



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: P 94 01511
(22) A bejelentés napja: 1994. 05. 16.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
93201401.2 1993. 05. 17. EP

(40) A közzététel napja: 1995. 09. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 06. 28.

(11) Lajstromszám:

218 154 B

(51) Int. Cl.⁷

A 61 K 39/09

C 12 P 21/02

C 07 K 14/315

(72) Feltaláló:

Jacobs, Antonius Arnoldus Christiaan, Kessel
(NL)

(73) Szabadalmaz:

Akzo Nobel N. V., Arnhem (NL)

(74) Képviseelő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Streptococcus suis-fertőzés elleni vakcina

KIVONAT

A találmány *Streptococcus suis* baktériumból származó, *Streptococcus suis* ellen neutralizáló ellenanyagok termelődését kiváltani képes, körülbelül 54 kilodalton molekulatömegű polipeptiddel foglalkozik. A talál-

mány tárgyát képezi továbbá egy *Streptococcus suis*-fertőzés elleni vakcina, valamint az említett vakcina előállítására szolgáló eljárás is.

A találmány *Streptococcus suis*-ból származó polipeptiddel, sertésekben *Streptococcus suis* által okozott betegségek ellen védtettséget létrehozó vakcinával, a *Streptococcus suis* polipeptiddel reagáló ellenanyagokkal, valamint ilyen vakcina előállítására szolgáló eljárással foglalkozik.

A *Streptococcus suis*-t sertésekben ízületi gyulladással, vérmérgezéssel, agyhártyagyulladással, szívburokgyulladással, szívbélhártya-gyulladással, a savós hárták gyulladásával és/vagy tüdőgyulladással [Clifton-Hadley, F. A., Br. Vet. Journ., 139, 1–5. (1983); Vecht és munkatársai, Vet. Quarterly, 7, 315–321. (1985); Windsor, R. S., Vet. rec., 101, 378–379. (1977); Higgins és munkatársai, Can. J. Vet. Res., 54, 170–173. (1990); Devriese és munkatársai, Vet. Rec., 127, 68. (1990)] járó fertőző megbetegedés fő okozójaként azonosították.

A megbetegedési arány különösen magas a 3–12 hetes korú malacoknál [Windsor, R. S. és Elliot, S. D., J. Hyg. Camb., 75, 69–78. (1975); Guise és munkatársai, Vet. Rec., 117, 43–44. (1985); Hoffman, L. J. és Henderson L. M., Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians, 28th Ann. Proc., 201–210. (1985)]. Bár a sertések minden életkorban fogékonyak ezen baktérium okozta megbetegedésekre, 14 hetes kor után az elhullási arány alacsony [Guise és munkatársai, Vet. Rec., 117, 43–44. (1985); Hoffman, L. J. és Henderson, L. M., Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians, 28th Ann. Proc., 201–210. (1985)].

Az organizmus esetenként egyéb állatfajokban és emberben is okozhat betegséget [Devriese és munkatársai, Vet. Rec., 127, 68. (1990); Hommez és munkatársai, Vet. Rec., 123, 626–627. (1988); Arends és munkatársai, Rev. Infect. Dis., 10, 131–137. (1988); Gottschalk és munkatársai, J. Clin. Microbiol., 27, 2633–2636. (1989); Arends, J. P. és Zanen, H. C., Rev. Infect. Dis., 10, 131–137. (1988)]. Ezekben az esetekben a fertőzés rendszerint bőrsérüléseken át történik. *S. suis* által okozott betegséget először Hollandiában írt le DeMoor [DeMoor, C. E., Antonie van Leeuwenhoek, 29, 272–280. (1963)]. Azóta más kutatók egyéb európai államokban, valamint Kanadában, az Amerikai Egyesült Államokban és Ausztráliában is leírtak járványokat [Sanford, E. és Tilker, M. E., J. Am. Vet. Med. Assoc., 23, 5–97. (1982); Perch és munkatársai, J. Clin. Microbiol., 17, 993–996. (1983); Larson, D. J. és Kott B., Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians, 28th Ann. Proc., 121–130. (1985); Guise és munkatársai, Vet. Rec., 117, 43–44. (1985); Clifton-Hadley, F. A., Br. Vet. Journ., 139, 1–5. (1983)].

A *Streptococcus suis* törzseket számos különböző szerotípusba sorolták.

A szerotípust a tokpoliszacharid antigén alapján határozzák meg [Koehne és munkatársai, Am. J. Vet. Res., 40, 1640–1641. (1979); Perch és munkatársai, J. Clin. Microbiol., 17, 993–996. (1983)].

Eddig világszerte 29 eltérő szerotípust találtak.

Néhány szerotípus azonban gyakrabban fordul elő bizonyos országokban. A skandináv országokban a 7-es szerotípus a leggyakoribb, míg Ausztriában legtöbbször a 9-es szerotípussal találkozunk. A világszerte leggyak-

rabban előforduló szerotípus a 2-es szerotípus [Gogolewski és munkatársai, Aust. Vet. J., 67, 202–204. (1987); Boetner és munkatársai, Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B, 233–239. (1987)].

A *Streptococcus suis* patogenezisééről, virulencia faktorairól vagy védtettséget létrehozó antigénjeiről keveset tudunk.

Ez azt jelenti, hogy nem ismert, mely faktorok szükségesek a kórokozó elleni hatékony vakcinázáshoz.

Egy baktérium okozta megbetegedés elleni vakcina előállításakor gyakran követett eljárás egy egészséjtvakcinakészítmény előállítása és vizsgálata.

Ezt megtették a *Streptococcus suis* esetében is, és azt találták, hogy az egészséjtvakcinák jelentős védtettséget hoznak létre sertésekben homológ törzzsel való fertőzéssel szemben [Holt és munkatársai, Res. Vet. Sci., 48, 23–27. (1990)].

Valószínűnek tűnik azonban, hogy az egészséjtvakcinák esetében létrejött védttség szerotípusra fajlagos [Kebede és munkatársai, Vet. Microbiol., 22, 249–257. (1990)]. Az egészséjtvakcinák egyéb általános és jól ismert hátrányai a) az injekálás helyén és akörül nemkívánatos reakciókat hoznak létre, és b) összehasonlítva a védttség kiváltásáért tulajdonképpen felelős anyag mennyiségével, nagy mennyiségű, nem fajlagos proteint kell adagolnunk.

Az a tény, hogy jelenleg a tokpoliszacharid antigén alapján már 29 különböző *Streptococcus suis*-szerotípus ismert, azt jelenti, hogy az egészséjtvakcinának széles körű védttség létrehozásához sok szerotípust kell tartalmazniuk.

Ilyen vakcinát valóban készítettek *Streptococcus pneumoniae* okozta tüdőgyulladás elleni védttség létrehozására emberben [Boulnois G. J., Journ. Gen. Microbiol., 138, 249–259. (1992)].

Ez a vakcina 23 poliszacharidot tartalmaz a leggyakrabban előforduló szerotípusokból. Ennek a vakcinának összetettségén kívül lényeges hátrányai vannak a tokpoliszacharidok alacsony fokú immunogenitása miatt. Sok próbálkozás irányult tehát a *Streptococcus suis* kóroktanában feltehetően szerepet játszó faktorok felderítésére. Leírtak hemagglutinineket és fimbriákat, mint lehetséges virulenciafaktorokat, azonban ezeknek a kóroktanban betöltött pontos szerepe vagy funkciója nem ismert, és az illető molekulákat vagy proteineket nem sikerült azonosítani. [Jacques és munkatársai, J. Bacteriol., 172, 2833–2838. (1990); Gottschalk és munkatársai, J. Clin. Microbiol., 28, 2156–2158. (1990)].

Eddig a következő négy proteinnél feltételezték, hogy azok lehetséges virulenciafaktorok:

a) egy 44 kilodalton molekulatömegű protein [Gottschalk és munkatársai, Vet. Microb. 30, 59–71. (1992)];

b) egy 94 kilodalton molekulatömegű protein [Holt és munkatársai, J. Comp. Path., 103, 85–94. (1990)];

c) egy 110 kilodalton molekulatömegű protein [az E. F. (Extracelluláris Faktor), Vecht és munkatársai, Infect. Immun., 59, 3156–3162. (1991); Vecht és munkatársai, Infect. Immun., 60, 550–556. (1992); Smith és Vecht, 92/16630 számú nemzetközi szabadalmi leírás];

d) egy 136 kilodalton molekulatömegű protein [az M. R. („Muraminidase Released Protein”), Vecht és munkatársai, *Infect. Immun.*, 59., 3156–3162. (1991); Vecht és munkatársai, *Infect. Immun.*, 60., 550–556. (1992); Smith és Vecht, WO92/16630 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés].

A 44 kilodalton molekulatömegű proteint 2-es szerotípusú, patogén *Streptococcus suis* törzsekben találták, és hiányzott egy nem patogén mutáns törzsből. A 44 kilodalton molekulatömegű proteint nem tartalmazó mutáns törzs ellen termelt antiszérum nem volt elegendő a szülő törzs elleni teljes védetség létrehozására. Ezért csak feltételezzük, hogy a virulenciában játszik szerepet.

A 2-es szerotípusú *S. suis* 94 kilodalton molekulatömegű proteint ellen termelt antiszérumról kimutatták, hogy egerekben védetséget hoz létre a homológ törzssel való fertőzéssel szemben.

A 110 kilodalton, valamint a 136 kilodalton molekulatömegű proteinek jelen vannak az igen patogén törzsekben és hiányoznak a nem patogén törzsekből, míg a 110 kilodalton molekulatömegű protein hiányzik az alacsony patogenitású törzsekből.

Ez arra utal, hogy a 110 kilodalton, valamint a 136 kilodalton molekulatömegű proteinek szerepet játszanak a patogenezisben. Ugyanakkor eddig nem jelent meg ezeket a proteineket tartalmazó izolátumokon alapuló védetséget létrehozó kísérletekről szóló beszámoló.

Következtetésképp az eddig kimutatott lehetséges virulenciafaktorok közül csak a 44 és a 94 kilodalton molekulatömegű proteinekről sikerült kimutatni, hogy szerepet játszanak a 2-es szerotípus elleni védetség létrehozásában. Az említett védetséget eddig csak egérben és csak homológ törzssel való fertőzés esetében sikerült kimutatni.

A fent említett négy protein jelenlétét eddig csupán a 2-es szerotípusú *Streptococcus suis* törzsekben mutatták ki. A fentiek szerint, a nagyszámú különböző szerotípus létezése miatt, egy szerotípustól független és szerológiai-
lag keresztreakciót adó, védetséget létrehozó antigén igen előnyös vakcinaalapul szolgálna. Eddig ilyen antigént *Streptococcus suis* esetében nem sikerült kimutatni.

Meglepő módon kiderült, hogy a *Streptococcus suis* néhány törzse egy körülbelül 54 kilodalton molekulatömegű polipeptidet választ ki, amely tiollal aktiválható, koleszterinnel gátolható és hemolitikus aktivitást mutat.

A hemolitikus toxinok mind rendelkeznek a membránintegritás és/vagy -funkció roncsolása révén emlőssejteket károsító tulajdonsággal. Ez a károsító hatás valószínűleg annak tudható be, hogy a toxin oligomerformái a sejtmembránba beépülve porózus szerkezetet alakítanak ki.

Kimutattuk, hogy a találmány szerinti hemolitikus polipeptid egy tiol által aktiválható toxin. A tiol által aktiválható toxinok csak redukált állapotban aktívak, és oxidációt követően reverzibilisen elvesztik aktivitásukat [Smyth, C. J. és Duncan, J. L., *Bacterial Toxins and Cell Membranes*, Jeljaszewicz, J. és Wadstrom, T. (szerk.), London, Academic Press, 129–183. (1978)].

Bár a tiolcsoport szerepe távolról sem világos, feltehetően fontos részét képezi a membránkárosodás előidézéséhez elengedhetetlenül szükséges folyamatnak.

A hemolizinek bizonyos csoportja által kiváltott sejtoldó hatás mögött álló mechanizmus feltételezi, hogy a hemolitikus polipeptid koleszterinhez kötődjön az emlőssejt membránjában. Ha egyszer a protein a sejthez kötődött, bejut a lipid kettős rétegbe. Ezután az oligomer hemolizin komplexeket képez, amelyek feltételezések szerint a membránon keresztül pórusokat alakítanak ki.

Kimutattuk, hogy a találmány szerinti polipeptid hemolitikus aktivitása a hemolizinek azon csoportjához tartozik, amelyek koleszterinnel gátolhatók. A koleszterin, úgy tűnik, kulcsszerepet játszik a hemolizinek a fogékony sejtekhez való kötődésében. Javasoltak néhány olyan modell, melyek szerint a toxinnak a sejthez való kötődésénél a koleszterin képviseli az elsődleges kötőhelyet. A szabad koleszterin hatásosan gátolja a sejtoldó aktivitást, ami magyarázható azzal a ténnyel, hogy abban az esetben, ha a toxin szterinkötő helye (szabad) koleszterin által foglalt, az többé nem képes (membránhoz kötött) koleszterint kötni. [Boulnois és munkatársai, *Mol. Microbiol.*, 5., 2611–2616. (1991)]. A találmány szerinti hemolitikus polipeptid becslés alapján körülbelül 54 kilodalton molekulatömeggel rendelkezik. Ezt a molekulatömeget szokásos eljárásokkal határoztuk meg a 2. példában ismertetett poliakrilamidgél-elektroforézis alkalmazásával.

Az 1. ábrán a C. csík mutatja a tisztított polipeptidet, az azt körülvevő csíkok pedig a jelző molekulákat (A és D csíkok).

A *Streptococcus suis* egy P1/7 elnevezésű törzsének hemolitikus polipeptidjét annak N-terminális aminosavszekvenciája meghatározásával tovább jellemeztük. Az 1. szekvencia mutatja a polipeptid N-terminális szekvenciáját. Hemolitikus polipeptidek a *Streptococcus suis* néhány, de nem mindegyik törzséből izolálhatók. Előfordulhat mérsékelt változatosság az egyes hemolitikus polipeptidet termelő *S. suis* törzsek hemolitikus polipeptidet kódoló génjének nukleinsavszekvenciájában. Ezek a módosulatok nincsenek hatással a polipeptid aminosavszekvenciájára abban az esetben, ha a módosulat olyan, hogy az új triplett ugyanazt az aminosavat kódolja. Ez az eset például, ha a leucint kódoló CTG triplettben a G-t C-vel helyettesítjük, az így kapott triplett szintén leucint kódol. Ha azonban a T-t helyettesítjük C-vel, az új triplett leucin helyett prolint kódol. Ez változáshoz vezet a hemolitikus polipeptid aminosavszekvenciájában.

Az aminosavszekvenciában létrejövő változás lehet egy vagy több aminosav funkcionális megfelelővel való helyettesítésének vagy sokkal ritkábban „stop”-kodon beépítésének vagy a nukleinsavszekvenciában bekövetkezett deléciók/inszerciók esetében egy vagy több aminosav inszerciójának vagy deléciójának eredménye. Funkcionális megfelelővel való helyettesítés gyakran megfigyelhető. Neurath és munkatársai által ismertetett példák [The Proteins, 14. oldal, 6. ábra, Academic Press, New York (1979)] többek között az alanin

aminosav cseréje szerinnel; Ala/Ser- vagy Val/Ile-, Asp/Glu-csere stb. A fent említett funkcionálisan megfelelő aminosavakkal történő helyettesítésekhez vezető változatokon kívül lehetségesek olyan változatok, amelyekben egy aminosavat egy másik, nem funkcionálisan megfelelő aminosav helyettesít. Ez a típusú változat csak annyiban különbözik a funkcionálisan megfelelő aminosavval való helyettesítéstől, hogy kissé megváltozott térbeli hajtogatódással rendelkező proteint eredményezhet.

Nem kell külön emlitenünk, hogy a hemolitikus polipeptidet kódoló nukleinsavszekvencia azon változatai, amelyek úgy vezetnek a hemolitikus polipeptid aminosavszekvencia-változásaihoz, hogy a polipeptid immunogén aktivitása megmarad, szintén a találmány tárgyát képezik. A találmány kiterjed sertésekben *Streptococcus suis*-fertőzés ellen védetség létrehozására alkalmas vakcinára, amely tartalmazza a fent említett hemolitikus polipeptidet vagy annak egy, a *S. suis* hemolitikus polipeptidje ellen immunválaszt kiváltani képes részét. Ilyen vakcina előállítható például a találmány szerinti polipeptidet, vagy annak egy, a *S. suis* hemolitikus polipeptidje ellen immunválaszt kiváltani képes részét utánzó szintetikus polipeptid alkalmazásával.

Más eljárás szerint, a találmány szerinti vakcina előállítható a hemolitikus polipeptid biokémiai úton történő tisztításával baktériumtenyészetből. Ez végezhető például a baktériumok centrifugálásával és gélszűrő oszlopok alkalmazásával a hemolitikus polipeptidnek más összetevőktől való elválasztása céljából. További tisztítás végezhető például ammónium-szulfáttal történő szelektív kicsapással, majd ezt követő centrifugálással, és az üledéknek megfelelő pufferben való oldásával.

A találmány szerinti vakcina előállítható továbbá például molekuláris klónozási technikákkal. Ezeknek a technikáknak az alkalmazásával a találmány szerinti polipeptidet vagy annak egy, a *S. suis* hemolitikus polipeptidje ellen immunválaszt kiváltására képes részét kódoló nukleinsavszekvencia egy expressziós vektorba klónozható, majd megfelelő expressziós rendszerben expresszálható. Az expressziós termék ezután vakcinában alkalmazható. Lehetséges expressziós rendszerek lehetnek baktérium, élesztő, gomba, rovar, valamint emlőssejt-expressziós rendszerek.

A találmány szerinti polipeptid előállításának egy másik módja a polipeptidet kódoló genetikai információ klónozása egy megfelelő vírusvektorba, és a vírus gazdasejtjének felhasználása a protein expresszálására. Ilyen rendszerek például a vaccinia vírusvektor és fogékony emlőssejtek kombinációja, vagy a bacilovírus vektor és *Spodoptera frugiperda*-sejtek. Az expresszált polipeptidet tartalmazó nyers vagy tisztított sejtizátumok ezután egy vakcina alapjaként használhatók. Egy másik megközelítés a sertést mint gazdaállatot felhasználó, úgynevezett élő rekombináns hordozóvírusok („Live Recombinant Carrier”, LRC) alkalmazása. Az LRC olyan vírus, amelybe járulékos genetikai információt klónoztak. Az ezzel a rekombináns vírussal fertőzött állatokban immunválaszt váltódik ki nem csak a vektorvírus immunogén csoportjai, hanem a rekombináns vírusba járulékosan klónozott genetikai kód által meghatározott polipeptid(ek) immunogén részei ellen is.

bináns vírusba járulékosan klónozott genetikai kód által meghatározott polipeptid(ek) immunogén részei ellen is.

Egyéb sertéskórokozó organizmusokból származó genetikai információ hordozására különösen előnyösen alkalmazható élő rekombináns hordozóvírus az álveszettség vírusa (Pseudorabies-vírus). Ezt a vírust korábban sikeresen alkalmazták LRC-ként például kombinált álveszettség/sertés koleravírus elleni vakcinázásra. Előnyös esetben a találmány szerinti vakcina tartalmaz egyéb *Streptococcus suis*-immunogéneket is.

Azt találtuk, hogy a 2-es szerotípusú *Streptococcus suis* hemolitikus polipeptidje ellen termelt antiszérum szerotípusra való tekintet nélkül reagál minden egyéb hemolizintermelő *Streptococcus suis* törzs hemolizinjével. Ezt nem mutatták ki a fent említett 44 kilodalton, 94 kilodalton, 110 kilodalton és 136 kilodalton molekulatömegű *Streptococcus suis*-polipeptidek esetében.

Mindazonáltal, a fentiek közül valamelyiket vagy bármely *Streptococcus suis*-immunogént járulékosan tartalmazó, találmány szerinti vakcina még hatékonyabb. Ez a nagyobb hatékonyság lehet például egy szinergista hatás eredménye. Ez még hatékonyabb és még alacsonyabb antigénterheléssel rendelkező vakcinák előállításához vezethet.

Még előnyösebb esetben a találmány szerinti vakcina tartalmaz továbbá egy, a találmány szerinti polipeptidhez kapcsolt hordozóanyagot. Hordozóanyagként alkalmazhatók egyéb molekulák, például éticsiga-hemocianin, szarvasmarha-szérumalbumin, de használhatók összetett cukormolekulák is.

Még előnyösebb esetben a találmány szerinti vakcina tartalmaz egy, a találmány szerinti polipeptidhez kapcsolt tokpoliszacharidot.

Polipeptideknek szénhidrátokhoz való kovalens összekapcsolására szolgáló eljárásokat ismertet többek között Dick, W. E. és Beurt, M. [Contrib. Microbiol. Immunol., 10., 48–114. (1989)].

Érthető, hogy egyéb hordozóanyag-típusok vagy polipeptidnek szénhidráthoz való kötéseire szolgáló, egyéb eljárások szintén a találmány tárgykörébe tartoznak. A találmány további értelmezésében a találmány szerinti vakcina más sertéskórokozó organizmusokból és vírusokból származó antigéneket is tartalmaz. Ilyen organizmusok és vírusok lehetnek például a következők: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, az álveszettség vírusa, a sertésinfluenza-vírus, sertésparvovírus, a fertőző gyomor-bél hurut vírusa, rotavírus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, valamint *Bordetella bronchiseptica*.

A találmány szerinti vakcina előnyös esetben tartalmazhat egy adjuvánst is. Az adjuvánssok általában olyan anyagok, amelyek nem fajlagos módon serkentik a gazdaszervezet immunválaszt. A gyakorlatban számos különböző adjuváns ismert. Adjuvánssok például a Freund-féle komplett és inkomplett adjuváns, az E-vitamin, nemionos blokk-kopolimerek, muramildipeptidek, Quill A®, ásványi olajok, például Bayol® vagy Markol®, növényi olajok és Carbopol® (egy homopolimer) vagy Diluvac® Forte.

A vakcina tartalmazhat továbbá egy úgynevezett „vivőanyagot”. A vivőanyag olyan összetevő, amelyhez a polipeptid anélkül tapad, hogy kovalensen hozzá lenne kötve. Gyakran alkalmazott vivőanyagok például az alumínium-hidroxid, -foszfát vagy -oxid, kovasav, kaolin és bentonit.

Az említett vivőanyagok egy különleges formája, amikor az antigén részben a vivőanyagba van ágyazva, az úgynevezett ISCOM (lásd a 109 942 számú európai szabadalmi leírás, a 180 564 számú európai szabadalmi leírás, valamint a 242 380 számú európai szabadalmi leírás). A vakcina tartalmazhat ezenkívül egy vagy több, megfelelő felületaktív vegyületet vagy emulgeálanyagot, mint például a Span vagy a Tween.

A vakcinát gyakran stabilizáló anyaggal elegyítik, például a lebomlásra hajlamos polipeptideknek a lebomlástól való védelmére, a vakcina lejáratí idejének meghosszabbítására vagy a fagyasztás-olvasztás következtében beálló hatékonyságcsökkenés mérséklésére. Alkalmos stabilizálóanyagok többek között az SPGA [Bovarnik és munkatársai, J. Bacteriology, 59., 509. (1950)], szénhidrátok, például szorbit, mannit, trehalóz, keményítő, szacharóz, dextrán vagy glükóz, proteinek, például albumin vagy kazein vagy azok bomlási termékei, és pufferek, mint például alkáliföldfém-foszfátok.

A vakcinát továbbá egy fiziológiásan megfelelő higítószerben szuszpendálhatjuk. Nem kell külön említünk, hogy az adjuválásnak, vivőanyagok vagy higítóanyagok hozzáadásának, egy polipeptid emulgeálásának vagy stabilizálásának egyéb módjai szintén a találmány tárgykörébe tartoznak.

Más eljárás szerint a találmány szerinti polipeptiddel vagy annak egy antigén hatású részével monospecifikusan reagáló ellenanyagokat alkalmazhatunk passzív immunitás létrehozására.

Monospecifikus ellenanyagok olyan ellenanyagok, amelyek fajlagosan képesek reagálni a találmány szerinti 54 kilodalton molekulatömegű polipeptiddel vagy annak egy részével anélkül, hogy egyéb *Streptococcus suis*-antigénnel fajlagosan reagálnának.

Kórokozók ellen termelt ellenanyagok sikeresen alkalmazhatók passzív immunizálásra. Az ilyen típusú kezelésnek az az előnye, hogy az ellenanyagok rendelkezésre állnak a fertőzés pillanatában. Így nem veszítünk időt a gazdaszervezet immunrendszerének aktivizálására és megfelelő szintű védettség kialakulására várva. Különösen abban az esetben, ha a fertőzés már megtörtént és a betegség kifejlődőben van, az ellenanyagok alkalmazásával az állat a kórokozók és a kórokozó által termelt toxinok okozta betegségből azonnal meggyógyítható. A találmány tárgyát képezi tehát egy, a *Streptococcus suis* hemolitikus polipeptidje ellen termelt ellenanyagokon alapuló, *Streptococcus suis*-fertőzést követően sertésekben a betegség ellen védettséget létrehozni képes vakcina.

A találmány kiterjed emlősökben *Streptococcus suis*-fertőzés ellen védettséget létrehozni képes vakcina előállítására szolgáló eljárásra, amely eljárás magában foglalja a találmány szerinti polipeptid elegyítését egy

gyógyszergyártásban elfogadott hordozóanyaggal, adjuvánssal vagy higítóanyaggal.

A találmány szerinti megoldást a következő példák-
kal szemléltetjük a korlátozás szándéka nélkül.

1. példa

Baktériumtörzsek

A P1/7, valamint 688/9 jelzésű 2-es szerotípusú *S. suis*-törzseket Dr. T. Alexandertől kaptuk [University of Cambridge, U. K.]. A 4005, D282, 3921, 3977, 3889, valamint T15 jelzésű 2-es szerotípusú törzsek Dr. U. Vechttől származtak [CDI-DLO, Lelystad, Hollandia]. A 10681, 10727, valamint 14391 jelzésű 7-es szerotípusú törzseket Dr. B. Nielsentől kaptuk [Intervet Scandinavia, Koppenhága, Dánia]. Az 1–22. jelzésű referenciatörzseket Dr. J. Henrichsensentől kaptuk [Statens Serum Institute, Koppenhága, Dánia]. A B10 jelzésű 1-es szerotípusú izolátum egy újabban izolált mezei törzs, amely a „Gezondheidsdienst voor dieren, Oost-Nederland” intézettől származik (Deventer, Hollandia). Az NV92109 jelzésű 8-as szerotípusú, a 220891KM és jelzésű 9-es szerotípusú és a 220891GV jelzésű 14-es szerotípusú törzsek újabban, beteg sertésektől származó mezei izolátumok.

Baktériumtenyészetek

A baktériumtenyészeteket birkavért tartalmazó agar-lemezekre oltottuk ki, és 24 órán át, 37 °C-on tenyésztettük. A hemolizintermelés tömegtenyészetben való vizsgálata céljából néhány telepet 100 ml Todd–Hewitt-táptalajba (Difco) oltottunk, és 37 °C-on az exponenciális szaporodási fázis végéig (rendszerint 5–6 órán át) tenyésztettünk. Ezután a sejteket centrifugálással eltávolítottuk (10 000 × g, 10 perc), és a felülúszót felhasználásig –20 °C-on tároltuk.

Hemolizáló vizsgálat

Szérumok hemolizáló titerének megállapítására a vizsgálandó szérumokból mély rekeszű titrálólemezekre kétszeres sorozathígításokat (75 mikroliter) készítettünk, higítófolyadékként 10 mmol/l Tris-pufferes sóoldatban (pH 7,4). Ezt követően mindegyik rekeszhez 75 mikroliter 25 hemolizálóegységet tartalmazó hemolizinsoldatot adtunk. 20 °C-on, 10 percig tartó inkubálást követően mindegyik rekeszhez 150 mikroliter 2%-os (mosott) lóvörösvérsejt-suszpenziót adtunk, majd a hemolitikus aktivitás meghatározására a vizsgálatot a fentiekben ismertettek szerint végeztük. A títret a minimálisan 50%-os hemolizálóhatást létrehozó legnagyobb szérumhígításban adtuk meg. A (2-es típusú *Streptococcus suis*-ból származó) tisztított hemolizin ellen termelt P399 fajlagos sertésszérum különböző (szerotípusú) törzsek hemolitikus aktivitását gátló képességét egy-egy rekeszben vizsgáltuk, a vizsgálatához 75 mikroliter 1:128 arányban előzőleg hígított P399 szérumot és a különböző törzsek tenyészetéből 75 mikroliter hígítatlan felülúszót használtunk. A vizsgálatot a fentiek szerint végeztük. Kontrollként előzőleg szintén (1:128 arányban) hígított, immunizálás előtt levett szérumot használtunk (a maximális hemolízis megállapítására). Keresztneutralizációról volt szó abban az esetben, ha a P399 szérum az immunizálás előtt levett szérum-

mal összehasonlítva több mint 50%-kal gátolta a hemolizist. A 2⁴-nél kisebb hemolizintiterrel rendelkező minták ebben a vizsgálatban nem adtak értékelhető eredményt, mivel a maximális hemolízis (immunizálás előtt levett szérum) nem érte el a háttérnek megfelelő érték kétszeresét (P399 szérum).

2. példa

A hemolizin tisztítása

A P1/7 törzs 250 ml-nyi éjszakai tenyészetét 12 liter Todd-Hewitt-levestáptalajba oltottuk, és anaerob körülmények között tenyésztettük 6 órán át 37 °C-on, majd a sejteket folyamatos átfolyó centrifugálással eltávolítottuk. A tenyészet felülúszóját 4 °C-ra hűtöttük, egy 0,8 mikrométer pórusátmérőjű szűrőn átszűrtük, majd PTCG 10,000 MMWL szűrőkön 150 ml-re koncentráltuk. Egy 0,2 mikrométer pórusátmérőjű szűrőn való átszűrést követően 1,0 ml térfogatú adagokat egy Superose-12 gélszűrő oszlopra (FPLC, Pharmacia) vittünk fel, és 0,5 mol/l NaCl-ot tartalmazó 40 mmol/l foszfátpufferes sóoldattal (pH 7,2) eluáltuk. 0,5 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttünk, és azokat SDS-PAGE-vel, immunlenyomat-vizsgálattal és a hemolizinvizsgálattal analizáltuk. A legnagyobb hemolitikus aktivitást a 35–45. eluált frakciókban találtuk (lásd a 2. ábrát).

Az oszlopról nyert különböző frakciók SDS-PAGE- és immunlenyomat-vizsgálata azt mutatta, hogy a hemolitikus aktivitás egyetlen, körülbelül 54 kilodalton molekulatömegű antigén megjelenésével esett egybe (lásd a 3. ábrát). A 35–45. hemolitikus frakciókat összegyűjtöttük, és a kis mennyiségben jelen levő szennyező anyagokat 50%-os (NH₄)₂SO₄-tal, 4 °C-on, 3 órán át végzett szelektív kicsapással eltávolítottuk. Centrifugálást követően az üledéket 20 ml 40 mmol/l foszfátpufferes sóoldatban (pH 7,2) szuszpendáltuk. Ez a végtermék SDS-PAGE-vizsgálat szerint, Coomassie brilliant kék festéssel egyetlen, körülbelül 54 kilodalton molekulatömegű polipeptidnek tűnt (lásd az 1. ábrát), és béta-merkaptóetanollal való redukálást követően fajlagos aktivitása milligrammonként körülbelül $0,7 \times 10^6$ hemolitikus egység volt.

Fehérjemeghatározás

A fehérjekoncentrációt Lowry és munkatársai szerint határoztuk meg [Lowry és munkatársai, J. Biol. Chem., 193., 265–275. (1951)], standardként szarvasmarha-szérumalbumint használtunk.

SDS-PAGE és Western lenyomatvizsgálat

Az SDS-PAGE-vizsgálatot, valamint a minták előkészítését alapvetően Laemmli szerint végeztük 9%-os gélben [Laemmli, U.K., Nature, 227., 680–685. (1970)]. Elektroforézist követően a polipeptideket Coomassie brilliant kék R250 festékkel festettük, vagy elektrolyomat-technikával Immobilon PVDF-szűrőre vittük át. A szűrőket R2089 jelzésű poliklonális nyúlserummal vagy M189 jelzésű poliklonális egérszérummal (lásd az Antiszérumok fejezetben) kezeltük. Mosást követően a kötődött ellenanyagokat torma-peroxidázzal jelölt, kecskében termelt antinyúl-, illetve antieger-konjugátummal, valamint szubsztrátként Di-amino-benzidin alkalmazásával tettük láthatóvá.

A hemolitikus aktivitás alakulása különböző kezeléseket követően

Mindegyik kezelésnél 0,5 ml, 2⁷ titerű tisztított hemolizint használtunk 40 mmol/l foszfátpufferes sóoldatban (pH 7,2).

Különböző hőmérsékletek hatását vizsgáltuk hemolizinpróbával, a hemolizinnek az illető hőmérsékleten, például –20 °C-on, 4 °C-on, 20 °C-on, 37 °C-on és 100 °C-on való inkubálását követően. A *proteináz-K-kezelés* hatásának vizsgálatára 5 mikroliter koncentrált enzimoldatot (2 mg/ml) adtunk 0,5 ml hemolizinoldathoz, és azt 10 percig 20 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a maradék hemolitikus aktivitást a hemolizinvizsgálattal mértük. *Béta-merkaptó-etanollal való redukálás* hatásának vizsgálatára 5 mikroliter 10%-os (térfogat/térfogat) béta-merkaptó-etanoldatot adtunk 0,5 ml hemolizinoldathoz, és 10 percig, 20 °C-on inkubáltuk, majd az aktivitást a hemolizinvizsgálattal mértük.

H₂O₂-dal való oxidálás hatásának vizsgálatára 5 mikroliter 10%-os H₂O₂-oldatot adtunk 0,5 ml hemolizinoldathoz, majd 20 °C-on, 10 percig inkubáltuk. Ezt követően a maradék hemolitikus aktivitást a hemolizinvizsgálattal mértük.

Az előforduló tiolcsoportok TLCK-val (N- α -p-tiozil-L-lizin-klór-metil-kezon, Sigma) való *alkilálásának* hatását 5 mikroliter 10%-os (tömeg/térfogat) TLCK-oldatnak 0,5 ml hemolizinoldathoz való hozzáadásával, majd az elegynek 10 percig, 20 °C-on való inkubálásával határoztuk meg. Ezt követően a maradék hemolitikus aktivitást a hemolizinvizsgálattal mértük.

Koleszterin hatását 10 mikroliter 5%-os koleszterin 0,5 ml hemolizinoldathoz való hozzáadásával, majd az elegynek 10 percig, 20 °C-on való inkubálásával határoztuk meg. Ezt követően a maradék hemolitikus aktivitást a hemolizinvizsgálattal mértük.

Néhány kezelés eredményének redukcióval történő *visszafordíthatóságát* a reakcióelegy egy részéhez béta-merkaptó-etanolnak feleslegben (2% végkoncentrációban) való hozzáadásával, majd az elegynek 10 percig, 20 °C-on való inkubálásával, ezt követően a hemolitikus aktivitás titrálásával vizsgáltuk.

A különböző kezeléseknél a hemolitikus aktivitásra kifejtett hatását az 1. táblázat mutatja. Az eredmények azt mutatják, hogy a hemolizin hőre érzékeny, érzékeny proteináz-K-emésztésre, H₂O₂-dal való oxidálásra és TLCK-val való alkilálásra. A hemolitikus aktivitás gátlható továbbá koleszterinnel. Béta-merkaptó-etanollal való inkubálás után megnövekedett aktivitást találtunk, és a H₂O₂-dal oxidált készítményhez béta-merkaptó-etanolnak feleslegben való hozzáadása visszaállította a hemolitikus aktivitást. A TLCK-val kezelt készítményhez béta-merkaptó-etanolnak feleslegben való hozzáadása a hemolitikus aktivitás részleges visszaállításához vezetett. Ez a részleges helyreállítás magyarázható lehet TLCK-val nem reagált oxidált tiolcsoportok jelenlétével. A hőmérséklet és koleszterin hatása nem volt visszafordítható béta-merkaptó-etanol hozzáadásával.

Olyan párhuzamos minták alkalmazásánál, amelyekből az illető reagenseket vagy a hemolizint kihagytuk, az adott módszernek nem volt kimutatható hatása a he-

molitikus aktivitásra, illetve a reagenseknek nem volt kimutatható hatása a vörösvérsejtekre.

Különböző fajokból származó vörösvérsejtek hemolizinerzékenysége

Különböző fajokból származó, például humán, szarvasmarha-, pulyka-, galamb-, egér-, csirke-, tengerimalac-, nyúl-, macska-, kutya- és sertésvörösvérsejtek érzékenységet 2⁸ titerrel rendelkező, redukált (0,1%-os béta-merkaptó-etanolal kezelte), tisztított hemolizinszisztémával vizsgáltuk. A vizsgálatokat lényegében „A hemolitikus aktivitás titrálása” című fejezetben ismertetettek szerint végeztük. Mindegyik vörösvérsejt körülbelül egyforma érzékenységet mutatott a hemolizinre. A titer 2⁷ (egér, macska és pulyka) és 2¹⁰ (humán) között változott.

N-terminális aminosavszekvencia

A P1/7 törzsből tisztított hemolizin első 16 aminosavat automatizált Edman-féle degradációs eljárással határoztuk meg, lásd az 1. szekvenciát.

Hemolizinmolekulák előfordulása különböző Streptococcus suis törzsekben

Mindegyik rendelkezésre álló, az 1–22. szerotípusokhoz tartozó törzset Todd–Hewitt-levestáptalajban tenyésztettünk az exponenciális szaporodási szakasz végéig (5–6 órán át), majd a sejteket centrifugálással eltávolítottuk. A tenyészet felülszójában a hemolizinmolekulák jelenlétét a hemolizinvizsgálattal és immunnyomat-vizsgálattal mutattuk ki. Számos, azonban nem mindegyik törzs tenyészetének felülszójában találtunk különböző mennyiségű hemolitikus aktivitást (lásd a 2. táblázatot).

Mindegyik hemolitikus minta, beleértve az alacsony aktivitással rendelkező mintákat, gátolható volt koleszterinnel és H₂O₂-dal. Ezenkívül, béta-merkaptó-etanolnak feleslegben való hozzáadása a H₂O₂-dal oxidált készítményekhez a hemolitikus aktivitás teljes helyreállításához vezetett.

Összefoglalva, a legtöbb vizsgált törzs hemolitikus aktivitást választott ki a tenyészet felülszójába, amely immunológiai és biokémiai rokonságot mutatott a találmány szerinti hemolizinnel, és nem találtunk utalást egyéb, azzal rokonságot nem mutató hemolizinek jelenlétére.

3. példa

Vakcinák

Négy, a P1/7 törzsből tisztított hemolizinen, koncentrálttenyészet-felülszón, illetve összegyűjtött Supe-rose–12 oszlopfrakciókon alapuló vakcinát, valamint egy placebovakcinát állítottunk elő. Összehasonlításképpen egy vakcinát tisztított EF-ből készítettünk.

Egy koncentrálttenyészet-felülszóból készült vakcinát a B10 jelzésű törzsből állítottunk elő.

A vakcinákat az alábbiak szerint állítottuk elő.

Tisztított hemolizint (40 mikrogramm/ml) 1:1 arányban Diluvac Forte® adjuvánssal elegyítettünk, míg homogén mikroemulziót nem kaptunk. Ezt a vakcinát VAC-SLY-nek neveztük.

Koncentrálttenyészet-felülszót tartalmazó vakcinához a PTCG-koncentrátum egy részét (1,9 mg pro-

tein/ml) 1:1 arányban Diluvac Forte® adjuvánssal elegyítettük, míg homogén szuszpenziót nem kaptunk. Ezt a vakcinát VAC-CCS-nek neveztük.

A harmadik vakcina előállításához a Supe-rose–12 oszlopról nyert összegyűjtött és koncentrált 19–31. frakciókat (2 mg protein/ml) Diluvac Forte® adjuvánssal egyesítettük, míg homogén szuszpenziót nem kaptunk. A 19–31. frakciók tartalmazták a *S. suis* törzs által termelt extracelluláris proteinek többségét, de lényegében mentesek voltak hemolizintól. Ezt a vakcinát VAC-SCF-nek neveztük.

A negyedik vakcinát a tenyészet felülszójának egy 0,2 mikrométer átmérőjű szűrőn való átszűrésével, majd 16 órán át, 0 °C-on, 60%-os telített (NH₄)₂SO₄-oldattal való kicsapásával állítottuk elő. Centrifugálást követően az üledéket PBS-ben szuszpendáltuk, hogy a tenyészet felülszójához képest körülbelül 100-szorosra koncentrált készítményt kapjunk.

Placebovakcinát az előzőekben ismertetettek szerint készítettünk, azzal az eltéréssel, hogy az antigénoldatot 40 mmol/l koncentrációjú foszfátpufferes fiziológiai sóoldattal (pH 7,2) helyettesítettük.

A B10 jelzésű törzsből a vakcinát az előbbiekben ismertetett módon, 16 órán át, 0 °C-on, 60%-os telített (NH₄)₂SO₄-oldattal való kicsapással állítottuk elő.

Az EF-vakcinát a P1/7 törzs tenyészetének felülszójából hidrofób interakciós kromatográfiával (Phenyl Sepharose magasán szubsztituált, gyors átfolyású oszlop) állítottuk elő csökkenő koncentrációjú (NH₄)₂SO₄-gradiens alkalmazásával.

A végső, tisztított EF-készítmény (dialízist és hígítást követően) körülbelül 150 mikrogramm/ml EF-t tartalmazott. SDS-PAGE és Coomassie festés alapján a készítmény tisztasága 95%-nál nagyobb volt.

Antisérum

A tisztított hemolizin ellen termelt fajlagos poliklonális sertésantisérumot (P399) a következő módon állítottuk elő. Négyhetes korú malacokat izomba adva (nyakizomba) immunizáltunk 2 ml VAC-SLY vakcinával. Két héttel az első immunizálást követően a malacokat azonos (mennyiségű) vakcinával és azonos módon adagolva megerősítő vakcinázásban részesítettük. A megerősítő oltást követően két héttel a malacokat elvéreztettük, és a szérumot –20 °C-on tároltuk.

Vizsgálat védettség létrehozására egérben

Négyhetes korú Balb–C-egereket 4 csoportba osztottunk, és bőr alá adva 0,5 ml VAC-CCS, VAC-SCF és VAC-SLY, illetve placebovakcinával vakcináztunk. Két héttel az első immunizálást követően az egereket azonos vakcinákkal és azonos módon adagolva megerősítő vakcinázásban részesítettük. A megerősítő oltást követően két héttel az egereket hasüregbe adagolva a P1/7 törzs Todd–Hewitt-levestáptalajban 6 órán át szaporított, milliliterenként 4 × 10⁹ telepképző egységet tartalmazó tenyészetével (0,5 ml) fertőztük. A fertőzést követően a mortalitást 7 napig feljegyeztük.

Eredmények

A fertőzést követően a placebóval vakcinázott egerek 3 napon belül elpusztultak, míg a VAC-CCS, valamint a VAC-SLY vakcinákkal vakcinázottak teljesen

védettnek tűntek (lásd a 3. táblázatot). A VAC-SCF vakcina csak részleges védetséget hozott létre. Ez a vakcina tartalmazta a P1/7 törzs extracellulárisan kiválasztott antigénjeinek többségét, azonban lényegében mentes volt hemolizintól.

Következtetés

Arra a következtetésre jutottunk, hogy a találmány szerinti tisztított hemolizint tartalmazó vakcina egerekben védetséget hoz létre. Ez arra utal, hogy a hemolizin virulenciafaktor, és ennek az egyetlen virulenciafaktornak a neutralizációja elegendő az egerekben a 2-es szerotípusú *Streptococcus suis*-fertőzés káros hatásai elleni védetség létrehozásához.

Heterológ védetség létrehozása egérben

Kísérleti állatok

Az Iffa Credo által szállított Balb/c egereket (4 hetes korúak) használtunk.

A kísérlet menete

30 egérből álló csoportokat (2×15) első alkalommal az illető vakcina 0,4 ml-ét bőr alá adva vakcináztunk vagy (egy 30 egérből álló csoportot) vakcinázás nélkül hagyottunk, amint azt a 6. táblázat mutatja. Négy héttel a vakcinázást követően a csoportba tartozó állatok felét hasüregbe adagolva a B10 jelzésű (1-es szerotípusú), a másik felét pedig a P1/7 (2-es szerotípusú) törzs hatórási tenyészetének 0,5 ml-ével fertőztük. A mortalitást 7 napon át feljegyeztük. A B10 jelzésű törzs egerekben alacsonyabb patogenitással (körülbelül 20%-os mortalitás) rendelkezik, mint a P1/7 törzs (100%-os mortalitás). Ezért a B10 törzsszel fertőzött csoportban a megbetegedett egerek számát is feljegyeztük. A fertőzést megelőzően vérmintákat vettünk, és a csoportból összegyűjtött szérumokat immunlenyomat-vizsgálattal vizsgáltuk.

Eredmények

A hemolizinvizsgálatban a B10 törzs (1-es szerotípus) tenyészetének felülúszója 29.5 titerű hemolitikus aktivitással rendelkezett, míg a P1/7 törzs (2-es szerotípus) hemolitikus aktivitásának titere 2^7 volt. Tehát a B10 jelzésű törzs körülbelül 5-ször magasabb hemolitikus aktivitással rendelkezett, mint a P1/7 törzs.

SDS-PAGE és Coomassie festés szerint mind a B10, mind a P1/7 törzs tenyészetének koncentrált felülúszója tartalmazta az 54 kilodalton molekulatömegű proteint (SLY), és a B10 törzs tenyészetének koncentrált felülúszója, összhangban annak magasabb aktivitásával több, 54 kilodalton molekulatömegű proteint tartalmazott. A tisztított EF nem tartalmazta az 54 kilodalton molekulatömegű proteint. Fertőzést követően kitudt, hogy a mindkét tenyészet felülúszóját tartalmazó vakcina homológ és heterológ védetséget is létrehozott egerekben (lásd a 6. táblázatot). Amikor a csoportok összegyűjtött szérumait antigénként a P1/7, valamint B10 törzsek tenyészetének felülúszójának felhasználásával immunlenyomat-vizsgálattal vizsgáltuk, azt találtuk, hogy mindkét tenyészet-felülúszóból készült vakcina anti-SLY-ellenanyagok képződését váltotta ki (lásd a 6. táblázatot). A B10 törzs tenyészetének felülúszója ellen termelt szérummal erősebb reakciót kaptunk, mint a P1/7 törzs tenyészetének felülúszója ellen termelt szé-

rummal. Amikor heterológ immunlenyomat-vizsgálatot végeztünk (a B10 törzs tenyészetének felülúszója ellen termelt szérummal a P1/7 törzs tenyészetének felülúszója ellen, és a P1/7 törzs tenyészetének felülúszója ellen termelt szérummal B10 törzs tenyészetének felülúszója ellen), az 54 kilodalton molekulatömegű protein volt a fő vagy az egyetlen reaktív antigén.

Tisztított EF-fel vakcinázott egerek, bár bennük ellenanyag-termelés kiváltódott, nagy dózisok esetében sem váltak védetté sem homológ, sem heterológ fertőzéssel szemben (lásd a 6. táblázatot).

Következtetés

Mindkét tenyészet felülúszójából készült vakcina homológ és heterológ védetséget is létrehozott egerekben. Az a tény, hogy immunlenyomat-vizsgálatban heterológ vizsgálatot végezve az 54 kilodalton molekulatömegű protein az egyetlen vagy a fő reaktív antigén, világosan mutatja, hogy az SLY a keresztvédetséget létrehozó faktor egerekben.

Védetség létrehozása sertésben

A VAC-SLY, a VAC-SCF, valamint a placebovakcinát a fent ismertetett módon állítottuk elő.

A VAC-SLY 20 mikrogramm/ml tisztított hemolizint tartalmazott Diluvac Forte® adjuvánsban. A VAC-SCF (2 mg protein/ml) tartalmazta a *Streptococcus suis* legtöbb extracellulárisan kiválasztott proteinjét Diluvac Forte® adjuvánsban szuszpendálva, azonban lényegében mentes volt hemolizintól.

Négyhetes korú malacokat egyenként 3-3 malacot tartalmazó 3 csoportba osztottunk, és 2 ml VAC-SLY, VAC-SCF, illetve PLACEBO-vakcinával vakcináztunk (nyakizomba adva). Az első vakcinázást követően két héttel a malacokat azonos vakcinákkal és azonos módon adagolva megerősítő vakcinázásban részesítettük. A megerősítő oltást követően két héttel a malacokat intravénásan adagolva a P1/7 törzs Todd-Hewitt-levestáptalajban 6 órán át szaporított, milliliterenként 4×10^9 telepképző egységet tartalmazó tenyészetével (0,5 ml) fertőztük. Közvetlenül az első és a megerősítő vakcinázás előtt vérmintákat vettünk, és a szérumokat felhasználásig -20°C -on tároltuk.

Baktériumok újraizolálása

Boncolás közben mintákat vettünk az agyból, tüdőből és a lábtőcsontokból mint a leginkább érintett területekből. A baktériumnövekedést 0, 1, 2, 3, illetve 4 ponttal értékeltük, a növekedés mértékétől függően.

Eredmények

A fertőzést követően a PLACEBO-val vakcinázott sertésekben súlyos klinikai tünetek fejlődtek ki, amelyeket több ízületet érintő sántítás, elesettség és magas láz jellemzett. Három PLACEBO-val vakcinázott sertés közül kettőben idegrendszeri tünetek alakultak ki, és olyan súlyos állapotba kerültek, hogy el kellett pusztítani őket. A VAC-SCF-fel vakcinázott sertésekben ugyanazok a klinikai tünetek alakultak ki, mint a kontrollokban, azonban enyhébb mértékben. Ebből a csoportból egy sertésnél alakultak ki idegrendszeri tünetek, és el kellett pusztítani. A VAC-SLY-vel vakcinázott sertések voltak a legkevésbé érintettek. Az ebbe a csoportba tartozó sertések csak enyhe tüneteket mutattak, amelyek

gyorsabban elmúltak, mint a másik két csoport esetében. A klinikai eredményeket a 4. táblázat mutatja. Boncolásnál azt találtuk, hogy a PLACEBO-val vakcinázott sertésekben súlyos sokizületi gyulladás fejlődött ki, a legtöbb ízület érintettségével (lásd az 5. táblázatot). A VAC-SLY-val vakcinázott sertésekben szintén kialakult sokizületi gyulladás, azonban kisebb mértékben, miután a VAC-SLY-val vakcinázott sertésekben a legtöbb ízület normális volt (lásd az 5. táblázatot).

Streptococcus suis-t különböző szövetekből és különböző mennyiségben sikerült újraizolálnunk két PLACEBO-val vakcinázott sertésből, és mindhárom VAC-SCF-fel vakcinázott sertésből, azonban nem izoláltunk *Streptococcus suis*-t a VAC-SLY-val vakcinázott sertésekből (az „újraizolálási összpontszám” alatti számok az egyes csoportokba tartozó összes állatból izolált baktériumok relatív mennyiségét jelölik, lásd az 5. táblázatot).

Az agyminták szövettani vizsgálata (lásd az 5. táblázatot) agyhártyagyulladást mutatott ki két VAC-SCF-fel vakcinázott sertésnél és két PLACEBO-val vakcinázott sertésnél.

Következtetés

Bár a VAC-SLY-val vakcinázott sertéseknél néhány napig tartó klinikai tünetek jelentkeztek, ezek a tü-

netek lényegesen enyhébbek voltak, és rövidebb ideig tartottak, mint a VAC-SCF-fel vagy a PLACEBO-val vakcinázott sertéseknél. Boncolásnál a VAC-SLY-val vakcinázott sertéseknél a fibrines ízületi gyulladás enyhébb volt, és ritkábban volt megfigyelhető, mint a VAC-SCF-fel vagy a PLACEBO-val vakcinázott sertéseknél. Ezenkívül két SCF-fel, és 2 PLACEBO-val vakcinázott sertésnél találtunk agyhártyagyulladást, míg a VAC-SLY-val vakcinázott sertések közül egynél sem alakult ki agyhártyagyulladás. Továbbá a VAC-SLY-val vakcinázott sertéseknél a tüdők, ízületek és az agy sterilek voltak, míg a másik két csoportnál ezen szervek többségéből 2-es szerotípusú *Streptococcus suis*-t izoláltunk. Immunlenyomat-vizsgálatban a VAC-SLY-val vakcinázott sertések (a fertőzés napján levett) széruma a tenyészet teljes felülúszójából egyetlen, 54 kilodalton nagyságú proteinnek megfelelő antigéncsíkkal reagált, ami igazolta, hogy a hemolizin immunogén hatása és a hemolizinkészítmény nagymértékben tiszta volt.

Az eredmények arra utalnak, hogy a *Streptococcus suis*-hemolizin fontos faktor, és ennek az egyetlen faktornak a neutralizációja elegendő sertésekben *Streptococcus suis*-fertőzés káros hatásai ellen jelentős mértékű védetség létrehozására, és a különböző szerveknek/szöveteknek a baktériumtól való megtisztítására.

1. táblázat

Tisztított hemolizin aktivitása különböző kezeléseket követően

Kezelés	Kezelés idő tartama	Hemolizintiter 2-es alapú logaritmusban kifejezve	Hemolizintiter 2% merkaptó-etanol hozzáadását követően 2-es alapú logaritmusban kifejezve
-20 °C	7 nap	7	ND ^a
4 °C	7 nap	6	ND
20 °C	7 nap	3	ND
37 °C	7 nap	0	0
100 °C	5 perc	0	0
20 °C	10 perc	7	ND
Proteináz-K (20 µg/ml)	10 perc, 20 °C	0	ND
β-merkaptó-etanol (0,1%)	10 perc, 20 °C	12	ND
H ₂ O ₂ (0,1%)	10 perc, 20 °C	0	12
TLCK (0,1%)	10 perc, 20 °C	2	6
Koleszterol (0,1%)	10 perc, 20 °C	0	0

^aND=nincs meghatározva

2. táblázat

Hemolizinaktivitású molekulák előfordulása különböző *S. suis* törzsek tenyészetének felülúszójában

Törzs	Szerotípus	Referenciatorzs (R)	Fenotípus ^a	2log hemolizintiter	Hemolizin-aktivitás gátlása 0.1% koleszterinnel	Reverzibilis inaktiváció, oxidáció és redukció hatására	A hemolizin gátlóhatósága a P399-es szérummal	Az 54 kD kimutathatósága immunlenyomat-technikával
S428	1	R		5	+	+	+	+
RS 2651	1/2	R		6	+	+	+	+
R735	2	R	MRP+EF-	5	+	+	+	+

2. táblázat (folytatás)

Törzs	Széro-típus	Referen-ciatörzs (R)	Fenotípus ^a	2log hemoli-zintiter	Hemolizin-aktivitás gátlása 0,1% koleszterinnel	Reverzibilis in-aktiváció, oxidá-ció és redukció hatására	A hemolizin gátlhatósága a P399-es szérummal	Az 54 kD kimutathatósága immunlenyomat-technikával
PI/7	2		MRP+EF+	8	+	+	+	+
688/9	2		MRP+EF+	6	+	+	+	+
4005	2		MRP+EF+	5	+	+	+	+
D282	2		MRP+EF+	7	+	+	+	+
3921	2		MRP+EF-	4	+	+	# ^c	-
3977	2		MRP+EF-	2	+	+	#	-
3889	2		MRP-EF-	6	+	+	+	+
T-15	2		MRP-EF-	6	+	+	+	+
4961	3	R		0	ND ^d	ND	ND	-
6407	4	R		4	+	+	+	-
11538	5	R		4	+	+	#	-
2524	6	R		2	+	+	#	-
8074	7	R		0	ND	ND	ND	-
10681	7			0	ND	ND	ND	-
10727	7			0	ND	ND	ND	-
14391	7			2	ND	ND	ND	-
14636	8	R		5	+	+	+	-
NV92109	8			3	+	+	#	-
22083	9	R		0	ND	ND	ND	-
220891KM	9			3	+	+	#	-
4417	10	R		2	+	+	#	+
12814	11	R		2	+	+	#	-
8830	12	R		0	ND	ND	ND	-
10581	13	R		2	+	+	#	-
13730	14	R		6	+	+	+	+
220891GV	14			6	+	+	+	+
T639	15	R		6	+	+	+	+
2726	16	R		0	ND	ND	ND	-
93A	17	R		4	+	+	+	-
NT77	18	R		6	+	+	+	+
42A	19	R		3	+	+	+	+
865192	20	R		0	ND	ND	ND	-
14A	21	R		0	ND	ND	ND	-
88/1861	22	R		2	+	+	#	-

^{a)} A 2-es típusú törzsek esetében a Vecht és munkatársai (26, 27) által használt fenotípusokat használtuk

^{b)} A hemolitikus aktivitás titrálása, annak gátlása 0,1% koleszterinnel a hemolitikus aktivitás reverzibilis gátlása H₂O₂ és β-merkaptó-etanolal és a hemolitikus aktivitás gátlása P399-es fajlagos sertésszérummal és az M 189-es fajlagos egérszérummal végzett immunlenyomat-vizsgálat menetét az anyagok és módszerek fejezetben szerepelnek

^{c)} A vizsgálat a túl alacsony hemolitikus aktivitás miatt nem értékelhető (lásd a leírást)

^{d)} ND=nem végeztük el

3. táblázat

Különböző vakcinákkal való immunizálás hatása P1/7 *S. suis* törzsszel fertőzött egerek túlélésére

Vakcina	Túlélési arány
VAC-CCS ^a	9/9
VAC-SCF ^b	6/10
VAC-SLY ^c	10/10
Placebo	0/10

^a: koncentrált tenyésztési folyadékot tartalmazó vakcina^b: a Superose oszlopról eluált 19–31 frakciókat tartalmazó vakcina^c: a tisztított suilysint tartalmazó vakcina

4. táblázat

Összefoglaló táblázat, amely számszerűen tartalmazza a klinikai megfigyeléseket a fertőzés napján, majd a fertőzés utáni 1–7. napon

Vakcina	Klinikai megfigyelések a fertőzés utáni napokon								
	0	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5	6	7	Összes
VAC-SLY	0	3,7	3	1,7	0,8	0,3	0,3	0,3	10,2
VAC-SCF	0	4,7	4,2	5,5	5,5	5	4,7	4,7	34,3
Placebo	0	5,7	5,8	6	7,8	7,7	7,3	7,7	48

^a) Az 1–4. napon történt megfigyelések két vizsgálat átlagát jelentik (dél előtt és délután)

5. táblázat

Összefoglaló táblázat, amely a boncolás napján észlelt klinikai tüneteket, a boncoláskor észlelt makroszkópos megfigyeléseket, a kórokozó visszaizolálását és az agyhártyagyulladásos tünetek előfordulását mutatja

Vakcina	Boncolás a fertőzés utáni napon	Ízületi gyulladás	A kórokozó visszaizolálása	Agyhártyagyulladás
VAC-SLY	7	3,5	0	0
VAC-SCF	7	8	7	2
Placebo	4	12	9	2

6. táblázat

Heterológ védettség kísérlet eredménye egerekben. 15 egerből álló csoportokat vakcináztunk különböző vakcinák 0,4 ml-ével GNE adjuvánsban. Az immunizálás után az egereket intraperitoneálisan fertőztük a P1/7 és a B10 törzsek 6 órás tenyészetének 0,5 ml-ével (3×10^9 baktérium/ml). A fertőzés előtt vérmintákat vettünk, és az állatcsoportok kevert szérumát immunlenyomat-technikával vizsgáltuk anti-SLY- és anti-EF-ellenanyagok jelenlétére a P1/7 és a B10 törzsek felülűszóit használva

A vakcina hatóanyaga	P1/7 ráfertőzés utáni elhullás	B10 ráfertőzés utáni eredmények		SLY-antigén jelenléte a vakcinában SDS-PAGE és Coomassie festés alapján	Anti-SLY ellenanyag jelenléte a kísérleti csoportok összegyűjtött szérumában immunlenyomat-vizsgálattal a P1/7 és a B10 felülűszókat használva antigénként,		EF jelentése a vakcinában SDS-PAGE és Coomassie festés alapján	Anti-EF-ellenanyag jelenléte az összegyűjtött szérumokban immunlenyomat-technikával vizsgálattal a P1/7 felülűszóit, illetve a B10 felülűszóit használva antigénként	
		Elhullás	Megbetegedési index a fertőzés utáni 3. napon						
B10	4	1	3	++	++	+++	–	–	–
P1/7	9	0	0	+	+	++	++	+	–
P1/7 EF	14	1	17	–	–	–	+++	+	–
Kontroll	15	3	21	–	–	–	–	–	–

Az ábrák rövid ismertetése

Az 1. ábra SDS-PAGE-vizsgálatot mutat, az A csík alacsony molekulatömegű jelzőproteineket, a B csík koncentrálttenyészet-felülúszót, a C csík tisztított *Streptococcus suis*-hemolizint, a D csík nagy molekulatömegű jelzőfehérjéket mutat. A gél Coomassie brilliant kék festékkel festettük. A bal, illetve jobb oldalon található számok a jelzőfehérjék molekulatömegét jelölik.

A 2. ábra 2-es szerotípusú *Streptococcus suis* P1/7 törzstenyészet koncentrált felülúszójából végzett Superose-12-kromatográfia elúciós profilját mutatja. A folyamatos vonal a 280 nanométeren mért fényelnyelést, a szaggatott vonal a hemolizintitert jelöli.

A 3. ábra Western lenyomatvizsgálatot mutat. Az A csík jelzőproteineket, a B csík a P1/7 törzs tenyészetének koncentrált felülúszóját, a C–N. csíkok Superose-12-oszlopról lejött frakciókat mutatnak. C csík: 15. frakció; D csík 18. frakció; E csík: 20. frakció; F csík: 23. frakció; G csík: 26. frakció; H csík: 28. frakció; I csík: 30. frakció; J csík: 32. frakció; K csík: 34. frakció; L csík: 36. frakció; M csík: 38. frakció; N csík: 40. frakció.

A jelzőproteineket (A csík) Coomassie brilliant kékkel festettük. A *Streptococcus suis*-antigéneket (B–N csíkok) nyúlserummal reagáltattuk, majd kecskében termelt antinyúlkonjugátummal és diamino-benzidinszubsztráttal előhívtuk a színreakciót. A jelzőproteinek molekulatömegét az ábra bal oldalán jelöltük.

SZEKVENCIALISTA

(1) Általános információ:

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

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. *Streptococcus suis*-polipeptid, azzal jellemezve, hogy az említett polipeptid körülbelül 54 kilodalton molekulatömeggel rendelkezik, tiollal aktiválható, koleszterinnel gátolható, natív formájában hemolitikus aktivitással rendelkezik, vagy az említett polipeptidnek az említett polipeptid elleni immunválasz kiváltására képes része.

2. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, azzal jellemezve, hogy az említett polipeptid N-terminális aminosavszekvenciája Asp-Ser-Lys-Gln-Asp-Ile-Asn-Gln-Tyr-Phe-Gln-Tyr-Phe-Gln-Ser-Leu-Thr-Tyr-Glu vagy ennek egy része.

3. Sertésekben *Streptococcus suis*-fertőzés ellen védetség létrehozására képes vakcina, azzal jellemezve, hogy egy, az 1. vagy 2. igénypont szerinti polipeptidet és adott esetben egyéb *Streptococcus suis*-immunogén anyagot is tartalmaz.

4. Vakcina sertések immunizálására, azzal jellemezve, hogy valamely 1. vagy 2. igénypont szerinti polipeptidet, adott esetben egyéb *Streptococcus suis*-immunogén anyagot, valamint sertéskórokozó vírusokból

(i) Bejelentő: Akzo N.V.

Levelezési cím:

(A) Címzett: Akzo N.V.

(B) Utca: Velperweg 76

(C) Város: Arnhem

(E) Ország: Hollandia

(F) Irányítószám: 6824 BM

(ii) Bejelentés címe: *Streptococcus suis*-fertőzés elleni vakcina

(iii) Szekvenciák száma: 1

(iv) Komputerrel olvasható forma:

(A) Hordozó típusa: floppy disk

(B) Komputer: IBM PC-kompatibilis

(C) Operátorszoftver: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: Patent In Release #1,0, #1,25 verzió (EPO)

(2) Információk az 1. szekvenciához:

(i) Szekvenciajellemzők:

(A) Hossz: 16 aminosav

(B) Típus: aminosav

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa: protein

(iii) Hipotetikus: nem

(v) Fragmentstípus: N-terminális

(vi) Eredeti forrás:

(A) Organizmus: *Streptococcus suis*

(B) Törzs: P1/7

(C) Egyedi izolátum: –

(vii) Közvetlen forrás: –

(B) Klón: –

(xi) Szekvencia leírása: 1. szekvencia:

vagy mikroorganizmusokból származó további immunogén anyagot tartalmaz.

5. A 3. vagy 4. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy a polipeptid egy hordozóanyaghoz van kötve.

6. Az 5. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy a hordozóanyag egy tokpoliszacharid.

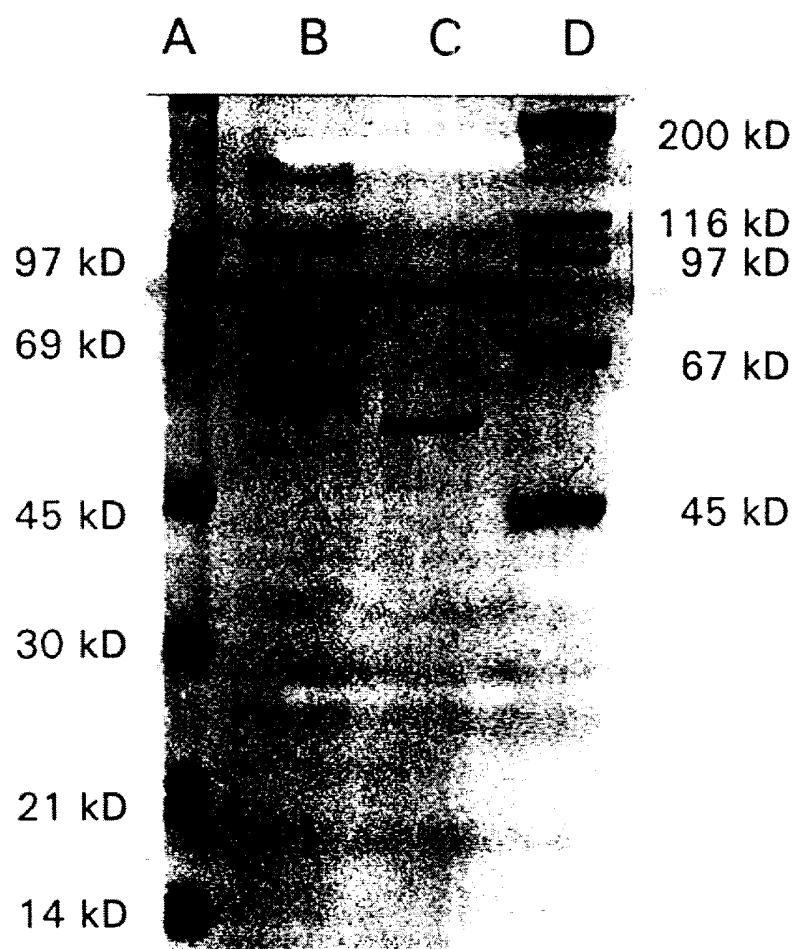
7. A 3–6. igénypontok bármelyike szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy egy adjuvánst tartalmaz.

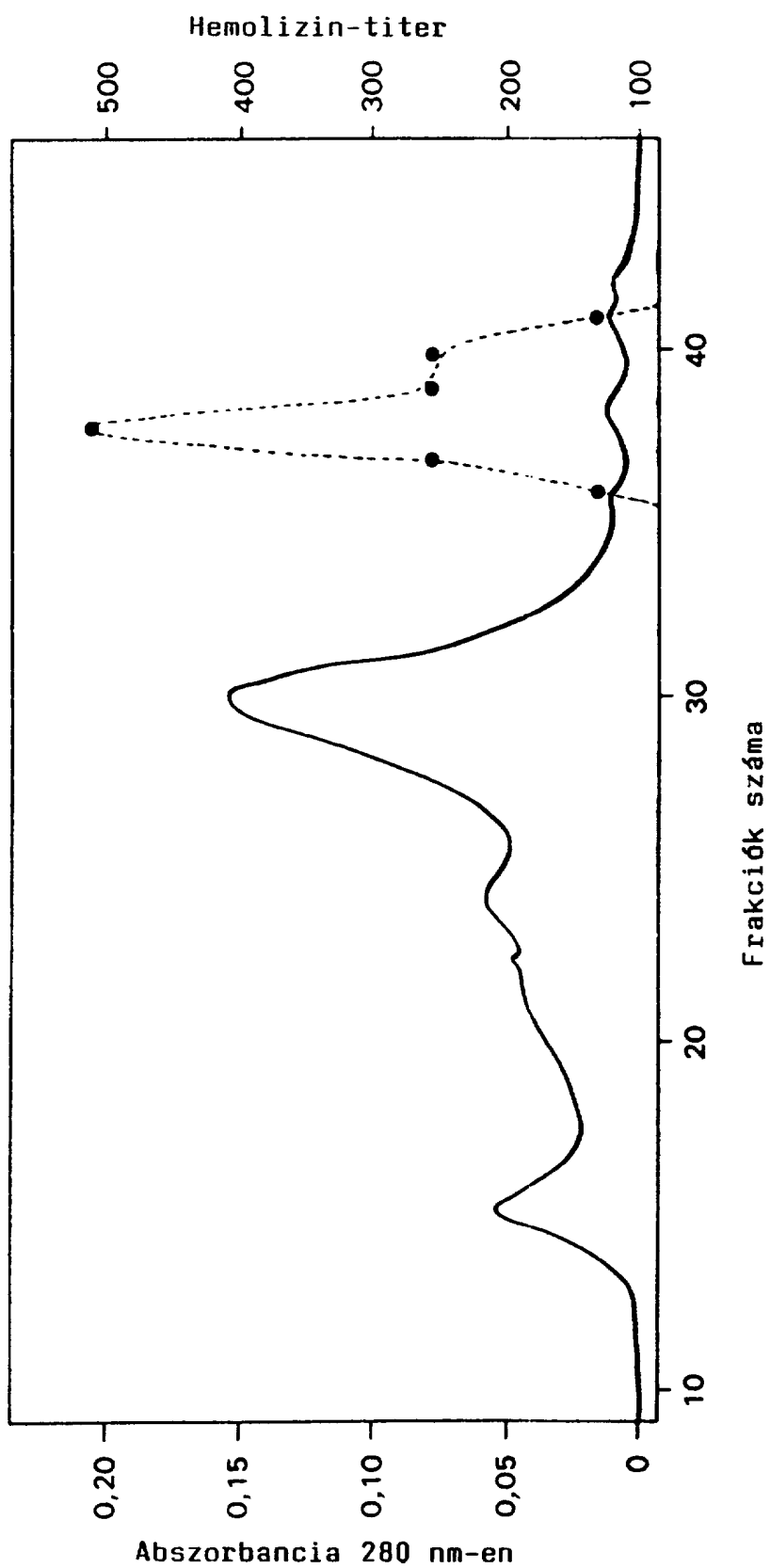
8. A 4. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy immunogénként a következő organizmusok közül valamelyiket tartalmazza: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, álveszettség vírusa, sertés-influenzavírus, sertésparvovírus, fertőző gyomor-bél hurut vírusa, rotavírus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, valamint *Bordetella bronchiseptica*.

9. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti polipeptiddel specifikusan reagáló ellenanyagok.

10. Eljárás emlősökben *Streptococcus suis*-fertőzés ellen védetséget létrehozni képes vakcina előállítására, azzal jellemezve, hogy valamely, az 1. vagy 2. igénypont szerinti polipeptidet egy gyógyszergyártásban elfogadott hordozóanyaggal, adjuvánssal és/vagy hígítóanyaggal összekeverve vakcinává alakítunk.

1. ábra





2. ábra

3. ábra

