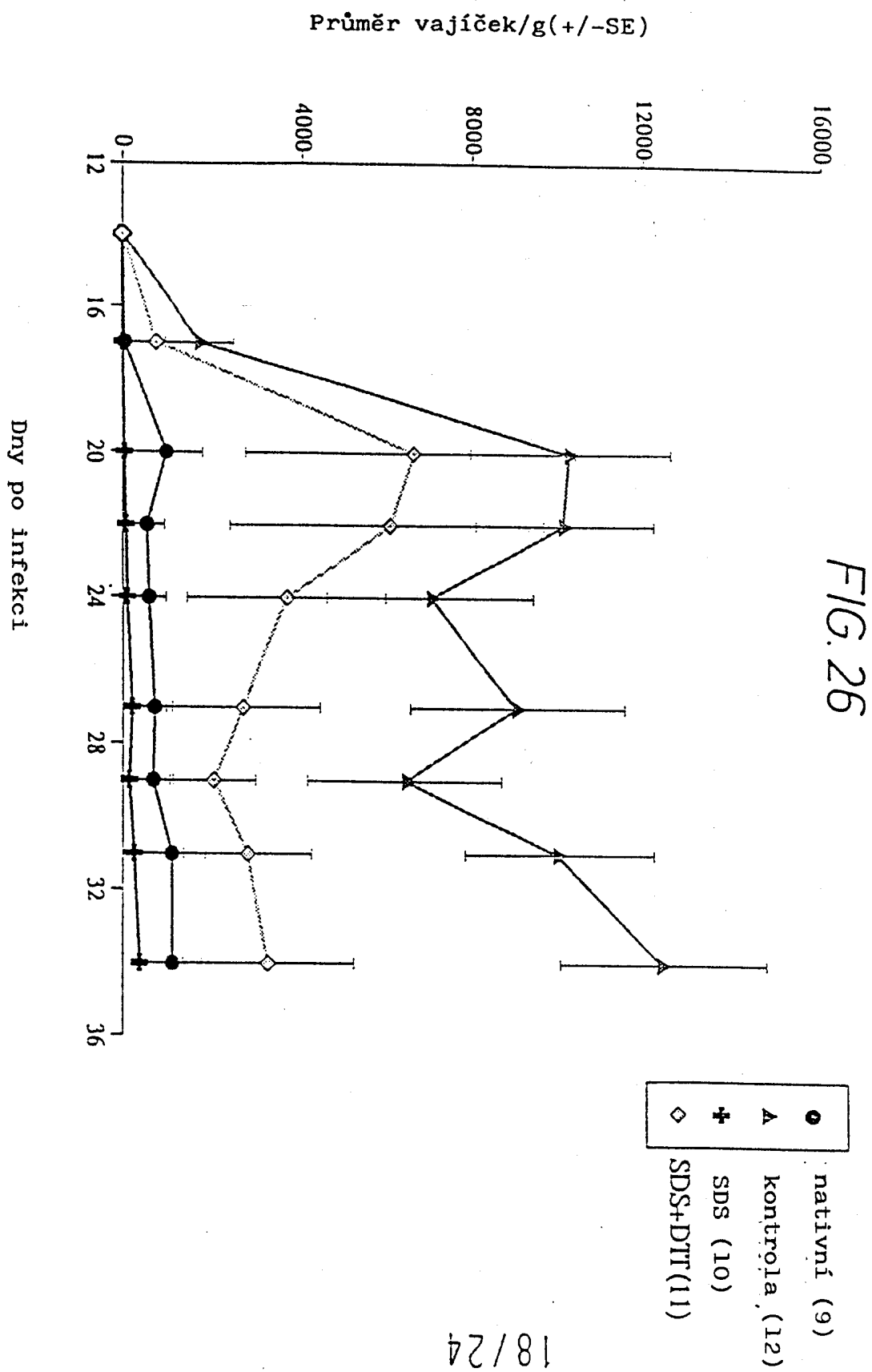
● pšeničné klíčky(1)
▲ kontrola(2)





● H11 (6)
▲ arašídý (7)
+ kontrola (8)

17/24



19/24



-205
-116
-97

1 2 3



-205
-116

1 2 3

FIG. 27

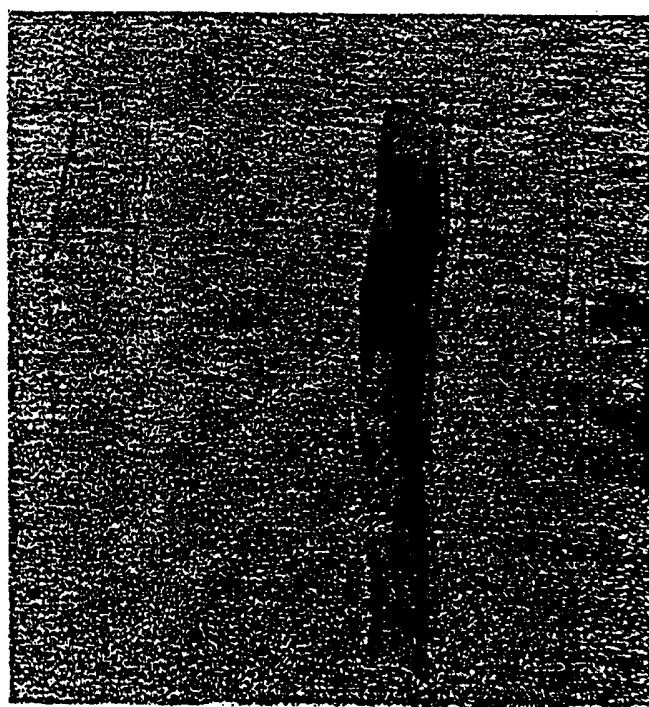


FIG. 28

-205

-116

1 2 3 4 5 6

20/24

FIG. 29

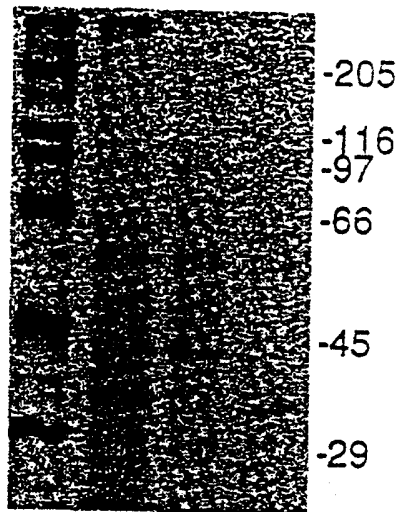
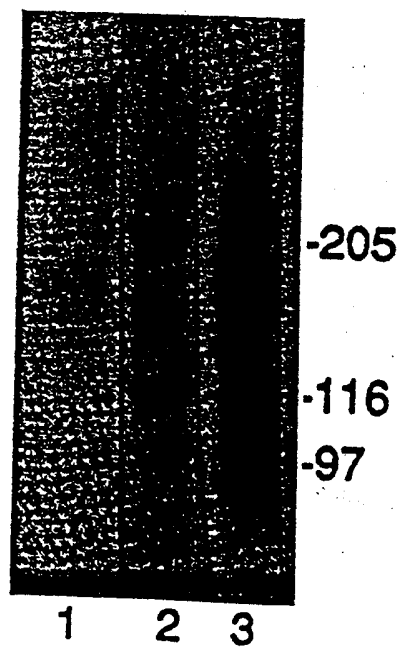
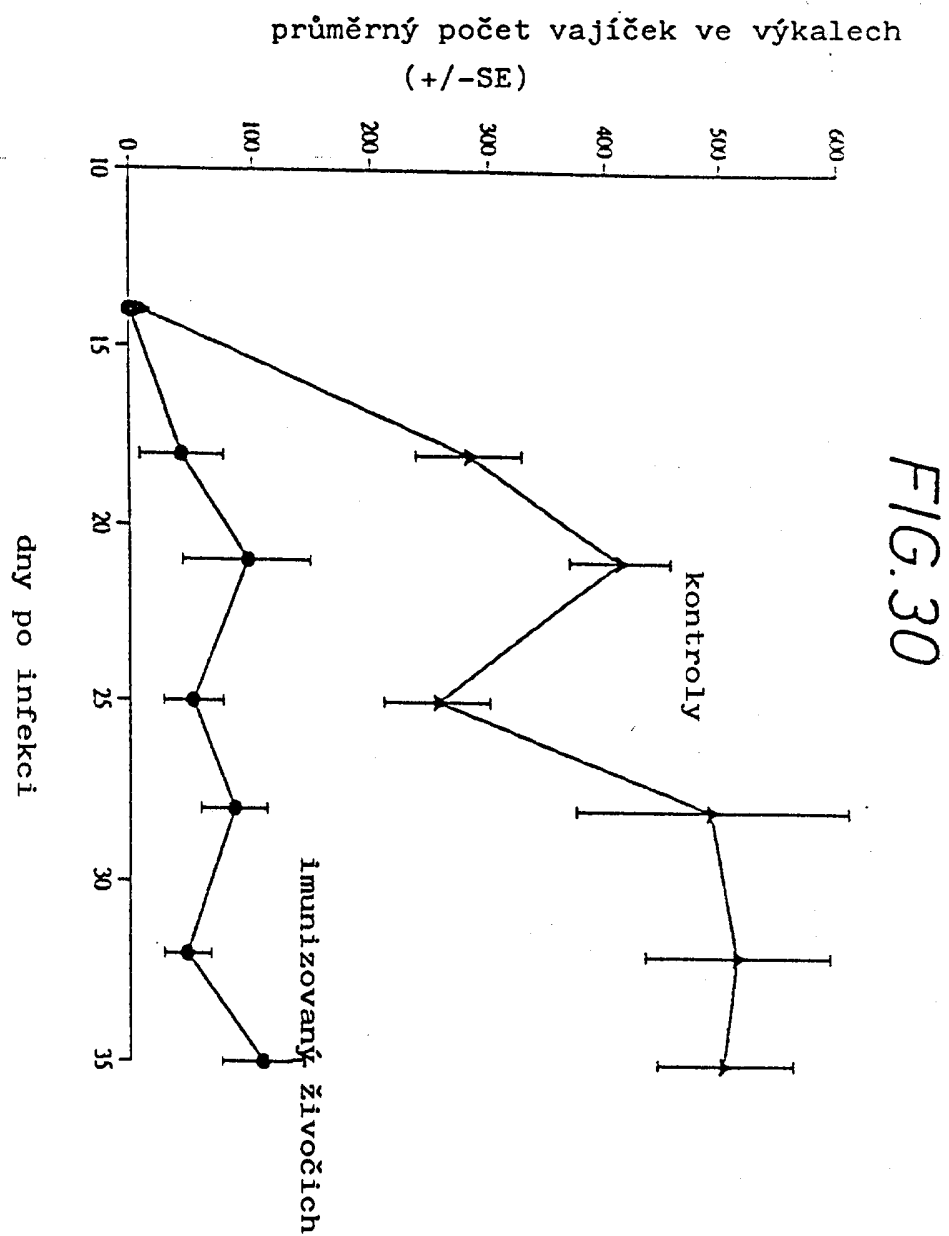


FIG. 31





22/24

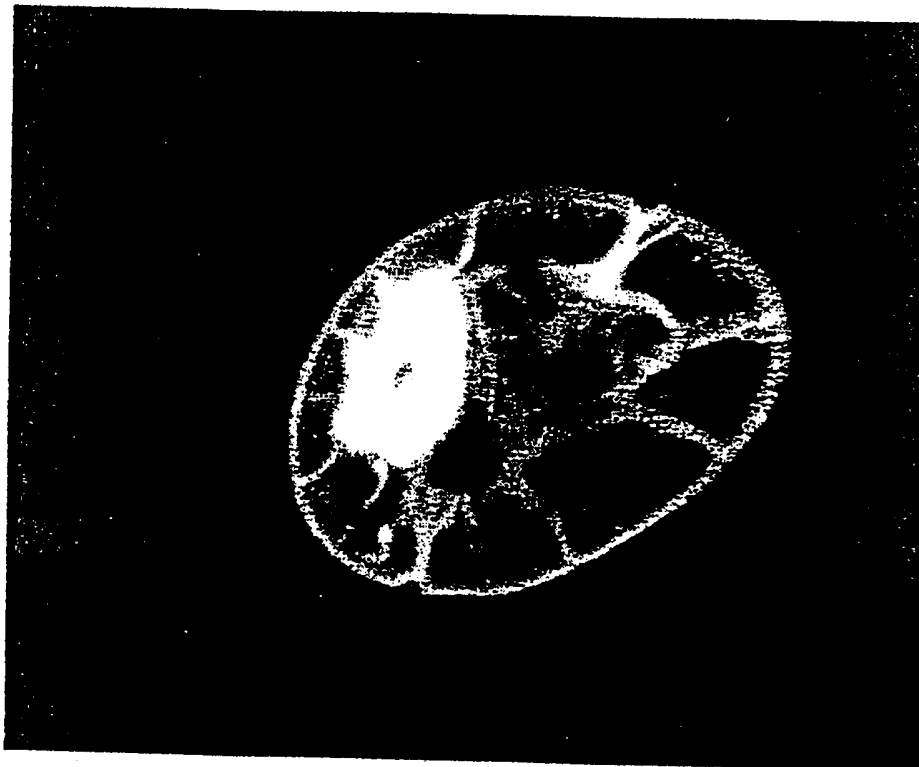
*FIG. 32.*

FIG. 33

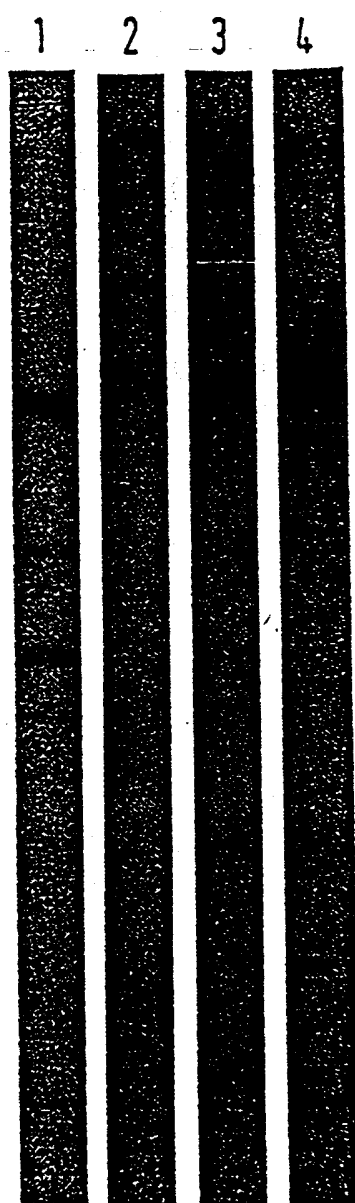
1 GGAATGTACT CGTCGTACCT TGCCTCTTT GGAATGCACC TTTTACAAAC
51 AAGGACTACC CGATGGCTGT CAATTTGCC GGCCTTGGTA GCGTTGTGGG
101 ACGCGAGCTT GTACATGCTT TCGATGATGA GGAATTCAG TTCGATGCCAA
151 TTGGAGCGCT CATCTGTGAG GAGTGGAAACC ACTGTTCCCTA GACAGACCTT
201 ACGATTCCG CC

FIG. 34

HG3
1 NVLVVPCALWNAPFYNKDYPMVNFAGLGSVVGRELVHAFDDEGIQFDAT 50
| :|. |.:.: |:|.: . :.|.:| |.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:
550 NQIVFPAGILQPFFSAQQSNSLYCGIGCMVIGIEITHGFDDNGRNFNKD 599

HC3	51	GALICEEWNICS	62
		. : .:.	
NEP	600	GDLV.DWWTQQS	610

24/24

*FIG.35.*