

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 3378

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.03.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.03.1999 20.04.1999**
23.04.1999 15.07.1999

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/9906437 1999/9909077 1999/9909466**
1999/9916677

(33) Země priority: **GB GB GB GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.03.2002**
(Věstník č. 3/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP00/02465**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/56358**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/09

A 61 K 39/39

A 61 K 39/385

A 61 P 31/04

(71) Přihlašovatel:

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A.,
Rixensart, BE;

(72) Původce:

Capiau Carine, Rixensart, BE;
Deschamps Marguerite, Rixensart, BE;
Desmons Pierre Michel, Rixensart, BE;
Laferriere Craig Antony Joseph, Rixensart, BE;
Poolman Jan, Rixensart, BE;
Prieels Jean-Paul, Rixensart, BE;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Vakcína

(57) Anotace:

Popisují se bakteriální polysacharidové antigenní vakcíny.
Zvláště se popisují specifické výhodné pneumokokové
polysacharidové konjugáty adjuvované s 3D-MPL a které v
podstatě neobsahují adjuvans založené na hliníku.

CZ 2001 - 3378 A3

03.12.01

PV 2001-3388

~~89 PVZ~~

Vakcína

Oblast techniky

Vynález popisuje vakcíny obsahující bakteriální polysacharidový antigen, jejich výrobu a použití takových polysacharidů v medicíně.

Vynález zvláště popisuje tři aspekty:

- A. Vakcíny obsahující pneumokokový polysacharidový antigen, v typickém případě pneumokokový polysacharidový konjugační antigen, vytvořený spolu s proteinovým antigenem z mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* a může při tom dále obsahovat indukční adjuvans Th1.
- B. Specifické, výhodné pneumokokové polysacharidové konjugáty doplněné adjuvans Th1 a
- C. Bakteriální polysacharidové konjugáty v obecném případě konjugované s proteinem D z mikroorganismu *H.influenzae*.

Dosavadní stav techniky

Mikroorganismus *Streptococcus pneumoniae* je gram-pozitivní bakterie odpovědná za značnou nemocnost a úmrtnost (zvláště u malých dětí a přestárklých lidí), která způsobuje invazivní onemocnění, jako je zápal plic, bakteriémie a meningitida a onemocnění spojené s kolonizací, jako je akutní zánět středního ucha. Četnost pneumokokového zápalu plic v USA se u lidí ve stáří 60 let odhaduje na 3 až 8 osob ze 100 000. Ve 20 % případů vede k bakteriémii a k jiným projevům meningitidy s úmrtností 30 % a to dokonce i v případech léčby antibiotiky.

Mikroorganismus *Pneumococcus* obsahuje kapsuli s chemicky vázaným polysacharidem, který odpovídá za serotypovou specifitu. Existuje 90 známých serotypů pneumokoků a kapsule

představuje u pneumokoků hlavní determinantu virulence, protože kapsule nejenom chrání vnitřní povrch bakterie před komplementem, ale je také sama slabě imunogenní. Polysacharidy jsou antigeny nezávislé na T-buňkách a mohou se zpracovat a prezentovat na molekulách MHC, aby mohly interagovat s T-buňkami. Tyto antigeny mohou však stimulovat imunitní systém pomocí alternativního mechanismu, který zahrnuje zesílení povrchových receptorů na buňkách typu B.

V několika experimentech se ukázalo, že ochrana proti invazivnímu pneumokokovému onemocnění nejsilněji koreluje s protilátkami specifickými pro kapsuli a ochrana je sérotypově specifická.

Vakcíny založené na polysacharidovém antigenu jsou dobře známy v oboru. Čtyři z nich je možné použít při aplikaci lidem a zahrnují polysacharid Vi mikroorganismu *Salmonella typhi*, polysacharid PRP z mikroorganismu *Haemophilus influenzae*, tetravalentní meningokokovou vakcínu složenou ze sérotypů A, C, W135 a Y a 23-valentní pneumokokovou vakcínu složenou z polysacharidů odpovídajícím sérotypu 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F a 33 (započítává se alespoň 90 % krevních izolátů pneumokoků).

Tři vakcíny jsou schopny zaručit ochranu proti bakteriím, které způsobují respirační infekce, které vedou k vážnému onemocnění a k úmrtí kojenců. Tyto vakcíny však nejsou zatím určeny pro děti mladší dvou let, protože pro děti v tomto věku nejsou adekvátně imunogenní (popisuje se v publikaci Peltota et al., (1984), N. Engl. J. Med. 310: 1561-1566). Mikroorganismus *Streptococcus pneumoniae* běžně způsobuje invazivní bakteriální onemocnění a zánět středního ucha kojenců a malých dětí. Podobně staří lidé velmi slabě odpovídají na pneumokokové vakcíny (popisuje se v publikaci

Roghmann et al., (1987), J. Gerontol. 42: 265-270), protože u této populace dochází ke zvýšenému výskytu bakteriálního zánětu plic (Verghese and Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62: 271-285).

Strategie, které se navrhly, aby se překonala imunitní nedostatečnost u kojenců, zahrnují navázání polysacharidu na velké imunogenní proteiny, které pomáhají T-buňkám a které vyvolávají imunologickou paměť proti polysacharidovému antigenu, na který je vázán. U pneumokokových glykoproteinových konjugačních vakcín se v současné době hodnotí bezpečnost, imunogennost a účinnost u různých věkových skupin.

A) Pneumokokové polysacharidové vakcíny

23-valentní nekonjugovaná pneumokoková vakcína vykazuje široké rozmezí klinické účinnosti. Je to od 0 % do 81 % (popisuje se v publikaci Fedson et al., (1994) Arch Intern Med. 154: 2531-2535). Ukazuje se, že účinnost se vztahuje na skupinu, která se imunizuje, jako jsou přestárlí lidé, lidé trpící Hodgkinovou nemocí, onemocněním srpkovitých buněk a gamaglobulinemií a splenektomií (popisuje se v publikaci Fine et al., (1994), Arch. Intern. Med. 154: 2666-2677), a také je spojena s projevy onemocnění. 23-valentní vakcína nedemonstruje ochranu proti zápalu plic způsobeným pneumokoky (v jistých velmi rizikových skupinách, jako jsou přestárlí) a zánětu středního ucha.

Existuje proto potřeba zlepšit pneumokokové vakcinační prostředky, zvláště ty, které budou účinnější při prevenci nebo zlepšení pneumokokového onemocnění (zvláště při zápalu plic) u přestárlých lidí a malých dětí.

Vynález popisuje takovou optimalizovanou vakcínu.

B) Prostředky obsahující vybraný pneumokokový polysacharidový konjugát + 3D-MPL

Obecně se přijímá, že účinnost ochrany běžné nekonjugované pneumokokové vakcíny se více či méně vztahuje ke koncentraci protilátek indukovaných po vakcinaci. 23 polysacharidům se udělila licence pro vhodnost aplikaci lidem (popisuje se v publikaci Ed. Williams et al., New York Academy of Sciences 1995 pp. 241-249). Proto další zesílení protilátkové odezvy na pneumokokové polysacharidy by mohlo zvýšit procento kojenců a přestárlých lidí, kteří odpovídají ochrannou hladinou protilátek na první injekci s polysacharidem nebo polysacharidovým konjugátem a mohla by se snížit dávka a počet injekcí požadovaných k indukci ochranné imunity na infekci způsobenou mikroorganizmem *Streptococcus pneumoniae*.

Od začátku dvacátých let tohoto století se provedly experimenty s velkým počtem sloučenin, které se mohou přidat k antigenům, aby zlepšily jejich imunigenitu ve vakcinačních prostředcích (popisuje se v publikaci M. F. Powell and M. J. Newman, Plenum Press, NY, „Vaccine Design - the Subunit and Adjuvant Approach“ (1995), Chapter 7, „A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients“). Řada z nich je velmi účinná, ale způsobují podstatné lokální a systémové nežádoucí reakce, které brání jejich použití jako lidské vakcinační prostředky. Adjuvans založené na hliníku (jako je alum, hydroxid hlinitý nebo fosforečnan hlinitý), poprvé popsán v roce 1926, zůstávají pouze imunologické adjuvans používané v lidských vakcínách, které získaly licenci v USA.

Adjuvans založené na hliníku jsou příklady třídy nosičových adjuvans, která pracuje na základě depotního účinku. Antigen se absorbuje na jeho povrch a když se kompozice zavede injekcí, adjuvans a antigen se ihned rozptýlí do krevního proudu, místo aby kompozice zůstala v místě zavedení injekce a tak se zesílí imunitní odezva. Takové

adjuvans vykazuje další známou výhodu. Je vhodné jako stabilizující činidlo pro látky náchylné k rozkladu, jako jsou například některé polysacharidové antigeny.

3D-MPL je příklad nenosičového adjuvans. Jeho celý název je 3-O-deacylovaný monofosforyllipid A (nebo 3-de-O-acylovaný monofosforyllipid A nebo 3-O-desacyl-4'-monofosforyllipid A). Zkratka 3D-MPL indikuje, že poloha 3 redukčního konce glukosaminu je de-O-acylována. Jeho příprava se popisuje v dokumentu GB 2 220 211 A. Chemicky je to směs 3-deacylovaného monofosforyllipidu A s 4, 5 nebo 6 acylovanými řetězci. Původně se vytvořil začátkem 1990, kdy metoda s 3-O-deacylátem 4'-monofosforylderivátu lipidu A (MPL) vedla ke vzniku molekuly s dále utlumenou toxicitou, aniž došlo ke změnám její imunostimulační aktivity.

Sloučenina 3D-MPL se použije samotná jako adjuvans nebo, což je výhodné, v kombinaci s nosičovým adjuvans depotního typu, jako je hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý nebo emulze olej ve vodě. Antigen a 3D-MPL jsou v takových kompozicích obsaženy ve stejné určité struktuře, která umožňuje zavedení vyšší účinnosti antigenních a imunostimulačních signálů. Studie ukázaly, že 3D-MPL je schopný dále zesílit imunogennost antigenu absorbovaného na alum (popisuje se v publikaci Thoelen et al., Vaccine (1998) 16: 708-14, EP 689454-B1). Takové kombinace se také preferují v dosavadním stavu techniky v případě antigenů, které jsou náchylné k adsorpci (například bakteriální polysacharidové konjugáty), kde adsorpce na alum má tendenci stabilizovat antigen. Většinou se používají precipitovaná adjuvans založená na hliníku. Jsou to jediná adjuvans, která se používají v současné době v USA jako lidské vakcíny. Vakcíny obsahující 3D-MPL v kombinaci s adjuvans založenými na hliníku jsou v oboru nejvýznamnější, protože se jednoduše vyvíjí a rychle se zavádí na trh.

MPL (který nemá acylovanou polohu 3) se vyvinul jako adjuvans s několika monovalentními polysacharidovými konjugačními vakcinačními antigeny. Současná injekce MPL ve fyziologickém roztoku zesiluje odezvu sérových protilátek v případě čtyř monovalentních polysacharidových konjugátů: pneumokokální PS-6B toxoid tetanu, pneumokokální PS 12-toxoid diftérie a *S. aureus* typ 5 a *S. aureus* typ 8 konjugovaný s exotoxinem A organismu *Pseudomonas aeruginosa* (Schneerson et al., J. Immunology (1991) 147: 2136-2140). Uvažuje se, že zesílené odezvy jsou antigenně specifické. MPL v emulzi olej ve vodě (nosičový typ adjuvans) konzistentně zesiluje účinek MPL ve fyziologickém roztoku, což je způsobeno přítomností MPL a antigenu ve stejné určité struktuře a považuje se za adjuvanční systém první volby pro optimální zavedení jiných polysacharidových konjugačních vakcín.

V publikaci Devi et al., Infect. Immun. (1991) 59: 3700-7 hodnotí účinek adjuvans MPL (který nemá acylovanou polohu 3) ve fyziologickém roztoku na myši protilátkovou odezvu na konjugát TT kapsulárního monosacharidu organismu *Cryptococcus neoformans*. Když se MPL použil souběžně s konjugátem, objevil se pouze nevýznamný nárůst odezvy specifické pro IgM a IgG na PS. MPL však měl daleko větší účinek, když se aplikoval 2 dny po konjugátu. Diskutuje se praktičnost použití imunizačního schématu, které vyžaduje oddálení aplikace MPL relativně k antigenu zvláště u novorozenců. Adjuvanční účinek MPL s polysacharidy a konjugáty polysacharid-protein se jeví být závislý na kompozici. Začlenění MPL do vhodných zaváděcích systémů s pomalým uvolňováním (například použití nosičového adjuvans) poskytuje trvalý adjuvanční účinek a lze tak obejít problémy načasování a oddálení aplikace.

V obecném případě platí, že v případě určitého polysacharidu nebo konjugátu polysacharidu a antigenu, kde se

jako adjuvans používá MPL nebo 3D-MPL, je výhodné použít spojení s nosičovým adjuvans (například adjuvans založené na hliníku) za účelem maximalizovat jeho imunostimulační účinek.

Překvapivě se zjistilo, že v případě jistých pneumokokových polysacharidových konjugátů, imunnogennost vakcinační kompozice je podstatně vyšší, když se antigen spojí se samotným 3D-MPL spíše, než s 3D-MPL ve spojení s nosičovým adjuvans (jako je adjuvans založené na hliníku). Pozorované zlepšení závisí na koncentraci použitého 3D-MPL a zda konjugáty jsou v monovalentní kompozici nebo zda se kombinují za vzniku polyvalentní kompozice.

C) konjugáty bakteriálního polysacharidu - proteinu D

Jak se zmiňuje shora v textu, vakcíny založené na polysacharidovém antigenu jsou dobře známy v oboru. Polysacharidové vakcíny s udělenou licencí uvedené shora v textu demonstrují odlišnou klinickou účinnost. Účinnost Vi polysacharidové vakcíny se stanovila mezi 55 % a 77 % při prevenci břišního tyfu (popisuje se v publikaci Plotkin and Cam, (1995) Arch. Intern. Med. 155: 2293-99). Ukázalo se, že vakcína obsahující meningokokový polysacharid C vykazuje účinnost 79 % za podmínek epidemie (popisuje se v publikaci De Wals P, et al., (1996) Bull World Health Organ. 74: 407-411). 23-valentní pneumokoková vakcína vykazuje široké rozmezí klinické účinnosti od 0 % do 81 % (popisuje se v publikaci Fedson et al., (1994) Arch. Intern. Med. 154: 2531-2535). Jak se uvádí shora v textu, účinnost ochrany u pneumokokové vakcíny více nebo méně souvisí s koncentrací protilátek indukovaných po vakcinaci.

Mezi problémy spojené s vakcinací polysacharidů patří skutečnost, že polysacharidy jsou slabě imunogenní. Strategie, která se navrhla, aby se obešla tato nedostatečnost

imunogennosti zahrnuje navázání polysacharidu na velké vysoce imunogenní proteinové nosiče, které pomáhají T-buňkám.

Příklady těchto uvedených vysoce imunogenních nosičů, které se v současnosti běžně užívají při produkci polysacharidových imunogenů zahrnují toxoid diftérie (DT nebo mutant CRM197), toxoid tetanu (TT), hemocyanin přílipkovitých plžů (KLH) a čištěný proteinový derivát tuberkulinu (PPD).

Problémy spojené s běžně používanými nosiči

S každým z běžně používaných nosičů je spojena řada problémů, které zahrnují problémy při produkci konjugátů GMP a také imunologické charakteristiky konjugátů.

Navzdory běžnému použití těchto nosičů a jejich úspěchu při indukci protilátkové odezvy proti polysacharidu, uvedené nosiče jsou spojeny s několika nedostatky. Například je známo, že antigenní specifické imunitní odezvy se mohou potlačit (potlačení epitopu) přítomností předem existujících protilátek řízených proti nosiči, v tomto případě toxinu tetanu (popisuje se v publikaci Di John et al., (1989) Lancet, 2: 1415-8). V populaci velmi vysoké procento lidí bude vykazovat předem existující imunitu jak proti DT tak proti TT, protože se lidé rutinně vakcinují těmito antigeny. V Anglii se například 95 % dětí vakcinovalo DTP vakcínou, která obsahuje DT a TT. V publikaci Sad et al., Immunology, 1991, 74: 223-227, Schutze et al., J. Immunol. 135: 4, 1985, 2319-2322 se popisuje problém potlačení epitopu v peptidových vakcínách aplikovaných zvířecím modelům.

Navíc v případě vakcín, které vyžadují pravidelné zesilující dávky, je pravděpodobné, že použití vysoce imunogenních nosičů, jako je DT a TT, potlačuje po několika injekcích protilátkovou odezvu na polysacharid. Tyto

vícenásobné vakcinace mohou být doprovázeny nežádoucí reakcí, jako je oddálený typ hyperodezvy (DTH).

KLH je znám jako potentní imunogen a už se používá jako nosič v případě peptidů IgE v lidských klinických studiích. Pozorovaly se však určité nežádoucí reakce (reakce podobné DTH nebo IgE přecitlivělost) stejně jako se pozorovaly protilátkové odezvy proti protilátkám)

Výběr nosičového proteinu v případě vakcíny založené na polysacharidu vyžaduje rovnováhu mezi nezbytností použít nosič fungující u všech pacientů (široké rozeznání molekul MHC), indukci silné protilátkové odezvy proti polysacharidům a slabé protilátkové odezvy proti nosiči.

Nosiče, které se dříve používaly v případě vakcín založených na polysacharidu, mají řadu nevýhod. To je zvláště v kombinovaných vakcínách, kde potlačení epitopu je zvláště problematické, jestliže se použije stejný nosič pro různé polysacharidové antigeny. V dokumentu WO 98/51 339, se použilo v kombinovaných vakcínách více nosičů, aby se obešel tento účinek.

Vynález popisuje nový nosič vhodný pro použití imunogenních konjugátů založených na polysacharidu a polypeptidu, přičemž uvedené konjugáty se nepotýkají se shora uvedenými problémy.

Vynález dále popisuje protein D (EP 0 594 610 B1) pocházející z organismu *Haemophilus influenzae* nebo jeho fragmenty jako nosiče vhodné pro imunogenní kompozice založené na polysacharidu, které zahrnují vakcíny. Použití tohoto nosiče je zvláště výhodné v kombinačních vakcínách.

Podstata vynálezu

A) Pneumokokové polysacharidové vakcíny

Vynález popisuje vakcinační prostředek obsahující alespoň polysacharidový antigen mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* (výhodný je konjugovaný) a proteinový antigen mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* nebo jeho imunologicky funkční ekvivalent a je možné, aby obsahoval adjuvans Th1 (adjuvans vyvolávající imunitní odezvu). Je výhodné, aby byly zahrnuty jak pneumokokový protein tak i adjuvans Th1. Prostředky podle vynálezu jsou zvláště vhodné při léčbě zápalu plic u přestárých lidí.

Pneumokokové polysacharidové vakcíny (konjugované nebo nekonjugované) nejsou schopny chránit přestárlou populaci proti pneumonii. V této populaci výskyt této nemoci je velmi vysoký. Klíčový obranný mechanismus proti pneumokokům je opsonofagocytóza (humorální B buňka/neutrofily zprostředkovaný jev způsobený produkcí protilátek proti pneumokokovému polysacharidu, přičemž bakterie podléhá fagocytóze), avšak části, které se podílejí na opsonizačních mechanismech jsou u přestárých lidí porušeny, to znamená produkce superoxidu pomocí PMN (polymorfni jaderné buňky), produkce jiných jiného druhu reaktivního kyslíku, mobilizace PMN, apoptóza PMN, deformabilita PMN. U přestárých lidí může být také porušena protilátková odezva.

Na rozdíl od normálně přijatého dogma normální množství antikapsulárních polysacharidových protilátek nemusí být účinné při kompletním odstranění bakterií. Pneumokoci mohou vstupovat do hostitelských buněk a obcházejí tuto část imunitního systému.

Je překvapivé, že současnou stimulací části imunitního systému zprostředkovaného buňkami (například imunita zprostředkovaná T buňkou) vedle humorální části imunitního systému (zprostředkovaná B buňkou) vede k lepšímu odstranění

pneumokoků z hostitele. To je objev, který povede obecně k prevenci (nebo léčbě) pneumokokové infekce, ale bude zvláště důležitý při prevenci (nebo léčbu) zápalu plic u přestárlých lidí, kde vakcíny založené na polysacharidech nejsou účinné.

Zjistilo se, že obě části imunitního systému se mohou navzájem tímto způsobem podporovat, jestliže se s pneumokokovým proteinem (upřednostňuje se protein exprimovaný na povrchu pneumokoků nebo vylučovaný nebo uvolňovaný, který se může zpracovat nebo se prezentuje v kontextu třídy II a MHC třídy I na povrchu infikovaných savčích buněk) aplikuje pneumokokový polysacharid (výhodně konjugovaný). Ačkoli pneumokokový protein může samotný způsobit imunitu zprostředkovanou buňkami, také se zjistilo, že přítomnost adjuvans indukující odezvu Th1 ve vakcinačním prostředku podporuje tuto část imunitního systému a překvapivě dále zesiluje synergii mezi oběma částmi imunitního systému.

B) Vybraný pneumokokový polysacharidový konjugát + kompozice 3D-MPL

Vynález dále také popisuje antigenní prostředek obsahující jeden nebo více pneumokokových polysacharidových konjugátů, kde se jako adjuvans použije 3D-MPL a následně neobsahuje adjuvans založené na hliníku, kde alespoň jeden z pneumokokových polysacharidových konjugátů je podstatně více imunogenní v prostředcích, které obsahují 3D-MPL v porovnání s prostředky, které obsahují 3D-MPL ve spojení s adjuvans založeným na hliníku.

Preferovaná provedení vynálezu popisují antigenní prostředky obsahující konjugáty jednoho nebo více následujících pneumokokových kapsulárních polysacharidů: sérotyp 4, 6B, 18C, 19F a 23F. V takových prostředcích je každý z polysacharidů překvapivě více imunogenní, jestliže

prostředek obsahuje samotný 3D-MPL, ve srovnání s prostředky, které obsahují 3D-MPL a adjuvans založené na hliníku.

Pak jedno provedení vynálezu popisuje antigenní prostředek obsahující kapsulární polysacharid mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* sérotyp 4, 6B, 18C, 19F nebo 23F konjugovaný s imunogenním proteinem a adjuvans 3D-MPL, kde prostředek v podstatě neobsahuje adjuvans založené na hliníku.

Další provedení vynálezu popisuje kombinaci antigenního prostředku, který v podstatě neobsahuje adjuvans založené na hliníku a obsahuje adjuvans 3D-MPL a dva nebo více pneumokokových polysacharidových konjugátů vybraných ze skupiny zahrnující sérotyp 4, 6B, 18C, 19F a 23F.

C) Konjugáty bakteriálního polysacharidu a proteinu D

Vynález popisuje polysacharidový konjugační antigen obsahující polysacharidový antigen získaný z patogenní bakterie konjugovaný s proteinem z mikroorganismu *Haemophilus influenzae* nebo jeho fragment. Navíc vynález popisuje polyvalentní vakcinační kompozici, kde jeden nebo více polysacharidových antigenů je konjugováno s proteinem D.

A) Pneumokokové polysacharidové vakcíny

Vynález popisuje zdokonalenou vakcínu zvláště vhodnou při prevenci nebo zlepšení pneumokokové infekce přestárlých lidí (a/nebo kojenců a nemluvňat).

V souladu s vynálezem se pacient považuje za starého člověka, jestliže dosáhne 55 let a více. V typickém případě je starší 60 let, preferuje se starší 65 let.

V jednom provedení vynálezu se popisuje vakcinační prostředek vhodný pro aplikaci přestárlým lidem (a/nebo kojencům a nemluvňatům), který obsahuje alespoň jeden

polysacharidový antigen mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* a alespoň jeden proteinový antigen mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*.

V jiném preferovaném provedení vynálezu se popisuje vakcína (vhodná při prevenci zápalu plic u starých lidí), která obsahuje alespoň jeden polysacharidový antigen mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* a alespoň jeden proteinový antigen mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* a adjuvans Th1.

Předpokládá se, že taková vakcína se může také použít při léčbě pneumokokové infekce (například zánětu středního ucha) v jiných vysoce rizikových skupinách populace, jako jsou kojenci nebo nemluvňata.

V dalším provedení vynálezu se popisuje vakcinační prostředek obsahující pneumokokový polysacharidový antigen a adjuvans Th1.

Polysacharidové antigeny mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* podle vynálezu

V typickém případě vakcína mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* obsahuje polysacharidové antigeny (výhodné jsou konjugované), kde se polysacharidy získaly z alespoň čtyř sérotypů mikroorganismu *Pneumococcus*. Výhodné jsou čtyři sérotypy zahrnující 6B, 14, 19F a 23F. Výhodnější je, když prostředek zahrnuje alespoň 7 sérotypů. Jsou to například ty získané ze sérotypů 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F a 23F. Více se upřednostňuje, když prostředek zahrnuje alespoň 11 sérotypů. Například prostředek v jednom provedení vynálezu zahrnuje kapsulární polysacharidy získané ze sérotypů 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F a 23F (výhodné jsou konjugované). V preferovaném provedení vynálezu je zahrnuto alespoň 13 polysacharidových antigenů (výhodné jsou konjugované).

antigeny), ačkoli dále zahrnuje další polysacharidové antigeny, například 23 valentní (takové jako je sérotyp 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9a, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F a 33F).

Jedenácti valentní antigenní kompozice popsaná shora v textu a vhodná pro vakcinaci přestárých lidí (například pro prevenci zápalu plic) s výhodou zahrnuje sérotyp 8 a 12F (nejvíce se upřednostňuje sérotyp 15 a 22), přičemž tvoří 15-ti valentní vakcínu, zatímco v případě kojenců a nemluvňat (kde připadá v úvahu zánět středního ucha) je výhodné, aby vakcína zahrnovala sérotyp 6A a 19A, přičemž tvoří 13-ti valentní vakcínu.

Při prevenci/zlepšení zápalu plic u populace přestárých lidí (ve věku nad 55 let) a zánětu středního ucha u kojenců (do 18-tého měsíce) a nemluvňat (v typickém případě odpovídá věku 18 měsíců až 5 let), vynález popisuje kombinaci multivalentního polysacharidu mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* s proteinem mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* nebo s jeho imunologicky funkčním ekvivalentem.

Pneumokokové proteiny podle vynálezu

Termín „imunologicky funkční ekvivalent“ je peptid proteinu, který obsahuje alespoň jeden ochranný epitop z proteinů podle vynálezu. Takové epitopy jsou v charakteristickém případě povrchově exponované, vysoce konzervativní a mohou v hostiteli vyvolávat baktericidní protilátkovou odezvu nebo předcházet toxickým účinkům. Je výhodné, aby funkční ekvivalent měl alespoň 15 a upřednostňuje se 30 nebo více nepřerušovaných aminokyselin z proteinu podle vynálezu. Nejvíce se upřednostňuje, aby se použily fragmenty, deleční proteiny, jako jsou jejich transmembránové deleční varianty (to znamená použití extrabuněčné oblasti proteinů),

fúze, chemicky nebo geneticky detoxifikované deriváty a podobně s podmínkou, že jsou schopny vyvolat v podstatě stejnou imunitní odezvu jako přirozený protein.

Preferované proteiny podle vynálezu jsou takové pneumokokové proteiny, které se exponují na vnějším povrchu pneumokoků (jsou schopny být rozeznány hostitelským imunitním systémem během poslední části životního cyklu pneumokoků) nebo jsou to proteiny, které pneumokoci vylučují nebo uvolňují. Nejvýhodnější je, když protein je toxin, adhezin, 2-komponent přenašeče signálu nebo lipoprotein mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* nebo jejich imunologicky funkční ekvivalenti.

Zvláště preferované proteiny, které jsou obsaženy v takové kombinační vakcíně, zahrnují: pneumolyzín (s výhodou je detoxifikován chemickou cestou nebo mutací) (popisuje se v publikaci Mitchell et al., Nucleic. Acids Res. 1990 Jul 11, 18(13): 4010 „Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* type 1 and 2.” Mitchell et al., Biochim. Biophys. Acta 1989 Jan. 23, 1007(1): 67-72 „Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties.”, WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton et al.), WO 99/03884 (NAVA)), PspA a jeho transmembránové deleční varianty (US 5804193 - Briles et al.), PspC a jeho transmembránové deleční varianty (WO 97/09994 - Briles et al.), PsaA a jeho transmembránové deleční varianty (popisuje se v publikaci Berry and Paton, Infect. Immun. 1996 Dec., 64(12): 5255-62 „Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*”), pneumokokové proteiny vázající cholin a jeho transmembránové deleční varianty, CbpA a jeho transmembránové deleční varianty (WO 97/41151, WO 99/51226), dehydrogenáza glycerinaldehyd-3-fosfátu (popisuje se v publikaci Infect. Immun. 1996 64:

3544), HSP70 (WO 96/40928), PcpA (popisuje se v publikaci Sanchez-Beato et al., FEMS Microbiol. Lett. 1998, 164: 207-14), protein podobný proteinu M (popisuje se v dokumentu SB patentová přihláška č. EP 0837130) a adhezín 18627 (popisuje se v dokumentu SB patentová přihláška č. EP 0834568).

Proteiny používané podle vynálezu se s výhodou vybraly ze skupiny zahrnující pneumolysin, PsaA, PspA, PspC, CbpA nebo kombinaci dvou nebo více takových proteinů. Vynález dále popisuje imunologicky funkční ekvivalenty takových proteinů (jak se definuje shora v textu).

V kompozici protein může pomáhat indukovat odezvu proti pneumokokovému onemocnění zprostředkovanou T buňkami, zvláště požadovanou ochranu proti zápalu plic, což spolupracuje s humorální částí imunitního systému, přičemž dochází k inhibici invaze pneumokoky a ke stimulaci opsonofagocytózy.

Další výhoda použití proteinových antigenů je přítomnost dalších antigenů v procesu opsonofagocytózy a inhibice bakteriální adheze (jestliže se použije adhezín) nebo neutralizace toxinu (jestliže se použije toxin).

Vynález popisuje vakcínu organismu *Streptococcus pneumoniae*, která obsahuje pneumokokový polysacharidový konjugát obsahující polysacharidové antigeny získané z alespoň ze čtyř sérotypů, přičemž se upřednostňuje alespoň sedm sérotypů, více se upřednostňuje alespoň jedenáct sérotypů, a alespoň jeden, ale s výhodou dva proteiny mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*. S výhodou je jeden z proteinů pneumolysin nebo PsaA nebo PspA nebo CbpA (nejvýhodnější je detoxifikovaný pneumolysin). Preferovaná kombinace obsahuje alespoň pneumolysin nebo jeho derivát a PspA.

Jak se uvádí shora v textu, problém spojený s vakcinací vakcínou obsahující polysacharidy, je skutečnost, že

polysacharidy jsou slabé imunogeny. Aby se obešel tento problém, polysacharidy se mohou konjugovat s proteinovými nosiči, které poskytují pomoc T-buňkám. Proto, když vynález používá polysacharidy, jsou spojeny s proteinovým nosičem. Příklady takových nosičů, které se v současné době běžně používají při produkci polysacharidových imunogenů zahrnují toxoidy diftérie a tetanu (DT, DT CRM197 a TT), hemocyanin přílipkovitých mlžů (KLH), OMPC pocházející z mikroorganismu *N. meningitidis* a čištěné proteinové deriváty tuberkulinu (PPD).

S každým z těchto běžně používaných nosičů je však spojena řada problémů (popisuje se v sekci „Problems Associated with Commonly-Used carriers“ uvedené shora v textu).

Vynález popisuje nový nosič vhodný pro použití konstrukcí imunogenu založených na polysacharidu, které nevykazují tyto nevýhody. Preferovaný nosič v případě imunogenních prostředků (nebo vakcín) založených na pneumokokovém polysacharidu je protein D z mikroorganismu *Haemophilus influenzae* (popisuje se v dokumentu EP 594610-B) nebo jeho fragmenty. Fragmenty vhodné pro použití zahrnují fragmenty obsahující epitopy pomocných buněk T. Zvláště fragment proteinu D bude přednostně obsahovat N-terminální 1/3 proteinu.

Dále preferovaným nosičem pneumokokového polysacharidu je samotný pneumokokový protein (jak se definuje shora v textu v sekci „Pneumokokové proteiny podle vynálezu“).

Vakcíny podle vynálezu přednostně obsahují adjuvans. Vhodné adjuvans zahrnuje hlinité sole, jako je gel hydroxidu hlinitého (alum) nebo fosforečnan hlinitý, ale musí také zahrnovat sole vápníku, želez nebo zinku nebo mohou zahrnovat nerozpustné suspenze acylovaného tyrozinu nebo acylované cukry, kationicky nebo anionicky derivatizované polysacharidy nebo polyfosfazený.

Je výhodné adjuvans vybrat tak, aby tvořilo preferenční indukční činidlo odezvy typu TH1, což podporuje část imunitního systému zprostředkované buňkou.

Adjuvans TH1 podle vynálezu

Velké množství cytokinů typu Th1 vyvolává imunitní odezvy zprostředkované buňkou na daný antigen, zatímco velké množství cytokinů typu Th2 má tendenci vyvolat humorální imunitní odezvy na antigen.

Je důležité si pamatovat, že rozdíl imunitní odezvy typu Th1 a Th2 není absolutní. Jedinec bude podporovat imunitní odezvu, která se popisuje jako převážně Th1 nebo převážně Th2. Často je vhodné zvažovat rodiny cytokinů tak, jak je popsáno pro myši CD4+ v klonech T-buněk (jak se popisuje v publikaci Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Tradičně odezvy typu Th1 jsou spojeny s produkcí INF- γ a cytokinů IL-2 T-lymfocyty. T buňky neprodukují jiné cytokiny, které jsou spojeny s indukcí imunitní odezvy typu Th1, jako jsou například IL-12. Naopak odezva typu Th2 je spojena se sekrecí IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Vhodné adjuvantní systémy, které podporují převážně odezvu Th1 zahrnují monofosforylový lipid A nebo jeho deriváty, zvláště 3-de-O-acylovaný monofosforyllipid A a kombinace monofosforyllipidu A, upřednostňuje se 3-de-O-acylovaný monofosforyllipid (3D-MPL) spolu se solí hliníku. Zesilovací systém zahrnuje kombinaci monofosforyllipidu A a derivát saponinu, zvláště v kombinaci QS21 a 3D-MPL, jak se popisuje v dokumentu WO 94/00153 nebo méně reaktogenní prostředek, kde QS21 je zakalený cholesterolem, jak se popisuje v dokumentu WO 96/33739.

V dokumentu WO 95/17210 se popisuje zvláště silné adjuvans zahrnující QS21, 3D-MPL a tokoferol v emulzi olej ve vodě, což se považuje za preferovanou formulaci.

Vynález také popisuje způsob produkce vakcinační formulace obsahující směs proteinu podle vynálezu spolu s farmaceuticky přijatelným excipientem, jako je 3D-MPL.

Nemethylované oligonukleotidy obsahující CpG (WO 96/02555) jsou také výhodnými indukčními činidly odezvy TH1 a jsou vhodné pro použití podle vynálezu.

Zvláště preferované prostředky podle vynálezu obsahují jeden nebo více konjugačních pneumokokových polysacharidů, jeden nebo více pneumokokových proteinů a adjuvans Th1. Indukce odezvy zprostředkované buňkou pneumokokovým proteinem (jak se popisuje shora v textu) a kooperace mezi oběma rameny imunitního systému se mohou podporovat za použití takového adjuvans Th-1, přičemž výsledek je zvláště účinná vakcína proti pneumokokovému onemocnění, zvláště proti pneumokokovému zápalu plic u přestárých lidí.

Vynález dále popisuje imunogen nebo vakcínu, jak se popisuje v případě použití v medicíně.

Vynález dále popisuje prostředek obsahující pneumokokový polysacharidový konjugát a adjuvans Th1 (upřednostňuje se 3D-MPL), který je schopný přeměnit sérum nebo indukovat humorální protilátkovou odezvu proti polysacharidovému antigenu v populaci lidí, kteří nereagují odezvou.

Je známo, že 10 až 30 % populace neodpovídá na polysacharidovou imunizaci (neodpovídá na více než 50 % sérotypů ve vakcíně) (popisuje se v publikaci Konradsen et al., Scand. J. Immun. 40: 251 (1994), Rodriguez et al., JID, 173: 1347 (1996). To může také být případ konjugačních vakcín

(popisuje se v publikaci Musher et al., Clin. Inf. Dis. 27: 1487 (1998)). To může být zvláště vážné pro silně rizikovou oblast populace (kojence, nemluvňata a přestárlé).

Zjistilo se, že kombinace konjugovaného pneumokokového polysacharidu (který je náchylný k malé odezvě v určité populaci) s adjuvans Th1 (popisuje se v kapitole „Adjuvans Th1 podle vynálezu“ shora v textu) může překvapivě překonat skutečnost, že nedochází k odezvě. Upřednostňuje se, aby se použilo adjuvans 3D-MPL a nejvíce se upřednostňuje 3D-MPL bez adjuvans založeném na hliníku (které stále poskytuje lepší odezvu). Vynález tak popisuje takové prostředky a dále popisuje metodu léčby lidí, kteří neodpovídají na pneumokokové polysacharidy, aplikací takových prostředků. Dále vynález popisuje použití adjuvans Th1 při výrobě léčiva, které obsahuje konjugované pneumokokové polysacharidové antigeny, při léčbě (nebo ochraně proti) pneumokokovému onemocnění jednotlivců, jejichž imunitní systém neodpovídá na polysacharidový antigen.

V jednom provedení vynálezu se popisuje způsob prevence nebo zlepšení zápalu plic u přestárlých lidí, který zahrnuje bezpečné a účinné množství vakcíny, jak se popisuje zde v textu, obsahující polysacharidový antigen mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* a buď adjuvans Th1 nebo pneumokokový protein (výhodné je, když obsahuje obě složky).

V dalším provedení vynálezu se popisuje způsob prevence nebo zlepšení zánětu středního ucha u kojenců nebo nemluvňat, který zahrnuje aplikaci bezpečného a účinného množství vakcíny obsahující polysacharidový antigen mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* a buď proteinový antigen mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* nebo adjuvans Th1 (výhodné je, když obsahuje obojí).

Upřednostňuje se, aby se v metodách podle vynálezu popsaných shora v textu použil polysacharidový antigen přítomný jako polysacharidový proteinový konjugát.

Vakcinační prostředky podle vynálezu

Vakcinační prostředky podle vynálezu se mohou použít k ochraně nebo k léčbě savců, kteří jsou náchylní k infekci tak, že se aplikuje uvedená vakcína systémovou nebo mukozální cestou. Tyto aplikace mohou zahrnovat intramuskulární, intraperitoneální, intradermální nebo podkožní injekci nebo mukozální aplikaci do orálního/zažívacího, respiračního, močopohlavního traktu. Preferuje se intranasální aplikace vakcín za účelem léčby zápalu plic nebo zánětu středního ucha (nasofaryngeální zavedení pneumokoků může působit jako velmi účinná prevence nebo může odstranit utlumenou infekci v jejím velmi časném stádiu).

Množství konjugačního antigenu v každé vakcinační dávce se vybralo jako množství, které vyvolává imunoochrannou reakci bez podstatného nežádoucího vedlejšího účinku. Takové množství kolísá v závislosti na použitém imunogenu a jak se prezentuje. V obecném případě se očekává, že každá dávka bude obsahovat 0,1 až 100 μg polysacharidu, upřednostňuje se 0,1 až 50 μg , dále se upřednostňuje 0,1 až 10 μg , z čehož se nejvíce upřednostňuje rozmezí 1 až 5 μg .

Obsah proteinových antigenů ve vakcíně je v typickém případě v rozmezí 1 až 100 μg , upřednostňuje se 5 až 50 μg , nejvíce se upřednostňuje rozmezí 5 až 25 μg .

Optimální množství komponent v určité vakcíně se může zjistit ve standardních studiích, které zahrnují pozorování vhodných imunitních odezev u subjektů. Pak následuje počáteční

vakcinace, kdy subjektu se aplikuje jedna nebo několik provokačních dávek v adekvátních časových úsecích.

Vakcinační prostředek se obecně popisuje v publikaci Vaccine Design („The subunit and adjuvant approach“, eds. Powell M.F. and Newman M. J., (1995) Plenum Press New York). Kapsulazice do lipozómů se popisuje v publikaci Fullerton, US Patent 4 235 877.

B) Prostředek obsahující vybraný pneumokokový polysacharidový konjugát + 3D-MPL

Termín „pneumokokové polysacharidové konjugáty podle vynálezu“ popisují ty konjugáty kapsulárních polysacharidů mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*, které jsou více imunogenní v kompozicích obsahujících 3D-MPL v porovnání s prostředky, které obsahují 3D-MPL ve spojení s adjuvans založeném na hliníku (například konjugáty sérotypu 4, 6B, 18C, 19F nebo 23F).

Termín „v podstatě neobsahuje adjuvans založené na hliníku“ popisuje prostředek, který v podstatě neobsahuje adjuvans založené na hliníku (například hydroxid hlinitý a zvláště pak fosforečnan hlinitý) a způsobuje libovolné snížení imunogennosti pneumokokového polysacharidového konjugátu podle vynálezu ve srovnání s ekvivalentní kompozicí, která obsahuje 3D-MPL, aniž se přidá adjuvans založené na hliníku. Upřednostňuje se, aby antigenní prostředek obsahoval adjuvans, které obsahuje podstatné množství 3D-MPL. Množství adjuvans přidaného do dávky by mělo přednostně obsahovat méně než 50 µg, více se upřednostňuje méně než 30 µg, stále výhodnější je méně než 10 µg a nejvíce se preferuje, když se do antigenního prostředku podle vynálezu nepřidá žádné adjuvans založené na hliníku.

Stanovení, zda pneumokokový polysacharidový konjugát je podstatně více imunogenní ve srovnání s prostředkem, který obsahuje 3D-MPL, ve srovnání s prostředkem, který obsahuje 3D-MPL ve spojení s adjuvans založeným na hliníku, se může provést způsobem popsaným v příkladu 2. Jako indikace, zda prostředek je podstatně více imunogenní, když obsahuje samotný 3D-MPL, poměr koncentrace GMC IgG (jak se stanovilo v příkladu 2) mezi prostředky, které obsahují samotný 3D-MPL versus ekvivalentní prostředek obsahující 3D-MPL ve spojení s fosforečnanem hlinitým by mělo být víc jak 2, upřednostňuje se více jak 5, více se upřednostňuje víc než 7, stále více se upřednostňuje více jak 9 a nejvíce se upřednostňuje více než 14.

Mezi problémy spojenými s polysacharidovou vakcínou patří skutečnost, že polysacharidy jsou málo imunogenní. Strategie, která se navrhla, aby se obešla nedostatečnost imunogenosti, zahrnuje vazbu (spojení) polysacharidu s velkými proteinovými nosiči, které pomáhají T buňkám. Preferuje se, aby pneumokokové polysacharidy podle vynálezu se vázaly na proteinový nosič, který pomáhá T-buňkám. Příklady takových nosičů, které se mohou použít zahrnují diftérie, mutant diftérie a toxoidy tetanu (DT, CRM197 a TT), hemocyanin přílipkovitých plžů (KLH), čištěný proteinový derivát tuberkulinu (PPD) a OMPC mikroorganismu *Neisseria meningitidis*.

Protein D z mikroorganismu *Haemophilus influenzae* (EP 0 594 610-B) nebo jeho fragmenty (sekce C) se používá jako imunogenní proteinový nosič pro pneumokokové polysacharidy podle vynálezu.

V jednom provedení antigenního prostředku podle vynálezu se popisuje pneumokokový polysacharid sérotyp (PS)4 konjugovaný s imunogenním proteinem a spojený s adjuvans 3D-MPL, kde prostředek v podstatě neobsahuje adjuvans založené na

hliníku. V dalších provedeních vynálezu antigenní prostředek obsahuje PS 6B, 18C, 19F nebo 23F konjugované s imunogenním proteinem a je formulován s adjuvans 3D-MPL, kde prostředek v podstatě neobsahuje adjuvans založené na hliníku.

V dalším provedení vynálezu se popisuje kombinace antigenního prostředku obsahující dva nebo více pneumokokových polysacharidových konjugátů ze skupiny PS 4, PS 6B, PS 18C, PS 19F a PS 23F formulované s adjuvans 3D-MPL, kde prostředek v podstatě neobsahuje adjuvans založené na hliníku.

Imunogennost pneumokokových polysacharidových konjugátů podle vynálezu není v podstatě ovlivněna kombinací s jinými pneumokokovými polysacharidovými konjugáty (příklad 3). Vynález popisuje kombinaci antigenního prostředku, který obsahuje jeden nebo více pneumokokových polysacharidových konjugátů podle vynálezu v kombinaci s jedním nebo více pneumokokovými polysacharidovými konjugáty, kde prostředek obsahuje adjuvans 3D-MPL, ale v podstatě neobsahuje adjuvans založené na hliníku.

V dalších provedeních vynálezu se popisuje kombinace antigenních prostředků, které obsahují alespoň jeden a přednostně 2, 3, 4 nebo všech pět pneumokokových polysacharidových konjugátů PS 4, 6B, 18C, 19F nebo 23F a navíc libovolnou kombinaci jiných pneumokokových polysacharidových konjugátů, které jsou tvořeny s adjuvans 3D-MPL, ale v podstatě neobsahují adjuvans založené na hliníku.

V typickém případě kombinace antigenního prostředku mikrorganismu *Streptococcus pneumoniae* podle vynálezu obsahuje polysacharidové konjugační antigeny, kde polysacharidy se získaly z alespoň čtyř, sedmi, dvanácti, třinácti, patnácti nebo dvacetitří sérotypů (předurčené kombinace sérotypů závisí na léčeném onemocnění a popisují se v sekci

„*Streptococcus pneumoniae* Polosaccharide Antigens of the Invention“).

Antigenné prostředky podle vynálezu se s výhodou používají jako vakcinační prostředky pro prevenci (nebo léčbu) pneumokokových infekcí zvláště u přestárých lidí a kojenců a nemluvňat.

Další provedení vynálezu zahrnuje zajištění shora popsaných antigenních kompozic vhodných pro použití v medicíně, způsob zahrnující imunitní odezvu na kapsulární polysacharidový konjugát mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*, který zahrnuje kroky aplikace bezpečného a účinného množství jednoho shora uvedených antigenních prostředků, a použití jednoho shora uvedených antigenních prostředků při výrobě léčiva vhodného pro prevenci (nebo léčbu) pneumokokového onemocnění.

Při prevenci/zlepšení zápalu plic u populace přestárých lidí (nad 55 let) a zánětu středního ucha u kojenců (až do 18 měsíců) a nemluvňat (v typickém případě 18 měsíců až 5 let) se v dalším preferovaném provedení podle vynálezu popisuje kombinace multivalentního polysacharidového konjugátu formulovaného stejným způsobem jako se popisuje v případě proteinu mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* nebo jeho imunologicky funkčního ekvivalentu. Preferovaný protein nebo proteinové kombinace se popisují ve shora v textu uvedené sekci „Pneumokokové proteiny podle vynálezu“.

Upřednostňuje se, aby popsané antigenní prostředky (a vakcíny) se lyofilizovaly a tak se udržovaly do toho okamžiku, kdy se mají použít, což znamená, že se rekonstituují rozpouštědlem. Více se upřednostňuje, aby se prostředky lyofilizovaly v přítomnosti 3D-MPL a rekonstruovaly se fyziologickým roztokem.

Lyofilizované prostředky jsou stabilnější (například se předchází rozkladu polysacharidových antigenů). Způsob je také překvapivě odpovědný za vyšší titr protilátek proti pneumokokovým polysacharidům. To se ukazuje zvláště podstatně v případě konjugátů PS 6B. V jiném ohledu podle vynálezu se tak lyofilizovaný antigenní prostředek obsahující konjugát PS 6B adjuvoval s 3D-MPL a v podstatě neobsahuje adjuvans založené na hliníku.

Příprava vakcín se popisuje shora v textu v sekci „Příprava vakcín podle vynálezu“.

C) Konjugáty bakteriální polysacharid - protein D

Kombinační vakcíny jsou výhodné v tom, že redukuje potíže recipienta, umožňují plánování a dokončení režimu, vykazují také průvodní jev, kterým je snížení účinnosti vakcíny (shora v textu se popisuje potlačení epitopu pomocí použití nosičových proteinů). Je proto výhodné vytvořit vakcinační kombinaci, která spojuje potřeby populace a která navíc vykazuje imunogenní interferenci mezi jejími komponenty. Tyto výhody zahrnují imunogenní prostředky (nebo vakcíny) podle vynálezu, které jsou zvláště výhodné pro aplikaci kombinačních vakcín vysoce rizikovým skupinám, jako jsou kojenci, nemluvňata nebo přestárlí lidé.

Vynález popisuje protein D pocházející z mikroorganismu *Haemophilus influenzae* nebo jeho fragmenty, jako nosič imunogenního prostředku založeného na polysacharidu, které jsou obsaženy ve vakcínách. Fragmenty vhodné pro použití zahrnují fragmenty obsahující epitopy pomocných buněk T. Zvláště fragment proteinu D bude s výhodou obsahovat N-terminální 1/3 proteinu.

Protein D je protein vázající IgD pocházející z mikroorganismu *Haemophilus influenzae* (EP 0 594 610 B1) a je potencionálním imunogenem.

Polysacharidy, aby se konjugovaly s proteinem D podle vynálezu zahrnují, ale nejsou omezeny na Vi polysacharidový antigen proti mikroorganismu *Salmonella typhi*, meningokokální sacharidy (zahrnující typ A, C, W135 a Y a polysacharid a upravený polysacharid a upravené polysacharidy meningokoků skupiny B), polysacharidy z mikroorganismu *Staphylococcus aureus*, polysacharidy z mikroorganismu *Streptococcus agalactae*, polysacharidy z mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*, polysacharidy z mikroorganismu mykobakterium, například *Mycobacterium tuberculosis* (mannofosfoinositidy trehalóz, kyselina mykoliová, kapsule vytvořené z těchto látek a arabinogalaktany), polysacharid z mikroorganismu *Cryptococcus neoformans*, lipopolysacharidy netypovatelného *Haemophilus influenzae*, kapsulární polysacharid z mikroorganismu *Haemophilus influenzae b*, lipopolysacharidy mikroorganismu *Moraxella catharralis*, lipopolysacharidy mikroorganismu *Shigella sonnei*, lipopeptidofosfoglykan (LPPG) mikroorganismu *Trypanosoma cruzi*, gangliosidy spojené se zhoubným bujením, GD3, GD2, mucíny spojené nádorovým onemocněním, zvláště T-F antigen a sialyl T-F antigen a polysacharid spojený s IV, který je strukturálně spojený s antigenem T-F.

Polysacharid může být spojen s nosičovým proteinem libovolnou známou metodou (popisuje se například v publikaci Likhite, U.S. Patent 4 372 945 a Armor et al., U.S. patent 4 474 757). Přednostně se provedlo spojení s CDAP (WO 95/08348).

V CDAP kyanylační činidlo 1-kyanodimethylaminopyridin-terafluoroborát (CDAP) se přednostně použil při syntéze konjugátů polysacharid-protein. Kyanilační reakce se může

uskutečnit za relativně mírných podmínek, které brání hydrolýze polysacharidů citlivých na alkalické činidlo. Tato syntéza umožňuje přímé spojování s nosičovým proteinem.

Polysacharid se rozpustil ve vodě nebo ve fyziologickém roztoku. CDAP se rozpustil v acetonitrilu a přidal se okamžitě k polysacharidovému roztoku. CDAP reaguje s hydroxylovými skupinami polysacharidu ve formě esteru kyanátu. Po aktivaci se přidal nosičový protein. Aminoskupiny lyzinu reagují s aktivovaným polysacharidem za vzniku izomočovinové kovalentní vazby.

Po reakci se přidá velký nadbytek glycinu a potlačí se zbytkové aktivované funkce. Produkt pak prochází gelem, aby se odstranil nezreagovaný nosičový protein a zbytková činidla. Vynález popisuje způsob produkce konjugátů polysacharidu a proteinu D, který zahrnuje kroky aktivace polysacharidu a spojení polysacharidu s proteinem D.

V preferovaném provedení vynálezu se popisuje imunogenní prostředek (nebo vakcína) vhodná pro prevenci infekcí *Streptococcus pneumoniae*.

Mechanismy rozšíření pneumokoků do plic, cerebrospinální tekutiny a krve nejsou zcela jasné. Růst bakterií v normálních plicních sklípcích se inhibuje jejich relativní suchostí a fagocytární aktivitou alveolárních makrofágů. Libovolné anatomické nebo fyziologické změny této koordinované obrany má tendenci zvyšovat citlivost plic k infekci. Buněčná stěna mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* má důležitou úlohu při vytvoření zánětlivé odezvy ve sklípcích plic (popisuje se v publikaci Gillespie et al., (1997), I and I 65: 3936).

V typickém případě vakcína proti mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* podle vynálezu bude obsahovat konjugáty polysacharidu a proteinu D, kde polysacharid se

získal z alespoň čtyř, sedmi, jedenácti, třinácti, patnácti nebo 23 sérotypů. V sekci „Polysacharidové antigeny mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*“ se podle vynálezu popisují preferované kombinace sérotypů závisající na léčeném onemocnění.

V dalším provedení vynálezu se popisuje vakcína proti mikroorganismu *Neisseria meningitidis*, zvláště sérotypy A, B, C W-135 a Y. Mikroorganismus *Neisseria meningitidis* je jeden z nejdůležitějších případů bakteriální meningitidy. Sacharidová kapsule těchto organismů může působit jako determinanta virulence a cíl ochranných protilátek. V oboru je známo, že polysacharidy jsou u malých dětí slabými imunogeny. Vynález popisuje zvláště vhodný proteinový nosič vhodný pro tyto polysacharidy, protein D, který popisuje epitopy buňky T, které se mohou aktivovat odezvou buňky-T, přičemž dochází k proliferaci, protože polysacharidový antigen specifický pro buňku B napomáhá jejich pomnožení a zrání, stejně jako indukci imunologické odpovědi.

V jiném provedení podle vynálezu se popisuje konjugát kapsulárního polysacharidu mikroorganismu *Haemophilus influenzae b* (PRP) - protein D.

Vynález dále popisuje kombinační vakcíny, které poskytují ochranu proti řadě rozdílných patogenů. Nosič proteinu D je překvapivě použitelný jako nosič v kombinačních vakcínách, kde je konjugováno více polysacharidových antigenů. Jak se popisuje shora v textu potlačení epitopu se pravděpodobně objevuje, jestliže se pro každý polysacharid může použít stejný nosič. Dokument WO 98/51339 popisuje prostředky, které minimalizují svůj vliv konjugací části polysacharidů v prostředku s DT a zbytek s TT.

Překvapivě se zjistilo, že protein D je zvláště vhodný pro minimalizaci takových účinků potlačení epitopu v kombinačních

vakcínách. Jeden nebo více polysacharidů v kombinaci může s výhodou konjugovat s proteinem D a přednostně v takových kombinačních vakcínách všechny antigeny konjugují s proteinem D.

Preferované kombinace zahrnují vakcínu, která umožňuje ochranu proti infekci mikroorganismu *Neisseria meningitidis* C a Y (a s výhodou A), kde polysacharidový antigen z jednoho nebo více sérotypů Y a C (a nejvýhodnější je A) je spojen s proteinem D.

Vakcína založená na polysacharidu mikroorganismu *Haemophilus influenzae* (PRP konjugovaný přednostně s TT, DT nebo CRM197 nebo výhodně s proteinem D) se může vytvořit stejně jako shora v textu popsané kombinační vakcíny.

Řada vakcín použitelných v pediatrii se vyskytuje jako kombinační vakcína, aby se snížil počet injekcí, které se musí dítěti aplikovat. Tak pediatrické vakcíny podle vynálezu obsahují více antigenů. Vakcíny podle vynálezu se mohou spojovat nebo se mohou aplikovat jednotlivě, ale je známa trivalentní kombinační vakcína obsahující toxoid diftérie (DT), toxoid tetanu (TT) a komponenty černého kašle (v typickém případě jde o detoxifikovaný toxoid černého kašle (PT) a filamentózní hemagglutinin (FHA) s pertaktinem (PRN) a/nebo aglutinin 1+2), která se označuje jako INFANRIX-DTPa™ (od firmy SmithKlineBeecham Biologicals), která obsahuje antigeny DT, TT, PT, FHA a PRN. Dále je známa vakcína obsahující celé buňky černého kašle, která je od firmy SmithKlineBeecham Biologicals s.a. a je označena jako Tritanrix™. Kombinovaná vakcína může také obsahovat jiný antigen, jako je povrchový antigen hepatitidy B (HbsAg), antigeny Polioviru (například deaktivovaný trivalentní poliovirus-IPV), proteiny vnější membrány mikroorganismu *Moraxella catarrhalis*, proteiny netypovatelného *Haemophilus*

influenzae, proteiny vnější membrány mikroorganismu *N. meningitidis* B.

Příklady preferovaných proteinových antigenů mikroorganismu *Moraxella catarrhalis* zahrnuté v kombinační vakcíně (zvláště pro prevenci zánětu středního ucha) jsou: OMP106[WO 97/41731] (Antex) a WO 96/34960 (PMC)], OMP 21, LbpA a LbpB [WO 98/55606 (PMC)], TbpA a TbpB [WO 97/13785 a WO 97/32980 (PMC)], CopB [Helminen ME, et al., (1993) Infect. Immun. 61: 2003-2010], UspA1/2 [WO 93/03761 (University of Texas)] a OmpCD. Příklady netypovatelných antigenů mikroorganismu *Haemophilus influenzae*, které jsou zahrnuty v kombinační vakcíně (zvláště vhodné pro prevenci zánětu středního ucha) zahrnují: protein fimbrin [US 5766608 - Ohio State research Foundation] a fúze obsahující jeho peptidy [například fúze peptidů LB1(f), US 5843464 (OSU) nebo WO 99/64067], OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs)], P6 [EP 281673 (State University of New York)], TbpA a TbpB, Hia, Hmw1,2, Hap a D15.

Preferované pediatrické vakcíny podle vynálezu jsou:

- a) Konjugát polysacharidu C mikroorganismu *N. meningitidis* a konjugát polysacharidu *Haemophilus influenzae* b, které mohou být spojeny s konjugátem polysacharidu A a/nebo Y *M.meningitidis*, přičemž se poskytuje alespoň jeden polysacharidový antigen a upřednostňuje se, aby všechny polysacharidy byly spojené s proteinem D.
- b) Vakcína a) doplněná DT, TT, komponenty černého kašle (upřednostňuje se PT, HFA a PRN), povrchový antigen hepatitidy B a IPV (deaktivovaná trivalentní vakcína polioviru).
- c) Polysacharidové antigeny mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* spojené s proteinem D.

- d) Vakcína c) s jedním nebo více antigeny, které pocházejí z mikroorganismu *Moraxella catarrhalis* a/nebo z netypovatelného *Haemophilus influenzae*.

Pro všechny shora uvedené kombinované vakcíny je výhodné použití proteinu D, jako nosiče. Je zřejmé, že čím více nosičů, které se zahrnou do kombinační vakcíny (například, aby se překonalo potlačení epitopu), tím je dražší a komplexnější konečná vakcína. Podstatně výhodné je, když všechny nebo většina polysacharidových antigenů v kombinační vakcíně se konjuguje s proteinem D.

Při prevenci zápalu plic u populace přestárlých lidí (nad 55 let) a zánětu středního ucha u kojenců nebo nemluvnat se preferuje provedení vynálezu, kdy se kombinuje multivalentní polysacharid mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* a protein D, což se zde nazývá protein mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* nebo jeho imunologicky funkční ekvivalent. Ve shora uvedené sekci „Pneumokokové proteiny podle vynálezu“ se popisují preferované proteiny (proteinové kombinace, které mohou být obsaženy v takových kombinacích.

Vynález dále popisuje imunogenní prostředek obsahující konjugát polysacharid *Streptococcus pneumoniae* - protein D a proteinový antigen mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*.

Antigeny polysacharid - protein D podle vynálezu jsou ve vakcinačním prostředku podle vynálezu s výhodou konjugované. Vhodná adjuvans zahrnují hlinité sole, jako je gel hydroxidu hlinitého (alum) nebo fosforečnan hlinitý, ale mohou to také být sole vápníku, železa nebo zinku nebo to mohou být nerozpustné suspenze acylovaného tyrozinu nebo acylované cukry, kationicky nebo anionicky derivatizované polysacharidy nebo polyfosfazený.

U vakcín pro přestárlé lidi se preferuje, že adjuvans se vybralo tak, aby vyvolávalo odezvu typu Th1.

Určité adjuvans Th1 se popisuje shora v textu v sekci „Adjuvans Th1 podle vynálezu“.

Vynález dále popisuje imunogen nebo vakcínu, kterou je možné použít v medicíně.

Příprava/aplikace konjugátu se popisuje v sekci „Příprava vakcíny podle vynálezu“ shora v textu.

Protein D se také s výhodou použije ve vakcíně proti zánětu středního ucha. Sám působí jako imunogen schopný produkovat ochranu zprostředkovanou B-buňkou proti netypovatelnému *H. influenzae* (ntHi). ntHi může vstoupit do hostitele a umožní pomocí proteinového antigenu indukci účinků zprostředkovaných buňkou B. Překvapivě se zjistil způsob zvýšení účinnosti působení proteinu D (buď se samotného nebo jako nosiče pro polysacharid) jako antigenu ve vakcíně proti zánětu středního ucha. To je možné provést adjuvancí proteinu D tak, že se v subjektu indukuje silná odezva Th1 proti proteinu D tak, že část imunitního systému zprostředkovaná buňkou se optimalizuje. Toho se překvapivě dosáhne použitím lyofilizovaného prostředku, který obsahuje protein D a adjuvans Th1 (upřednostňuje se 3D-MPL), který se rekonstituoval krátce před aplikací. Vynález tak popisuje takové prostředky, způsob pro přípravu takových kompozic (lyofilizací směsi, která obsahuje protein D a adjuvans Th1) a použití takového prostředku při léčbě zánětu středního ucha.

Ukázalo se, že lyofilizace imunogenu v přítomnosti adjuvans Th1 (popisuje se v sekci „adjuvans Th1“ podle vynálezu), přednostně 3D-MPL, v obecném případě vyvolá imunitní odezvu Th1 proti imunogenu. Vynález je možné aplikovat na libovolný imunogen, v případě, že je nutné, aby

imunitní systém reagoval silnější imunitní odezvou Th1. Takové imunogeny obsahují bakteriální, virové a nádorové proteinové antigeny, stejně jako samotné proteiny a peptidy.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Kapsulární polysacharid mikroorganismu *S.pneumoniae*

11-valentní vakcína zahrnuje kapsulární polysacharidy sérotypu 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F a 23F se připravily v podstatě stejným způsobem, jak se popisuje v dokumentu EP 72513. Každý polysacharid se aktivuje a derivatizuje za použití chemie CDAP (popisuje se v dokumentu 95/08348) a konjugoval se s proteinovým nosičem. Všechny polysacharidy se konjugovaly ve své přirozené formě s výjimkou sérotypu 3 (jehož velikost se redukovala, aby se snížila viskozita).

Proteinový nosič:

Vybraný proteinový nosič je rekombinantní protein D (PD) z netypovatelného *Haemophilus influenzae*, který se exprimuje v *E. coli*.

Expres proteinu D

Protein D mikroorganismu *Haemophilus influenzae*

Genetická konstrukce vhodná pro expresi proteinu D

Počáteční materiál

DNA kódující protein D

Protein D je mezi *H.influenzae* všech typů a netypovatelnými kmeny vysoce konzervativní. Vektor pHIC348 obsahující sekvenci DNA kódující celý gen proteinu D se získal od Dr. A. Forsgrena, z instituce Department of Medical

Microbiology, University of Lund, Malmo General Hospital, Malmo, Sweden. Sekvence DNA proteinu D se popisuje v publikaci Janson et al., (1991) Infect. Immun. 59: 119-125.

Expresí vektoru pMG1

Expresivní vektor pMG1 je derivát pBR322 (popisuje se v publikaci Gross et al., 1985), kde bakteriofág λ nese řídící elementy pro transkripci a translaci cizorodých začleněných genů (popisuje se v publikaci Shatzman et al., 1983). Navíc gen nesoucí rezistenci na ampicilin se zaměnil za gen nesoucí rezistenci na kanamycin.

Kmen AR58 mikroorganismu *E. coli*

Kmen AR58 mikroorganismu *E. coli* se vytvořil transdukci N99 se zásobním roztokem fágu P1, který se kultivoval na derivátu SA500 (galE::TN10, lambdaKil⁻cI857 Δ H1).

Kmeny N99 a SA500 jsou kmeny K12 mikroorganismu *E. coli* získané od Dr. Martina Rosenberga z instituce National Institute of Health.

Expresivní vektor pMG1

Při produkci proteinu D DNA kódující protein se klonovala do expresivního vektoru pMG1. Tento plazmid využívá signály z DNA fágu lambda, aby řídil transkripci a translaci začleněných cizorodých genů. Vektor obsahuje promotor PL, operátor OL a dvě utilizační místa (NutL a NutR), aby se uvolnily transkripční polarizační účinky, když se připravuje protein A (popisuje se v publikaci Gross et al., 1985). Vektory obsahující promotor PL se zavedou do mikroorganismu lysogenního kmene *E. coli*, aby se stabilizovala plazmidová DNA. Lisogenní hostitelské kmeny obsahují DNA fágu lambda, který se nereplikuje, integrovanou do genomu (popisuje se

v publikaci Shatzman et al., 1983). Chromozomální DNA fága lambda řídí syntézu proteinu represoru cI, který se váže na represor OL vektoru a předchází navázání RNA polymerázy na promotor PL a tím předchází transkripci začleněného genu. Kmen AR58 exprimující gen cI obsahuje mutant citlivý na teplotu tak, že transkripce řízená PL může regulovat posunem teploty. To znamená, že zvýšením teploty kultivace se deaktivuje represor a inicijuje se syntéza cizorodého proteinu. Tento expresivní systém umožňuje řízenou syntézu cizorodých proteinů zvláště těch, které mohou být pro buňku toxické (popisuje se v publikaci Shimataka and Rosenberg, 1981).

Kmen AR58 mikroorganismu *E. coli*

Lysogenní kmen mikroorganismu *E. coli* AR58 používaný při produkci nosiče proteinu D je derivát standardního kmene NIH *E. coli* K12 kmen N99 (F^{-} su $^{-}$ galK2, lacZ $^{-}$ thr $^{-}$). Tento kmen obsahuje defektivní lysogenní fág lambda (galE::TN10, lambdaKil $^{-}$ cI857 Δ H1). Fenotyp Kil $^{-}$ brání vypnutí syntézy makromolekul v hostiteli. Mutace cI857 udílí lézi citlivou na teplotu represoru cI. Delece Δ H1 odstraňuje pravý operon fágu lambda a hostitelské loci bio, uvr3 a chlA. Kmen AR58 se vytvořil transdukci N99 se zásobním roztokem fága P1, který se dříve kultivoval na derivátu SA500 (galE::TN10, lambdaKil $^{-}$ cI857 Δ H1). Zavedení defektního lyzogenu do N99 se zjistilo na základě selekce s tetracyklinem a základě přítomnosti transpozonu TN10, který kóduje rezistenci na tetracyklin v přilehlém genu galE.

Konstrukce vektoru pMGMDPPrD

Vektor pMG 1, který obsahuje gen kódující nestrukturový protein S1 viru Influenzae (pMGNSI), se použil při konstrukci

pMGMDPPrD. Gen proteinu D se amplifikoval pomocí PCR z vektoru pHIC348 (popisuje se v publikaci Janson et al., 1991) s primery PCR, které obsahují restrikční místa NcoI a XbaI na 5' a 3' konci. Fragment NcoI/XbaI se pak zavedl do pMGNS1 mezi restrikční místa NcoI a XbaI a tak vznikl fúzní protein obsahující 81 N-terminálních aminokyselin proteinu NS1, po nichž následuje protein PD. Tento vektor se označil jako pMGNS1PrD.

Na základě konstrukce popsané shora v textu se vytvořila konečná konstrukce pro expresi proteinu D. Z pMGNS1PrD se odstranil fragment BamI/BamHI. Hydrolýza této DNA odstranila oblast kódující NS1, mimo prvních tří zbytků N-konce. Po opětovné ligaci vektoru se vytvořil gen kódující fúzní protein s následující N-terminální aminokyselinovou sekvencí.

-MDP SSHSSNMANT-

NS1 protein D

Protein D neobsahuje vedoucí peptid ani N-terminální cystein, na který se v normálním případě připojí lipidový řetězec. Protein se proto nevylučuje do periplazmy a zůstává v cytoplasmě v nerozpustné formě.

Konečná konstrukce pMG-MDPPrD se zavedla do hostitelského kmene AR58 teplotním šokem při teplotě 37 °C. Bakterie obsahující plazmid se vybraly v přítomnosti kanamycinu. Přítomnost proteinu D obsahující inzert DNA se demonstrovala štěpením izolované plazmidové DNA s vybranými endonukleázami. Rekombinantní kmen *E. coli* se označil jako ECD4.

Exprese proteinu D je řízena promotorem lambda P_L /operátorem O_L . Hostitelský kmen AR58 obsahuje v genomu gen *cI* citlivý na teplotu, přičemž tento gen blokuje expresi lambda P_L při nízké teplotě pomocí navázání O_L . Když se zvýší

teplota z O_L se uvolní cI a exprimuje se protein D. Nakonec fermentace se zvýší koncentrace buněk a buňky se zamrazí.

Extrakce ze sebraných buněk a čištění proteinu D se provedla následujícím způsobem. Pelet kultury zamražených buněk se rozpustil a resuspendoval se v roztoku, který porušuje buňky (citrátový pufr pH 6,0) na konečnou hodnotu $OD_{650} = 60$. Suspenze dvakrát prošla homogenizérem za vysokého tlaku při $P = 1000$ barů. Homogenát buněčné kultury se vyčeřil centrifugací a buněčný odpad se odstranil filtrací. V prvním čistícím kroku se filtrovaný lyzát aplikoval na chromatografickou kolonu s výměnou kationtů (SP sefaróza s malým průtokem). PD se váže na gelovou matici iontovou interakcí a vymyl se postupným zvyšováním iontové síly elučního pufru.

Při druhém kroku čištění se nečistoty odstranily na matici s výměnou aniontů (Q sefaróza s rychlým průtokem). PD se neváže na gel a může se hromadit ve výtokové fázi.

Oba kroky hromadění frakcí na chromatografické koloně se monitorují pomocí hodnoty OD. Frakce vytékající z kolony s výměnou aniontů obsahující čištěný protein D se koncentrovaly ultrafiltrací.

Protein D obsažený ve frakci po ultrafiltraci nakonec prošel membránou o velikosti pórů $0,2 \mu m$.

Chemické postupy:

Aktivace a konjugace

Podmínky aktivace a párování jsou specifické pro každý polysacharid. Tyto podmínky jsou popsány v tabulce č. 1. Přirozený polysacharid (s výjimkou PS3) se rozpustil v 2M roztoku NaCl nebo ve vodě a roztok je vhodný pro zavedení

injekcí. Optimální koncentrace polysacharidu se stanovila v případě všech typů polysacharidů.

Do polysacharidového roztoku se přidal CDAP (CDAP/PS = 0,75 mg/mg PS) ze zásobního roztoku v nitrilu o koncentraci 100 mg/ml. Po 1,5 minutě se přidal 0,2 M triethylamin, aby došlo ke specifické aktivaci pH. Aktivace polysacharidu se provedla při uvedeném pH během 2 minut při teplotě 25 °C. Protein D (množství závisí na počátečním poměru PS/PD) se přidal do aktivovaného polysacharidu a provedla se konjugace při specifickém pH po dobu 1 hodiny. Reakce se zastavila glycinem po dobu 30 minut při teplotě 25 °C a nechala se stát přes noc při teplotě 4 °C.

Konjugáty se čistily gelovou filtrací na gelové filtrační koloně Sephacryl 500HR, která se uvedla do rovnováhy 0,2 M roztokem NaCl.

Stanovil se obsah sacharidů a proteinů eluovaných frakcích. Konjugáty se slily a sterilně se filtrovaly na sterilizační membráně o velikosti pórů 0,22 µm. V konjugátu se stanovil poměr PS/protein.

Charakterizace:

Charakterizoval se každý konjugát a specifikace se uvedly v tabulce 2. Obsah polysacharidů (µg/ml) se měřil resorcinolovým testem a obsah proteinu (vyjádřený v µg/ml) se stanovil Lowryho testem. Konečný poměr PS/PD (hmotn./hmotn.) se stanovil poměrem koncentrací.

Zbytkový obsah DMAP (ng/µg PS):

Aktivace polysacharidu s CDAP zavádí do polysacharidu kyanátovou skupinu a uvolňuje se DMAP (4-

dimethylaminopyridin). Zbytkový obsah DMAP se stanovil specifickým testem vyvinutým při SB.

Obsah volných polysacharidů (vyjádřeno v %):

Obsah konjugátů volných polysacharidů při teplotě 4 °C nebo skladovaných 7 dní při teplotě 37 °C se stanovil na supernatantu získaném po inkubaci s protilátkami α -PD a saturovaným sulfátem amonným, pak následuje centrifugace.

Test ELISA α -PS/ α -PS se použil při kvantifikaci volného polysacharidu v supernatantu. Absence konjugátu se také kontrolovala testem ELISA α -PD/ α -PS. Snížení množství polysacharidu vede ke zlepšení konjugační vakcíny.

Antigenicita:

Antigenicita stejných konjugátů se analyzovala testem ELISA sendvičového typu, kde zachycení a detekce protilátek byly α -PS a α -PD.

Obsah volného proteinu (vyjádřeno v %)

Množství volného zbytkového proteinu D se stanovilo použitím způsobu, kdy se vzorek ošetřil SDS. Konjugát se zahříval při teplotě 100 °C po dobu 10 minut v přítomnosti 0,1 % a nanasl se injekcí na gelovou filtrační kolonu SEC-HPLC (TSK 3000-PWXL). V případě, že protein D je dimér, existuje nebezpečí nadhodnocení množství volného proteinu D disociací struktury s SDS.

Molekulová velikost (K_{av}):

Molekulová velikost se stanovila použitím gelové filtrační kolony SEC-HPLC (TSK 5000-PWXL).

Stabilita:

Stabilita se měřila na gelové filtrační HPLC-SEC (TSK 6000-PWXL) v případě konjugátů udržovaných při teplotě 4 °C a skladovaných po dobu 7 dní při teplotě 37 °C.

11-valentní charakterizace je dána v tabulce č. 2.

Proteinové konjugáty se mohou adsorbovat na fosforečnan hlinitý a spojit se za vzniku konečné vakcíny.

Závěr

Připravily se imunogenní konjugáty, které jsou komponenty slibné vakcíny. V případě každé z jedenácti valencí se zjišťovaly optimální podmínky CDAP, aby vznikl konečný konjugovaný pneumokokový polysacharidový produkt. Konjugáty těchto pneumokokových polysacharidů, které je možné získat shora uvedeným způsobem (optimalizovaným) CDAP (s ohledem na nosičový protein, ale přednostně protein D) je tak dalším aspektem vynálezu.

Příklad 2: Studie účinku výhodného adjuvans na imunogennost 11-valentní pneumokokové konjugační vakcíny PS-PD u krys.

Právě narozené krysy se imunizovaly 11 valentní pneumokokovou konjugační vakcínou PS-PD, která obsahuje 0,1 µg každého polysacharidu (vyrobena způsobem popsáném v příkladu 1) a použilo se následující adjuvanční činidlo: žádné, AlPO₄, 3D-MPL, 3D-MPL na AlPO₄.

Prostředek obsahující pouze 3D-MPL je statisticky (a překvapivě více imunogenní) (nejvíce GMC IgG) ve srovnání s jinými prostředky v případě pěti z 11-ti antigenů. To platí, jak pro vysoké tak nízké koncentrace 3D-MPL.

Opsonofágocytóza potvrdila výsledky GMC.

Materiály a metody

Imunizační protokol

Právě narozené krysy se vybraly od různých náhodných matek a při první imunizaci byly 7 dní staré. Pak se provedly 2 další imunizace o 14 dní a 28 dní později. Vykrvácení se provedlo v den 56 (to je 28 dní po III. imunizaci). Všechny vakcíny se zavedly podkožní injekcí a ve skupině pro jednu vakcínu bylo 10 krys.

Krysy se imunizovaly 11-valentní pneumokokovou konjugační vakcínou, která obsahuje následující polysacharidové sérotypy konjugované s proteinem D: 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F.

Příprava

Za účelem testování účinku různých výhodných adjuvans, dávka konjugátu se udržovala konstantní 0,1 μg každého polysacharidu a připravilo se adjuvans AlPO_4 a 3D-MPL v různých dávkách a kombinacích, které nezahrnují žádné adjuvans. Ty jsou uvedeny podle čísel v tabulce č. 3.

Adsorpce na AlPO_4

Koncentrované, adsorbované monovalenty se připravily podle následujícího postupu. 50 μg AlPO_4 (pH 5,1) se míchalo s 5 μg konjugovaných polysacharidů po dobu 2 hodin. pH se upravilo na hodnotu pH 5,1 a směs se nechala stát dalších 16 hodin. Přidal se 1 500 mM roztok NaCl, koncentrace sole je 150 mM. Po 5 minutách se přidal 2-fenoxyethanol v koncentraci 5 mg/ml. Po dalších 30 minutách se pH upravilo na hodnotu 6,1 a směs se nechala stát po dobu 3 dní při teplotě 4 °C.

Příprava ředidla

Tři ředidla se připravila v roztoku NaCl při koncentraci 150 mM/5 mg/ml fenoxxyethanolu

A: AlPO_4 při koncentraci 1 mg/ml.

B: 3D-MPL na AlPO_4 při koncentraci 250 a 1 000 $\mu\text{g/ml}$, poměr hmotností 3D-MPL/ AlPO_4 = 5/20

C: 3D-MPL na AlPO_4 při koncentraci 561 a 1 000 $\mu\text{g/ml}$, poměr hmotností 3D-MPL/ AlPO_4 = 50/89

Příprava adsorbovaného undekavelentu

Dvanáct koncentrovaných adsorbovaných PS-PD monovalentů se smíchalo při správném poměru. Jako ředidlo A se přidal doplněk AlPO_4 . Když je to nutné, přidal se 3D-MPL buď ve formě vodného roztoku (neadsorbovaného, způsob 1 popsáný dále v textu) nebo jako ředidlo B nebo C (3D-MPL adsorbovaný na AlPO_4 ve dvou dávkách, způsob 2 popsáný dále v textu).

Způsob 1:

3D-MPL se přidal ke kombinovaným adsorbovaným konjugátům ve formě vodné suspenze. Směs se míchala s undekavalentem po dobu 10 minut při teplotě místnosti a před aplikací se uchovával při teplotě 4 °C.

Způsob 2:

Před přidáním k adsorbovanému konjugátu se 3D-MP předem adsorboval na AlPO_4 (ředidlo B a C). Aby se připravil 1 ml ředidla, vodná suspenze 3D-MPL (250 nebo 561 μg) se míchala s 1 mg AlPO_4 ve 150 mM NaCl s hodnotou pH 5,6 po dobu 5 minut při teplotě místnosti. Roztok se ředil v NaCl s hodnotou pH 6,1/fenoxxy a inkuboval se přes noc při teplotě 4 °C.

Příprava neadsorbovaného undekavalentu

Smíchalo se jedenáct konjugátů PS-PD a ve správném poměru se přidal 150 mM roztok NaCl pH 6,1, fenoxý. Když je to nutné přidal se 3D-MPL ve formě roztoku (neadsorbovaný).

Přípravky pro všechny injekce se připravily 18 dní před první aplikací.

Test ELISA

Test ELISA se uskutečnil za účelem měření krysího IgG za použití protokolu získaného z WHO workshopu zabývajícím se postupy testů ELISA při kvantifikaci protilátek IgG proti kapsulárním polysacharidům v lidském séru. V podstatě čištěný kapsulární polysacharid se potáhl přímo na mikrotitrační destičku. Vzorky sér se předem inkubovaly s polysacharidem z buněčné stěny, který je běžný pro všechny pneumokoky (substance C) a který je přítomen v pneumokokových polysacharidech čištěných podle popisu v dokumentu EP 72513 B1) v přibližné koncentraci 0,5 %. Aby se detekovaly vázané myší IgG, použily se činidla získaná v instituci Jackson ImmunoLaboratories Inc.. Titrační křivky odpovídaly vnitřním standardům (monoklonální protilátky) modelovaným logickou logaritmickou rovnicí. Výpočet se provedl za použití SoftMax Pro softwaru. Očekávalo se, že maximální absolutní chyba u těchto výsledků bude faktor dvou. Relativní chyba je menší než 30 %.

Opsonofágocytóza

Opsonizační titry se stanovily pro sérotypy 3, 6B, 7F, 14, 19F a 23F za použití protokolu CDC (*Streptococcus pneumoniae* Opsonophagocytosis using Differentiated HL60 cells, version 1.1) s čištěnými lidskými PMN a s komplementem mláďat králíků.

Úprava zahrnovala použití pneumokokových kmenů a fagocytické buňky HL60 se nahradily čištěnými lidskými neutrofily PMN (kde existuje vysoký stupeň korelace mezi uvedenými fagocytickými buňkami). Navíc se do mikrotitračních prohlubní přidaly skleněné kuličky o velikosti 3 mm za účelem intenzivnějšího míchání a to umožňuje redukovat poměr fagocyty : bakterie, jehož doporučená hodnota je 400.

Výsledky:

Koncentrace IgG

Geometrický průměr koncentrací IgG se stanovil pro každý sérotyp a PD se zobrazilo v tabulkách č. 4 až 10. V případě sérotypů 6B, 14, 19F a 23F jsou zahrnuty pro porovnání předchozí výsledky získané za použití tetraivalentní formulace.

Nejvyšší koncentrace IgG jsou v tabulkách 4 až 10 označeny tučným písmem. Porovnání statistických hodnot p v případě kompozic 3D-MPL versus 3D-MPL/ $AlPO_4$ je v tabulce č. 11. Adjuvantní formulace č. 4 (neadsorbované konjugáty s vysokou dávkou 3D-MPL), které umožňují nejvyšší GMC pro 9 z jedenácti případů. V pěti z jedenácti případů je MPL v nízké dávce druhým nejvíce imunogenním adjuvans. Přísady umožní vyšší GMC ve srovnání s dávkou pro všechny sérotypy (data nejsou uvedena) a to je statisticky podstatné v případě sérotypů 4, 6B, 7F, 18C a 23F (p je menší než 0,05 od 95 % CI).

Opsonofagocytóza

Výsledky opsonofagocytózy na shromážděném séru jsou zobrazeny pro sérotyp 3, 6B, 7F, 14, 19F a 23F v tabulce 4 až 8. Ve většině případů tyto opsonizační titry potvrdily přítomnost GMC IgG. Korelace s koncentrací IgG je vyšší než 85 % v případě sérotypů 6B, 19F, 23F (data nejsou uvedena). V případě sérotypu 3, je důležité poznamenat, že pouze skupina 3D-MPL vyvolala opsonizační aktivitu nad hodnotu pozadí.

Závěr

V tomto experimentu se neočekávalo, že použití samotného 3D-MPL bude indukovat nejvyšší koncentrace IgG.

Maximální GMC IgG získané modifikací pomocí adjuvans se porovnávalo s maximální získanou GMC modifikací dávky PS a zjistilo se, že 3D-MPL by mohlo vyvolat vyšší odezvy u 5-ti z jedenácti sérotypů.

Tabulka č. 11 ukazuje, že když se porovnávají kompozice 3D-MPL a 3D-MPL/ AlPO_4 (porovnání způsobu formulace a dávka 3D-MPL), podstatně se zlepšila imunogennost 5-ti polysacharidových konjugátů, když se přidá jen 3D-MPL než 3D-MPL plus AlPO_4 , PS 4, PS 6B, PS 18C, PS 19F a PS 23F.

Příklad 3: Studium účinku kombinací na imunogennost konjugátů PS4, PS 6B, PS 18C, PS 19F a PS 23F dospělých krys

Dospělé krysy se imunizovaly konjugační vakcínou obsahující pneumokokový polysacharid a protein D, buď jednotlivě nebo kombinovaně v multivalentní kompozici (buď tetra-, penta-, hepta- nebo dekavalent). Skupiny deseti krys se imunizovaly dvakrát v časovém intervalu 28 dní a testovací krev se získala v den 28 a v den 42 (14 dní po druhé dávce).

V sérech se testem ELISA testovala přítomnost protilátek IgG proti pneumokokovým polysacharidům. Testem ELISA se zjistilo, že všechny konjugáty vyvolaly specifické protilátky IgG. Tabulka č. 12 ukazuje účinek konjugátů proteinu D v kombinaci monovalentu PS 6B, PS 18C, PS 19F a PS 23F na jejich imunogennost u dospělých krys, jak se měřila koncentrace IgG po 14-ti dnech po druhé dávce.

U všech vzorků se provedla statistická analýza, aby se stanovilo, zda rozdíly v koncentraci protilátek po kombinaci byli podstatné. Kombinace libovolných sérotypů PS 6B, PS 18C, PS 19F a PS 23F konjugátů proteinu D v multivalentní vakcíně podstatně nemění jejich imunogennost.

Tabulka č. 1: Specifická aktivace/konjugace/podmínky ukončení
PS konjugátů *S. pneumoniae* - protein D

serotyp	1	3 (mikroka palina)	4	5	6B	7F
PS konc. (mg/ml)	2,0	3,0	2,0	7,5	5,4	3,0
PS rozpušt.	NaCl 2M	NaCl 2M	H ₂ O	H ₂ O	2M NaCl	2M NaCl
PD konc. (mg /ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
počáteč. poměr PS/PD (hmotn./ hmotn.)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP konc. (mg/mg PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a =pH _c =	9,0/9,0/	9,0/9,0/	9,0/9,0/	9,0/9,0/	9,0/9,0/	9,0/9,0/
pH _q	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0

serotyp	9V	14	18C	19F	23F
PS konc. (mg/ml)	2,5	2,5	2,0	4,0	3,3
PS rozpušt.	2M NaCl	2M NaCl	H ₂ O	2M NaCl	2M NaCl
PD konc. (mg/ ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
počáteč. poměr PS/PD (hmotn./h motn.)	1/0,75	1/0,75	1/1	1/0,5	1/1
CDAP konc. (mg/mg PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a =pH _c =	8,5/8,5/9	9,0/9,0/9	9,0/9,0/9	10/9,5/9	9,0/9,0/9
pH _q					

Tabulka č. 2: Specifikace 11-valentní pneumokokové vakcíny PS-PD (první čísla kódu dávky indikují sérotyp)

kritérium	D01PDJ227	D03PDJ236	D4PDJ228	D5PDJ235	D6PDJ209
Poměr PS/Prot. (hmotn.)	1/0,66	1/1,09	1/0,86	1/0,86	1/0,69
obsah volného polysacharidu (%)	1	1	7	9	0
<10 %					
Obsah volného proteinu (%)	8	<1	19	21	9
<15 %					
Obsah DMAP (ng/μg PS)	0,2	0,6	0,4	1,2	0,3
<0,5 ng/μg PS					
Molekulová velikost (K_{av})	0,18	0,13	0,12	0,11	0,13
stabilita	není posun	není posun	není posun	není posun	není posun

	D07PDJ225	D09PDJ222	D14PDJ202	D18PDJ221	D19PDJ206	D23PDJ212
Poměr PS/prot (hmotn./hmotn.)	1/0,58	1/0,80	1/0,68	1/0,62	1/0,45	1/0,74
obsah volného polysacharidu (%)	1	<1	<1	4	4	0
<10 %						

03.10.01

obsah volného proteinu (%)	8	0,3	3	21	10	12
<15 %						
obsah DMAP (ng/μg PS)	0,1	0,6	0,3	0,2	0,1	0,9
<0,5 ng/μg PS						
velikost molekul (K_{av})	0,14	0,14	0,17	0,10	0,12	0,12
stabilita	není posun	není posun	není posun	není posun	není posun	není posun

03.12.01

Tabulka č. 3: Shrnutí adjuvančních formulací testovaných 11-valentní pneumokokové PS-PD u novorozených krys

skupina	AlPO ₄	MPL	způsob	popis
1				žádný
2	100			AlPO ₄
3		5		nízká konc. MPL
4		50		vysoká konc. MPL
5	100	5	způsob 1	způsob 1 nízká konc.
6	100	50	způsob 1	způsob 1 vysoká konc.
7	100	5	způsob 2	způsob 2 nízk. konc.
8	100	50	způsob 2	způsob 2 vysok. konc.

Tabulka č. 4: Geometrický průměr koncentrace IgG serotyp 6B, serokonverze a průměr opsonizačního titru 28 dní po III. imunizaci novorozených krys s 11-valentní PS-PD za použití různých adjuvans (a porovnání s tetravalentní imunizací)

skupina	AlPO ₄ μg	MPL μg	způsob	6B GMC IgG (μg/ml)	6B serokon- verze	6B opsotitr *	6B GMC IgG (μg/ml)	6B serokon- verze	6B opso titr*
				tetravalent			undekavalent		
1				0,047	2/10	12,5	0,004	1/10	<6,25
2	100			0,048	4/10	65	0,019	4/10	<6,25
3		5					1,345	10/10	43
4		50					4,927	10/10	192
5	100	5	1				0,042	7/10	<6,25
6	100	50	1				0,255	10/10	<6,25
7	100	5	2	0,033	3/10	<6,25	0,048	8/10	<6,25
8	100	50	2				0,057	8/10	<6,25

Tabulka č. 5: Geometrický průměr koncentrace IgG serotyp 14, serokonverze a průměr opsonizačního titru 28 dní po III. imunizaci novorozených krys s 11-valentní PS-PD za použití různých adjuvans (a porovnání s tetravalentní imunizací)

skupina	AlPO ₄ μg	MPL μg	způsob	14 GMC IgG (μg/ml)	14 serokon- verze	14 opson. titr*	14 GMC IgG (μg/ml)	14 serokon- verze	14 opson. titr*
				tetravalent			undekavalent		
1				0,046	3/10	64	0,022	3/10	<6,25
2	100			0,99	10/10	88	0,237	8/10	27
3		5					0,233	10/10	41
4		50					0,676	10/10	81
5	100	5	1				0,460	9/10	67
6	100	50	1				0,477	10/10	98
7	100	5	2	0,81	10/10	49	0,165	8/10	81
8	100	50	2				1,611	10/10	133

Tabulka č. 6: Geometrický průměr koncentrace IgG serotyp 19F, serokonverze a průměr opsonizačního titru 28 dní po III. imunizaci novorozených krys s 11-valentní PS-PD za použití různých adjuvans (a porovnání s tetravalentní imunizací)

skupina	AlPO ₄ μg	MPL μg	způsob	19F GMC IgG (μg/ml)	19F serokon- verze	19F opson. titr*	19F GMC IgG (μg/ml)	19F serokon- verze	19F opson. titr*
				tetravalent			undekavalent		
1				0,04	2/10	64	0,021	2/10	<6,25
2	100			1,07	9/10	367	0,222	7/10	79
3		5					4,028	10/10	296
4		50					21,41 1	10/10	1276
5	100	5	1				1,649	10/10	172
6	100	50	1				2,818	10/10	208

7	100	5	2	1,09	10/10	193	0,766	10/10	323
8	100	50	2				3,539	10/10	241

Tabulka č. 7: Geometrický průměr koncentrace IgG serotyp 23F, serokonverze a průměr opsonizačního titru 28 dní po III. imunizaci novorozených krys s 11-valentní PS-PD za použití různých adjuvans (a porovnání s tetraivalentní imunizací)

skupina	AlPO ₄ μg	MPL μg	způsob	23F GMC IgG (μg/ml)	23F serokon- verze	23F opson. titr*	23F GMC IgG (μg/ml)	23F serokon- verze	23F opson. titr*
				tetraivalent			undekavalent		
1				0,06	2/10	<6,25	0,152	3/10	<6,25
2	100			0,29	10/10	70	0,56	8/10	<6,25
3		5					2,296	9/10	389
4		50					4,969	10/10	>1600
5	100	5	1				0,462	5/10	17
6	100	50	1				0,635	8/10	54
7	100	5	2	0,38	10/10	<6,25	0,203	3/10	18
8	100	50	2				0,501	7/10	43

Tabulka č. 8: Geometrický průměr koncentrace IgG serotyp 3 a 7F, serokonverze a průměr opsonizačního titru 28 dní po III. imunizaci novorozených krys s 11-valentní PS-PD za použití různých adjuvans (a porovnání s tetraivalentní imunizací)

skupina	AlPO ₄ μg	MPL μg	způsob	3 GMC IgG (μg/ml)	3 serokon- verze	3 opson. titr*	7F GMC IgG (μg/ml)	7F serokon- verze	7F opson. titr*
1				0,003	1/10	<6,25	0,040	7/10	<6,25
2	100			0,008	6/10	<6,25	0,25	9/10	43
3		5		0,070	10/10	<6,25	2,435	10/10	477
4		50		0,108	10/10	18	2,569	10/10	332

5	100	5	1	0,015	10/10	<6,25	0,579	10/10	54
6	100	50	1	0,027	10/10	<6,25	0,611	9/10	59
7	100	5	2	0,006	10/10	<6,25	0,154	8/10	30
8	100	50	2	0,034	10/10	<6,25	0,638	9/10	140

Tabulka č. 9: Geometrický průměr koncentrace IgG serotyp 1, 4 a 5, serokonverze 28 dní po III. imunizaci novorozených krys s 11-valentní PS-PD za použití různých adjuvans

skupina	AlPO ₄ μg	MPL μg	způsob	1 GMC IgG (μg/ml)	1 serokon- verze	4 GMC IgG (μg/ml)	4 serokon- verze	5 GMC IgG (μg/ml)	5 serokon- verze
1				0,026	4/10	0,005	1/10	0,040	3/10
2	100			0,282	8/10	0,052	5/10	0,774	9/10
3		5		1,614	10/10	3,452	10/10	7,927	10/10
4		50		2,261	10/10	7,102	10/10	13,97 4	10/10
5	100	5	1	0,568	10/10	0,676	10/10	3,015	10/10
6	100	50	1	1,430	10/10	0,419	9/10	5,755	10/10
7	100	5	2	0,478	10/10	0,267	9/10	2,062	10/10
8	100	50	2	1,458	10/10	0,423	10/10	5,009	10/10

Tabulka č. 10: Geometrický průměr koncentrace IgG serotyp 9V, 18C a PD, serokonverze 28 dní po III. imunizaci novorozených krys s 11-valentní PS-PD za použití různých adjuvans

skupina	AlPO ₄ μg	MPL μg	způsob	9V GMC IgG (μg/ml)	9V serokon- verze	18C GMC IgG (μg/ml)	18C serokon- verze	PD GMC IgG (μg/ml)	PD serokon- verze
1				0,018	0/10	0,013	1/10	0,003	0/10
2	100			0,489	6/10	0,092	5/10	0,993	10/10
3		5		0,482	7/10	6,560	10/10	3,349	10/10
4		50		11,42	10/10	14,02	10/10	5,446	10/10

				1		3			
5	100	5	1	2,133	9/10	0,690	10/10	11,40 7	10/10
6	100	50	1	2,558	10/10	1,771	10/10	1,258	10/10
7	100	5	2	1,536	10/10	0,528	10/10	1,665	8/10
8	100	50	2	2,448	9/10	0,980	10/10	5,665	10/10

Tabulka č. 11: Statistická významnost (hodnota p), zda jisté pneumokokové polysacharidové konjugáty zlepšily imunogenost, když se spojily se samotným 3D-MPL ve srovnání s 3D-MPL/ AlPO_4 . Hodnota p nižší než 0,01 se považuje za vysoce podstatnou. Způsob 1 a 2 indikuje způsob formulace.

serotyp	50 μg 3D-MPL vs 3D-MPL/ AlPO_4		5 μg 3D-MPL vs 3D-MPL/ AlPO_4	
	Způsob 1	Způsob 2	Způsob 1	Způsob 2
1				
3	0,3	0,05	0,079	0,11
4	0,075	0,01	0,27	0,008
5	0,002	0,0003	0,02	0,003
6B	0,001	0,0001	0,001	0,0006
7F	0,13	0,15	0,01	0,005
9V	0,02	0,02	0,1	0,04
14	0,65	0,21	0,3	0,66
18C	0,0008	0,0002	0,006	0,004
19F	0,0009	0,006	0,21	0,04
23F	0,002	0,0004	0,01	0,0004

Tabulka č. 12: Geometrický průměr koncentrace IgG ($\mu\text{g}/\text{ml}$) v den 14 po druhé dávce po imunizaci dospělých krys 1,0 μg samotného konjugátu polysacharid-protein nebo kombinovaného do tetravalentní, pentavalentní, heptavalentní nebo dekavalentní

vakcíny. Tato data se μg kombinují z pěti nezávislých experimentů.

Serotypy vakcíny	4	6B	18C	19F	23F
	H	T	H	T	T
samotný	9,3	0,11	15	5,2	2,5
kombinovaný	4	0,23	3,7	3,7	2,8

T: kombinovaný v tetraivalentní (T) (PS 6B, 14, 19F, 23F), pentavalentní (T plus PS3), heptavalentní (H) (T plus PS4, 9V a 18C) a dekaivalentní (H plus PS 1, 5 a 7F) kombinální vakcíny. H: kombinovaný do heptavalentní (H) (T plus 4, 9V a 18C) a dekaivalentní (H plus PS 1, 5 a 7F) kombinovanou vakcínu.

Příklad 4: Výhody přidání pneumolyzinu a 3D-PML na účinnost ochrany PD-konjugované 11-valentní polysacharidové vakcíny proti pneumokokové kolonizaci plic u myši

Odečítání imunologických hodnot

Dávka sérového IgG specifických pro pneumolyzin určených testem ELISA

Imunodestičky Maxisorp Nunc se potáhly po dobu 2 hodin při teplotě 37°C $100\ \mu\text{l}$ /prohlubeň rekombinantního nativního pneumolyzinu (PLY) v koncentraci $2\ \mu\text{g/ml}$ ředěného PBS. Destičky se promyly 3 krát NaCl 0,9 % v 0,05% pufru Tween-20. Standardní křivka se vytvořila za použití dvojnásobného ředění (v PBS/Tween-20 0,05 %, $100\ \mu\text{l}$ v jedné prohlubni) anti-PLY séra (počáteční koncentrace je $670\ \text{ng/ml}$ IgG) a vzorky séra (počáteční ředění je 1/10) se inkubovaly po dobu 30 minut při teplotě 20°C za stálého míchání. Po promytí, jak se popisuje shora v textu, se kozí anti-myši IgG konjugované s peroxidázou (Jackson) ředěné 5 000 x v PBS/Tween-20 0,05 % inkubovaly ($100\ \mu\text{l}$ na jednu prohlubeň) po dobu 30 minut při teplotě 20°C za

stálého míchání. Po promytí se destičky inkubovaly po dobu 15 minut při teplotě místnosti se 100 μ l vyvíjejícího pufru na jednu prohlubeň (OPDA 0,4 mg/ml a H_2O_2 0,05 % ve 100 mM pH 4,5 citrátového pufru). Vyvíjení se zastavilo přidáním 50 μ l roztoku 1N HCl na jednu prohlubeň. Optická hustota se odečítala při 490 a 620 nm za použití zařízení Emax (od firmy Molecular Device). Titr protilátek se vypočítal matematickou metodou pro čtyři parametry za použití software SoftMaxPro.

Inhibice hemolýzy

Tento test se provedl za účelem měření schopnosti serových protilátek inhibovat hemolytickou aktivitu pneumolyzinu (PLY). Za účelem eliminovat cholesterol (který je náchylný k reakci s PLY), vzorky séra se ošetřily 2X následujícím způsobem: vzorky se smíchaly s jedním ekvivalentním objemem chloroformu a pak se inkubovaly po dobu 45 minut za stálého míchání. Supernatanty se sebraly po centrifugaci po dobu 10 minut při 1 000 ot./min.. Séra zbavená cholesterolu se ředila (provedlo se dvojnásobné seriové ředění v 1 mM dithiothreitolu, 0,01% BSA, 15 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) na mikrodestičkách s 96 prohlubněmi (Nunc). Do každé prohlubně se přidalo 50 μ l roztoku, který obsahuje 4 HU (jednotek hemolyzinu) PLY a destičky se inkubovaly po dobu 15 minut při teplotě 37 °C. Pak se přidalo 100 μ l ovčí červené krevní destičky (1% roztok) a vše se inkubovalo po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Po centrifugaci po dobu 10 minut při 1 000 ot./min. se shromáždil supernatant (150 μ l) a přenesl se do další mikrotitrační destičky s 96 prohlubněmi, přičemž je možné číst optickou hustotu při vlnové délce 405 nm. Výsledky se exprimovaly jako střední bod ředění titrů.

Chemická detoxifikace pneumolyzinu

Rekombinantní přirozený pneumolysin (PLY) se dialyzoval proti 50 mM fosfátovému pufru s NaCl o koncentraci 500 mM pH 7,6. Všechny následující kroky se provedly při teplotě 39,5 °C za episodického míchání. V den 1 se přidal k roztoku PLY roztok obsahující 10% Tween-80 (1/25 objem/objem), 57,4 mM N-acetyltryptofan pH 7,6 (3/100 Objem/objem), 2,2 M glycin ve fosfátovém pufru (1/100 objem/objem) a 10% formaldehyd ve fosfátovém pufru (3/100 objem/objem). V den 2 a 3 se opět přidal 10% formaldehyd v poměru 3/100 a 2/100 (objem/objem). Kultivace proběhla při teplotě 39,5 °C do sedmého dne za stálého míchání. Nakonec se roztok PLY dialyzoval proti 50 mM fosfátovému pufru s 500 mM NaCl pH 7,6. V hemolytickém testu se demonstrovala úplná deaktivace PLY.

Pneumokoková intranasální čelendž u myši OF1

Sedm týdnů staré samice myši se intranasálně inokulovaly při anestezii s 5×10^5 jednotek tvořící kolonie mukroorganizmem *S.pneumoniae* adaptovaný pro myši serotyp 6B. Plíce se vnaly 6 hodin po čelendži a homogenizovaly se (zařízením Ultramax, při 24 000 ot./min a teplotě 4 °C) v kultivačním médiu Todd Hewth Broth (THB, Gibco). Sériové desetinasobné ředění plicního homogenátu se nanoslo na Petriho misky, které obsahují agar THB doplněný kvasinkovým extraktem, a ty se inkubovaly přes noc při teplotě 37 °C. Pneumokoková plicní infekce se stanovila jako počet jednotek tvořící kolonie/myš a vyjádřila se jako logaritmicky vážený průměr. Limit detekce je 2,14 log jednotek tvořící kolonie/myš.

Příklad 4A: Adjuvanční účinek 3D-MPL na imunitní odezvu na pneumolysin

V tomto příkladu se hodnotí vliv adjuvace s 3D-MPL na imunitní odezvu na přirozený rekombinantní pneumolysin (PLY, poskytl J. Panton, Children's Hospital, North Adelaide,

Australia) a na jeho chemicky detoxifikovanou část (DPLY). Chemická detoxifikace se provedla, jak se popisuje shora v textu.

Skupina deseti samic šesti týdnů starých samic myší Balb/c se intramuskulárně imunizovaly v den 0, 14 a 21 s 1 μg PLY nebo DPLY, který je obsažen buď v A: AlPO_4 100 μg nebo B: AlPO_4 100 μg + 5 μg 3D-MPL (3 de-O-acylovaný monofosforyllipid A od firmy Ribi Immunochem). Obrázky č. 1A a 1B zobrazují hodnoty IgG získané testem ELISA a hemolyzinové inhibiční titry (HLI) měřené v seru po III imunizaci.

V případě kteréhokoli antigenu se nejsilnější imunitní odezva vyvolala u zvířat vakcinovaných formulacemi doplněnými 3D-MPL. Je zajímavé, že DPLY je stejně imunogenní jako PLY v případě, že se aplikoval s AlPO_4 + 3D-MPL, zatímco je slabší imunogen ve formulaci s AlPO_4 . To ukazuje výhodnou schopnost 3D-MPL zlepšit protilátkovou odezvu na detoxifikovaný pneumolysin.

V prostředku, který obsahuje pneumolysin, se může s výhodou použít chemicky detoxifikovaný pneumolysin spíše než mutačně detoxifikovaný pneumolysin. To proto, že detoxifikovaní mutanti získáni do této doby stále obsahují zbytkovou aktivitu toxinu, přičemž chemicky detoxifikovaný pneumolysin tuto aktivitu nemá. Uvažuje se proto další aspekt vynálezu, prostředek obsahující pneumolysin (nebo pneumolysinové mutanty), které se chemicky detoxifikovaly, aby se mohly použít ve vakcíně. Mohou se smíchat s Th1 adjuvans, přičemž se upřednostňuje 3D-MPL. Tyto prostředky jsou obsahem vynálezu. Také se předpokládá způsob zvyšující imunitní odezvu chemicky detoxifikovaného pneumolyzinu v imunogenním prostředku obsahující kroky přidání Th1 adjuvans (upřednostňuje se 3D-MPL) k prostředku.

Příklad 4B: Výhody přidání utlumeného mutantu pneumolyzinu a adjuvans 3D-MPL na 11-valentní polysacharidové vakcíny proti pneumokokové plicní kolonizaci u myši OF1, kterým se provedla intranasální čelendž se serotypem 6B.

V tomto příkladu se hodnotila účinnost profylaxe vakcíny obsahující 11-valentní konjugát polysacharid-protein D, utlumený mutantní pneumolyzinový antigen (PdB, popisuje se v dokumentu WO 90/06951) a adjuvans AlPO_4 + 3D-MPL ve srovnání s klasickým 11-ti valentním konjugačním prostředkem obsahující konjugát polysacharid-protein D s adsorbovaným AlPO_4 .

Skupiny 12-ti samic čtyři týdny starých myši OF1 se podkožně imunizovaly v den 0 a 14 prostředkem obsahujícím A: 50 μg AlPO_4 , B: 0,1 μg PS/serotyp PD-konjugované 11-valentní polysacharidové vakcíny + 50 μg AlPO_4 nebo C: 0,1 μg PS/serotyp PD-konjugované 11-valentní polysacharidové vakcíny + 10 μg PdB (poskytl Dr. J. Palton, Children's Hospital, North Adelaide, Australia) + 50 μg AlPO_4 + 5 μg 3D-MPL (od firmy Ribi Immunochem). Čelendž se provedla v den 21, jak se popisuje shora v textu.

Jak je zobrazeno na obrázku č. 1C, 11-valentní polysacharidová konjugační vakcína doplněná PdB a adjuvans AlPO_4 + MPL (černé sloupce reprezentují aritmetický průměr) vykazuje velmi podstatnou ochranu (hodnota p je menší než 0,007). Naopak nepodstatná ochrana se pozorovala u zvířat imunizovaných 11-valentním polysacharidovým konjugátem a AlPO_4 . Tento výsledek ukazuje, že přidání antigenu pneumolyzinu (dokonce utlumeného) a adjuvans 3D-MPL zesiluje účinnost 11-valentní polysacharidové konjugační vakcíny proti zápalu plic.

Příklad 4C: Imunní koreláty ochrany popsané v příkladu 4B

Za účelem zavést imunitní koreláty ochrany popsané v příkladu 4B pomocí 11-valentní polysacharidové konjugační vakcíny doplněné atenuovaným mutantním pneumolyzinem (PdB) a 3D-MPL, se měřila serologická protilátková odezva na polysacharid 6B a PdB před čelendží, jak se popisuje shora v textu.

Titry protilátek se pak porovnály s počtem bakteriálních kolonií určených v plicích odpovídajících zvířat odebraných 6 hodin po čelendži. Hodnota R^2 se vypočítala log/log lineární regrese.

Vypočtená hodnota R^2 se rovná 0,18 a 0,02 jako v případě anti-PdD a anti-6B protilátkové odezvy. To ukazuje na nepřítomnost korelace mezi humorální imunitní odezvou a ochrannou proti oběma antigenům. Titry protilátek proti 6B se ve skupinách imunizovaných 11-ti valentní konjugační vakcínou podstatně neliší (GMT je 0,318 ng/ml) a to také v případě stejné vakcíny doplněné PdD a 3D-MPL (GMT = 0,458 ng/ml). Proto zdokonalení ochrany pomocí prostředku C není zřejmě způsobené silnější protilátkovou ochranou proti polysacharidu 6B.

Výsledky naznačují, že ochrana není zprostředkována samotnou humorální imunitní odezvou, ale spíše imunitou zprostředkovanou buňkou, která se vyvolala antigenem PdB v přítomnosti 3D-MPL. To podporuje myšlenku aplikace proteinového antigenu(ů) a potentních adjuvans v pneumokokové polysacharidové konjugační vakcíně tak, že dochází ke koordinaci obou částí imunitního systému pro optimální ochranu.

Příklad 5: Spolupráce obou částí imunitního systému u myši aktivně imunizovaných pneumolyzinem a pasivně imunizovaných protilátkami proti pneumokokovému PS

Příklad 5A: Zjištění koncentrace pasivně aplikovaných anti-6B-polysacharidových protilátek, které chrání před zápallem plic

Metoda:

Vakcinační skupiny: Čtyři skupiny 16-ti myší se pasivně imunizovaly (ip.) v den -1 se 100 μ l neředěného krysího anti-polysacharidového antiséra v souladu se skupinami popsányi dále v textu (celkem 64 myší).

skupina	specifita	koncentrace IgG v antiséru
G1	α -PS-6B	5 μ g/ml
G2	α -PS-6B	2 μ g/ml
G3	α -PS-6B	0,75 μ g/ml
G4	kontrola	0 μ g/ml

Zvířata: 64 samic myší CD-1 z Charles River, Canada, které váží přibližně 35 g (jsou přibližně 10 týdnů staré).

Anesteze: K anestezii myší se použil isofluran (3 %) plus O_2 (1 l/min).

Organismus: *S.pneumoniae* N1387 (serotyp 6) se sklídily tryptikázových sojových agarových ploten (TSA) doplněných 5% koňskou krví a suspendovaných v 6 ml PBS. Bezprostředně před infekcí 1 ml bakteriální suspenze se ředil na 9 ml tekutého nutričního agaru (BBL) a vše se uchovávalo při teplotě 41 °C. Myším se aplikovalo 6,0 $\log_{10}$ jednotek tvořící kolonie/myš v objemu 50 μ l.

Infekce: V den 0 se provedla anesteze u myší, jak se popisuje shora v textu, a infikovaly se mikroorganizmem

S.pneumoniae N1387 (50 μ l chlazené bakteriální suspenze) intrabronchiální instilací pomocí intratracheální inkubací. Tato metoda se popisuje v publikaci Woodnut and Berry, Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43: 29(1999)).

Vzorky: 3 dny po infekci se usmrtilo 8 myší ve skupině nadměrnou dávkou CO₂, odebraly se plíce a homogenizovaly se v 1 ml PBS. Aby se určil živý počet bakterií, připravilo se desetinasobné ředění v PBS. Vzorky se inokulovaly (objem 20 μ l) ve třech provedeních na plotny TSA doplněné 5% koňskou krví μ g/ml a vše se inkubovalo přes noc při teplotě 37 °C a pak se provedlo hodnocení. Další sady myší se usmrtily v den 7 a připravily se vzorky způsobem popsáným shora v textu.

Výsledky:

koncentrace v krysím (μ g/ml)	IgG seru	počet bakterií ($\log_{10}$ cfu/plíce) v dny po infekci	
		3	8
5		6,7 $\pm$ 0,7 (1/7)	7,2 $\pm$ 0,7 (5/8)
2		6,5 $\pm$ 0,7 (1/7)	6,9 $\pm$ 1,8 (4/7)
0,75		7,7 $\pm$ 0,5 (5/8)	4,8 $\pm$ 1,4 (2/8)
0		6,7 $\pm$ 1,5 (3/6)	6,3 $\pm$ 1,5 (3/9)

čísla v závorce jsou zvířata, která zemřela před přípravou vzorků

Závěr: Obecně nedošlo k podstatnému rozdílu v počtu izolovaných bakterií z libovolných ošetřovaných skupin. To ukazuje, že nedošlo k žádné měřitelné ochraně anti-polysacharidem v koncentracích až 5 μ g/ml.

To je podobné tomu, co se pozorovalo v některých klinických studiích na lidech, to znamená, že anti-polysacharidová část není schopna některé populace chránit proti pneumokokovému zápalu plic.

Příklad 5B: Stanovení ochrany před zápalom plic dosažené aktivní aplikací Ply (pneumolyzin) s adjuvans nebo bez a synergie s suboptimálními protilátkami proti PS.

skupina	objem injekce aktivní	vakcína aplikovaná v den -22, -14 (dávka μg)	injekční objem pasivní	pasivní IgG (den -1)
1-1	100 μl podkožně	PdB/AlPO ₄ (10/50)		žádné
1-2	100 μl podkožně	PdB/MPL/AlP O ₄ (10/5/50)		žádné
1-3	100 μl podkožně	PdB/AlPO ₄ (10/50)	100 μl i.p.	α-PS
1-4	100 μl podkožně	PdB/MPL/AlP O ₄ (10/5/50)	100 μl i.p.	α-PS
1-5	100 μl podkožně	PdB/AlPO ₄ (5/50)	100 μl i.p.	α-PS
1-6	100 μl podkožně	PdB/AlPO ₄ (5/50)		žádné

Infekce: V den 0 se provedla u myši anestezie (3% isofluran plus 1 l/min O₂). Bakteriální inokulum se připravilo sklizením kultury mikroorganismu *S.pneumoniae* N1387 (serotyp 6) z ploten s tryptikázovým sojovým agarem (TSA) doplněným 5 % koňskou krví a buňky se suspnedovaly v 6 ml PBS. Těsně před infekcí se v chlazeném kapalném nutričním agaru (udržovaném při teplotě 41 °C) připravilo desetinásobné ředění (1 ml plus 9 ml). Myši se infikovaly intrabronchiální instilací prostřednictvím intratracheální inkubace a aplikovalo se jim přibližně 6,0

$\log_{10}$ jednotek tvořící kolonie na jednu myš v objemu 50 μ l. Tato metoda se popisuje v publikaci Woodnut and Berry (Antimicrob. Ag. chemotherap. 43: 29 (1999)).

Vzorky: 72 dní po infekci se usmrtilo 8 myší ve skupině nadměrnou dávkou CO_2 , odebraly se plíce a homogenizovaly se v 1 ml PBS. Aby se určil živý počet bakterií, připravilo se desetinasobné ředění v PBS. Vzorky se inokulovaly (objem 20 μ l) ve třech provedeních na plotny TSA doplněné 5% koňskou krví μ g/ml a vše se inkubovalo přes noc při teplotě 37 °C a pak se provedlo hodnocení. Další sady myší se usmrtily v den 8 a připravily se vzorky způsobem popsaným shora v textu.

Analýza dat

Výstupní hodnota vhodná pro porovnání aplikace je počet bakterií v plicích v den 3 a 7 po infekci. Výsledky se prezentovaly jako skupinový průměr se standardní odchylkou. Statistická analýza se uskutečnila za použití Studentova t-testu, kde se považuje za podstatnou hodnotu hodnota $\underline{p}$, když je menší než 0,05.

Výsledky

72 hodin po infekci

Počet bakterií ze skupiny 1-4 je podstatně nižší ($p < 0,05$) než v ve skupině 1-3.

Počet bakterií ze skupiny 1-4 je podstatně nižší ($p < 0,05$) než v ve skupině 1-5.

168 hodin po infekci

Počet bakterií ve všech skupinách je přibližně o 2 log nižší v den 8 než v den 3, což indikuje, že infekce se lepší.

Počet bakterií ze skupiny 1-2 je podstatně nižší ($p < 0,05$) než ve skupině 1-5.

skupina	den 3		den 8	
	log cfu/plíce	stand. odchylka	log cfu/plíce	stand. odchylka
1-1	6,93	0,61	5,23	1,28
1-2	6,59	1,25	4,08	1,34
1-3	7,09	0,8	5,32	1,26
1-4	6,09	1,43	4,46	2,32
1-5	7,19	0,89	5,42	1,05
1-6	6,68	1,14	5,01	1,48

Jak se ukázalo shora v textu samotné anti-polysacharidové protilátky (skupina 1-5) nevykazují ochranu proti pneumokokům v plicích. PdB s adjuvans $AlPO_4$ také nezaručuje ochranu, ale v den 8 je zde zjevný trend ochrany, když se PdB kombinuje s 3D-MPL (skupina 1-2).

V den 3 skupina, která vyjadřuje nejvíce podstatnou ochranu, což je skupina 1-4, vykazuje všechny tři elementy, PdB, 3D-MPL a pasivně aplikované anti-polysacharidové protilátky. Tento závěr je podpořen četností úmrtí. Skupina 1-4 vykazuje pouze 2 úmrtí z 8 samic ve srovnání se skupinou 1-5 a 1-3, kde je 5 úmrtí z 10 myší.

Závěr:

V případě, že se provedl experiment s pasivně imunizovanými zvířaty, synergický účinek aktivní imunizace pneumolyzinem a MPL nemůže být způsoben zvýšením množství protilátek proti polysacharidovému antigenu.

V případě, že zvířata byla imunizována proti pneumokokovému polysacharidu pouze pasivně, v den 8 se množství takových protilátek v hostiteli rychle ztrácí.

Podstatnou ochranu proti pneumokokovému zápalu plic je možné spatřit ve skupinách imunizovaných pneumolysinem plus 3D-MPL a zvláště ve skupinách imunizovaných pneumolysinem plus 3D-MPL, kde se pasivně přidávají anti-polysacharidové protilátky, což indikuje synergii této kombinace.

Jestliže se anti-polysacharidová imunizace provede aktivně (upřednostňuje se s konjugovaným polysacharidem), účinek bude více znatelný jako účinek paměti B-buněk a konstantní množství protilátek proti PS se bude podílet na kooperaci imunitní odpovědi (popisuje se například na obrázku č. 1C, kde řada zvířat aktivně imunizovaných polysacharidem a proteinem nevykazuje v plicích po čelendži žádné bakterie).

Příklad 6: Imunogennost u jednoletých myši Balb/C 11-valentní konjugační vakcíny obsahující pneumokokový polysacharid a protein D a adjuvans 3D-MPL

Úvod a cíle

Ochrana proti pneumokokové infekci je zprostředkována protilátkami specifickými pro serotyp prostřednictvím opsonofágocytozy. Je možné se domnívat, že zvýšení koncentrace protilátek povede k silnější ochraně a proto se velké úsilí věnuje nalezení způsobu jak zesílit humorální odezvu. Jedna strategie, která se s úspěchem aplikuje, je použití konjugační vakcíny v preklinické studii spolu s imunostimulačním adjuvans (popisuje se v publikaci Poolman et al., 1998, Carbohydrate-Based Bacterial Vaccines. In: Handbook of Experimental Pharmacology eds. P. Perlmann and H. Wigzell, Springer-Verlag, Heidelberg, D).

Data uvedená v této sekci ukazují výsledky posledního experimentu za použití klinických serií v protokolu navrženém tak, aby napodobil klinickou studii.

Protokol:

Jednoleté myši balb/c se imunizovaly jednou desetinou lidské dávky konjugační vakcíny zahrnující pneumokokový polysacharid a protein D nebo 23-valentní vakcíny obsahující pouze polysacharid. Používané vakcíny byly klinické série DSP009, DSP013 nebo DSP014 odpovídající 1 µg dávky serotypu 6B a 23F a 5 µg zbývajících serotypů 11-valentní konjugační vakcíny, 0,1 µg dávky 11-valentní konjugační vakcíny nebo 0,1 µg dávky 11-valentní konjugační vakcíny s 5 µg adjuvans 3D-MPL. Všechny 11-valentní konjugované vakcíny obsahují také 50 µg AlPO₄.

Skupiny 20 myši se imunizovaly do svalu. Injekce skupin uvedených v následující tabulce se zavedly v den 0 a 21. Testovaná krev se získala v den 35 (14 dní po druhé dávce).

Tabulka: Imunizační rozvrh v případě jednoletých myši Balb/c imunizovaných klinickou serií konjugační vakcíny obsahující pneumokokový polysacharid a protein D

Skupina	den 0 vakcína dávka	den 21 vakcína dávka	počet myši
1	pneumovax-23 2,5 µg	pufr	20
2a	11-valent. Pn-PD 0,1 µg	pufr	20
2b	11-valent. Pn-PD 0,1 µg	11-valent. Pn-PD 0,1 µg	20

3a	11-valent. Pn-PD +MPL 0,1 µg + 5 µg	pufr	20
3b	11-valent. Pn-PD +MPL 0,1 µg + 5 µg	11-valent. Pn-PD +MPL 0,1 µg + 5 µg	20
4a	11-valent. Pn-PD 1 µg + 0,5 µg	pufr	20
4b	11-valent. Pn-PD 1 µg + 0,5 µg	11-valent. Pn-PD 1 µg + 0,5 µg	20
kontrola	pufr	pufr	20

V seru se testem ELISA testovala přítomnost protilátek IgG proti pneumokokovému polysacharidu podle protokolu CDC/WHO, což znamená, že po neutralizaci séra se použije polysacharid z buněčné stěny. Test ELISA se kalibroval tak, že koncentrace protilátek se vyjadřuje v µg/ml za použití serotypově specifických monoklonálních protilátek IgG1.

Statistické analýzy porovnání se provedly za použití programu UNISTAT verze 5,0 beta. Test ANOVA pomocí metody Tukey-HSD se provedl na logaritmicky transformovaných koncentracích IgG. Porovnání rychlosti přeměny sera se uskutečnilo použitím Fisherova exaktního testu.

Výsledky:

V následující tabulce jsou zobrazeny GMC IgG a 95% interval spolehlivosti proti 11 serotypům a protein D indukovaný 14 dní po druhé imunizaci (dávka 2). Rychlosti serokonverze jsou zobrazeny tam, kde není možné vypočítat 95% interval spolehlivosti.

Skupina jedna vykazuje účinek imunizace se samotným polysacharidem, který normálně indukuje u zvířat pouze IgM. Většina množství IgG se drží pod mezí detekce, nicméně myši

balb/c jsou schopny vytvořit IgG na několik pneumokokových polysacharidů, přičemž je možné zmínit serotypy 3, 19F a 14.

Imunizace s konjugačními vakcínami vyvolala protilátky IgG s vysokou rychlostí serokonverze proti všem serotypům s výjimkou 23F.

Pouze v případě serotypu 7F a 19F se pozorovala odezva závislá na dávce (skupina 4 vs skupina 2), ale tyto pozorování nebyli statisticky podstatná. Silnější odezva se pozorovala po dvou dávkách (skupiny b vs skupiny a) v případě serotypu 3, 6B, 7F a 19F a PD a tato pozorování jsou v mnoha případech se všemi třemi prostředky statisticky podstatná.

Nejvíce zajímavý je účinek 3D-MPL. Dvě dávky 3D-MPL vytvořené vakcíny (skupina 3b) indukovala nejvyšší GMC specifického IgG a to je statisticky podstatné pro všechny serotypy s výjimkou 23F. V tomto případě je podstatně vyšší rychlost serokonverze ($p = 0,02$ skupina 3b vs 2b, Fisherův extrakt).

Tabulka: Geometrický průměr (IgG) a 95% intervaly spolehlivosti pro vybrané pneumokokové serotypy a protein D u jednoletých myši Balb/c 14 dní po II imunizaci s 11-valentní konjugační vakcínou PS-PD

skupina	1	2a	2b	3a	3b	4a	4b
Sero- typ	GM [IgG] μg/ml (95% CI)	GM [IgG] μg/ml (95% CI)	GM [IgG] μg/ml (95% CI)	GM [IgG] μg/ml (95% CI)	GM [IgG] μg/ml (95% CI)	GM [IgG] μg/ml (95% CI)	GM [IgG] μg/ml (95% CI)
3	0.24 (0.16-0.6)	0.18 (0.11-0.27)	0.84 (0.47-1.5)	0.72 (0.51-1.0)	4.84 (3.0-7.9)	0.22 (0.14-0.35)	0.95 (0.19-1.8)
6B	0.02 0/20 [#]	0.04 8/19	0.19 (0.09-0.41)	0.14 (0.07-0.27)	0.74 (0.29-1.9)	0.09 (0.05-0.16)	0.11 (0.05-0.23)
7F	0.04 0/20 [#]	0.07 (0.04-0.12)	0.19 (0.10-0.39)	0.15 (0.10-0.22)	0.97 (0.49-2.0)	0.09 (0.06-0.14)	0.45 (0.20-1.02)
14	0.15 3/20 [#]	4.5 (2.5-8.1)	6.2 (3.6-10.5)	12.9 (7.8-21.2)	13.6 (9.4-19.7)	4.0 (2.0-8.0)	6.9 (4.6-10.6)
19F	1.2 (0.56-2.6)	6.7 (3.6-12.5)	12.1 (7.6-19.3)	10.1 (5.5-18.5)	58.5 (42-81)	5.9 (3.5-9.9)	22.0 (16.0-30.2)
23F	0.07 1/20 [#]	0.08 3/20 [#]	0.08 2/19 [#]	0.07 2/10 [#]	0.17 9/20 [#]	0.06 1/18 [#]	0.10 4/20 [#]
PD*	0.25 1/20 [#]	5.2 (3.3-8.3)	11.9 (6.9-20.7)	13.5 (9.5-19.0)	98.0 (49.1-195.)	10.9 (6.4-18.4)	38.7 (21.3-70.3)

*vyjádřeno v EU/ml,

rychlost serokonverze se definuje jako 2 standardní odchylky nad průměr negativní kontroly.

V předchozí tabulce jsou definovány skupiny.

Závěr:

Zde uvedená data demonstrují, že přidání 3D-MPL k 11-valentní konjugační vakcíně obsahující pneumokokový polysacharid a protein D zvýší imunitní odpověď u starých myši balb/c v případě všech testovaných serotypů.

U většiny případů dvě dávky vakcíny indukovaly vyšší geometrickým průměr koncentrací IgG ve srovnání s jednou dávkou. To se nepozorovalo za použití samotné polysacharidové vakcíny. Tato skutečnost se považuje za indikaci imunitní odezvy závislé na T-buňkách a imunitní paměti.

Tato data podporují vakcinační aplikační schéma za použití konjugovaných pneumokokových polysacharidů, kde se jako adjuvans používá Th1 (upřednostňuje se 3D-MPL), přičemž se aplikují alespoň dvě dávky vakcíny obsahující adjuvans, přičemž se preferuje časový interval mezi dávkami 1 až 12 týdnů a nejvýhodnější je interval tří týdnů. Takové aplikační schéma je obsahem vynálezu.

Myši používané v experimentu nevykazují odezvu na PS 23 (samotný nebo konjugovaný). Je zajímavé, že ačkoli množství protilátek proti polysacharidu zůstává nízké s ohledem na použitý vakcinační prostředek, o mnoho více myši odpovídá na PS 23, v případě, že se jako adjuvans použije 3D-MPL (serokonverze je podstatně vyšší). Použití adjuvans Th1, zvláště pak 3D-MPL ve vakcinačních prostředcích obsahujících konjugované pneumokokové polysacharidy za účelem odstranit neschopnost odezvy na pneumokokový polysacharid ve vakcíně je

také dalším aspektem vynálezu. Dalším způsobem jak odstranit neschopnost odpovídat na dříve uvedený prostředek je použití dvou dávkového aplikačního schématu popsaného shora v textu.

Příklad 7: Konjugát polysacharidu C mikroorganismu *Neisseria meningitidis* - protein D (PSC-PD)

A: Exprese proteinu D

Probíhá jako v příkladu 1.

B: Výroba polysacharidu C

Zdroj polysacharidu skupiny C je mikroorganismus *N. meningitidis* kmen C11. Tento kmen se fermentuje za použití klasické fermentační techniky (popisuje se v dokumentu EP 72513). Suché práškové polysacharidy užívané v konjugačním procesu jsou shodné s Mencevax (SB Biologicals s.a.).

Alikvot kmene C11 se roztavil a 0,1 ml suspenze se nanoslo na petriho misku s médiem Mueller Hinton doplněným dialyzátem kvasinkového extraktu (10 % objem/objem) a kultura se inkubovala po dobu 23 až 25 hodin při teplotě 36°C v inkubátoru v atmosféře vzduchu saturovaného vodou.

Povrchová kultura se resuspendovala ve sterilním fermentačním médiu a s touto suspenzí se inokulovala Rouxova lahev obsahující médium Mueller Hinton doplněné dialyzátem kvasinkového extraktu (10 %, objem/objem) a sterilní skleněné kuličky. Po inkubaci Rouxovy nádoby po dobu 23 až 25 hodin při teplotě 36 °C v inkubátoru v atmosféře vzduchu saturovaného vodou se povrchová kultura resuspendovala v 10 ml sterilního fermentačního média a 0,2 až 0,3 ml této suspenze se inokulovalo do 12 jiných Rouxových lahcí s médiem Mueller Hinton.

Po inkubaci během 23 až 25 hodin při teplotě 36 °C v inkubátoru v atmosféře vzduchu saturovaného vodou se povrchová kultura resuspendovala v 10 ml sterilního fermentačního média. Bakteriální suspenze se slila do konické lahve.

Tato suspenze se pak sterilně přenesla do fermentoru za použití sterilní stříkačky.

Fermentace meningokoků se provedla ve fermentoru, které se nacházejí v čisté místnosti při negativním tlaku. Fermentace se v obecném případě ukončila po 10 až 12 hodinách. Koncentrace bakterií je 10^{10} bakterií v jednom mililitru (to je časná stacionární fáze) a ukončení fermentace se detekuje zvýšením pH.

V tomto stádiu se celá půda před centrifugací deaktivovala zahřátím (12 min. při teplotě 56 °C). Před aktivací a po ní se odebral vzorek půdy a rozetřel se na petriho misky na médium Mueller Hinton.

C. Čištění PS

Proces čištění je postup zahrnující více kroků a provedl se s celým obsahem fermentace. V prvním stádiu čištění se deaktivovaná kultura čířila centrifugací a získal se supernatant.

Čištění polysacharidů je založeno na srážení s kvartérní amonnou solí (bromid cetyltrimethylamonný/CTAB, Cetavlon R). CTAB tvoří nerozpustné komplexy s polyantiony, jako jsou polysacharidy, nukleové kyseliny a proteiny závislé na jejich pI. Tato metoda se může použít při srážení nečistot (nízká konduktivita) nebo polysacharidů (vysoká konduktivita).

Polysacharidy obsažené v čistém supernatantu se srážely za použití diatomitu (CELITE® 545) jako matrice, aby se zabránilo tvorbě nerozpustné inertní hmoty během srážení/čištění.

Schéma čištění polysacharidu C mikroorganismu *N.meningitidis*

Krok 1: Fixace komplexu PSC-CTAB na CELITE® 545 a odstranění buněčného odpadu, nukleových kyselin a proteinů promytím 0,05 % CTAB.

Krok 2: Eluce PS 50% EtOH. První frakce, která je turbidní a obsahuje nečistoty a LPS se vylila. Přítomnost PS v dalších frakcích se ověřila flokulačním testem.

Krok 3: Opětná fixace komplexu PS-CTAB na CELITE® 545 a odstranění menších nukleových kyselin a proteinů promytím 0,05 % CTAB.

Krok 4: Eluce PS 50% EtOH. První turbidní frakce se vylije. Přítomnost PS v následujících frakcích se ověří flokulačním testem.

Eluát se filtroval a sbíral se filtrát obsahující surový extrakt. Polysacharid se srážel z filtrátu přidáním ethanolu na konečnou koncentraci 80 %. Polysacharid se pak odstranil jako bílý prášek, sušil se ve vakuu a skladoval se při teplotě -20 °C.

D. Konjugace CDAP

Konjugace PSC a PD

V případě konjugace PSC a PD se preferuje technologie CDAP konjugace oproti klasické aktivaci CNBr a provedlo se párování přes mezerník na nosičový protein. Polysacharid se nejdříve aktivoval kyanylací s 1-kyano-4-dimethylaminopyridiniumtetrafluoroborátem (CDAP). CDAP je ve

vodě rozpustné cyanylační činidlo, ve kterém se elektrofilita kyanoskupiny zvyšuje nad hodnotu pro CNBr, což umožňuje, aby cyanylační reakce se provedla za poměrně jemných podmínek. Po aktivaci se může polysacharid přímo spojit s nosičovým proteinem přes jeho aminoskupiny, aniž je nutné zavést distanční molekuly. Nezreagované esterkyanátové skupiny se uhasí extenzivní reakcí s glycinem. Celkový počet kroků zahrnutých v přípravě konjugačních vakcín se omezil a v konečném produktu nejsou přítomny nejdůležitější potencionálně imunogenní distanční molekuly.

Aktivace polysacharidů s CDAP zavádí kyanoskupinu do polysacharidů a uvolňuje se dimethylaminopyridin (DMAP). Během následujícího postupu párování kyanátová skupina reaguje se skupinami NH_2 v proteinu a je přetvořena na karbamát.

Aktivace PSC a párování PSC-PD

Aktivace a párování se provedlo při teplotě 25°C .

120 mg PS se rozpouštělo alespoň po dobu 4 hodin v WFI.

Roztok CDAP (100 mg/ml čerstvě připraveného acetonitrilu) se přidalo v množství, aby se dosáhlo poměru CDAP/PS (hmotn./hmotn.) 0,75.

Po 1 minutě a 30 vteřinách se zvýšila hodnota pH až na hodnotu aktivace (pH 10) přidáním triethylamoinu a pak se tato hodnota stabilizuje až do přidání PD.

V čase 3 minuty 30 vteřin se přidalo NaCl tak, aby konečná koncentrace byla 2M.

V čase 4 minuty se přidal PD tak, aby poměr PD/PS byl 1,5/1. Hodnota pH je bezprostředně upravena na hodnotu při párování (pH 10). Roztok se nechal stát po dobu jedné hodiny při regulované hodnotě pH.

Zastavení reakce

Ke směsi PS/PD/CDAP se přidalo 6 ml 2M glycinu. Hodnota pH se upravila na pH, při kterém dochází k zastavení reakce (pH 8,8). Roztok se míchal po dobu 30 minut při pracovní teplotě a pak se pomalu míchal přes noc při teplotě 2 až 8 °C.

Čištění PS-PD

Po filtraci (velikost pórů membrány je 5 µm) se konjugát PS-PD čistil v lednici gelovou permeační chromatografií na gelu Sephacryl S400HR, aby se odstranily malé molekuly (zahrnující DMAP) a konjugovaný PD: Eluce se provedla pomocí NaCl 150 mM při hodnotě pH 6,5 a monitorování se provedlo při UV 200 nm a dále se sledovalo pH a konduktivita.

Na základě různých molekulových velikostí reakčních komponentů, konjugáty se nejdříve eluovaly konjugáty PS-PD a pak následují volný PD a nakonec DMAP. Frakce obsahující konjugát, jak se detekovalo pomocí DMAB (PS) a µBCA (protein) se slily. Slité frakce se sterilizovaly filtrací (velikost pórů je 0,2 µm).

E. Tvorba adsorbované konjugační vakcíny PSC-PD

Promytí AlPO_4

Za účelem optimalizovat adsorpci konjugátu PSC-PD na AlPO_4 se AlPO_4 promylo, aby se redukovala koncentrace PO_4^{3-} :

- AlPO_4 se promylo 150 mM NaCl a centrifugovalo se (4x),
- pelet se pak resuspendoval ve 150 mM NaCl a pak se filtroval (velikost pórů je 100 µm) a
- filtrát se sterilizoval zahřátím.

Takto promytý AlPO_4 se nazývá WAP (promytý autoklávovaný fosforečnan).

Postup přípravy:

Před vytvořením konečného produktu se konjugát PSC-PD adsorboval na AlPO_4 WAP. AlPO_4 WAP se míchal s PSC-PD po dobu 5 minut při teplotě místnosti. pH se upravilo na hodnotu 5,1 a směs se míchala po dalších 18 hodin při teplotě místnosti. Pak se přidal roztok NaCl, aby koncentrace byla 150 mM a směs se míchala po dobu 5 minut při teplotě místnosti. Ke směsi se přidal 2-fenoxyethanol, aby koncentrace byla 5 mg/ml a směs se míchala po dobu 15 minut při teplotě místnosti, pak se pH upravilo na hodnotu 6,1.

Konečné složení/dávka:

- PSC-PD	10 μg PS
- AlPO_4 WAP:	0,25 mg Al^{3+}
- NaCl	150 mM
- 2-fenoxyethanol:	2,5 mg
- voda vhodná pro injekci:	až 0,5 ml
- pH:	6,1

F. Preklinické informace

Imuogenicita polysacharidového konjugátu u myší

Imunogennost konjugátu PC-PD se stanovila v případě 6 až 8 týdnů starých myší Balb/C. Samotný konjugát (neadsorbovaný) nebo konjugát adsorbovaný na AlPO_4 se zavedl injekcí jako monovalentní vakcína. Vyvolané protilátky proti PSC se stanovily testem ELISA, zatímco funkční protilátky se analyzovaly za použití baktericidního testu. Obě metody jsou založeny na protokolech CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA). Na základě výsledků ze dvou různých

provedených experimentů se odhaduje odezva versus dávka a účinek adjuvans (AlPO_4).

Rozsah dávky vhodný pro experiment

V tomto experimentu se myším Balb/C dvakrát (v intervalu jednoho týdne) injekcí zavedla vakcína PSC-PD. Použily se čtyři různé dávky konjugátu vytvořené na AlPO_4 : 0,1, 0,5, 2,5 a 9,6 μg na jedno zvíře. Myši (10 myši v jedné skupině) se nechaly vykrváct v den 14 (14 post I), 28 (14 post II) a 42 (28 post II). Geometrický průměr koncentrací (GMC) protilátek specifických pro polysacharidstanovený testem ELISA se vyjádřil v μg IgG v jednom mililitru za použití čištěného IgG. V séru se měřily baktericidní protilátky a titry se vyjádřily jako převrácená hodnota ředění, které je schopné usmrtit 50 % bakterií, přičemž se používá mikroorganismus *N. meningitidis* kmen C11 v přítomnosti komplementu mláďat králíků.

Získaná odezva na dávku je znázorněna rovinou už od dávky 2,5 μg . Výsledky indikují, že existuje dobrá odezva na zesilovací dávku mezi 14 post I a 14 post II. Množství protilátek v 28 post II je alespoň stejný jako v době 14 post II. Titry baktericidních protilátek souhlasí s koncentracemi určenými v testu ELISA a potvrzují imunogennost konjugátu PSC-PD.

Účinek adjuvans

V tomto experimentu se vytvořila jedna sada konjugátu PSC-PD vytvořená na AlPO_4 , pro případ porovnání se zavedl injekcí samotný konjugát (bez adjuvans). 10-ti myším ve skupině se dvakrát injekcí zavedlo ve dvou týdenních intervalech podkožní cestou 2 μg konjugátu. Myši se nechaly vykrváct v den 14 (14 post I), 28 (14 post II) a 42 (28 post II). Stanovily se testy ELISA a titry funkčních protilátek (v případě baktericidního

testu pouze 14 post II a 28 post II). Formulace AlPO_4 vyvolává až 10 krát vyšší titry protilátek ve srovnání s formulacemi, které nezahrnují adjuvans.

Závěry:

Následující obecné závěry se vytvořily na základě výsledků shora popsaného experimentu:

- konjugát PSC-PD vyvolává anamnestickou odezvu demonstrující, že PSC, když je konjugován, se stává antigenem závislým na T buňce,
- koncentrace protilátek proti PSC měřené testem ELISA dobře koreluje s titry baktericidních protilátek, což ukazuje, že protilátky vyvolané konjugátem PSC-PD jsou funkční proti mikroorganismu *N.meningitidis* seroskupina C,
- přibližně 2,5 μg konjugátu adsorbovaného na AlPO_4 se jeví, že vyvolává u myši optimální protilátkovou odezvu,
- chemie CDAP je vhodnou metodou pro přípravu imunogenních konjugátů PSC-PD.

Příklad 8: Příprava konjugátu polysacharidu z mikroorganismu *N.meningitidis* seroskupina A - PD

Suchý prášek polysacharidu A (PSA) se rozpustil po dobu jedné hodiny v 0,2 M roztoku NaCl, aby konečná koncentrace byla 8 mg/ml. pH se pak fixovalo na hodnotě 6 pomocí HCl nebo NaOH a roztok se temperoval při teplotě 25 °C. K roztoku PSA se přidalo 0,75 mg CDAP/mg PSA. Po 1,5 min. bez regulace pH se přidal 0,2 M NaOH a získal se hodnota pH 10. Po 2,5 minutách se přidal v souladu s poměrem PD/PSA přibližně 1 protein D (jeho koncentrace je 5 mg/ml). Během párování po dobu jedné hodiny se udržuje pH na hodnotě 10. Pak se přidalo 10 mg glycinu (2 M, pH 9) na jeden miligram PSA (hodnota pH je 9, čas 30 minut a teplota 25 °C). Před čištěním na kolonové chromatografii s exkluzí (Sephacryl S400HR od firmy Pharmacia)

se směs konzervovala přes noc při teplotě 4 °C. Jako první eluuje konjugát, pak následuje PD a vedlejší produkty (DMAP, glycin, sole). Konjugát se shromáždila a sterilizoval se filtrací na membráně Sartopore (od firmy Sartorius) s velikostí pórů 0,2 µm.

Příklad 9: Charakterizace produktů popsaných v příkladu 7 a 8
in vitro

Hlavní charakteristiky se uvádějí v tabulce dále v textu:

č.	popis konjugátu	protein a obsah PS (µg/ml)	poměr PS/protein (hmotn.)	volný protein (%)	volný PS (%)
1	PS C-PD pH se reguluje NaOH	PD : 210 PS : 308	1/0,68	< 2	8-9
2	PS C -PD pH se reguluje TEA	PD : 230 PS : 351	1/0,65	< 2	5-6
3	PS A - PD pH se reguluje NaOH	PD : 159 PS : 149	1/1,07	5	5-9

Výsledky *in vivo*

Jako zvířecí model pro testování imunogennosti konjugátů se použily myši Balb/C. Konjugáty se adsorbovaly buď na AlPO_4 nebo $\text{Al}(\text{OH})_3$ (10 µg PS na 500 µg Al^{3+}) nebo se neadsorbovaly. Myšim se zavedly následující injekce: 2 injekce ve dvoutýdenních intervalech (2 µg PS/injekci).

Na základě těchto výsledků vyplývá, že volný PS velmi ovlivňuje imunitní odezvu. Lepší výsledky je možné získat

s konjugátem, který obsahuje méně než 10 % volného PS. Vynález tedy popisuje optimalizaci postupu CDAP.

Příprava je také důležitá. V tomto modelu se AlPO_4 jeví jako nejvhodnější adjuvans. Konjugáty vyvolávají zesilovací účinek, ke kterému nedochází, když se injekcí zavádějí samotné polysacharidy.

Závěry:

Konjugáty mikroorganismu *N.meningitidis* A a C se získaly z konečným poměrem PS/protein 1 a 0,6 až 0,7 (hmotn.). Volný PS a volný nosičový protein byl pod 10 % respektive 15 %. Výtěžek polysacharidu je vyšší než 70 %. Konjugáty PSA a PSC získatelné shora popsaným optimalizovaným postupem CDAP (bez ohledu na nosičový protein, ale přednostně s proteinem D) je pak dalším aspektem vynálezu.

Příklad 10: Příprava konjugátu polysacharidu z mikroorganismu *H.influenzae* b - PD

Mikroorganismus *H.influenzae* b je jeden z hlavních agens, které způsobuje meningitidu u dětí mladších dvou let. V oboru je dobře znám kapsulární polysacharid mikroorganismu *H.influenzae* (PRP) tvořící konjugát s toxoidem tetanu (konjugace probíhá metodou vyvinutou J. Robbins). CDAP je zdokonalená chemická metoda. Následuje výčet optimálních podmínek pro CDAP zjištěných pro případ konjugace PRP přednostně PD.

Parametry ovlivňující reakci konjugace jsou následující:

- počáteční koncentrace polysacharidu (může mít vliv na konečné množství volného polysacharidu a na krok sterilizace filtrací),
- počáteční koncentrace nosičového proteinu,

- počáteční poměr polysacharidu a proteinu (může mít vliv na konečné množství volného polysacharidu a sterilizaci filtrací),
- používané množství CDAP (obvykle se používá velký nadbytek),
- teplota reakce (která může ovlivnit rozpad polysacharidu, kinetiku reakce a rozpad reaktivních skupin),
- hodnota pH aktivace a konjugace,
- hodnota pH ukončení reakce (ovlivňuje množství zbytkového DMAP),
- doba aktivace, konjugace a ukončení reakce.

Zjistilo se, že 3 nejvíce kritické parametry pro optimalizaci kvality konečného produktu jsou počáteční poměr polysacharidu a proteinu, počáteční koncentrace polysacharidu a hodnota pH konjugace.

Reakční kostka se tak znázornila se třemi shora uvedenými podmínkami, jako tři osy. Centrální body (a rozmezí experimentálních hodnot) v případě těchto os jsou: poměr PS/protein = 1/1 ($\pm 0,3/1$), [PS] = 5 mg/ml (± 2 mg/ml) a pH při párování je 8,0 ($\pm 1,0$ jednotek pH).

Méně podstatné parametry se zafixovaly následovně: použilo se 30 mg polysacharidu, teplota je 25 °C, (CDAP) = 0,75 mg/mg PS, pH se titruje 0,2 M NaOH, pH aktivace je 9,5, teplota aktivace se udržuje po dobu 1,5 minut, teplota konjugace se udržuje po dobu jedné hodiny, koncentrace proteinu je 10 mg/ml, pH pro ukončení reakce je 9,0, teplota pro ukončení reakce se udržuje po dobu jedné hodiny, teplota pro rozpouštění PS v rozpouštědle se udržuje po dobu jedné hodiny a rozpouštědlo je 2M NaCl, Sephacryl S-400HR se eluuje 150 mM NaCl při rychlosti 12 cm/hodinu a sterilizace filtrací se provádí na SARTOLAB P20 při rychlosti 5 ml/min.

Vyhledávaná data při optimalizaci podmínek jsou: data zpracování - maximální výtěžek po filtraci, maximální množství začleněného proteinu a kvalita produktu - konečný poměr PS/protein, množství volného PS, množství volného proteinu, minimální množství zbytkového DMAP (rozklad produkce CDAP).

Výstup z filtrace

Faktor, který ovlivňuje výstup po filtraci je interakce mezi počáteční hodnotou pH (PS) a hodnotou pH při spojování a počáteční poměr PS/protein. Při nízké koncentraci PS dochází k malé interakci s pozdějšími dvěma faktory a rozhoduje dobrá schopnost se filtrovat (přibližně 95 % v případě všech produktů). Při vysoké koncentraci se však filtrovatelnost snižuje, jestliže hodnota pH a počáteční poměr roste (vysoká koncentrace PS, nejnížší poměr, nejnížší pH = 99 % filtrace, ale vysoká koncentrace PS, nejvyšší poměr a pH = 19 % filtrace).

Množství začleněného proteinu

Poměr konečného poměru PS/protein s ohledem na počáteční poměr je mírou účinnosti spojování. Při vysoké koncentraci PS, hodnota pH neovlivňuje poměr poměrů. Avšak počáteční poměr ovlivňuje hodnotu poměrů (1,75 při nízkém počátečním poměru, 1,26 při vysokém počátečním poměru). Při nízké koncentraci PS je poměr poměrů ve většině případů nižší, avšak pH vykazuje více účinků (nízké pH, nízký poměr = 0,96, nízké pH, vysoký poměr = 0,8, vysoké pH, nízký poměr = 1,4 a vysoké pH, vysoký poměr = 0,92).

Konečný poměr PS/protein

Konečný poměr závisí na počátečním poměru a koncentraci PS. Konečný poměr, který je nejlépe rozdělitelný podle

velikosti, se získal kombinací vysokých počátečních poměrů a vysoké koncentrace PS. Účinek pH na konečný poměr není podstatný pokud je nízká koncentrace PS.

Množství volného proteinu D

Nejmenší množství volného proteinu D se pozorovalo při vysokém pH a při vysoké koncentraci PS (množství dosahuje hodnoty 0,0). Účinek vysoké koncentrace PS se stává zvláště znatelný při nízkém pH. Zvýšení počátečního poměru trochu přispívá ke zvýšení množství volného proteinu D.

Zbytkový DMAP

Počáteční poměr nemá podstatný účinek, naopak množství DMAP roste s koncentrací PS a klesá s roztoucím pH.

Závěry

Nejvýhodnější konjugační podmínky jsou následující: pH konjugace je 9,0, koncentrace PS je 3 mg/ml a počáteční poměr je 1/1. Při takových podmínkách charakteristiky konečného produktu jsou následující:

konečný poměr PS/protein		výstup PS z filtrace (%)		poměr poměrů		volný protein D (%)		množství DMAP (ng/10 μg PS)	
hodnota	rozmezí	hodnota	rozmezí	hodnota	rozmezí	hodnota	rozmezí	hodnota	rozmezí
1,10	0,91- 1,30	92,6	50- 138	1,16	1,03- 1,29	0,71	0- 10,40	4,95	2,60- 7,80

Vynález dále popisuje konjugáty PRP, které je možné získat shora v textu popsáním (optimalizovaným) způsobem CDAP (bez ohledu na nosičový protein, ale přednostně se použije protein D).

Příklad 11: Protein D jako antigen - jak je možné zvýšit jeho účinnost ochrany proti netypovatelnému *H.influenzae* připojením 3D-MPL

Samice myši Balb/c (10 myši ve skupině) se imunizovaly poprvé ve stáří 20-ti týdnů (D0) (do svalu) 11-valentní konjugační vakcínou obsahující pneumokokový polysacharid a protein D. Druhá imunizace se provedla o dva týdny později (D14). 7 dní po druhé imunizaci se shromáždila krev. Titry protilátek proti proteinu D se měřily jako množství protilátek typu IgG1, IgG2a a IgG2b.

Připravily se za mrazu sušené undekavalentní vakcíny (bez $AlPO_4$) kombinací konjugátů s 15,75 % laktózou, míchaly se po dobu 15 minut při teplotě místnosti a pH se upravilo na hodnotu $6,1 \pm 0,1$ a lyofilizovaly se (cyklus obvykle začíná při teplotě $-69\text{ }^{\circ}\text{C}$, postupně během 3 hodin se teplota zvyšuje na $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pak se tato teplota udržuje po dobu 18 hodin. Teplota se dále zvedá na $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu jedné hodiny a udržuje se po dobu 6 hodin a pak dosáhne během 3 hodin $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tato teplota se udržuje po dobu 9 hodin).

Složení kompozic vhodných pro lyofilizaci se uvádí v tabulce č. 13.

Je známo, že nejvýznamnější charakteristika, zda se objeví imunitní odezva zprostředkovaná buňkami typu Th1, koreluje s množstvím protilátek IgG2a. Jak je možné vidět na základě dat, dojde k překvapivě velkému zvýšení množství protilátek IgG2a, jestliže protein D se lyofilizoval s adjuvans Th1 (v tomto případě 3D-MPL).

Tabulka č. 13: Složení prostředků (pro aplikaci lidem) a titry protilátěk proti proteinu D u myši
(s dávkou 1/10)

Fyzikální stav	PS(/500μl)	AlPO ₄ (/500 μl)	imunostimulant	zpevňující činidlo	konzervační činidlo	rekonstituent	IgG1				IgG2				IgG2b			
							μg/ml				%							
kapal.	1 μg	500 μg	žádný	žádný	2-PE ³	žádné	76		0,425	0,24	99,1	0,554	0,313					
kapal.	5 μg	500 μg	žádný	žádný	2-PE	žádné	66		0,284	0,176	99,3	0,427	0,265					
kapal.	1 μg	0 μg	žádný	žádný	2-PE	žádné	6,6		0,207	0,036	96,4	3,02	0,526					
kapal.	5 μg	0 μg	žádný	žádný	2-PE	žádné	5,2		0,169	0,043	96,1	3,12	0,795					
lyof.	1 μg	0 μg	žádný	laktóza 3,15 %	žádné	NaCl 150 mm ¹	5,2		0,147	0,046	96,4	2,73	0,853					
lyof.	5 μg	0 μg	žádný	laktóza 3,15 %	žádné	NaCl 150 mm ¹	11,1		0,11	0,168	97,6	0,967	1,477					
lyof.	1 μg	0 μg	žádný	laktóza 3,15 %	žádné	AlPO ₄	45		1,86	0,075	95,9	3,96	0,160					
lyof.	5 μg	0 μg	žádný	laktóza 3,15 %	žádné	500μg ²												
lyof.	1 μg	0 μg	žádný	laktóza 3,15 %	žádné	AlPO ₄	19		0,077	0,119	99,0	0,401	0,620					
lyof.	1 μg	0 μg	žádný	laktóza 3,15 %	žádné	500μg ²	45		2,6	3,5	88,1	5,09	6,849					
lyof.	5 μg	0 μg	žádný	laktóza 3,15 %	žádné	MPL	135		25	5,1	81,8	15,1	3,089					

						50µg ¹							
lyof.	1 µg	0 µg	MPL (50 µg)	laktóza 3,15 %	žádné	pufr ¹	43	22	5,7	60,8	31,1	8,062	
kapal.	1 µg	500 µg	MPL (50 µg)	žádné	2-PE	žádný	441	7,1	9,1	96,5	1,55	1,990	
kapal.	5 µg	500 µg	MPL (50 µg)	žádné	2-PE	žádný	299	1,4	0,899	99,2	0,465	0,298	

¹před injekcí, ² $\pm$ 2 hod.před injekcí, ³ 2-fenoxylethanol

1. Lyofilizovaný antigenní prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje konjugovaný kapsulární polysacharid serotypu 6B mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*, který je adjuvován 3D-MPL a v podstatě neobsahuje adjuvans založené na hliníku.
2. Lyofilizovaný antigenní prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje jeden nebo více pneumokokových polysacharidových konjugátů vybraných ze skupiny obsahující serotyp 4, 18C, 19F a 23F.
3. Lyofilizovaný antigenní prostředek podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e kapsulární polysacharidy mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* jsou konjugovány s proteinem vybraným ze skupiny zahrnující toxoid tetanu, OMPC mikroorganismu *Neisseria meningitidis*, toxoid diftérie, pneumolysin mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* nebo CRM197.
4. Antigenní prostředek podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e kapsulární polysacharidy mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* jsou konjugovány s proteinem D mikroorganismu *Haemophilus influenzae*.
5. Lyofilizovaný antigenní prostředek podle nároku 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje konjugáty kapsulárního polysacharidu mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* serotyp 6B, 14, 19F a 23F.

6. Lyofilizovaný antigenní prostředek podle nároku 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje konjugáty kapsulárního polysacharidu mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* serotyp 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F a 23F.
7. Lyofilizovaný antigenní prostředek podle nároku 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje konjugáty kapsulárního polysacharidu mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* serotyp 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F a 23F.
8. Lyofilizovaný antigenní prostředek podle nároku 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje konjugáty kapsulárního polysacharidu mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* serotyp 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9V, 12F, 14, 18C, 19F a 23F.
9. Lyofilizovaný antigenní prostředek podle nároku 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje konjugáty kapsulárního polysacharidu mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* serotyp 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F a 23F.
10. Lyofilizovaný antigenní prostředek podle nároku 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje konjugáty kapsulárního polysacharidu mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* serotyp 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F a 33F.
11. Lyofilizovaný antigenní prostředek podle nároků 1 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je vakcinačním prostředkem.

12. Antigenní prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje lyofilizovaný antigenní prostředek podle nároků 1 až 11 uvedený do původního stavu ředidlem.
13. Způsob přípravy antigenního prostředku, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje krok uvedení lyofilizovaného antigenního prostředku podle nároků 1 až 11 do původního stavu ředidlem.
14. Způsob vyvolání imunitní odezvy na konjugát kapsulárního polysacharidu mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci pacientovi bezpečného a účinného množství antigenního prostředku podle nároku 12.
15. Použití lyofilizovaného antigenního prostředku podle nároků 1 až 11 nebo antigenního prostředku podle nároku 12 při výrobě léčiva pro prevenci pneumokokového onemocnění.