

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239045**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424214**

(22) Data zgłoszenia: **09.01.2018**

(51) Int.Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

(54) **Epitop specyficzny dla zakaźnych *Streptococcus agalactiae* oraz sposób wykrywania zakażenia pacjenta szczepem *Streptococcus agalactiae***

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

15.07.2019 BUP 15/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

02.11.2021 WUP 31/21

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, Kraków, PL
INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOŚWIADCZALNEJ POLSKIEJ AKADEMII
NAUK, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

SABINA GÓRSKA, Jarosław, PL
EWA BRZOZOWSKA, Wrocław, PL
ANDRZEJ GAMIAN, Wrocław, PL
MONIKA BRZYCHCZY-WŁOCH, Kraków, PL
ANNA DOBRUT, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Rafał Witek

PL 239045 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest test diagnostyczny służący do wykrywania, w sposób wysoce specyficzny i czuły, zakażeń i nosicielstwa *Streptococcus agalactiae* (ang. *Group B Streptococcus*; GBS) u ludzi. W teście diagnostycznym wykorzystane są markery zwane dalej epitopami, które w teście immunoenzymatycznym rozpoznawane są przez przeciwciała ludzkie różnych klas (IgG, IgM i IgA) obecne w surowicy. W szczególności wynalazek dotyczy sposobu wykrywania zakażenia pacjenta szczepem *Streptococcus agalactiae* umożliwiającego potwierdzenie zakażeń u kobiet w ciąży, który to sposób wykorzystuje specyficzną reakcję białek immunoreaktywnych otrzymanych z izolatów klinicznych *Streptococcus agalactiae* z przeciwciałami obecnymi w surowicy pacjentek.

Streptococcus agalactiae, zaliczany do paciorkowców grupy serologicznej B (ang. *group B streptococcus* – GBS) może kolonizować dolny odcinek przewodu pokarmowego, odbytu i pochwy, nie wywołując żadnych objawów zakażenia. Potwierdzono, że GBS występuje w pochwie lub odbytnicy u około 10–30% ciężarnych kobiet. Kolonizacja ta może mieć charakter przejściowy, przewlekły lub przerywany. Jednakże, obecność paciorkowców grupy B w pochwie u kobiet ciężarnych stanowi istotny czynnik ryzyka wystąpienia zakażeń u noworodków. Do zakażenia wewnątrzmacicznego może dojść w trakcie trwania ciąży, drogą wstępującą, jak również na skutek zaaspirowania zakażonego płynu owodniowego przez płód. Może być to przyczyną zgonu wewnątrzmacicznego, zapalenia płuc w okresie noworodkowym lub posocznicy. Do kolonizacji noworodka może dojść także w czasie porodu, ale w tych przypadkach częściej, dochodzi tylko do bezobjawowej kolonizacji skóry oraz błon śluzowych, a nie do rozwoju zakażenia. Szybka diagnostyka w kierunku zakażeń wywołanych przez GBS jest niezbędna dla możliwości zastosowania celowanej antybiotykoterapii, jednakże obecnie na rynku brak jest testów diagnostycznych, umożliwiających potwierdzenie zakażeń wywołanych przez *Streptococcus agalactiae*.

W zgłoszeniu patentowym P.404498 zaprezentowano sekwencje czterech białek (NRID1, NRID2, NRID3, NRID4) należących do szczepów *Streptococcus agalactiae*, wywołujących zakażenia u ludzi, które były wysoce immunoreaktywne z surowicami osób, które przeszły zakażenie o etiologii GBS i nosicieli tych bakterii. Brak podobnej reaktywności zanotowano w przypadku surowic osób niezakażonych oraz niebędących nosicielami *S. agalactiae*.

Zgłoszenie EP20070825757 dotyczy polipeptydowych pochodnych epitopów białka należącego do *Streptococcus agalactiae* – GBS80 oraz użycie wspomnianego epitopu do celów diagnostycznych. Diagnostyka dotyczy zakażeń u zwierząt. Epitop polipeptydowy należy do sekwencji białka o nazwie ang. *cell wall surace anchore protein in GBS*. Są to odmienne epitopy polipeptydowe do tych ujętych niniejszym zgłoszeniem. Inny rodzaj epitopów, które mogą być narzędziem diagnostycznym zakażeń GBS oraz, które różnią się od tych opisywanych w niniejszym zgłoszeniu, ujęty został w zgłoszeniu nr PCT/IB2002/003059.

Celem wynalazku jest dostarczenie nowych metod wykrywania zakażeń wywołanych przez *Streptococcus agalactiae* oraz środków, które mogą być wykorzystane do realizacji takich metod.

Istota wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest epitop specyficzny dla zakaźnych *Streptococcus agalactiae* posiadający sekwencję aminokwasową wybraną spośród Sekw. Nr 3–15 oraz ich pochodnych wybranych spośród Sekw. Nr 16–27.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania zakażenia pacjenta szczepem *Streptococcus agalactiae*, charakteryzujący się tym, że w pobranej od pacjenta próbce sprawdza się obecność epitopu posiadającego sekwencję aminokwasową wybraną spośród Sekw. Nr 3–15 lub przeciwciał specyficznych wobec epitopu posiadającego sekwencję aminokwasową wybraną spośród Sekw. Nr 3–15 lub przeciwciał specyficznych wobec pochodnej epitopu posiadającej sekwencję aminokwasową wybraną spośród Sekw. Nr 16–27, przy czym obecność tego epitopu lub takich przeciwciał świadczy o zakażeniu pacjenta szczepem *Streptococcus agalactiae*.

Korzystnie, badanie przeprowadza się z wykorzystaniem znanych metod immunochemicznych, zwłaszcza Western Blotting lub ELISA.

Równie korzystnie, jako badaną próbkę wykorzystuje się surowicę ludzką, zwłaszcza w rozcieńczeniu 500 – 10000 razy.

W szczególnej realizacji obecność epitopu lub przeciwciał świadczy o nosicielstwie przez pacjenta szczepu *Streptococcus agalactiae*.

Szczegółowy opis

Ujawnione zostały sekwencje aminokwasowe dwóch białek immunoreaktywnych chorobotwórczych szczepów *Streptococcus agalactiae*, a mianowicie NRID5 i NRID6 (Sekw. Nr 1 i 2, Fig. 1), a także, co najmniej, 13 epitopów rdzennych, wchodzących w skład sekwencji aminokwasowych poznanych białek immunoreaktywnych (tj. NRID2, NRID4, NRID5 i NRID6) pochodzących z klinicznych szczepów *Streptococcus agalactiae* (Tab. 2). Epitopy polipeptydowe oznaczono kolejno symbolami Ep1 – Ep13 (Tab. 1). Przy czym, w wyniku modyfikacji epitopów rdzennych uzyskano epitopy pochodne rozpoznawane przez ludzkie przeciwciała z możliwie największą swoistością. Modyfikacja polega na skracaniu od N i/lub C-końca epitopów rdzennych oraz/lub podstawieniu jednego innym aminokwasem (Tab. 4, Fig. 4). Nieoczekiwanie, niektóre modyfikacje doprowadziły do uzyskania epitopów o wyższej immunoreaktywności niż obserwowana dla epitopu naturalnego.

Białka o sekwencjach oznaczonych NRID5 i NRID6 nieoczekiwanie okazały się być wysoce immunoreaktywnymi białkami produkowanymi przez szczepy *Streptococcus agalactiae* wywołujące zakażenia u ludzi. Białka te powodują naturalną immunizację, co manifestuje się ich wysoką immunoreaktywnością z surowicami osób zakażonych GBS oraz nosicieli tych bakterii (patrz Tab. 3). Brak podobnej reaktywności zanotowano w przypadku surowic osób niezakażonych oraz niebędących nosicielami *Streptococcus agalactiae* (patrz Fig. 2).

Ujawniony sposób jest rozwiązaniem umożliwiającym szybką, czułą i specyficzną diagnostykę zakażenia i nosicielstwa wywołanego przez *Streptococcus agalactiae*. Nowatorskim podejściem w opracowanym teście jest wykorzystanie epitopów pojedynczo i/lub w kombinacji, które są rozpoznawane przez przeciwciała ludzkie. Epitopy Ep1 – Ep13 oraz ich pochodne mogą dalej posłużyć do wytworzenia wysoce specyficznych przeciwciał monoklonalnych.

Ujawniony sposób obejmuje metody immunochemiczne, takie jak np. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

W korzystnej realizacji sposób według wynalazku obejmuje następujące etapy:

- a) Płytki 96-cio dołkowe opłaszczają się epitopem pojedynczym i/lub w kombinacji po kilka epitopów immunoreaktywnych, będącymi markerami zakażeń i/lub nosicielstwa szczepów *Streptococcus agalactiae*, korzystnie w stężeniu 1,0–100 µg/ml w buforze o pH zasadowym. Poddaje się reakcji blokowania wolnych miejsc przy użyciu czynnika blokującego, korzystnie 0,5–5,0% BSA w buforze fosforanowym.
- b) Przeprowadza się reakcję z surowicą ludzką rozcieńczoną 500–10000 razy, inkubuje na kołyszce w 37°C przez godzinę, odmywa się nadmiar przeciwciał przy użyciu buforu fosforanowego z detergentem, korzystnie z Tween-20 w stężeniu 0,01–0,5%.
- c) Wykonuje się reakcję z koniugatem przeciwciał antyludzkich z zasadową fosfatazą w rozcieńczeniu 500–10000 razy na kołyszce w 37°C przez 1 godzinę. Nadmiar koniugatu odmywa się przy użyciu buforu fosforanowego z Tween-20.
- d) Test wizualizuje się przy użyciu substratów dla zasadowej fosfatazy.

Sposób według wynalazku został bliżej przedstawiony na przykładzie.

Przykład 1

Określenie immunoreaktywności epitopów z wykorzystaniem metody PEPSCAN [J. Mark Carter 1996]

Bibliotekę kilkudziesięciu epitopów uzyskano w wyniku syntezy chemicznej na polietylenowych pinach (NCP Block of 96 gears – Mimotopes, nr kat.: MIA10750001) z wykorzystaniem Fmoc pochodnych aminokwasów wg procedury:

1. DEPROTEKCJA – piny inkubowano w 20% roztworze piperydyny (PIP) rozpuszczonej w dimetyloformamidzie (DMF) przez 1 godzinę.
2. PŁUKANIE – piny płukano jednokrotnie w DMF przez 2 minuty, następnie czterokrotnie w metanolu (MeOH) przez 2 minuty i osuszano.
3. SPRZĘGANIE (acylacja aminokwasów) – piny aktywowano w DMF przez 5 minut, a następnie sprzęgano z 60 mM pochodną aminokwasu rozpuszczoną w DMF z 65 mM 1-hydroksy-7-azabenzotriazolem (HoAt) i 60 mM diisopropylkarbodiimidem (DIC) i 50 µM błękitem bromofenolowym, stosowanym jako indykator końca reakcji acylacji. Aminoacylacja prowadzona była w temperaturze pokojowej (~22°C) przez całą noc lub przez 4 godziny w szczelnie zamkniętym naczyniu, aby zapobiec parowaniu roztworu.
4. PŁUKANIE

Wariant A: jeżeli synteza była kontynuowana piny jednokrotnie płukano w MeOH przez 5 minut, suszono na powietrzu przez 5 minut, a następnie inkubowano przez 5 minut w DMF.

Wariant B: przy zakończeniu syntezy piny jednokrotnie płukano w MeOH przez 5 minut, suszono na powietrzu przez 5 minut, następnie inkubowano w DMF przez 5 minut. Po jej zakończeniu piny dwukrotnie płukano w MeOH przez 2 minuty i suszono na powietrzu przez 30 minut.

5. ELONGACJA – polegała na cyklicznym powtarzaniu etapów 1–4.
6. N-ACETYLACJA (opcjonalnie) – acetylację grup α -aminowych zsyntetyzowanych peptydów prowadzono w dołkach płytki polietylenowej za pomocą koktajlu acetylującego (3% bezwodnik octowy, 0,5% N,N-diizopropylodetyloamina (DIEA) rozpuszczone w DMF) przez 90 minut.
7. PŁUKANIE – piny jednokrotnie płukano w MeOH przez 10 minut i suszono na powietrzu przez 15 minut.
8. ODBLOKOWANIE / USUNIĘCIE GRUP BOCZNYCH – boczne grupy blokujące usuwano z aminokwasów poprzez 3–4 godziną inkubację w łaźni z koktajlem odblokującym (2,5% anizol, 2,5% 1,2 ditioetan w kwasie trifluoroctowym (TFA)).
9. PŁUKANIE – piny jednokrotnie płukano w MeOH przez 10 minut po czym inkubowano je w roztworze kwasu octowego (0,5% kwasu octowego, 50% MeOH rozcieńczonych w wodzie) przez 60 minut. Następnie piny dwukrotnie płukano w MeOH przez 2 minuty i suszono przez noc nad żywicą osuszającą.
10. DYSRUPCJA – piny umieszczono w sonikatorze wypełnionym buforem do dysrupcji (1% siarczan dodecyl sodu, 0,1% 2-merkaptioetan, 0,1 M fosforan sodu; pH 7,2) podgrzany do temperatury ok. 60°C i sonikowano przez 10 minut (7 kW/25 kHz). Następnie piny usuwano z buforu i opłukiwano w wodzie ogrzanej do 60°C.

Po dysrupcji piny przechowywano w warunkach bezwodnych (np. w obecności substancji pochłaniającej wodę lub w eksykatorze w warunkach próżniowych) lub używano bezpośrednio do ELISA.

Przykład 2

Test ELISA [Andersson, et al., 1989]

1. Syntetyczne epitopy na pinach zanurzano w buforze blokującym Tris/HCl z Tween 20 (TBS-T) zawierającym 1% BSA i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.
2. Piny przemywano trzykrotnie buforem TBS-T przez 5 minut.
3. Po odplukaniu piny inkubowano w roztworze surowicy ludzkiej rozcieńczonej 1:1000 przez 2 godziny w temperaturze pokojowej.
4. Piny przemywano trzykrotnie buforem TBS-T przez 5 minut.
5. Piny zanurzono w roztworze z przeciwciałami kozimi anty-ludzkimi sprzężonymi z alkaliczną fosfatazą rozcieńczonymi 1:10 000 i inkubowano przez 1 godzinę.
6. Piny przemywano trzykrotnie buforem TBS-T przez 5 minut.
7. Po przemyciu, piny zanurzono w roztworze z substratem dla alkalicznej fosfatazy i przez 30 minut wywoływano barwną reakcję.
8. Piny wyjmowano i odczytano absorbancję przy $\lambda = 405$ nm.

Przykład 3

Synteza na żywicy Wangę metodą Fmoc stosowana do uzyskania epitopów rdzennych oraz ich modyfikowanych pochodnych [Bachem, 2016]

1. Żywicę aktywowano w 20% roztworze piperydyny (PIP) rozcieńczonej w dimetyloformamidzie (DMF) przez 15 minut.
2. Żywicę sześciokrotnie opłukiwano 2 ml DMF.
3. Do żywicy przyłączano kolejne aminokwasy, dodając odpowiednią ich ilość określoną według wzoru:

$$m_{\text{związku}} = n_{(\text{miejsca aktywne})} \cdot 2,5 \text{ eq} \cdot M_{\text{związku}}$$

oraz 43,7 μ l 1-hydroksy-7-azabenzotriazolu (HoAt) i 43,9 μ l diisopropylodkarbodiimidu (DIC). Inkubację prowadzono od 6 do 36 godzin w zależności od charakteru przyłączanego aminokwasu.

4. Żywicę sześciokrotnie opłukiwano 2 ml DMF.
5. Etapy 2–4 powtarzano cyklicznie do momentu uzyskania peptydu o pożądanej sekwencji.
6. Peptyd usuwano z żywicy przy użyciu 95% roztworu kwasu trifluoroctowego (TFA) rozpuszczonego w wodzie.
7. Peptyd wytrącano eterem i wirowywano, następnie rozpuszczano w wodzie i liofilizowano.

Wyniki i wnioski

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów zidentyfikowano 13 epitopów rdzennych (Tab. 1), które w sposób wysoce specyficzny rozpoznawane były przez ludzkie przeciwciała obecne w surowicy krwi pępowinowej pacjentek zakażonych i/lub nosicielek GBS (GBS+). Reakcji nie obserwowano z surowicą osób GBS negatywnych (GBS-) (Fig. 3).

Modyfikacje polegające na podstawianiu poszczególnych aminokwasów m.in. alaniną, czy glicyną oraz biotynylacja peptydów spowodowały wzrost immunoreaktywności w granicach od 7 do 80%, co jest rezultatem nieoczywistym (Fig. 4). Wykazano również, że użycie w teście kombinacji pochodnych epitopów po dwa i/lub trzy, zwiększa specyficzność w reakcji z przeciwciałami krwi pępowinowej do ok. 40% w stosunku do pojedynczego epitopu.

PIŚMIENNICTWO:

Andersson G., Ekre H.P., Alm G., Perlmann P. Monoclonal antibody two-site ELISA for human IFN-gamma. Adaptation for determinations in human serum or plasma. *J Immunol Methods*. 1989; 125: 89–96.

Solid phase synthesis Bachem (002363) published by Global Marketing, Bachem Group, February 2016.

Carter J.M. Epitope Mapping of a Protein Using the Geysen (PEPSCAN) Procedure. *The Protein Protocols Handbook*; 1996, Part V, 581–593.

SEQLTX.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Uniwersytet Jagielloński

<120> Test diagnostyczny do wykrywania zakażeń i/lub nosicielstwa
Streptococcus

<130> PK/4506/RW

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 493
<212> PRT
<213> Streptococcus agalactiae

<400> 1

Met Ser Asn Trp Asp Thr Lys Phe Leu Lys Lys Gly Phe Thr Phe Asp
1 5 10 15

Asp Val Leu Leu Ile Pro Ala Glu Ser His Val Leu Pro Asn Glu Val
 20 25 30

Asp Met Asn Thr Lys Leu Ala Asp Asn Leu Thr Leu Asn Ile Pro Ile
 35 40 45

Ile Thr Ala Ala Met Asp Thr Val Thr Asp Ser Lys Met Ala Ile Ala
 50 55 60

Ile Ala Arg Ala Gly Gly Leu Gly Ile Ile His Lys Asn Met Ser Ile
65 70 75 80

Val Asp Gln Ala Glu Glu Val Arg Lys Val Lys Arg Ser Glu Asn Gly
 85 90 95

Val Ile Ile Asp Pro Phe Phe Leu Thr Pro Asp Asn Thr Val Ser Glu
 100 105 110

Ala Glu Glu Leu Met Gln Asn Tyr Arg Ile Ser Gly Val Pro Ile Val
 115 120 125

SEQLTX.txt

Glu Thr Leu Glu Asn Arg Lys Leu Val Gly Ile Ile Thr Asn Arg Asp
 130 135 140

Met Arg Phe Ile Ser Asp Tyr Lys Gln Leu Ile Ser Glu His Met Thr
 145 150 155 160

Ser Gln Asn Leu Val Thr Ala Pro Ile Gly Thr Asp Leu Glu Thr Ala
 165 170 175

Glu Arg Ile Leu His Glu His Arg Ile Glu Lys Leu Pro Leu Val Asp
 180 185 190

Asp Glu Gly Arg Leu Ser Gly Leu Ile Thr Ile Lys Asp Ile Glu Lys
 195 200 205

Val Ile Glu Phe Pro Lys Ala Ala Lys Asp Glu Phe Gly Arg Leu Leu
 210 215 220

Val Ala Gly Ala Val Gly Val Thr Ser Asp Thr Phe Glu Arg Ala Glu
 225 230 235 240

Ala Leu Phe Glu Ala Gly Val Leu Arg Lys Ile Val Ile Asp Thr Ala His
 245 250 255

Gly His Ser Ala Gly Val Leu Arg Lys Ile Ala Glu Ile Arg Ala His
 260 265 270

Phe Pro Asn Arg Thr Leu Ile Ala Gly Asn Ile Ala Thr Ala Glu Gly
 275 280 285

Ala Arg Ala Leu Tyr Asp Ala Gly Val Asp Val Val Lys Val Gly Ile
 290 295 300

Gly Pro Gly Ser Ile Cys Thr Thr Arg Val Val Ala Gly Val Gly Val
 305 310 315 320

Pro Gln Ile Thr Ala Ile Tyr Asp Ala Ala Ala Val Ala Arg Glu Tyr
 325 330 335

SEQLTX.txt

Gly Lys Thr Ile Ile Ala Asp Gly Gly Ile Lys Tyr Ser Gly Asp Ile
 340 345 350

Val Lys Ala Leu Ala Ala Gly Gly Asn Ala Val Met Leu Gly Ser Met
 355 360 365

Phe Ala Gly Thr Asp Glu Ala Pro Gly Glu Thr Glu Ile Phe Gln Gly
 370 375 380

Arg Lys Phe Lys Thr Tyr Arg Gly Met Gly Ser Ile Ala Ala Met Lys
 385 390 395 400

Lys Gly Ser Ser Asp Arg Tyr Phe Gln Gly Ser Val Asn Glu Ala Asn
 405 410 415

Lys Leu Val Pro Glu Gly Ile Glu Gly Arg Val Ala Tyr Lys Gly Ser
 420 425 430

Val Ala Asp Ile Val Phe Gln Met Leu Gly Gly Ile Arg Ser Gly Met
 435 440 445

Gly Tyr Val Gly Ala Ala Asn Ile Lys Glu Leu His Asp Asn Ala Gln
 450 455 460

Phe Val Glu Met Ser Gly Ala Gly Leu Lys Glu Ser His Pro His Asp
 465 470 475 480

Val Gln Ile Thr Asn Glu Ala Pro Asn Tyr Ser Val His
 485 490

<210> 2
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Streptococcus agalactiae

<400> 2

Met Ala Lys Asp Ile Lys Phe Ser Ala Asp Ala Arg Ser Ala Met Val
 1 5 10 15

Arg Gly Val Asp Ile Leu Ala Asp Thr Val Lys Val Thr Leu Gly Pro

SEQLTXT.txt

20

25

30

Lys Gly Arg Asn Val Val Leu Glu Lys Ala Phe Gly Ser Pro Leu Ile
 35 40 45

Thr Asn Asp Gly Val Thr Ile Ala Lys Glu Ile Glu Leu Glu Asp His
 50 55 60

Phe Glu Asn Met Gly Ala Lys Leu Val Ser Glu Val Ala Ser Lys Thr
 65 70 75 80

Asn Asp Ile Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Thr Gln
 85 90 95

Ala Ile Val Arg Glu Gly Leu Lys Asn Val Thr Ala Gly Ala Asn Pro
 100 105 110

Ile Gly Ile Arg Arg Gly Ile Glu Thr Ala Val Ser Ala Ala Val Glu
 115 120 125

Glu Leu Lys Glu Ile Ala Gln Pro Val Ser Gly Lys Glu Ala Ile Ala
 130 135 140

Gln Val Ala Ala Val Ser Ser Arg Ser Glu Lys Val Gly Glu Tyr Ile
 145 150 155 160

Ser Glu Ala Met Glu Arg Val Gly Asn Asp Gly Val Ile Thr Ile Glu
 165 170 175

Glu Ser Arg Gly Met Glu Thr Glu Leu Glu Val Val Glu Gly Met Gln
 180 185 190

Phe Asp Arg Gly Tyr Leu Ser Gln Tyr Met Val Thr Asp Asn Glu Lys
 195 200 205

Met Val Ser Glu Leu Glu Asn Pro Tyr Ile Leu Ile Thr Asp Lys Lys
 210 215 220

Ile Ser Asn Ile Gln Glu Ile Leu Pro Leu Leu Glu Glu Val Leu Lys

SEQLTXT.txt

435

440

445

Arg Gln Ile Ala Tyr Asn Ala Gly Tyr Glu Gly Ser Val Ile Ile Glu
 450 455 460

Arg Leu Lys Gln Ser Glu Ile Gly Thr Gly Phe Asn Ala Ala Asx Gly
 465 470 475 480

Glu Trp Val Asp Met Val Thr Thr Gly Ile Ile Asp Pro Val Lys Val
 485 490 495

Thr Arg Ser Ala Leu Gln Asn Ala Ala Ser Val Ala Ser Leu Ile Leu
 500 505 510

Thr Thr Glu Ala Val Val Ala Asn Lys Pro Glu Pro Glu Ala Pro Thr
 515 520 525

Ala Pro Ala Met Asp Pro Ser Met Met Gly Gly Phe
 530 535 540

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Streptococcus agalactiae

<400> 3

Arg Ala Ala Ala Asp Tyr Leu Glu Val Pro Leu Tyr Ser Tyr Leu Gly
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Streptococcus agalactiae

<400> 4

Asp Arg Ala Met Ile Ala Leu Asp Gly Thr Pro Asn Lys Gly
 1 5 10

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT

SEQLTX.txt

<213> Streptococcus agalactiae

<400> 5

Leu Thr Ala Ala Ile Thr Thr Val Leu Ala Arg Arg Leu Pro
1 5 10

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae

<400> 6

Gly Gln Val Leu Ala Lys Pro Gly Ser Ile Asn Pro His Thr Lys Phe
1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae

<400> 7

Val Val Lys Val Gly Ile Gly Pro Gly Ser Ile Cys Thr Thr Arg
1 5 10 15

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae

<400> 8

Gln Gly Arg Lys Phe Lys Thr Tyr Arg Gly
1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae

<400> 9

Lys Ala Phe Gly Ser Pro Leu Ile Thr Asn
1 5 10

SEQLTXT.txt

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Streptococcus agalactiae

<400> 10

Ala Gly Gly Val Ala Val Ile Lys Val Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Streptococcus agalactiae

<400> 11

Met Val Thr Thr Gly Ile Ile Asp Pro Val Lys Val
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Streptococcus agalactiae

<400> 12

Lys Leu Gln Glu Arg Leu Ala Lys Leu Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> Streptococcus agalactiae

<400> 13

Ala Ala Thr Glu Thr Glu Leu Lys Glu Met Lys Leu Arg
1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Streptococcus agalactiae

<400> 14

Lys Val Thr Arg Ser Ala Leu Gln Asn Ala

SEQLTX.txt
1 5 10

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Streptococcus agalactiae

<400> 15

Leu Gln Asn Ala Ala Ser Val Ala Ser Leu Ile Leu Thr Thr Glu
1 5 10 15

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> pochodna epitopu

<400> 16

Met Val Thr Thr Gly Ile Ile Asp Pro Val Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> pochodna epitopu

<400> 17

Met Val Thr Thr Gly Ile Ile Asp Pro Ala Lys
1 5 10

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> pochodna epitopu

<400> 18

SEQLTXT.txt

Met Val Thr Thr Gly Ile Ile Asp Ala Val Lys
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> pochodna epitopu

<400> 19

Met Val Thr Thr Gly Ile Ile Ala Pro Val Lys
1 5 10

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> pochodna epitopu

<400> 20

Met Val Thr Thr Gly Ile Ala Asp Pro Val Lys
1 5 10

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> pochodna epitopu

<400> 21

Met Val Thr Thr Gly Ala Ile Asp Pro Val Lys
1 5 10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>

SEQLTX.txt

<223> pochodna epitopu

<400> 22

Met	Val	Thr	Thr	Ala	Ile	Ile	Asp	Pro	Val	Lys
1				5					10	

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> pochodna epitopu

<400> 23

Met	Val	Thr	Ala	Gly	Ile	Ile	Asp	Pro	Val	Lys
1				5					10	

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> pochodna epitopu

<400> 24

Met	Val	Ala	Thr	Gly	Ile	Ile	Asp	Pro	Val	Lys
1				5					10	

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> pochodna epitopu

<400> 25

Met	Ala	Thr	Thr	Gly	Ile	Ile	Asp	Pro	Val	Lys
1				5					10	

<210> 26

<211> 11

Tabela 1. Polipeptydowe epitopy rdzenne *Streptococcus agalactiae*.

Symbol epitopu	Sekwencja aminokwasowa peptydu rdzennego	Nr identyfikacyjny białka
Ep1	RAAADYLEVPLYSYLG	NRID2
Ep2	DRAMIALDGTPNKG	NRID2
Ep3	LTAAITTVLARRLP	NRID4
Ep4	GQVLAKPGSINPHTKF	NRID4
Ep5	VKVGIGPGSICTTR	NRID5
Ep6	QGRKFKTYRG	NRID5
Ep7	KAFGSPLITN	NRID6
Ep8	AGGVAVIKVGAA	NRID6
Ep9	MVTTGIIDPVKV	NRID6
Ep10	KLQERLAKLA	NRID6
Ep11	AATETELKEMKLR	NRID6
Ep12	KVTRSALQNA	NRID6
Ep13	LQNAASVASLILTE	NRID6

Tabela 2. Charakterystyka klinicznych szczepów bakterii z gatunku *S. agalactiae*.

Lp	Nazwa szczepu	Materiał kliniczny	Pacjent/ rozpoznanie	Serotyp	geny z rodziny Alp	Fenotyp oporności	gen <i>ermB</i>	gen <i>mefA/E</i>
1	1736/08	mocz	noworodek ZUM*	V	<i>alp2</i>	kMLSβ	<i>ermB</i>	-
2	D129	mocz	kobieta ZUM*	III	<i>rib</i>	-	-	-
3	D437	mocz	kobieta ZUM*	Ib	<i>epsilon</i>	-	-	-
4	D280	mocz	mężczyzna ZUM*	Ia	<i>epsilon</i>	-	-	-
5	D481	mocz	kobieta ZUM*	V	<i>rib</i>	-	-	-
6	G413	mocz	kobieta ZUM*	V	<i>alp2</i>	-	-	-
7	G408	mocz	kobieta ZUM*	Ib	<i>epsilon</i>	-	-	-
8	G437	mocz	kobieta ZUM*	III	<i>rib</i>	-	-	-
9	G361	mocz	mężczyzna ZUM*	IV	<i>epsilon</i>	-	-	-
10	286378	mocz	mężczyzna ZUM*	II	<i>rib</i>	kMLSβ	<i>ermB</i>	-
11	300666	mocz	mężczyzna ZUM*	V	<i>alp2</i>	iMLSβ	-	-
12	305139	mocz	noworodek ZUM*	II	<i>bca</i>	-	-	-
13	306723	mocz	noworodek ZUM*	III	<i>alp2</i>	-	-	-
14	13793/08	mocz	noworodek ZUM*	V	<i>alp2</i>	kMLSβ	<i>ermB</i>	-
15	13723/07	mocz	noworodek ZUM*	III	<i>rib</i>	kMLSβ	<i>ermB</i>	-
16	2992/08	mocz	noworodek ZUM*	V	<i>rib</i>	-	-	-
17	5303/08	mocz	noworodek ZUM*	Ia	<i>epsilon</i>	-	-	-
18	PP4	wymaz z pochwy	kobieta nosicielstwo	bd	<i>alp2/3</i>	-	-	-
19	PP6	wymaz z pochwy	kobieta nosicielstwo	bd	<i>alp2/3</i>	-	-	-
20	PP7	wymaz z pochwy	kobieta nosicielstwo	bd	bd	-	-	-
21	PP8	wymaz z pochwy	kobieta nosicielstwo	bd	<i>alp2/3</i>	-	-	-
22	PP9	wymaz z pochwy	kobieta nosicielstwo	bd	<i>rib</i>	-	-	-
23	NPP1	wymaz z pochwy	kobieta nosicielstwo	bd	bd	-	-	-
24	GAS1	wymaz z gardła	dziecko angina	bd	bd	-	-	-
25	GBS1	wymaz z gardła	dziecko zakażenie	bd	<i>alp2/3</i>	-	-	-
26	GBS2	wymaz z ran	kobieta martwicze	bd	bd	-	-	-
27	2337/08	wymaz z i. ustnej	noworodek kolonizacja	Ia	<i>epsilon</i>	-	-	-
28	CM47	krew	noworodek EOD**	II	<i>rib</i>	kMLSβ	<i>ermB</i>	-
29	13793/08	krew	noworodek EOD**	V	<i>alp2</i>	kMLSβ	<i>ermB</i>	-
30	2992/08	mocz	Noworodek ZUM*	V	<i>rib</i>	-	-	-

*ZUM – zakażenie układu moczowego (*S. agalactiae* >10⁵ CFU/ml); ** EOD – zakażenie o wczesnym początku (ang. early onset disease); bd – brak danych; „-” – brak.

Tabela 3. Wykaz surowic GBS-dodatnich i GBS-ujemnych wykorzystanych do oceny specyficzności immunoreaktywnych białek *S. agalactiae* i ich epitopów w testach immunochemicznych.

Surowice GBS-dodatnie:	
Krew żylna	Krew pępowinowa
SK1, SK2, PP4, PP6, PP7, PP8, PPG, NPP1, GBS1, GBS2a, GBS2b, PP9, SB3b, SB4b, PP7, 28/3, 14/3, 10/3, 3/3, 42/3	1/KP, 2/KP, 3/KP, 4/KP, 5/KP, 6/KP, 8/KP, 10/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP
Surowice GBS-ujemne:	
Krew żylna	Krew pępowinowa
SK8, SB7, SB8, SB9, SB1a, SB1b, SB3a, 5/3, 13/3, 22/3, 34/3	12/KP, 13/KP, 24/KP, 28/KP, 29/KP

Tab. 4. Procentowy wzrost immunoreaktywności pochodnych epitopu MVTTGIIDPVK wobec surowicy GBS-dodatniej, uzyskanych w wyniku podstawiania alaniną kolejnych aminokwasów.

Peptyd	Średnia absorbancja (A405nm GBS+)	% wzrost reaktywności w porównaniu z sekwencją wyjściową (MVTTGIIDPVK)
MVTTGIIDPVA	1,38510001	wzrost o 45%
MVTTGIIDPAK	1,01940002	wzrost o 7%
MVTTGIIDAVK	1,32013333	wzrost o 38%
MVTTGIIPVK	1,15009999	wzrost o 21%
MVTTGIADPVK	0,89886667	spadek o 6%
MVTTGAIDPVK	1,28863335	wzrost o 35%
MVTTAIDPVK	1,50660002	wzrost o 58%
MVTAGIIDPVK	1,24636666	wzrost o 31%
MVATGIIDPVK	1,2343667	wzrost o 30%
MATTGIIDPVK	1,69836664	wzrost o 78%
AVTTGIIDPVK	1,34063331	wzrost o 40%
MVTTGIIDPVK	0,95466667	

Rysunki

Fig. 1

Sekwencje aminokwasowe immunoreaktywnych białek *S. agalactiae*.

Sekw. NRID5

MSNWDTKFLKKGFTFDDVLLIPAESHVLPNEVDMNTKLADNLTNIPITAAMDTVTDKMAIAIARAG
GLGIIHKNMSIVDQAEVVRKVKRSENGVIIDPFLLTPDNTVSEAEELMQNYRISGVPIVETLENRKLVGII
NRDMRFISDYKQLISEHMTSQNLVTAPIGTDLETAERILHEHRIEKLPLVDDEGRLSGLITIKDIEKVIEFP
KAAKDEFGRLLVAGAVGVTSDTFERAEALFEAGADAIVIDTAHGHSAGVLRKIAEIRAHFPNRTLIAGNI
ATAEGARALYDAGVDVVKVGIGPGSICTRVAVGVGPQITAIYDAAAVAREYGKTIHADGGIKYSGDI
VKALAAGGNAVMLGSMFAGTDEAPGETEIFQGRKFKTYRGMGSAAMKKGSSDRYFQGSVNEANKLV
PEGIEGRVAYKGSVADIVFQMLGGIRSGMGYVGAANIKELHDNAQFVEMSGAGLKESHPhdVQITNEA
PNYSVH

Sekw. NRID6

MAKDIKFSADARSAMVRGVDILADTVKVTLGPKGRNVVLEKAFGSPLITNDGVITAKEIELEDHFENMG
AKLVSEVASKTNDIAGDGTATVLTQAIVREGLKNVTAGANPIGIRRGIIETAVSAAVEELKEIAQPVSG
KEAIAQVA AVSSRSEK VGEYISEAMERVGNDGVITIEESRGMETELEVVEGMQFDRGYLSQYMVTDNE
KMVSELENPYILITDKKISNIQEILPLLEEVLKTNRPLLIADDVDGEALPTLVLNKIRGTFNVVAVKAPGF
GDRRKAMLEDIAILTGGTVVTEDLGLDLKDATMQVLGQSAKVTVDKDVIVEGAGDSSAIANRVAIIK
SQMEATTSDFDREKLQERLAKLAGGVAVIKVGAA TETELKEMKLRIEDALNATRAAVEEGIVSGGGTA
LVNVIEKVAALKLNGDEETGRNIVLRALEEPVRQIAYNAGYEGSVIIERLKQSEIGTFNAABGEWVDM
VTTGIIDPVKVTRSALQNAASVASLILTTEAVVANKPEPEAPTAPAMDPSMMGGF

Fig. 2

Przykładowe zdjęcie z analizy Western blot z wykorzystaniem trzech szczepów: S55 (1736/08), S57 (13793/08), D129. Do sprawdzenia immunogenności wykorzystano surowice z krwi pępowinowej: A) 3/KP (inaktywowana), B) 1/KP, C) 6/KP. Białka immunoreaktywne to NRID5 i NRID6 o masach około 55 kDa.

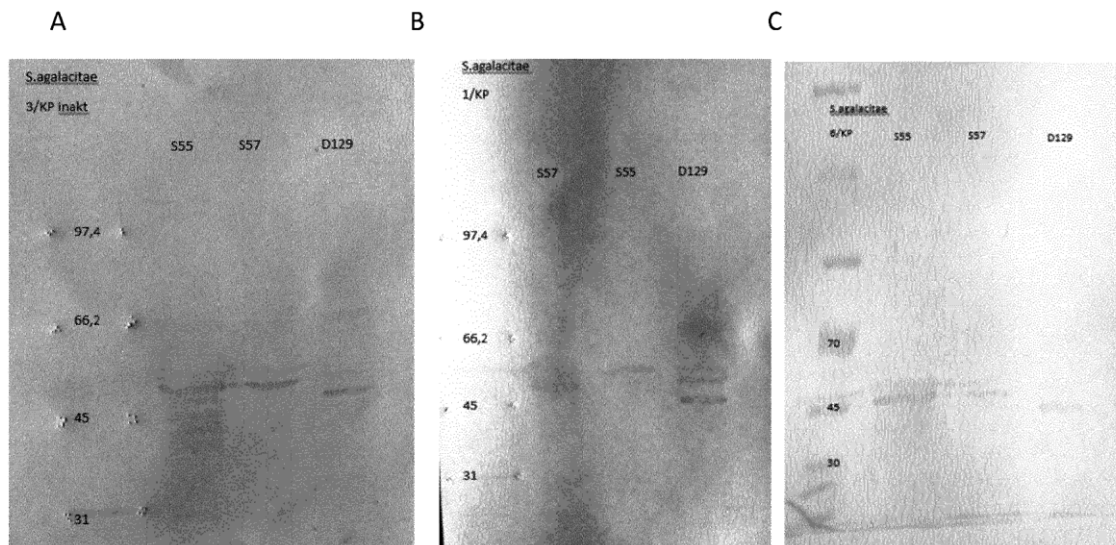


Fig. 3

Specyficzność rdzennych epitopów polipeptydowych *S. agalactiae* z miksem surowic GBS+ oraz miksem surowic GBS-.

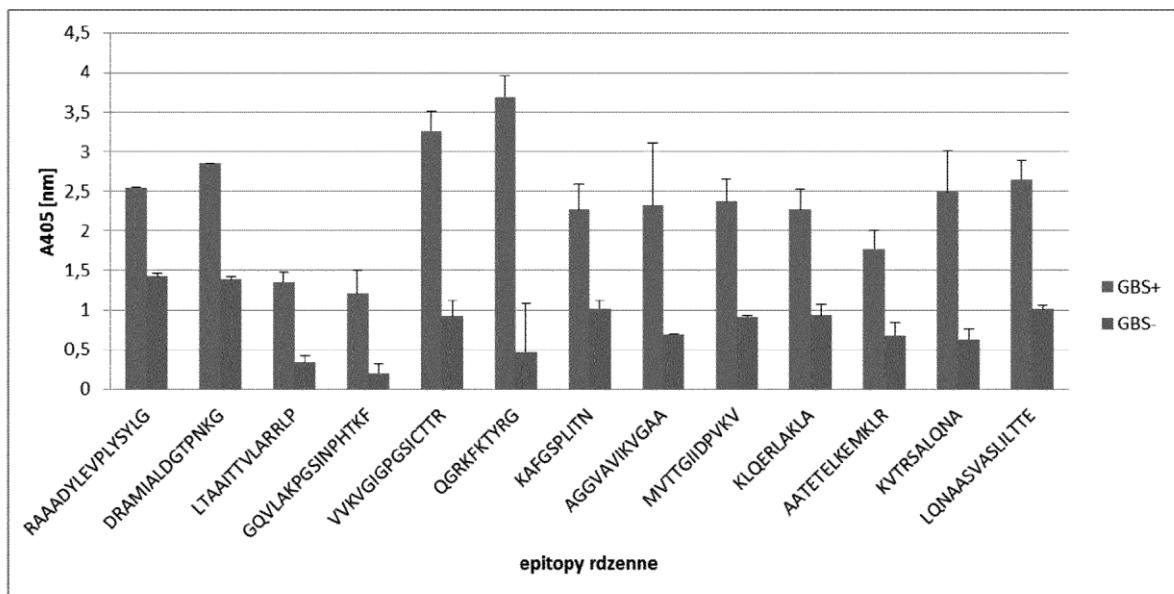


Fig. 4

Przykład reaktywności peptydów zmodyfikowanych poprzez podstawianie alaniną dla pochodnej epitopu rdzennego MVTTGIIDPVKV (Ep9) białka NRID6.

