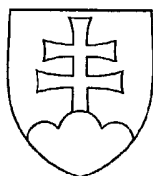


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 659

(21) Číslo prihlášky: 199-92

(22) Dátum podania: 23.01.1992

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 646.570, 807.942

(32) Dátum priority: 28.01.1991, 19.12.1991

(33) Krajina priority: US, US

(40) Dátum zverejnenia: 14.10.1992

(45) Dátum zverejnenia udelenia
vo Vestníku: 16.05.2000

(86) Číslo PCT:

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61K 39/09

A 61K 39/095

C 12P 19/04

C 07K 14/22

(73) Majiteľ patentu: MERCK & CO., INC., Rahway, NJ, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Marburg Stephen, Metuchen, NJ, US;
Tolman Richard L., Warren, NJ, US;
Kniskern Peter J., Lansdale, PA, US;
Miller William J., North Wales, PA, US;
Hogopian Arpi, Lansdale, PA, US;
IP Charlotte C., Blue Bell, PA, US;
Hennessey John P., Jr., Dublin, PA, US;
Kubek Dennis J., Salem, WV, US;
Burke Pamela D., Lansdale, PA, US;

(74) Zástupca: Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;

(54) Názov vynálezu: **Konjugát obsahujúci imunogénny proteín, spôsob jeho výroby, jeho použitie a vakcínový prípravok**

(57) Anotácia:

Konjugát obsahujúci imunogénny proteín, ktorým je proteínový komplex vonkajšej membrány (OMPC) *Neisseria meningitidis* b alebo jeho podjednotka MIEP, kde MIEP znamená hlavný proteín zvyšujúci imunitu, pričom tento proteín je kovalentne viazaný s polysacharidom odvodeným od jedného alebo viacerých poddruhov *Streptococcus pneumoniae*, pričom uvedený polysacharid obsahuje v priemere menej ako 1200 opakujúcich sa jednotiek na molekulu, jeho molekulová hmotnosť je medzi 1×10^5 a 1×10^6 , polydisperzita medzi 1,0 a 3,0 a hladina kontaminácie pneumokokovým skupinovo špecifickým C-polysacharidom je nižšia ako 3 % tohto druhovo špecifického polysacharidu. Ďalej sa opisuje spôsob výroby tohto konjugátu a vakcínový prípravok na jeho báze. Napokon sa opisuje aj použitie tohto konjugátu na výrobu kombinovaného vakcínového prípravku.

Oblasť techniky

Vynález sa týka konjugátu obsahujúceho imunogénny proteín, spôsobu jeho výroby, jeho použitia a vakcinového prípravku.

Doterajší stav techniky

Patogénne baktérie, určené ako *Streptococcus pneumoniae* (pneumokoky, Pn), sa delia na 84 antigénnych sérotypov podľa kapsulárnych polysacharidov (Pn-Ps) tohto mikroorganizmu.

Do skupiny chorôb, ktoré sú spôsobené týmito mikroorganizmami, patrí pneumónia, meningitis, otitis media, bacteraemia a akútna exacerbácia chronickej bronchitis, sinusitis, arthritis a conjunctivitis. Prevažná časť týchto chorôb je však spôsobená obmedzeným súborom z 84 známych izolátov. Preto môže polyvalentná vakcína obsahujúca Pn-Ps z najrozšírenejších patogénnych izolátov tohto mikroorganizmu poskytnúť ochranu proti veľmi vysokému podielu najčastejšie uvádzaných patogénov tejto triedy.

Vyrábané polyvalentné vakcíny spôsobujú zosilnené ochranné imunitné odpovede proti pneumokokom u dospelých. Napríklad "PNEUMOVAX^(R)" (Pneumococcal Vaccine Polyvalent, MSD; pozri PDR, vydanie 1990, str. 1431) je kvapalnú prípravku obsahujúci 50 µg/ml každého z 23 rôznych nekonjugovaných pneumokokových polysacharidov, z ktorých všetky sú uložené v zbierke ATCC a poskytujú jeden z možných zdrojov východiskového materiálu na tento vynález. PNEUMOVAX^(R) 23 obsahuje všetky nasledujúce voľné, t.j. nekonjugované polysacharidy: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F a 33F, ktoré tvoria asi 90 % pneumokokových krvných izolátov. No tieto vakcíny sú najmenej účinné v tej časti populácie, ktorá je najviac vystavená riziku pneumokokových infekcií: pri jedincoch s narušením imunity spôsobeným poškodením B-buniek, pri ľuďoch pokročilejšieho veku a deťoch mladších ako dvojročných, u ktorých imunitnú ochranu zabezpečujú T-bunky. Pretože nekonjugované polysacharidy sú slabými indukčnými imunitnej odpovede T-buniek, je konverzia Pn-Ps na imunogény schopné indukovať imunitnú odpoveď T-buniek kľúčovým problémom pri zaisťovaní vhodnej ochrany tejto časti populácie. No použitie týchto imunogénov nie je obmedzené len na túto skupinu jedincov. Napríklad podávanie vakcíny, ktorá obsahuje jeden alebo viac nových konjugátov, cicavčej samici pred alebo počas gravidity zvyšuje v jej tele množstvo protilátok, ktoré môžu pasívne chrániť vyvíjajúci sa plod a dojča bez toho, aby sa vakcína priamo podávala plodu alebo dojčaťu. Tieto konjugované vakcíny by mali byť užitočné aj na vyvolanie tvorby protilátok, a tým na pasívnu ochranu ohrozených častí populácie, ako sú novorodenci alebo súrodenci infikovaných jedincov.

Polysacharidy, ktoré samy osebe sú slabo imunogénne, sa ukázali ako dobré imunogény po konjugácii s imunogénnym proteínom PRO [Marburg a ďalší, US patent č. 4 695 624; Schneerson a ďalší, New Dev. with Hum. and Vet. Vaccines, 77 až 94 (1980); Schneerson a ďalší J. Exptl. Med., 152, 361 (1980); Anderson, Infection and Immunity, 39, 233 (1983)]. Ale hlavným problémom pri produkcii takých konjugátov je viskóznosť a nehomogénna povaha polysacharidového východiskového materiálu, kvôli ktorej je ťažké chemicky definovať konjugovaný produkt. Preto sa vyžaduje taký spôsob výroby, pri ktorom je východiskový materiál čo najlepšie definovaný a každý

krok syntetickej dráhy je analyzovateľný, pokiaľ ide o vytvorený medziprodukt. Tu opísaný spôsob výroby uspokojuje tieto požiadavky tým, že poskytuje vysoko imunogénne konjugátové imunogény proti patogénom, ktoré sú príbuzné patogénnym mikroorganizmom, od ktorých bol daný Pn-Ps odvodený. Konjugáty sú užitočné pre deti mladšie ako dvojročné.

Marburg a ďalší [pozri J. Am. Chem. Soc., 108, 5282 (1986) a US patenty č. 4 695 624; 4 830 852 a 4 882 317] objavili spôsob konjugácie polysacharidov a imunogénnych proteínov pomocou dvojväzbových medzerníkov (bigenerických spacerov). PRO (proteín) sa derivatizuje takým spôsobom, aby mal vyčnievajúce nukleofilné alebo elektrofilné skupiny (PRO*), zatiaľ čo Ps (polysacharid) sa funkcionalizuje tak, aby obsahoval vyčnievajúce skupiny s opačnou reaktivitou (Ps*). Pri zlúčení Ps* s PRO* sa utvoria dvojväzbové medzerníky, ktoré kovalentne viažu Ps s PRO (Ps-PRO). Pri kyslej hydrolýze sa dvojväzbový medzerník uvoľní ako nezvyčajná aminokyselina, ktorá sa stanoví pri analýze aminokyselín, a tým sa dá dokázať kovalentnosť väzby.

Tento vynález predstavuje zlepšenie spôsobov uvedených v amerických patentoch č. 4 695 624; 4 830 852 a 4 882 317. Toto zlepšenie zahŕňa prípravu východiskového materiálu Pn-Ps, ktorý má špecifickejšie, reprodukovateľnejšie a z hľadiska spracovania vhodnejšie fyzikálne vlastnosti ako surové prípravky Pn-Ps. Tieto fyzikálne vlastnosti zahŕňajú zvýšenú rozpustnosť, zvýšenú filtrateľnosť, zvýšenú čistotu [zníženie kontaminácie skupinovo špecifickým C-polysacharidom (C-Ps)], zníženú molekulovú hmotnosť, polydisperzitu a viskozitu. Tu uvedené výsledné konjugáty majú lepšie vlastnosti ako konjugáty pripravené podľa postupu z amerického patentu č. 4 695 624 s ohľadom na svoju vyššiu konzistentnosť, ľahšiu prípravu, zlepšenú antigénnosť a vyššiu čistotu finálneho produktu. Obzvlášť významné je troj- až dvadsaťnásobné zníženie kontaminácie skupinovo špecifickým C-polysacharidom a peptidoglykánom v prekonjugácii Pn-Ps vzhľadom na prekonjugáciu preparátov Ps, opísanú v americkom patente č. 4 695 624. Aj keď prítomnosť C-polysacharidového kontaminantu neinterferuje s imunitnou odpoveďou proti druhovo špecifickým antigénom, mohol by sa C-PS zúčastňovať konjugáčnej reakcie, a tým spôsobovať, aby bola menej špecifická a riadená pre druhovo špecifický Ps. Okrem toho môže produkcia anti-C-polysacharidových protilátok súvisieť s poškodením tkaniva pozorovaným pri niektorých nevyjasnených pneumokokových infekciách.

Okrem nového konjugátového produktu opisuje tento vynález aj nový spôsob prípravy čiastočne hydrolyzovaných, vysoko purifikovaných pneumokokových polysacharidových medziproduktov, nové prípravky obsahujúce jeden až desať rôznych konjugátov a spôsoby použitia tohto vynálezu. Osobitne významné sú kapsulárne polysacharidy nachádzajúce sa v "PNEUMOVAX^(R) 23" (Pneumococcal Vaccine Polyvalent, MSD; pozri PDR, vydanie 1990, str. 1431). Podskupinu, ktorej sa dáva najväčšia prednosť, tvoria kapsulárne polysacharidy zo *Streptococcus pneumoniae*, poddruhy 6B, 23F, 19F, 14, 18C, 4 a 9V, pretože sa odhaduje, že táto malá skupina pneumokokových poddruhov je zodpovedná za 75 až 85 % pneumokokových infekcií u malých i väčších detí. Tu uvedené spôsoby prípravy sú aplikovateľné na široké spektrum pneumokokových a iných bakteriálnych polysacharidov.

Podstata vynálezu

Predmetom vynálezu je konjugát obsahujúci imunogénny proteín, ktorým je proteínový komplex vonkajšej membrány (OMPC) *Neisseria meningitidis* b, alebo jeho podjednotka MIEP, kde MIEP znamená hlavný proteín zvyšujúci imunitu, pričom tento proteín je kovalentne viazaný s polysacharidom odvodeným od jedného alebo viacerých poddruhov *Streptococcus pneumoniae*, pričom uvedený polysacharid obsahuje v priemere menej ako 1200 opakujúcich sa jednotiek na molekulu, jeho molekulová hmotnosť je medzi 1×10^5 a 1×10^6 , polydisperzita medzi 1,0 a 3,0 a hladina kontaminácie pneumokokovým skupinovo špecifickým C-polysacharidom je nižšia ako 3 % tohto druhovo špecifického polysacharidu.

Ďalej je predmetom vynálezu spôsob výroby uvedeného konjugátu, ktorého podstata spočíva v tom, že zahŕňa

- izoláciu surového pneumokokového polysacharidu Pn-Ps;
- častočnú hydrolyzu alebo mechanické šmykové spracovanie surového Pn-Ps;
- derivatizáciu frakcionovaného Pn-Ps odvodeného od jedného alebo viacerých pneumokokových poddruhov, získaného podľa krokov a) až b) s cieľom zaviesť vyčnievajúce bočné nukleofilné alebo elektrofilné skupiny;
- izoláciu OMPC alebo jeho podjednotky z *Neisseria meningitidis*;
- funkcionalizáciu OMPC alebo jeho podjednotky s cieľom zaviesť reaktívne elektrofilné alebo nukleofilné skupiny;
- konjugáciu polysacharidu z kroku c) proteínom z kroku e);
- blokovanie konjugátu na odstránenie zvyškových funkčných skupín;
- izoláciu konjugátového produktu,

kde OMPC a Pn-Ps majú uvedený význam.

Ďalej je predmetom vynálezu spôsob výroby uvedeného konjugátu, ktorého podstata spočíva v tom, že zahŕňa

- kultiváciu pneumokokov a izoláciu surového pneumokokového polysacharidu alebo solubilizáciu práškoveho pneumokokového polysacharidu;
- purifikáciu a častočnú hydrolyzu polysacharidu z kroku a) až po vopred stanovenú hranicu za vzniku polysacharidu schopného konjugácie, ktorý nestratil viac ako 30 % polysacharidovej druhovo špecifickej antigénnosti v porovnaní so surovým polysacharidom z kroku a) a
- konjugáciu produktu z kroku b) s imunogénnym proteínom;

pričom pneumokoky kultivované v kroku a) zahŕňajú aspoň jeden poddruh zvolený zo skupiny obsahujúcej poddruhy 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F a 23F; Pn-Ps si zachováva svoju antigénnu integritu, podľa merania Ouchterlonyho dvojitou imunodifúznou skúškou alebo rýchlostnou nefelometriou s použitím anti-Pn-Ps druhovo špecifickej protilátky; a Pn-Ps sa pred konjugáciou fyzikálne spracováva šmykom v Gaulinovom lise pri tlaku medzi 13,74 a 103,05 MPa alebo sa hydrolyzuje zohrievaním pri 100 °C 24 hodín alebo pôsobením ultrazvuku, kým sa nedosiahne pri koncentrácii Pn-Ps 1 mg/ml v roztoku chloridu sodného s koncentraciou 0,9M konečná hodnota viskozity alebo K_d pik, ktoré pre každý poddruh Pn-Ps uvádza nasledujúci zoznam

Poddruh	Cieľová konečná hodnota viskozity. 10^6 ($m^2 \cdot s^{-1}$)	Cieľová konečná hodnota K_d pik
Pn-4-Ps	1, 5 - 1, 00	0, 65 $\pm$ 0, 05
Pn6B-Ps	1, 3 - 1, 00	0, 60 $\pm$ 0, 05
Pn9V-Ps	1, 3 - 1, 00	0, 65 $\pm$ 0, 05
Pn14-Ps	1, 1 - 0, 95	0, 60 $\pm$ 0, 05
Pn18C-Ps	1, 5 - 1, 00	0, 65 $\pm$ 0, 05
Pn19F-Ps	1, 3 - 1, 00	0, 65 $\pm$ 0, 05
Pn23F-Ps	1, 5 - 1, 00	0, 54 $\pm$ 0, 05

Predmetom vynálezu je i vakcínový prípravok, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje uvedený konjugát a i-nerntný nosič, ktorým je oxid hlinitý, fosforečnan hlinitý alebo oxid hlinitý, pričom konjugát obsahuje jeden až všetky konjugáty vybrané zo skupiny obsahujúcej Pn4-Ps-OMPC, Pn6B-Ps-OMPC, Pn9V-Ps-OMPC, Pn14-Ps-OMPC, Pn18C-Ps-OMPC, Pn19F-Ps-OMPC, Pn23F-Ps-OMPC, Pn1-Ps-OMPC, Pn5-Ps-OMPC, Pn7F-Ps-OMPC.

Napokon je predmetom vynálezu aj použitie definovaného konjugátu, pričom konjugát obsahuje jeden až všetky konjugáty vybrané zo skupiny obsahujúcej Pn4-Ps-OMPC, Pn6B-Ps-OMPC, Pn9V-Ps-OMPC, Pn14-Ps-OMPC, Pn18C-Ps-OMPC, Pn19F-Ps-OMPC, Pn23F-Ps-OMPC, Pn1-Ps-OMPC, Pn5-Ps-OMPC, Pn7F-Ps-OMPC na výrobu kombinovaného vakcínového prípravku proti *Pneumococcus* a jednej až všetkým chorobám zvoleným zo súboru zahŕňajúceho hepatitis B, hepatitis A, hepatitis non-A non-B, AIDS, záškrt-čierny kašeľ-tetanus, osýpky, príušnice, ružienku, ovčie kiahne, detskú obrnu a *Haemophilus influenzae* b.

Presne chemicky definovaný pneumokokový polysacharid (Pn-Ps) sa pripraví častočnou hydrolyzou surového preparátu Pn-Ps. Hydrolyza prebieha až po vopred stanovený konečný produkt, ktorý si udržiava antigénnu integritu Pn-Ps. Častočne hydrolyzovaný Pn-Ps sa výdatne čistí a používa na prípravu konjugátu Pn-Ps-imunogénny proteín (PRO), Pn-Ps-PRO.

Nové vysoko antigénne konjugáty Pn-Ps-PRO podľa tohto vynálezu, obsahujúce proteínový komplex z vonkajšej membrány (OMPC) *Neisseria meningitidis* b alebo jeho rekombinantné alebo purifikované podjednotky, ako je MIEP, alebo iné imunogénne nosičové proteíny kovalentne viazané k častočne hydrolyzovaným a vysoko purifikovaným medziproduktom Pn-Ps z prevládajúcich pneumokokových izolátov, sú užitočné na prevenciu pneumokokových infekcií cicavcov. Tieto konjugáty sú osobitne užitočné vo vakcínových prípravkoch na stimuláciu antipneumokokových imunitných odpovedí cicavcov, najmä pri jedincoch s narušením imunity v dôsledku poškodenia B-buniek, pri starších osobách a pri deťoch do dvoch rokov, pretože konjugáty vyvolávajú odpoveď T-buniek. Konjugáty Pn-Ps-OMPC a Pn-Ps-MIEP sa vyrábajú podľa postupu, ktorý obsahuje nasledujúce kroky: izoláciu kapsulárneho Ps z kultúr *Streptococcus pneumoniae* (pneumokoky Pn), častočnú hydrolyzu alebo fyzikálne rozštiepenie Pn-Ps, frakcionáciu Pn-Ps za vzniku produktu Pn-Ps so zmenšenou veľkosťou molekuly, polydisperzitou a viskozitou, a potom kovalentnú konjugáciu Pn-Ps s OMPC alebo MIEP.

Spôsob prípravy kovalentných konjugátov pneumokokový polysacharid - imunogénny proteín (Pn-Ps-PRO) je zlepšený oproti spôsobu uvedenému v americkom patente č. 4 695 524. Toto zlepšenie spočíva vo väčšej chemickej definovateľnosti a čistote východiskového Pn-Ps, medziproduktov a finálneho produktu a vo väčšej konzistentnosti a ľahšom uskutočnení celého postupu. Chemicky definované konjugáty Pn-Ps-PRO prejavujú závislosti od T-buniek a dajú sa využiť pri vyvolávaní tvorby sérových protilátok

proti patogénnym pneumokokom, najmä pri deťoch do dvoch rokov a pri jedincoch so zníženou imunitou. Konjugáty podľa vynálezu sa môžu použiť na terapeutické účely vo forme očkovacích látok na prevenciu chorôb vyvolaných pneumokokmi, ako sú otitis media, meningitis, pneumónia, bacteraemia a akútna exacerbácia chronickej arthritis, sinusitis, bronchitis a conjunctivitis.

Nasleduje podrobný opis tohto vynálezu.

A. Nový konjugát Pn-Ps-PRO a polysacharidové medzi produkty

V konjugovanom produkte Pn-Ps-PRO podľa tohto vynálezu sa pomer Pn-Ps k PRO pohybuje medzi hodnotami 0,05 až 0,5 mg polysacharidu na miligram proteínu. Produkt má vysoký stupeň kovalentnosti, minimálnu kontamináciu voľným Pn-Ps a jedinečné fyzikálne a chemické charakteristiky, čo je spôsobené novou polysacharidovou zlozkou produktu.

Konjugát obsahuje imunogénny proteín (PRO) kovalentne viazaný pomocou medzerníka na nový, čiastočne hydrolyzovaný a vysoko purifikovaný, pneumokokový kapsulárny polysacharid (Pn-Ps). Imunogénnym proteínom je prednostne proteínový komplex vonkajšej membrány (OMPC) získaný z kultúry *Neisseria meningitidis* b. Jeden spôsob prípravy OMPC je opísaný v americkom patente č. 4 271 147, konkrétne v príklade 1. Alternatívne sa môže výhodne použiť podjednotka OMPC, ako je MIEP, získaná disociáciou OMPC alebo jeho rekombinantnou expresiou. Jeden spôsob prípravy tejto podjednotky je opísaný v patentových prihláškach USA č. 555 978, 555 329 a 555 204, ktoré boli podané 19. júla 1990, a v príklade 2.

Nový, čiastočne hydrolyzovaný a vysoko purifikovaný pneumokokový kapsulárny polysacharid (Pn-Ps) je preparát antigénneho polysacharidu, získaný z kultúry jedného z pneumokokových poddruhov (ako sa opisuje ďalej, v časti opisujúcej nový spôsob konjugácie a v príkladoch 3 až 10). Priemerná molekulová hmotnosť Pn-Ps je od asi 1×10^5 do 1×10^6 daltonov. Molekula Pn-Ps obsahuje v priemere menej ako 1000 opakujúcich sa jednotiek. Kontaminácia C-polysacharidom je nižšia ako asi 3 % a index antigénnosti je medzi hodnotami 0,4 a 1,1, prednostne medzi 0,7 a 1,1. Tento parameter vyjadruje relatívne množstvo väzieb anti-pneumokokovo špecifickej protilátky na jednotku hmotnosti nového Pn-Ps v porovnaní so surovým Pn-Ps uloženým v zbierke ATCC. Okrem toho je nový Pn-Ps schopný konjugácie s imunogénnym proteínom, čím sa vytvorí produkt Pn-Ps-PRO podľa vynálezu. Niektoré fyzikálne a chemické charakteristiky dvoch rôznych preparátov Pn6B-Ps a dvoch rôznych preparátov Pn24F-Ps sú uvedené v tabuľke I ďalej. Nasledujúci opis vysvetľuje, ako sa tieto charakteristiky merajú. Ďalej uvedený postup predstavuje spôsob tvorby medzi produktov Pn-Ps a konjugátov Pn-Ps-PRO so širokou skupinou pneumokokových poddruhov. Táto skupina zahŕňa poddruhy 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F a 33F, ale neobmedzuje sa na ne. Ako sa uvádza, prednostne používanú podskupinu pneumokokových polysacharidov tvoria polysacharidy odvodené od pneumokokových poddruhov 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F a 23F. Odborníkom v danom odbore je zrejme, že okrem týchto polysacharidov alebo namiesto nich sa môžu použiť iné tak, ako to vyžaduje ohrozená populácia. Pn1-Ps a Pn5-Ps sa teda môžu spracovávať ako Pn4-Ps, alebo Pn9V-Ps, podobne ako polysacharidy z *Neisseria meningitidis* B, C alebo polysacharidy zo streptokokov skupiny B, zatiaľ čo Pn7F-Ps sa môže spracovávať ako Pn14-Ps a potom sa môžu vzniknuté konjugáty včleniť do polyvalentnej vakcíny, ako sa to bliž-

šie opisuje ďalej. Odborníkom v tomto odbore je jasné aj to, že začlenením Pn6B-Ps by bolo možné dosiahnuť ochranu proti Pn6a prostredníctvom krížovo reaktívnych protilátok. To platí aj pre rad iných poddruhov pneumokokov.

Polyvalentné vakcíny sú vakcíny obsahujúce zmesi rôznych konjugátov Pn-Ps-PRO, pričom každý konjugát je pripravený oddelene s Pn-Ps daného poddruhu. Okrem toho sú polyvalentné vakcíny vakcínami, v ktorých je naraz alebo postupne konjugovaných niekoľko rôznych poddruhov Pn-Ps s daným PRO.

I. Charakterizácia nových polysacharidových medzi produktov

Fyzikálne a chemické charakteristiky čiastočne hydrolyzovaných, purifikovaných pneumokokových kapsulárnych polysacharidových medzi produktov závisí od poddruhu pneumokoku, od ktorého je polysacharid odvodený, a od úprav, ktoré sa s ním uskutočňujú pri postupe podľa tohto vynálezu. Všeobecne majú medzi produkty Pn-Ps dva- až desaťkrát menšiu veľkosť molekuly a polydisperzitu v porovnaní so surovými polysacharidmi, získanými z bakteriálnej kultúry. Menšia veľkosť molekuly umožňuje lepšiu manipuláciu s polysacharidom počas konjugácie, ľahšie odstránenie voľných Pn-Ps po konjugácii, dosiahnutie vyššej čistoty a homogenity Pn-Ps, nižšej polydisperzity Pn-Ps, pokiaľ ide o veľkosť molekúl pri v podstate nezmenenej antigénnosti. Tieto charakteristiky nových Pn-Ps podporujú významne konzistentnú tvorbu dobre definovaného, vysoko druhovo špecifického, antigénneho produktu Pn-Ps-PRO.

i) Molekulová hmotnosť a polydisperzita Pn-Ps

Meraním hmotnostnej strednej molekulovej hmotnosti M_w pomocou difúzie, sedimentácie alebo chromatografickým spôsobom a meraním číselnej strednej molekulovej hmotnosti M_n pomocou koligatívnej vlastnosti, ako sú viskozita, zníženie teploty tuhnutia alebo zvýšenie teploty varu, sa získa polydisperzita preparátu Pn-Ps ako pomer M_w/M_n . Čím viac sa táto hodnota blíži k jednotke, tým má polysacharidový preparát väčšiu homogenitu. V tomto opise je uvedená polydisperzita radu preparátov Pn-Ps a opisuje sa tu aj prednostný spôsob dosiahnutia tejto zvýšenej homogenity.

Rozdeľovací koeficient vzorky (Kd) je definovaný takto:

$$K_d = \frac{V_o - V_e}{V_i - V_o}$$

kde

V_o predstavuje mŕtvy objem kolóny,

V_i predstavuje celkový permeačný objem kolóny a

V_e predstavuje elučný objem vzorky.

K_d každého surového alebo čiastočne hydrolyzovaného preparátu Pn-Ps sa meria pomocou normálnej alebo vysokoúčinnnej chromatografie založenej na princípe rozlíšenia veľkosti molekuly [size-exclusion chromatography (SEC) alebo high-performance size exclusion chromatography (HPSEC)]. Meranie sa uskutočňuje s alikvotným podielom vzorky polysacharidu postupom známym v tomto odbore. Takto získaná hodnota K_d je meradlom priemerného hydrodynamického objemu polysacharidového konjugátu. Pri znižovaní veľkosti molekúl Pn-Ps fyzikálnym štiepením molekúl alebo tepelnou, alebo ultrazvukovou hydrolyzou

spôsobom podľa vynálezu sa zvyšuje elučný objem vzorky Pn-Ps a rastie aj hodnota K_d .

Prednostne používanou náplňou kolóny na tento účel je gél SHEPHAROSE CL2B (Pharmacia č. 17-0120-01). Mŕtvy objem kolóny sa stanoví pomocou modrej Blue Dextran 2000 (Pharmacia č. 17-0360-01) a celkový permeačný objem kolóny (V_i) sa stanoví pomocou piku chloridu sodného. Podľa jedného spôsobu sa vzorka Pn-Ps pripraví ako roztok s koncentráciou 2,5 mg Pn-Ps na 1 ml destilovanej vody. Objem nástreku je 1 ml. Pomer V_o/V_i by mal byť v rozmedzí 0,32 až 0,37. K_d pre Dextran T500 (Pharmacia č. 17-0320-01) by mal byť v rozmedzí 0,37 až 0,49. Prednostne používaný systém HPSEC obsahuje kolónu s veľkosťou 7,5 x 600 mm TSK G6000 PW vyhrievanou na 50 °C.

V optimálnom usporiadaní je systém SEC alebo HPSEC kombinovaný s diferenčným refraktometrom, ktorý monitoruje relatívnu koncentráciu analytu ako funkciu elučného objemu, a s diferenčným viskozimetrom, ktorý monitoruje špecifickú viskozitu analytu ako funkciu elučného objemu. Univerzálna kalibračná krivka [$\log$ (vnútorná viskozita krát molekulová hmotnosť) proti retenčnému objemu] sa zostrojí na základe analýzy série monodisperzných štandardov polyetylénoxidu. Koncentračný profil a profil špecifickej viskozity sa môže použiť na výpočet profilu závislosti molekulovej hmotnosti od elučného objemu pre danú vzorku a z týchto hodnôt sa ďalej vypočítajú hodnoty M_N a M_W . Z hodnôt M_N a M_W sa vypočíta index polydispersity (M_W/M_N) [Yau, W. W. a Rementer, S. W., J. Liq. Chromatog., 13, 627 až 675 (1990); Nagy, J. Liq. Chromatog., 13, 677 až 691 (1990); Benoit a ďalší, J. Phys. Tome., 63, 1507 až 1514 (1966)]. Podľa tohto vynálezu sa vnútorná viskozita merá v tlmivom roztoku s koncentráciou 0,1M fosforečnanu sodného pri pH 7,2.

Po stanovení priemernej molekulovej hmotnosti preparátu Pn-Ps sa môže priemerný počet opakujúcich sa jednotiek v molekule ľahko zistiť vydelením molekulovej hmotnosti polyméru molekulovou hmotnosťou opakujúcej sa jednotky (pozri tabuľka II).

ii) Retencia druhovo špecifickej antigénnosti Pn-Ps

Pre každý surový Pn-Ps, podrobený fyzikálnemu štiepeniu alebo hydrolyze chemickými prostriedkami, teplotou, ultrazvukom alebo enzýmami, je dôležité stanoviť konečný produkt, za ktorým sa antigénna integrita už začína strácať. Tento konečný produkt sa dá ľahko zistiť pomocou korelácie medzi viskozitou vzorky a ktorýmkoľvek z radu imunologických testov, známych v tomto odbore. Prednostným spôsobom je meranie alikvotného podielu polysacharidového roztoku pomocou Ouchterlonyho dvojitého imunodifúzneho stanovenia s použitím pneumokokovej poddruhu špecifickej protilátky. Vznik bieleho precipitačného pásu v agare, ktorý sa pripája k precipitačnému pásu vzorky surového Pn-Ps, umiestneného v susednej jamke, po uplynutí času na difúziu, umožňuje kvalitatívnu identifikáciu reaktantov a poskytuje dôkaz, že polysacharidová antigénna integrita vzorky zostala neporušená. Kvantitatívnejšie imunologické stanovenie sa uskutočňuje metódou rýchlostnej nefelometrie alebo pomocou testu RIA.

Pri rýchlostnej nefelometrii sa meria zmena alebo rýchlosť zmeny intenzity rozptýleného svetla počas tvorby komplexu antigén-protilátka. Reakcia prebieha v reakčnej cele, ktorou prechádza svetelný lúč. V tomto prípade sa tvoria komplexy pri imunoprecipitačnej reakcii, ktorá prebieha v roztoku, keď špecifická protilátka (Ab) reaguje so svojim špecifickým antigénom (Ag), t.j. Pn-Ps. Pretože tvorba komplexu Ag-Ab závisí od prítomnosti molekúl Ag

a Ab v optimálnych množstvách, rastie miera tvorby komplexu pri konštantnom množstve Ab s rastúcim množstvom Ag až po maximálnu hranicu; väčšie množstvo Ag spôsobujú nižšiu tvorbu komplexu. Kalibračná krivka sa vytvorí tak, že sa udržiava konštantné množstvo Ab a meria sa rozptyl svetla pri zvyšujúcich sa koncentráciách Ab. Pre preparát Ps (alebo derivatizovaný preparát Ps) je možné vypočítať koncentráciu Ag, ak sa vzorky nechajú reagovať so svojimi špecifickými Ab za rovnakých podmienok, za akých sa zostrojila kalibračná krivka.

Porovnanie koncentrácie vypočítanej imunologicky pomocou rýchlostnej nefelometrie s koncentráciou získanou chemicky alebo fyzikálne (pomocou kalorimetrie, merania indexu lomu alebo totálnej hydrolyzy a stanovenia monosacharidov pozri ďalej) sa udáva index antigénnosti pre vzorky Ps. Stanovenie sušiny polysacharidov je vhodné len v prípade, že je známy obsah prchavého podielu v práškovej vzorky. Je všeobecne známe, že polysacharidy sú hygroscopické a môžu obsahovať akékoľvek množstvo od 5 do 30 % hmotnostných prchavých látok. Preto nie je stanovenie sušiny v nich alebo pri nich príliš spoľahlivé. Na stanovenie koncentrácie polysacharidu s rozumnou presnosťou sa používa kolorimetrické stanovenie. Kalibrácia sa uskutoční pomocou štandardného roztoku polysacharidu, ktorý sa sleduje. Napríklad Pn6B-Ps, Pn18C-Ps, Pn19F-Ps a Pn23F-Ps sa môžu kvantifikovať pomocou stanovenia metylpentózy podľa Dische a Shettles [J. Biol. Chem., 175, 595 až 603, (1948)]. Pn4-Ps, Pn9V-Ps, Pn14-Ps a Pn19F sa môžu kvantifikovať stanovením obsahu hexozamínu a Pn9V sa môže kvantitatívne stanoviť aj na základe obsahu kyseliny urónovej. Stanovenie pomocou fenolu a kyseliny sírovej [Dubois a ďalší, Anal.Chem., 28, 350 až 356 (1956)] je užitočné na zistenie celkového množstva všetkých preparátov Pn-Ps pri testovaní počas prípravy konjugátu. Ďalším používaným spôsobom je meranie signálu indexu lomu ako miery hmotnosti analytu. Pri tomto spôsobe sa uskutočňuje aj kalibrácia pomocou štandardného roztoku polysacharidu, ktorý sa sleduje. Kolorimetrické stanovenie sa síce používa na sledovanie obsahu polysacharidu vo vzorkách počas derivatizácie a konjugácie, ale refraktometrické meranie sa používa pri fyzikálnej charakterizácii polysacharidového preparátu pomocou HPSEC univerzálnej kalibračnej analýzy a pri výpočte indexu antigénnosti. Vychádzajúcemu surovému Pn-Ps sa pridelí hodnota indexu antigénnosti 1,0. Pre experimentálne vzorky sa vypočíta index relatívnej antigénnosti; ak je jeho hodnota v rozmedzí od 4,0 do 1,1, považuje sa to za uspokojivé. Index antigénnosti väčší ako 1,0 sa môže dosiahnuť, ak sa polysacharid značne vyčistí počas hydrolyzy a frakcionácie. Teoreticky by mohlo samotné zmenšenie veľkosti molekúl zvýšiť index antigénnosti preparátu zväčšením flexibility polysacharidových molekúl, a tým znížením sterické interferencie okolo antigénnych epitopov. Tieto stanovenia sa uskutočňujú ako kontrolné stanovenia počas procesu hydrolyzy, frakcionácie a derivatizácie vzoriek Ps. Vzorky, ktoré majú hodnoty relatívnej antigénnosti menšie ako 0,4 sa vyradžia, t.j. nekonjugujú sa. Anti-Pn-Ps-protilátky sú dostupné a používajú sa na charakterizáciu pneumokokových polysacharidov. Anti-Ps-Pn-protilátky sú dostupné napríklad v the Health Research, Inc., Albany, NY a the Staten Serun Institute. Alternatívne sa druhovo špecifické anti-Ps-Pn-protilátky môžu na tento účel pripraviť podľa postupov známych v tomto odbore, pričom ako imunogén sa použije komerčne dostupný surový Pn-Ps [Baker a ďalší, Immunology 20, 469 (1971); Brooke, M. S., J. Immunol., 95, 358 (1966); Kearney, R. a Halladay, W. J., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 48, 227 (1970); Schneerson, R. a ďalší, Prog.

Allergy, 33, 144 (1983); Robbins, J. B., Infect. Immun., 26 116 (1979)].

Dalším ukazovateľom zachovanej antigénnej integrity je udržiavanie správneho chemického zloženia preparátu Pn-Ps. Napríklad Pn6B-Ps má opakujúcu sa jednotku [α -Gal(1-3)- α -Glu(1-3)- α -L-Rhap(1-4)-D-Ribitol-5-PO₁₍₂₎], takže molový pomer cukorných zložiek ribitol : ramnóza : galaktóza : glukóza je približne 1 : 1 : 1 : 1. Tento pomer sa môže stanoviť napríklad po hydrolyze polysacharidu. Hydrolyza sa uskutočňuje dve hodiny pri teplote 45 až 65 °C 36 % kyselinou fluorovodíkovou, ďalej 10 až 20 hodín pri teplote 100 °C kyselinou trifluóroctovou s koncentráciou 2 M. Po hydrolyze sa uskutoční stanovenie pomocou vysokoúčinnnej chromatografie na anexe s pulznou amperometrickou detekciou. Ukazovateľom zachovanej integrity sú štyri piky, ktoré reprezentujú približne ekvimolárne množstvá cukorných zložiek. Približne teoretické pomery cukorných zložiek sa zachovávajú pri všetkých nových zlúčeninách Pn-Ps podľa tohto vynálezu s rozptylom asi 20 %. Odchýlky od teoretických hodnôt sú spôsobené hlavne obmedzeniami danými povahou zvolenej metódy. Takže po celkovej hydrolyze má

Pn23F-Ps molový pomer glycerol : ramnóza : galaktóza :

: glukóza 1 : 2 : 1 : 1;

Pn14-Ps molový pomer N-acetylglukozamín : galaktóza :

: glukóza 1 : 2 : 1;

Pn19F-Ps má molový pomer ramnóza : N-acetylmanozamín : glukóza asi 1 : 1 : 1;

Pn18C-Ps má molový pomer glukóza : galaktóza : ramnóza : glycerol : acetát asi 3 : 1 : 1 : 1 : 1;

Pn9V-Ps má molový pomer glukóza : galaktóza : N-acetylmanozamín : kyselina glukurónová : kyselina galakturónová : acetát asi 2 : 1 : 1 : 1 : 1 : 7 a

Pn4-Ps má molový pomer N-acetylmanozamín : N-acetylfukozamín : galaktóza : pyruvát asi 1 : 1 :

: 1 : 1 : 1.

Okrem toho sa nedávno zistilo, že Pn-4Ps obsahuje prídavnú zložku identifikovanú pomocou analýzy HPLC ako 2-aminopneumozamín (2-amino-2,6-dideoxytalóza), rovnako ako Pn5-Ps [Barker a ďalší, Carbohydrate Res., 224 až 233 (1966)]. Pn19F-Ps obsahuje aj prídavnú zložku, pravdepodobne hexozamín, čo sa v literatúre neuvádza. Definítivna identifikácia tejto zložky nie je doteraz vyriešená. Tieto a prídavné teoreticky možné polysacharidové opakuje sa zložky sa uvádzajú v nasledujúcich odkazoch: J. E. G. van Dam a ďalší, Carbohydr. Res. 187, 267 (1988); H. J. Jennings, Adv. Carbohydr. Chem. 41, 155 (1983) a odkazy v tejto publikácii; J. C. Richards a M. Perry, Biochem. Cell. Biol. 66, 758 (1988). Okrem cukorných zložiek obsahujú niektoré sledované Pn-Ps fosfátové, acetátové a pyruvátové bočné skupiny, pričom niektoré z týchto skupín majú imunodominantné rysy. Preto sa môže obsah týchto zložiek tiež sledovať (pozri príklad 30). Kvantitatívne stanovenie monosacharidov je užitočným prostriedkom aj na určenie koncentrácie polysacharidu vo vzorke.

Dalším prvkom antigénnosti sledovaných polysacharidov je zachovanie toho, čomu sa hovorí "konformačný e-pitop" v polysacharide [pozri napríklad Wessels, M. R. a Kasper, D. L., J. Exp. Med., 169, 2121 až 2131 (1989)]. Táto úroveň antigénnosti sa vyjadruje len pri sacharidoch s vysokou molekulovou hmotnosťou. Tu opísané metódy sa riadia tak, aby sa táto úroveň antigénnosti tiež zachovala.

iii) Minimálna kontaminácia C-polysacharidom

Dalším kritickým parametrom je hladina kontaminácie C-polysacharidom. Táto hodnota sa môže získať po totálnej kyslej hydrolyze polysacharidového preparátu pomocou

chromatografickej analýzy hydrolyzáta a konduktometrickej detekcie cholínu [Hermans a ďalší, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 107, 600 (1988)]. Alternatívne sa môže stanoviť cholínu v nehydrolyzovanom polysacharide pomocou NMR. Pri použití techniky NMR sa na výpočet obsahu C-Ps používa pomer signálu cholínu k signálu metylskupiny ramnózy (pre Pn-Ps obsahujúci ramnózu; pre Pn-Ps neobsahujúci ramnózu sa používa iný signál). Pri použití chromatografického spôsobu analýzy sa na výpočet obsahu C-Ps využíva pomer signálu cholínu buď k obsahu polysacharidu určenému konduktometricky, alebo k píku jednej zo zložiek Pn-Ps. V obidvoch prípadoch dovoľujú štandardy so známymi koncentraciami cholínu priamy výpočet množstva cholínu prítomného v polysacharidovej vzorke s použitím teoretickej opakujúcej sa štruktúry C-Ps (Herman a ďalší, uvedená citácia); stanoví sa tak koncentrácia C-Ps v polysacharidovej vzorke. Koncentrácia polysacharidu vo vzorkách Pn-Ps sa meria spôsobmi, ktoré sú v tomto odbore známe. Napríklad celková koncentrácia polysacharidu sa môže stanoviť po celkovej hydrolyze polysacharidu meraním koncentrácie špecifického monosacharidu. Porovnaním koncentrácie C-Ps k celkovej koncentrácii polysacharidu sa stanoví stupeň kontaminácie C-polysacharidom v hmotnostných percentách. Stupeň kontaminácie nižší ako 3 % hmotnostné sa považuje za prijateľný, ale vhodnejší je stupeň kontaminácie nižší ako 1 %.

Chemické a fyzikálne vlastnosti dvoch šarží Pn6B-Ps a dvoch šarží Pn23F-Ps sú zhrnuté v tabuľke I ďalej v texte. Tieto údaje ukazujú reprodukovateľnosť parametrov od šarže k šarži, ktoré je výsledkom nového, tu opísaného procesu.

Tabuľka I

Vlastnosti hydrolyzovaných a frakcionovaných Pn-Ps

Preparát Pn-Ps	6b-1	6B-2	23F-1	23F-2
Viskozita konečného produktu	1,094	1,147	1,350	1,376
K _d (HPSEC)	0,62	0,62	0,49	0,49
K _d (CL-2B)	0,64	0,60	0,41	nestanovené
Monosacharid	S	S	S	S
Antigénnosť: stanovenie podľa Ouchterlonyho	S	S	S	S
Nefelometrické stanovenie	S	S	S	S
Stanovenie postupom s fenolom a kyselinou sírovou	S	S	S	S

S: zistená hodnota je uspokojivá

Tabuľka II, uvedená ďalej, ukazuje chemické a fyzikálne parametre niekoľkých surových pneumokokových polysacharidov a príslušných nových hydrolyzovaných a frakcionovaných (hyd+frak) zlúčenín podľa vynálezu. Uvedené hodnoty sú približné, v medziach experimentálnej chyby a hraníc detekcie pripravených komplexných polysacharidových zlúčenín.

Tabuľka 11
Výsledky a chemické vlastnosti surových a narušených hydrolyzovaných a frakcionovaných Pn-Ps prípravkov

Pa-Ps prípravok	Pk K ₁	Výťažok (%)	Hmotnosť molekuly (M _n)	Stredná molekulová hmotnosť (M _w)	Čistota (%)	Stredná molekulová hmotnosť (M _w)	Polydispersita (M _w /M _n)	Počet oneskorených na molekulu	C-Pa
1-surový	0,54 ± 0,05	4,24 ± 10 %	1,2 × 10 ⁵ ± 20 %	2,1 × 10 ⁵ ± 20 %	1,3 - 1,6	>600	>3		
1-hydrolyz.	0,46 ± 0,05	1,0 - 1,4	1 × 10 ⁵ ± 20 %	2 × 10 ⁵ ± 20 %	1,0 - 1,4	<600	<3		
1B-surový	0,40 ± 0,05	2,47 ± 10 %	1,4 × 10 ⁵ ± 20 %	3 × 10 ⁵ ± 20 %	1,3 - 1,5	>1 000	>3		
1B-hydrolyz.	0,40 ± 0,05	1,0 - 1,4	2 × 10 ⁵ ± 20 %	3 × 10 ⁵ ± 20 %	1,0 - 1,4	<1 000	<3		
1V-surový	0,53 ± 0,06	2,29 ± 10 %	1,2 × 10 ⁵ ± 20 %	3 × 10 ⁵ ± 20 %	1,3 - 1,5	>600	>3		
1V-hydrolyz.	0,45 ± 0,05	1,0 - 1,4	2 × 10 ⁵ ± 20 %	3 × 10 ⁵ ± 20 %	1,0 - 1,4	<600	<3		
14-surový	0,50 ± 0,06	1,49 ± 10 %	1,2 × 10 ⁵ ± 20 %	2 × 10 ⁵ ± 20 %	1,3 - 1,4	>1 000	>3		
14-hydrolyz.	0,40 ± 0,05	0,6 - 1,4	4 × 10 ⁵ ± 20 %	2 × 10 ⁵ ± 20 %	1,0 - 1,4	<1 000	<3		
18C-surový	0,58 ± 0,05	5,26 ± 10 %	0,7 × 10 ⁵ ± 20 %	8 × 10 ⁵ ± 20 %	1,4 - 1,5	>700	>3		
18C-hydrolyz.	0,45 ± 0,05	1,0 - 1,4	2 × 10 ⁵ ± 20 %	2 × 10 ⁵ ± 20 %	1,0 - 1,4	<700	<3		
18F-surový	0,44 ± 0,05	2,81 ± 10 %	1,0 × 10 ⁵ ± 20 %	6 × 10 ⁵ ± 20 %	1,3 - 1,5	>1 000	>3		
18F-hydrolyz.	0,45 ± 0,05	1,0 - 1,4	2 × 10 ⁵ ± 20 %	2 × 10 ⁵ ± 20 %	1,0 - 1,4	<1 000	<3		
23F-surový	0,48 ± 0,05	4,13 ± 10 %	2,2 × 10 ⁵ ± 20 %	1 × 10 ⁵ ± 20 %	1,0 - 1,4	>1 000	>3		
23F-hydrolyz.	0,54 ± 0,10	1,5 - 2,0	4 × 10 ⁵ ± 20 %	2 × 10 ⁵ ± 20 %	1,0 - 1,4	<1 000	<3		

2. Charakterizácia nového konjugátu Pn-Ps-PRO

i) Identifikácia a kvantitatívne stanovenie Pn-Ps

Je veľmi užitočné overiť si množstvo a chemickú integritu Pn-Ps v konečnom konjugáte nezávislou technikou, aby sa overila antigénnosť (integrita) a aby sa vypočítal pomer Pn-Ps/PRO. Jeden zo spôsobov zahŕňa totálnu hydrolyzu pomocou TFA s koncentráciou 2 M pri teplote 100 °C počas 5 až 16 hodín, pričom optimálny čas hydrolyzy závisí od každého jednotlivého Pn-Ps. Rovnaké množstvá konjugátu Pn-Ps-PRO a hydrolyzáta PRO (na podklade výsledku stanovenia proteínov podľa Lowryho) sa analyzujú pomocou vysokotlačnej chromatografie na anexe s pulznou amperometrickou detekciou. Získajú sa monosacharidové profily. Profil PRO sa "odčíta" od profilu konjugátu Pn-Ps-PRO s použitím vhodného počítačového softvéru, ako je Nelsonov program, na účely korekcie na monosacharidy, ktoré pochádzajú z PRO, napríklad lipopolysacharidu (LPS), prítomného v OMPC. Množstvo Pn-Ps v konjugáte sa teda vypočíta porovnaním profilu známeho množstva derivatizovaného hydrolyzáta Pn-Ps a korigovaného konjugátu Pn-Ps-PRO. Pomer Pn-Ps/PRO sa tiež meria týmto spôsobom.

ii) Stanovenie nových aminokyselín ako indikátora konjugácie a blokovania

Po konjugácii Pn-Ps s PRO sa vzorky konjugátu hydrolyzujú v HCl s koncentráciou 6N a uskutoční sa analýza aminokyselín. Tento spôsob deteguje prítomnosť a množstvo výnimočných aminokyselín, ako je 5-karboxymetylhomocysteín (S-CMHC) a S-karboxymetylcysteamin (S-CMCA). S-CMHC sa tvorí ako súčasť chemickej väzby pri chemickej reakcii medzi derivatizovaným Pn-Ps a PRO, ako sa to opisuje v časti zaoberajúcej sa postupom, uvedenej ďalej. Prítomnosť tejto aminokyseliny sa pokladá za definitívny dôkaz kovalentnej väzby medzi derivatizovaným Pn-Ps a PRO. Tvorba takej kovalentnej väzby je nevyhnutná na imunogénnosť konjugátovej vakcíny vzhľadom na T-bunky. Ihneď po skončení konjugáčnej reakcie sa nezreagované brómacetamidové skupiny blokujú N-acetylcysteaminom. Výsledkom hydrolyzy tejto väzby je uvoľnenie (S-CMCA), čo sa tiež deteguje analýzou aminokyselín. Detekcia tejto aminokyseliny (S-CMCA) potvrdzuje úspešné blokovanie reaktívnych brómacetamidových skupín. Tým sú tieto skupiny nedostupné pre akékoľvek nechcené chemické reakcie. Prijateľné hodnoty kovalentnosti a blokovania sú v rozmedzí asi 1 až 15 % pre S-CMHC/Lys a asi 0 až 5 % pre S-CMCA/Lys.

iii) Analýza vakcíny adsorbovanej na hydroxid hlinitý

Prednostne sa konjugát Pn-Ps-PRO adsorbuje na hydroxid hlinitý [gél Al (OH)₃] (pozri oddiel C ďalej), a tým zosilnie imunitná odpoveď na vakcínu. Iné možné vytvore-

nie vakcíny zahŕňa použitie fyziologicky prijateľných riedidiel, iných adjuvans, imunomodulátorov alebo iných inertných excipientov, ako je gél hydroxidu hlinitého. Analýza materiálu adsorbovaného na gél hydroxidu hlinitého sa uskutočňuje nasledujúcim spôsobom.

Pn-Ps-PRO adsorbovaný na hydroxide hlinitom sa môže analyzovať, pokiaľ ide o jeho zloženie a stabilitu po desorpcii konjugátov z hydroxidu hlinitého. Tento spôsob sa doplní dialýzou Pn-Ps-PRO adsorbovaného na hydroxide hlinitom proti roztoku citrátu sodného s koncentráciou 3 % počas 16 hodín pri laboratórnej teplote. Vzniknutá rozpustná soľ, citrát hlinitý, migruje preč cez dialyzačnú membránu a zostáva Pn-Ps-PRO. Tento spôsob je dôležitý, aby sa potvrdilo, že v prípravku adsorbovanom na hydroxide hlinitom je správne množstvo Pn-Ps-PRO.

No niektoré prípravky, ako Pn6B-PS-OMPC a Pn23F-PS-OMPC obsahujú 10, 5, 2 a 1 µg Pn-Ps/ml (pozri oddiel C ďalej), čo sú koncentrácie nedetegovateľné chemickými metódami. Aby sa dali uskutočniť analýzy zloženia cukrov aj v tomto prípade, vakcíny s adsorbovaným Pn-Ps-OMPC sa najprv peletujú, aby sa odstránila voda. Pelety sa resuspendujú v jednej pätine pôvodného objemu vody pred rozpúšťaním v roztoku citráta. Po dialýze je solubilizovaný Pn-Ps-OMPC prítomný v koncentráciách 50, 25, 10 a 5 µg Pn-Ps/ml. Pri týchto koncentráciách je možné stanoviť Pn-Ps aj proteín a potvrdiť tak úroveň dávky.

Vzorky desorbované pomocou citráta sa analyzujú aj na možnú prítomnosť voľných Pn-Ps. To je dôležité na kontrolu imunogénnosti a na konzistentnosť výroby. Táto analýza sa uskutočňuje chromatograficky v kolóne s náplňou SEPHAROSE CL-2B alebo SEPHACRYL S100SF. Kolóna pracuje na princípe molekulového sita a je na nej možné oddeliť Pn-Ps-OMPC od Pn-Ps. Prítomnosť a množstvo voľných Pn-Ps sa meria nefelometricky. Úroveň kontaminácie Pn-Ps-OMPC voľnými Pn-Ps je nižšia ako 15 % z celkového obsahu Pn-Ps.

iv) Test na pyrogenitu: dôkaz neprítomnosti pyrogenity vo významnom rozsahu

Konjugátny produkt podľa tohto vynálezu sa testuje, aby sa vylúčila možnosť nežiaducich efektov zvyšujúcich teplotu. Zistilo sa, že konjugátny produkt vyrobený podľa tu opísaného postupu majú prijateľnú pyrogenitu.

Spôsob (I. V.)

Vakcína s konjugovaným Pn-Ps sa testuje podľa postupu opísaného v 21 CFR, oddiel 610.13 (b).

1. Spôsob (I. M.)

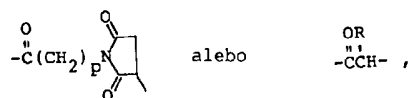
Druhým spôsobom merania pyrogenity je králičí test IM. Tento test lepšie simuluje klinické použitie produktu a považuje sa za presnejší odraz zjavného znečistenia produktu endotoxínom.

Každý králik dostane 1,0 ml vakcíny v podobe vnútrošvalovej injekcie. Test sa uskutočňuje aspoň na troch králikoch. Teplota sa sleduje 5 hodín po aplikácii injekcie. Iné testovacie spôsoby sa opisujú v 21 CFR, oddiel 610.13 (b). (Testovaná dávka udáva koncentrácie polysacharidu).

v) Povaha kovalentnej väzby

Pn-Ps-PRO, ako konjugáty Pn-Ps-OMPC alebo Pn-Ps-MIEP, sa môžu pripravovať kondenzáciou pomocou dvojitých väzbových medzerníkov, ktoré obsahujú tioéterovú skupinu a primárnu aminoskupinu. Tieto medzerníky tvoria hydrolyticky labilné kovalentné väzby s polysacharidom a PRO, ako je OMPC alebo MIEP. Prednostne konjugáty podľa tohto vynálezu sú konjugáty, ktoré sa môžu vyjadriť vzor-

camí Pn-Ps-A-E-S-B-PRO alebo Pn-Ps-A'-S-E'-B'-PRO. A-E-S-B a A'-S-E'-B' tvoria dvojvázbové medzerníky, ktoré obsahujú hydrolyticky stabilné kovalentné tioéterové väzby a ktoré tvoria kovalentné tioéterové väzby (napríklad hydrolyticky labilné esterové alebo amidové väzby) s makromolekulami PRO a Pn-Ps. V medzerníku A-E-S-B symbol S znamená atóm síry; symbol E je transformačný produkt tiofilnej skupiny, ktorá zreagovala s tiolovou skupinou a dá sa vyjadriť vzorcom

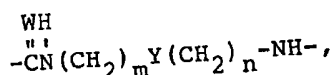


v ktorom

R predstavuje atóm vodíka alebo metylovú skupinu a

p predstavuje číslo od 1 do 3;

A predstavuje skupinu všeobecného vzorca



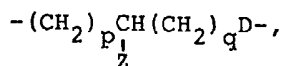
kde

W predstavuje kyslík alebo skupinu NH, m predstavuje číslo 0 až 4,

n predstavuje číslo 0 až 3 a

Y predstavuje metylenskupinu, kyslík, síru, skupinu NR' alebo CHCO_2H , kde R' predstavuje vodík alebo alkylskupinu s 1 až 2 atómami uhlíka, pričom keď Y predstavuje metylenskupinu, potom ani m, ani n neznamená číslo 0, a keď Y predstavuje kyslík alebo síru, potom m je väčšie ako 1 a n je väčšie ako 1,

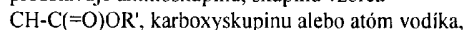
B predstavuje skupinu všeobecného vzorca



kde

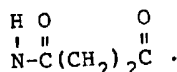
q predstavuje číslo 0 až 2,

Z predstavuje aminoskupinu, skupinu vzorca



R' a p majú uvedený význam a

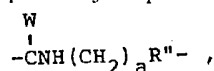
D predstavuje oxoskupinu, skupinu NR' alebo skupinu vzorca



V medzerníku A'-S-E'-B'

S predstavuje atóm síry,

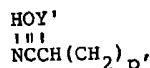
A' predstavuje skupinu všeobecného vzorca



kde

a znamená číslo 1 až 4 a

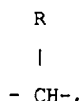
R'' predstavuje metylenskupinu alebo skupinu všeobecného vzorca



kde

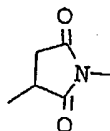
Y' predstavuje aminoskupinu alebo skupinu všeobecného vzorca NHCOR' a W, p a R' majú uvedený význam a

buď E' predstavuje transformačný produkt tiofilnej skupiny, ktorá zreagovala s tiolovou skupinou a dá sa vyjadriť všeobecným vzorcom



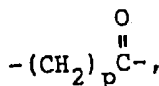
kde R má uvedený význam a B' predstavuje oxoskupinu;

alebo E' predstavuje skupinu vzorca



a

B' predstavuje skupinu všeobecného vzorca



kde p znamená číslo 1 až 3.

Z dvojvázbových medzerníkov vzorca A-E-S-B a A'-S-E'-B' je možné kvalitatívne a kvantitatívne stanoviť zložky E-S-B a A'-S-E', pričom táto identifikácia odráža kovalentnosť väzby konjugátu, ktorá spája miesto s tioéterovou sírou, pochádzajúcou z kovalentne modifikovaného polysacharidu s miestom v medzerníku, ktoré pochádza z funkcionizovaného proteínu.

Konjugáty Pn-Ps-A-E-S-B-PRO podľa tohto vynálezu môžu obsahovať medzerníky, ktorých zložkami sú okrem iných tieto deriváty: oxid uhličitý, 1,4-butándiamín a S-karboxymetyl-N-acetylhomocystein; oxid uhličitý, 1,5-petándiamín a S-karboxymetyl-N-acetylhomocystein; oxid uhličitý, 3-oxa-1,5-pentándiamín a S-karboxymetyl-N-acetylhomocystein; oxid uhličitý, 1,4-butándiamín a S-karboxymetyl-N-acetylcystein; oxid uhličitý, 1,3-propándiamín a S-karboxymetyl-N-benzoylhomocystein; oxid uhličitý, 3-aza-1,5-pentándiamín a S-karboxymetyl-N-acetylcystein; oxid uhličitý, 1,2-etándiamín, glycín a S-(sukcin-2-yl)-N-acetylhomocystein. Konjugáty Pn-Ps-A'-S-E'-B'-PRO podľa tohto vynálezu môžu obsahovať medzerníky, ktorých zložkami sú tieto deriváty: oxid uhličitý a S-karboxymetylcysteamín; oxid uhličitý a S-(α -karboxyetyl)cysteamín; oxid uhličitý a S-karboxymetylhomocysteamín; oxid uhličitý, S-(sukcin-2-yl)cysteamín a glycín; oxid uhličitý a S-karboxymetylcystein.

B. Spôsob výroby nových medziproduktov Pn-Ps a konjugátov Pn-Ps-PRO

Pri opise sa rozlišuje niekoľko stupňov:

I. Príprava polysacharidu

a) izolácia surového pneumokokového polysacharidu Pn-Ps,

- b) čiastočná hydrolyza alebo mechanické rozštiepenie surového Pn-Ps strižnými silami,
- c) frakcionácia čiastočne hydrolyzovaných Pn-Ps podľa veľkosti a čistoty.

II. Konjugácia

- a) funkcionalizácia frakcionovaného Pn-Ps s cieľom vytvorenia elektrofilne alebo nukleofilne reaktívneho Pn-Ps*, prednostne takého, ktorý má 21 reaktívnych brómacylových skupín na 100 Pn-Ps oligosacharidových opakujúcich sa jednotiek;
- b) izolácia imunogénneho proteínu PRO, prednostne OMPC alebo jeho podjednotky z *Neisseria meningitidis* B;
- c) funkcionalizácia PRO s cieľom vytvorenia nukleofilne alebo elektrofilne reaktívneho PRO*, prednostne OMPC alebo jeho podjednotky, ako je MIEP s reaktívneho sulfhydroxylovými skupinami;
- d) konjugácia polysacharidu (Pn-Ps*), pripraveného podľa kroku a) s proteínom (PRO*), pripraveným podľa bodu c);
- e) blokovanie konjugátu Pn-Ps-PRO, aby sa odstránili zvyškové funkčné skupiny;
- f) izolácia konjugovaného produktu.

I.a) Izolácia surového pneumokokového polysacharidu Pn-Ps

Pneumokokové kapsulárne polysacharidy sa líšia chemicky a antigénnou reakciou podľa zloženia a väzby oligosacharidovej opakujúcej sa jednotky daného kapsulárneho polysacharidového sérotypu. Izolácia polysacharidov musí prebiehať trochu inými cestami, ktoré závisia od fyzikálnych charakteristík daného polysacharidu. No všeobecne sa baktérie kultivujú a Pn-Ps sa získava známymi spôsobmi [príklad 3 a Williams, C. A., a Chase, M. W., Metódy v imunológii a imunochémii, zv. I, Academic Press (1967)], zatiaľ čo samotné patogény sú dostupné od ATCC. Stručne povedané, po kultivácii baktérií vo veľkom meradle vo vhodnom živnom médiu, ktoré podporuje rast pneumokokov a je v odbore známe, sa do média pridá baktericídna látka, napríklad fenol alebo toluén, aby sa mikroorganizmy usmrtili (príklad 3).

Ďalej sa uskutoční frakcionácia polysacharidu alkoholom v dvoch stupňoch. V prvom stupni sa použije alkohol s nízkou koncentráciou, aby sa vyzrážali bunkové zvyšky a iné nežiaduce nečistoty, zatiaľ čo surový Pn-Ps zostáva v roztoku. Nasledujúci prídavok alkoholu miešateľného s vodou na vopred stanovenú koncentráciu spôsobí vyzrážanie kapsulárnych polysacharidov, zatiaľ čo prídavné nečistoty zostanú v supernatante. Po resuspendovaní polysacharidov vo vodnom médiu sa odstránia kontaminujúce proteíny a nukleové kyseliny známym spôsobom, ako sú napríklad štiepenie nukleázami, proteolytické štiepenie alebo extrakcia rozpúšťadlom. Surový polysacharid sa získa zrážaním alkoholom. Po vysušení vznikne prášok surového Pn-Ps (príklad 3).

I.b) Čiastočná hydrolyza alebo mechanické rozštiepenie surového Pn-Ps

Surový polysacharid pripravený v podstate podľa postupu opísaného v texte (pozri aj príklad 3 ďalej) sa použije v nekonjugovanom stave na vytvorenie pneumokokových vakcín. Tieto vakcíny sú určené pre dospelých a deti staršie ako dvojročné. V nasledujúcich stupňoch postupu sa získava nový, čiastočne hydrolyzovaný, purifikovaný produkt Pn-Ps, ktorý má jedinečné a definované chemické a fyzikálne vlastnosti (pozri tabuľka II), ktoré sú užitočné na prípravu konjugátových vakcín. Zmenšenie veľkosti surového

Pn-Ps prispieva k úspešnosti nasledujúcich purifikačných krokov, ktorými sa získa vysoko vyčistený produkt Pn-Ps. Okrem toho pri príprave konjugátov je konjugácia účinnejšia, keď sa použijú nové Pn-Ps podľa tohto vynálezu. To je spôsobené tým, že vodné roztoky surového polysacharidového materiálu sú vysoko viskózne, zle rozpustné a konjugáty vytvorené z neho sú z veľkej časti nerozpustné a nefiltrovaťelné. Uskutočniť samotný konjugáčny proces je ťažké a výsledkom toho je nízky výťažok konjugátu. Okrem toho sa nekonjugovaný Pn-Ps z výsledného konjugátu ľahšie odstráni, keď má Pn-Ps pred konjugáciou menšiu veľkosť a viskozitu a lepšiu rozpustnosť. Tento fakt je dôležitý, pretože prítomnosť voľných Pn-Ps v konjugátových prípravkoch sťažuje odhad skutočnej dávky konjugátu Pn-Ps, ktorý sa podáva. Pretože významný stimulačný efekt na T-bunky má práve konjugovaný Pn-Ps, prítomnosť nekonjugovaného Pn-Ps znamená zníženie imunologicky "relevantných" Pn-Ps.

Vysušený surový kapsulárny polysacharid pripravený podľa opisu uvedeného v texte sa môže aj čistiť, napríklad s použitím chromatografie na aneoch alebo inej chromatografickej techniky, po čiastočnej hydrolyze alebo po nej, čo ukazuje príklad 6 pre Pn14-Ps. Chromatografický adsorpčno-desorpčný proces sa môže použiť pozitívne alebo negatívne. Pri pozitívnom spôsobe sa Pn-Ps adsorbuje na živici a nečistoty sa odstránia z roztoku, ktorým sa vymýva kolóna, pred desorpciou Pn-Ps. Pri negatívnom spôsobe sa nečistoty sorbujú na náplň kolóny z roztoku Pn-Ps a odstránia sa, pričom Pn-Ps v roztoku odchádzajúcom z kolóny je vyčistený. Alternatívne sa Pn-Ps môžu čiastočne hydrolyzovať tepelne, ako znázorňuje príklad 4 pre Pn6B-Ps, alebo ultrazvukom, čo ukazuje príklad 6 pre Pn14-Ps. Možná je aj hydrolyza inými prostriedkami, napríklad chemická, enzymatická alebo fyzikálna (napríklad vo vysokotlakovkej celi).

Čiastočná hydrolyza sa dopĺňa obmedzeným zohriatím vo vodnom médiu, prednostne na teplotu 50 až 110 °C asi na 1 až 48 hodín. Alternatívnym spôsobom je obmedzené pôsobenie ultrazvuku s vysokou energiou počas 5 s až 5 minút, ktoré sa opakuje s obdobiami chladenia. To sa uskutočňuje toľkokrát, koľkokrát je to nutné na dosiahnutie žiadanej viskozity alebo konečnej hodnoty K_d . Pre polysacharidy s komplexnou štruktúrou (pozri ďalej) je prednostným spôsobom hydrolyza ultrazvukom pred termálnou hydrolyzou. Iné vhodné spôsoby s účinkom čiastočnej hydrolyzy polysacharidov známe v tomto odbore sa tiež môžu použiť. Teda aj obmedzená chemická hydrolyza pôsobením kyseliny, pôsobením endolytického enzýmu alebo fyzikálne štiepenie v mixéri alebo mlynčeku sa môže použiť na zmenšenie priemernej veľkosti reťazca Pn-Ps.

Prednostne sa na Pn-Ps pôsobí fyzikálnym šmykom pri prechode homogenizátorom pri teplote v rozmedzí 0 až 30 °C a tlaku v rozmedzí od 13,75 do 103 MPa. Hodnoty teploty a tlaku sa vopred stanovujú tak, aby sa získal produkt Pn-Ps so žiadanou veľkosťou molekuly, polydisperzitou a antigénnosťou (pozri príklad 10).

Cieľová konečná hranica hydrolyzy sa výhodne zistí meraním viskozity roztoku alebo vysokoúčinnou chromatografiou s rozlíšením veľkostí molekúl (SEC) a vopred sa stanoví pre každý polysacharid v skúšobnom meradle tak, aby sa antigénnosť polysacharidu nestratila. Ako sa diskutuje v texte, za uspokojivý výsledok sa považuje to, keď nominálna vyjadrená schopnosť viazať antipneumokokovú druhovo špecifickú protilátku nie je menšia ako 70 % tejto schopnosti, ktorú má východiskový surový materiál Pn-Ps pri rovnakej koncentrácii. To neznamená, že Pn-Ps s podstatne nižšími hodnotami M_N , M_W , alebo počtom opakujú-

cich sa jednotiek na molekulu (tabuľka II) sa nemôžu týmto spôsobom vytvoriť a že pre tieto Pn-Ps, ktoré môžu byť pri nefelometrickom stanovení (pozri v texte) určené ako neuspokojivé s ohľadom na uvedených 70 % hodnoty schopnosti viazať špecifickú protilátku, nemôžu po konjugácii pôsobiť imunogénnym spôsobom pri zvieratách. Platí teda, že navzdory nedostatku žiadanej schopnosti viazať druhovo špecifickú protilátku anti-Pn-Ps môžu byť Pn-Ps s nízkou molekulovou hmotnosťou v konjugovanom stave rozoznávane cicavčím imunitným systémom a môže na ne vzniknúť dobrá druhovo špecifická antipneumokoková odpoveď. V tomto prípade by sa termín "antigénny" mal nahradiť termínom "imunogénny" a ten brať ako operatívne kritérium na prijatie alebo odmietnutie daného preparátu Pn-Ps. V praxi je však omnoho výhodnejšie využívať radšej in vitro stanovený parameter antigénnosti ako in vivo stanovený parameter imunogénnosti na kontrolu procesu.

Všeobecne sa na väčšinu polysacharidov dá aplikovať rovnaký postup na zmenšenie ich veľkosti. No zatiaľ čo Pn6B-Ps si zachováva svoju antigénnosť po rozsiahlom zmenšení veľkosti pôsobením tepla, Pn23F-Ps môže po tomto zásahu stratiť svoju štruktúrnú integritu (odstránenie glycerolfosfátových bočných reťazcov). Preto Pn23F-Ps vyžaduje zmenšenie veľkosti molekuly za miernejších podmienok, dosiahnuteľné ultrazvukom alebo štipcím fyzikálnymi strižnými silami. Použitie vplyvu fyzikálnych strižných síl, napríklad v Gaulinovom homogenizátore, je prednostným spôsobom z niekoľkých dôvodov. Po prvé sa tento spôsob môže preniesť do väčšieho meradla. Po druhé spôsoby hydrolyzy pomocou ultrazvuku alebo tepla všeobecne vyžadujú nasledujúcu frakcionáciu hydrolyzovaných Pn-Ps, aby sa dosiahlo rozmedzie polydisperzity 1,0 až 1,5. Pri spôsobe s použitím fyzikálnych strižných síl sa však všeobecne získava produkt Pn-Ps, ktorého polydisperzita patrí do tohto rozmedzia bez ďalšej frakcionácie, aj keď sa môže použiť frakcionácia, aby sa dosiahlo zvýšenie čistoty a zníženie kontaminácie C-Ps, ak je to nutné. Po tretie spôsob využívajúci fyzikálne strižné sily je reprodukovateľnejší pre akýkoľvek daný Pn-Ps v porovnaní s termálnou a ultrazvukovou hydrolyzou. Po štvrté spôsob využívajúci fyzikálne strižné sily má výhodu v tom, že sa ním získavajú produkty Pn-Ps, ktoré majú väčšiu antigénnosť ako Pn-Ps s rovnakou veľkosťou molekuly získané termálnou alebo ultrazvukovou hydrolyzou.

Viskozita, ktorá je závislá od priemernej molekulovej hmotnosti Pn-Ps, je vhodným parametrom na sledovanie priebehu procesu. Dá sa ľahko stanoviť počas hydrolyzy, a tak sa môže obmedziť a riadiť proces zmenšovania veľkosti Pn-Ps. Chemicky a fyzikálne nerozlíšiteľné šarže Pn6B-Ps a Pn23F-Ps sa môžu jednoducho pripraviť zmenšovaním veľkosti molekúl polysacharidu až do dosiahnutia konzistentnej cieľovej konečnej viskozity (pozri tabuľka I, v texte). Meranie viskozity počas procesu sa môže použiť v širokej skupine surových polysacharidov, čo umožňuje hydrolytické zmenšenie ich veľkosti bez zmeny antigénnych vlastností výsledných Pn-Ps. Ako sa opisuje v texte, zachovanie antigénnych vlastností sa ľahko stanoví napríklad Ouchterlonyho dvojitou difúznou skúškou, rýchlostnou nefelometriou alebo iným v tomto odbore známym spôsobom. Cieľové, konečné hodnoty viskozity pre niekoľko roztokových preparátov Pn-Ps s koncentraciou 1 mg/ml, v 0,9 % roztoku chloridu sodného (fyziológický roztok) udáva tabuľka III v texte. Tieto hodnoty viskozity sa môžu obdobne použiť pre Pn-Ps odvodené od iných pneumokokových poddruhov.

Tabuľka III

Viskozita roztoku surového a hydrolyzovaného Pn-Ps

Pn-Ps poddruh	Viskozita surového Pn-Ps.10 ⁶ (m ² .s ⁻¹)	Cieľová, konečná viskozita.10 ⁶ (m ² .s ⁻¹)
Pn-4-Ps	1,8	1,5 - 1,00
Pn6B-Ps	1,4	1,3 - 1,00
Pn9V-Ps	1,4	1,3 - 1,00
Pn14-Ps	1,2	1,1 - 0,95
Pn18C-Ps	2,0	1,5 - 1,00
Pn19F-Ps	1,4	1,3 - 1,00
Pn24F-Ps	1,6	1,5 - 1,00

V prípade niektorých pneumokokových polysacharidov je výhodné zaradiť prídavný purifikačný krok, ako je iónová výmena, pred alebo čiastočnej hydrolyzy. V prípade Pn14-Ps sa tento stupeň uskutočňuje pomocou adsorpcie nečistôt so záporným nábojom na živici Whatman DE52 pred čiastočnou ultrazvukovou hydrolyzou. Živica sa pridáva vo forme vsádzky do roztoku. Toto čistenie sa deje pri slabom kyslom pH, keď je polysacharid neutrálny. Polysacharid pripravený na hydrolyzu sa získava ako supernatant.

Hodnota molekulovej hmotnosti pre preparáty Pn-6B-Ps je asi 900 kilodaltonov (kD) pred a asi 300 kD po zmenšení veľkosti a frakcionácii. Pre Pn23F-Ps je to asi 1000 kD alebo viac pred a asi 400 až 500 kD po tejto úprave. Teda zmenšenie veľkosti Pn-Ps na asi 500 ± asi 300 kD je vhodné v tejto fáze procesu pre všetky poddruhy Pn-Ps.

Opakované vyzrážanie čiastočne hydrolyzovaného materiálu alkoholom s vopred stanovenými koncentraciami umožňuje získať a ďalej vyčistiť čiastočne hydrolyzovaný Pn-Ps. Tento postup je opísaný v pododieli (c) ďalej.

I.c) Frakcionácia čiastočne hydrolyzovaného Pn-Ps podľa veľkosti a čistoty

Polydisperzita preparátu Pn-Ps je nielen ukazovateľom nezhody v dĺžke reťazca poddruhovo špecifického Pn-Ps, ale aj toho, že v preparáte Pn-Ps mohol zostať skupinovo špecifický C-polysacharid alebo iné kontaminanty. Ako sa uvádza v texte, zvyšková kontaminácia Pn-Ps nie je užitočná a môže dokonca súvisieť s nepriaznivou imunitnou odpoveďou.

Selekcia polysacharidov s úzkym rozpätím veľkosti molekúl (zníženou polydisperzitou) sa vhodne uskutoční tak, že sa využije rozdielna rozpustnosť rozlične veľkých polysacharidov po zmenšení veľkosti v alkohole, prednostne v izopropylalkohole (IPA). Princípom tejto selekcie je skutočnosť, že pre daný preparát Pn-Ps je rozpustnosť v alkohole nepriamo úmerná molekulovej hmotnosti. Preto sa tento spôsob môže úspešne použiť na kvantitatívnu izoláciu populácií molekúl s rovnakou veľkosťou, čím sa podstatne zvýši homogenita prípravku v porovnaní s homogenitou východiskového Pn-Ps po zmenšení veľkosti molekuly. Riadenie IPA frakcionáciou počas procesu sa uskutočňuje na základe predbežného pokusu, pri ktorom sa určuje koncentrácia IPA, nad ktorými sa Pn-Ps vyzráža. Na zaistenie kvantitatívneho získania Pn-Ps sa frakcionácia monitoruje nefelometrickou skúškou zameranou na stanovenie protilátky. Pomocou tohto zlepšeného spôsobu sa kontaminácia C-polysacharidom, skupinovo špecifickým polysacharidom, ktorý je spoločný pre mnoho rôznych pneumokokových izolátov, zníži troj- až dvadsaťnásobne v porovnaní s hladinou kontaminácie zistenou v surových preparátoch Pn-Ps. Okrem toho sa polydisperzita molekulovej hmotnosti preparátov Pn-Ps zároveň zníži na 1,0 až 1,4.

Namiesto IPA frakcionácie Pn-Ps so zníženou veľkosťou sa môže použiť SEC chromatografia vodného roztoku

Pn-Ps so zmenšenou veľkosťou na vhodnej živici, napríklad na živici CL-2B alebo na inej živici, ktorá umožňuje frakcionovať polysacharidy s molekulovou hmotnosťou v rozmedzí 200 až 1000 kD. HPSEC s použitím rigidnej matrice so schopnosťou rozlíšiť molekuly podľa veľkosti je vhodná s ohľadom na zníženie času zdržania a zvýšenie rozlíšenia. Výberom frakcií eluovaných z kolóny podľa vopred určenej viskozity, retenčného času alebo podľa detekcie "on-line" sa získa populácia molekúl Pn-Ps s požadovanou veľkosťou, viskozitou a čistotou, ako sa uvádza v texte.

Preparáty Pn-Ps podrobené týmto prídavným krokom (frakcionácii IPA alebo chromatografickej frakcionácii) sa správajú konzistentnejšie počas chemického blokovania, a preto sa ich použitím vyrobia konjugáty s reprodukovateľnými parametrami. Dosiahne sa aj významné zvýšenie čistoty Pn-Ps, najmä koncentrácia C-polysacharidu sa výrazne zníži.

Uvedené manipulácie a merania sa prejavujú v tom, že získané medziprodukty Pn-Ps majú prednostné parametre, ktoré sú súhrnne uvedené v tabuľke II v texte.

II a) Funkcionalizácia frakcionovaných Pn-Ps s cieľom vytvoriť elektrofilné alebo nukleofilné reaktívne Pn-Ps*, prednostne také, ktoré majú 10 až 40 reaktívnych brómocetylových skupín na 100 monomérnych jednotiek Pn-Ps

Pn-Ps, pripravený podľa postupu z oddielu Ic, je dostatočne homogénny a má také vlastnosti, ako je zvýšená rozpustnosť a znížená viskozita, ktoré spôsobujú, že je vhodný na konjugáciu. Odborníci v tomto odbore môžu použiť mnoho rôznych postupov na prípravu konjugátov polysacharidov s inými zvyškami. Tu opísaný spôsob je len jednou možnou cestou použitia nových čiastočne hydrolyzovaných a frakcionovaných medziproduktov Pn-Ps podľa vynálezu na vytvorenie konjugátov. Tento spôsob by sa nemal považovať za jediný spôsob použitia medziproduktov Pn-Ps.

Metóda využívajúca dvojväzbový medzerník, ktorú opísal Marburg, S. a ďalší (americký patent č. 4 695 624; J. Am. Chem. Soc. 108, 5282 (1986)), je prednostnou metódou konjugácie frakcionovaných Pn-Ps so zmenšenou veľkosťou molekuly s imunogénnym proteínom. Pn-Ps sa funkcionalizuje, aby mal elektrofilné alebo nukleofilné skupiny. Vzniknutý Pn-Ps* je potom schopný reagovať s opačne funkcionalizovaným proteínom PRO*. Postup podľa tohto vynálezu zahŕňa aj výber nukleofilu alebo binukleofilu, ktorý reaguje s aktivovaným polysacharidom za vzniku kovalentne modifikovaného polysacharidu s výčnievajúcimi elektrofilnými skupinami alebo výčnievajúcimi tiolovými skupinami. Tým sa odstráni potreba ďalšej funkcionalizovať polysacharid, modifikovaný binukleofilom, pred reakciou kovalentne modifikovaného polysacharidu s kovalentne modifikovaným proteínom. Aj funkcionalizácia proteínu na účely vytvorenia obidvoch druhov PRO* (s elektrofilnými aj nukleofilnými skupinami) sa môže uskutočňovať vo viacerých ako v jednom kroku podľa výberu reaktantov v týchto krokoch.

Nech je Pn-Ps* akokoľvek funkcionalizovaný, frakcionovaný Pn-Ps so zmenšenou veľkosťou molekuly sa musí najprv rozpustiť v rozpúšťadle, ktoré neinterferuje s funkcionalizačným procesom. Pretože na funkcionalizáciu sú najvhodnejšie hydroxylové skupiny Pn-Ps, kritickým miestom funkcionalizácie je vybratie Pn-Ps z vody na začatie funkcionalizácie. Nahradením "kyslých" vodíkových atómov Pn-Ps hydrofóbnymi kationmi, ako sú tetra- alebo tributylamóniové ióny, sa Pn-Ps stane rozpustným v nevodných rozpúšťadlách, ako je DMSO alebo DMF. Priro-

dzene nie je potrebné uskutočňovať toto nahrádzanie pri Pn-Ps, ktoré sú neutrálne (napríklad Pn14-Ps alebo Pn7F-Ps). V nevodnom roztoku môže Pn-Ps reagovať s bielektrofilom, ako je karbonyldiimidazol, a tak vytvoriť imidazolydiuretán. Počet funkčných skupín na 100 monomérnych jednotiek Pn-Ps sa riadi v tomto okamihu prídavkom obmedzeného množstva reakčného činidla, karbonyldiimidazolu. V porovnaní s celkovým množstvom monomérov Pn-Ps sa pridá asi pätina molového množstva tohto činidla, takže v priemere len asi 10 až 40 zo 100 monomérnych jednotiek Pn-Ps sa derivatizuje. Vzniknutý produkt je vhodný na nukleofilnú substitúciu buď reagentom, ako je

1. cystamíndihydrochlorid, čím vzniknú nukleofilné deriváty Pn-Ps*, alebo
2. 1,4-butándiamín, čím vzniknú elektrofilné deriváty Pn-Ps*, ako sa uvádza v americkom patente č. 4 695 624 a ako uvádza Marburg a ďalší, J. Am. Chem. Soc., 108, 5282 (1986).

Nedávno sa zistilo, že niektoré "kyslé" pneumokokové polysacharidy, ako sú Pn9V-Ps, Pn4-Ps, Pn1-Ps, Pn5-Ps a *Neisseria meningitidis B* alebo C-polysacharidy, obsahujú voľné kyslé karboxylové skupiny, ako aj voľné hydroxylové skupiny. Konjugácia týchto polysacharidov je trochu iná v porovnaní s neutrálnymi polysacharidmi alebo s polysacharidmi, ktoré majú záporný náboj vzhľadom na prítomnosť fosfodiesterových väzieb, ako v polyribozylribitolfosfáte. Konjugácia polysacharidov neobsahujúcich karboxylátové skupiny všeobecne spočíva v konverzii voľných hydroxylových skupín polysacharidu na uretánové väzby, t. j. z Pn-Ps-OH na Pn-Ps-O-C(=O)-N(H)-R^a, kde symbol R^a predstavuje zvyšok reťazca viažuceho polysacharid s proteínom. No v prípade polysacharidov obsahujúcich karboxyskupiny, ako je Pn-9V-Ps, ktorý obsahuje glukuronátové skupiny alebo Pn4-Ps, ktorý obsahuje pyruvátové skupiny, prebieha konverzia z Pn-Ps-C(=O)-OH na Pn-Ps-C(=O)-N(H)-R^a, pričom symbol R^a opäť predstavuje zvyšok reťazca viažuceho polysacharid s proteínom. Preto sa ukazuje, že esterová skupina uretánu sa v polysacharide obsahujúcom karboxylovú skupinu buď neutvorí, alebo sa okrem nej vytvorí jednoduché amidové väzby na miestach s karboxylovými skupinami. Konjugácia prebieha rýchlejšie v prítomnosti karboxylových skupín.

Pretože karboxylové skupiny pravdepodobne významne prispievajú k antigénnym a imunogénnym vlastnostiam tejto triedy aniónových polysacharidov, musí sa konjugácia týchto polysacharidov opatrne riadiť. Požiadavka vysokého pomeru polysacharidových molekúl k proteínovým molekulám vo výslednom konjugáte musí byť v rovnováhe s požiadavkou na zachovanie antigénnej integrity. To sa dosiahne obmedzením počiatkovej aktivácie sprostredkovej karbonyldiimidazolom. Keď už vznikne amid, môže v ďalšom kroku reagovať cystamíndihydrochlorid alebo 1,4-butándiamín, ako sa uvádza v texte a rozoberá ďalej.

Alternatívne sa karboxylové skupiny môžu reverzibilne chrániť, a potom zbaviť chrániacich skupín. Ako chrániace skupiny sa používajú trimetylsilylskupiny alebo podobné chrániace skupiny, ktoré sa môžu odstrániť v mierne alkalickom prostredí, alebo 2,4-dimetoxibenzyloxy skupiny, ktoré sú nestabilné v kyslom prostredí. V tomto prípade prebieha konjugácia zvyčajným spôsobom cez hydroxylové skupiny polysacharidu.

I. Príprava nukleofilného Pn-Ps*

Frakcionovaný Pn-Ps so zmenšenou veľkosťou molekuly a aktivovaný karbonyldiimidazolom, získaný podľa u-

vedeného opisu, sa môže nechať reagovať vo vodných alebo iných rozpúšťadlách s reagentmi uvedenými v americ-
kom patente č. 4 695 624. Prednostným reagentom je cystamindihydrochlorid. Nasledujúcim odstránením nadbytku
cystamínu a redukciou ditiotreitolu alebo ditiocerytreitolu sa
získa nukleofilný Pn-Ps funkcionalizovaný sulfhydrylový-
mi skupinami. Tento derivát Pn-Ps* je schopný reagovať s
elektrofilným PRO*, napríklad s proteínom modifikova-
ným tak, že má vyčnievajúce brómacytové skupiny.

2. Příprava elektrofilného Pn-Ps*

Frakcionovaný Pn-Ps so zmenšenou veľkosťou molekuly a aktivovaný karbonyldiimidazolom, získaný podľa uvedeného opisu, sa môže nechať reagovať vo vodných alebo iných rozpúšťadlách s reagentmi uvedenými v americkej patente č. 4 695 624. Prednostným reagentom je 1,4-butanđiamín (BuA₂). Nasledujúcou acyláciou Pn-Ps-BuA₂ p-nitrofenylbromacetátom alebo podobným reagentom sa vytvorí elektrofilný derivát Pn-Ps-BuA₂-BrAc schopný reagovať s elektrofilným PRO*, napríklad s proteínom modifikovaným sulhydrylovými skupinami. Stupeň derivatizácie sa meria pomocou NMR porovnaním integrálneho signálu 1,4-butanđiamínu s vhodným signálom z monosacharidu, napríklad so signálom metylskupiny z ramnózy. Prednostný stupeň derivatizácie je v rozmedzí 10 až 40 %, najlepšie približne 20 %.

II.B) Izolácia imunogénneho proteínu (PRO), prednostne OMPC alebo jeho podjednotky z *Neisseria meningitidis* B

Protein by mal zosilňovať imunitnú odpoveď. Pri výbere proteínu je potrebné vyhnúť sa proteínom, ktoré spôsobujú nešpecifickú aktiváciu imunitnej odpovede prijemcu (reaktogenicitu). Použitie proteínového komplexu z vonkajšej strany (OMPC) *Neisseria meningitidis* na prípravu konjugátov polysacharid-proteín je uvedené v americkom patente č. 4 695 624 (Marburg a ďalší). Na tento vynález sa ukázalo ako vhodné použitie OMPC, ale môžu sa použiť aj iné autoimúne proteíny, ako je tetanový alebo záškrtový toxoid alebo pertussinogén.

Už sa navrhli rôzne spôsoby purifikácie OMPC z gramnegatívnych baktérií [Frasch a ďalší, J. Exp. Med. 140, 87 (1974); Frasnch a ďalší, J. Exp. Med. 147, 629 (1978); Zollinger a ďalší, americký patent č. 4 707 543 (1978); Helting a ďalší, Acta Path. Microbiol. Scand. oddiel C 89, 69 (1981); Helting a ďalší, americký patent č. 4 271 147). Príprava tu použitého OMPC opisuje príklad 1. Prednostné je aj použitie proteínovej podjednotky izolovanej použitím disociácie OMPC alebo rekombinantnou expresiou materiálu, ktorý kóduje konštitutívny proteín OMPC, najmä hlavný membránový proteín (uvádzaný ako proteín indukujúci mitózu IMP alebo ako proteín zvyšujúci hlavnú imunitnú odpoveď). Spôsob získavania podjednotkových proteínov sa uvádza v príklade 2 a v amerických patentových prihláškach s poradovými číslami 555 978, 555 329, 555 204 podaných 19. januára 1990 a 639 457 podanej 10. januára 1991.

II.c) Funkcionalizácia PRO s cieľom vytvorenia nukleofilne alebo elektrofilne reaktívnych PRO*, prednostne funkcionizácie OMPC alebo jeho podjednotky, zavedením reaktívnych sulfhydrylových skupín

PRO, izolovaný podľa opisu v oddieli IIB) v texte, sa funkcionalizuje tak, aby mal buď elektrofilné, alebo nukleofilné skupiny. Výsledný PRO* je potom schopný reagovať s opačne funkcionalizovanými typmi Pn-Ps*, ktorého príprava je uvedená v oddieli IIA) v texte.

1. Tvorba eletrofilných derivátov PRO*

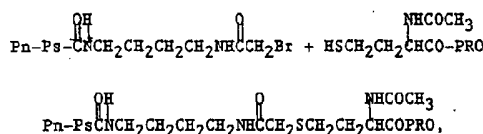
Izolovaný PRO, napríklad OMPC z *Neisseria* alebo MIEP z OMPC, sa prednostne nechá reagovať s reagentom, ako je *p*-nitrofenylester kyseliny N-(brómocetyl)-6-aminokaprónovej, ktorý je schopný reagovať s ϵ -aminoskupinami lyzínu v PRO. Výsledný brómocetylovaný PRO* je schopný reagovať s nukleofilnými derivátmi Pn- Ps^* , pripravenými podľa odstavca Iia)1).

2. Tvorba nukleofilných derivátov PRO*

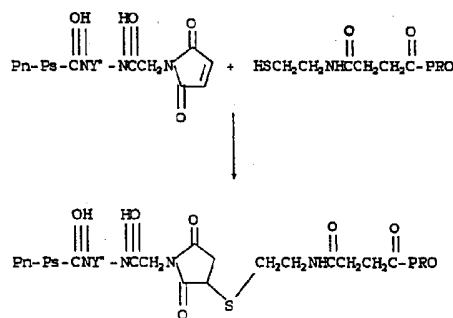
Izolovaný PRO, napríklad OMPC z *Neisseria* alebo MIEP, sa nechá reagovať s reagentom, ako je *N*-acetylhomocysteintiolaktón, čím vznikne sulphydrylový derivát proteínu. Tento nukleofilný derivát je schopný reagovať s elektrofilným Pn-Ps* pripraveným podľa odstavca IIa)2. Typickým výsledkom tejto fázy procesu je koncentrácia sulphydrylových skupín v rozmedzí 0,1 až 0,3 $\mu\text{mol/mg}$ proteínu.

II.d) Konjugácia polysacharidu (Pn-Ps*) podľa bodu IIa) s
proteinom (PRO*) podľa bodu IIc)

Po utvorení reaktívnych látok Pn-Ps* a PRO* podľa bodu IIa) a IIc) sa opačne aktivovaní reakční partneri privedú do kontaktu v hmotnostnom pomere približne 1 : 1. Reakčná zmes sa môže odvzdušniť dusíkom, uzavrieť a nechať reagovať štyri dni pri teplote 17 °C až 40 °C. Ako príklady prebiehajúcich reakcií, pri ktorých vznikne konjugát, je možné uviesť reakciu

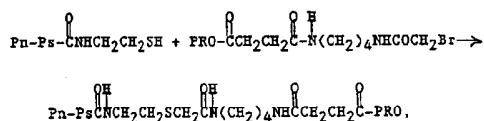


pri ktorej sa aktivovaný polysacharid, ktorý vopred zreagoval so 4-brómacetamido-butylaminom, nechá reagovať s proteínom, ktorý vopred zreagoval s *N*-acetylhomocysteíntiolaktónom, a reakciu

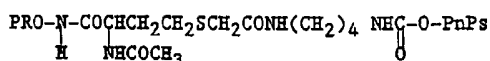


(kde symbol Y " označuje alkylový zvyšok s 2 až 8 atómami uhlíka), pri ktorej sa amino-derivatizovaný polysacharid, ktorý zreagoval s aktivovaným maleinimidovou kyselinou, nechá reagovať s karboxy-aktivovaným proteínom, do ktorého sa zaviedla aminoskupina pomocou aminotiolu.

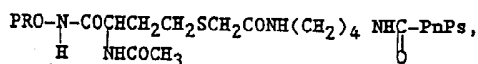
Podobne akýkoľvek z kovalentne modifikovaných polysacharidov s vyčnievajúcimi tiolovými skupinami sa môže nechať reagovať s bakteriálnym proteínom OMPC alebo MIEP, ktorý má vyčnievajúce elektrofilné skupiny, za vzniku kovalentného konjugátu. Príkladom takej reakcie je



pri ktorej sa aktivovaný polysacharid, ktorý je modifikovaný aminosolom, nechá zreagovať s karboxy-aktivovaným proteínom, ktorý bol modifikovaný monohalogenacetylovými derivátmi diamínu. Prednostným väzbovým zoskupením podľa tohto vynálezu je medzerník, ktorého zloženie je jasné zo vzorca



v prípade väzieb sprostredkovaných hydroxylovými skupinami polysacharidu alebo



v prípade polysacharidov s karboxylovými skupinami.

Ak je potrebné eliminovať elektrofilnú aktivitu nadbytku halogenacetylových skupín, nechá sa konjugát reagovať s tiolom s malou molekulovou hmotnosťou, ako je *N*-acetylcysteamín. Použitie *N*-acetylcysteamínu umožňuje aj potvrdenie počtu využitých halogenacetylových skupín, pretože vytvorený S-karboxymetylcysteamín sa môže jednoznačne detegovať spôsobom podľa Spackmana, Moora a Steina.

II.e) Blokovanie konjugátu Pn-Ps-PRO s cieľom odstrániť zvyškové funkčné skupiny

Zvyškové elektrofilné skupiny konjugátu budú na PRO*, alebo na Pn-Ps* sa na konci reakcie nechajú zreagovať s nukleofilom s malou molekulovou hmotnosťou, ktorý sa pridá v dvoj- až desaťnásobnom molovom nadbytku. Ako nukleofil je možné použiť napríklad *N*-etyl-maleinimid (NEM) na blokovanie zvyškových voľných sulfhydrylových skupín. Na blokovanie zvyškových brómocetylových skupín sa môže použiť elektrofil, napríklad *N*-acetylcysteamín.

II.f) Izolácia konjugátového produktu

Blokový konjugátový produkt sa oddelí od nekonjugovaného PRO, Pn-Ps a iných reaktantov ultracentrifugáciou alebo diafiltráciou. Konjugátová peleta sa resuspenduje vo vodnom pufrovacom kúpeli, ktorý môže obsahovať detergent, ako je roztok deoxycholínu a soľ, ako je 0,1 M Tris s pH 7 až 9 a asi 10 nM EDTA. Takto sa odstránia zvyškové pyrogény. Zmes sa nechá stáť 1 až 25 hodín pri laboratórnej teplote. Konjugát sa opäť nechá utvoriť peletu, resuspenduje sa vo vodnom tlmivom roztoku bez detergentu, a potom sa z neho opäť vytvorí peleta ultracentrifugáciou pri 100 000 g použitím odstredivky s rotorom nastaveným v pevnom uhle. Odstredí sa 2 hodiny pri teplote 1 až 20 °C. Konjugát sa alternatívne môže aj čistiť akýmkoľvek iným purifikačným postupom, napríklad gélovou filtráciou, ionexovou chromatografiou, gradientovou centrifugáciou alebo inou diferečne adsorpčnou chromatografiou, a

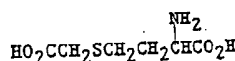
by sa odstránili nekovalentne viazané proteíny a polysacharidy. Pritom sa na sledovanie požadovanej biologickej aktivity použijú in vitro metódy, ako je stanovenie Ps, PRO a rýchlostné nefelometrické stanovenie a aj skúška kovalentnosti pre dvojvázbový medzerník (pozri ďalej).

Ďalšia separácia reakčných zložiek sa môže uskutočňovať pomocou chromatografie s rozlíšením veľkosti molekúl v kolóne alebo v prípade veľmi veľkých nerozpustných proteínov sa môže separácia uskutočňovať pomocou ultracentrifugácie. Resuspendovanie konjugátu v sterilnej vode a starnutie počas 1 dňa pri teplote 4 °C umožní kompletnú solubilizáciu. Nasleduje centrifugácia pri nízkej rýchlosti na odstránenie nerozpustných častíc. Supernatant obsahuje konečný produkt, ktorý sa môže sterilne prefiltrovať a ďalej sa z neho môžu vytvoriť vakcínové prípravky s imunologicky účinnou úrovňou dávky. Vakcíny sa sterilne plnia do fliaš.

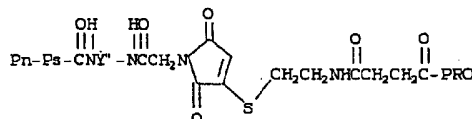
Analýza konjugátu na potvrdenie kovalentnosti, a teda stability konjugátu sa uskutočňuje hydrolyzou konjugátu (prednostne pomocou HCl s koncentráciou 6 M pri 110 °C 20 hodín) a kvantitatívnym stanovením jedinečnej aminokyseliny hydrolyticky stabilného medzerníka obsahujúceho tioéterovú väzbu a stanovením stavebných aminokyselín proteínu. Ak je to nutné, môže sa príspevok aminokyselín pochádzajúcich z proteínu "odčítať" od celkového množstva aminokyselín porovnaním s vhodným aminokyselinovým štandardom pre daný proteín. Počet zvyšujúcich aminokyselín odráža kovalentnosť konjugátu. Alternatívne sa môže aminokyselina v medzerníku navrhnuť tak, aby jej stanovenie prebiehalo mimo analýzy aminokyselín proteínového štandardu. Stanovenie kovalentnosti je užitočné aj na sledovanie purifikačných postupov a na zistenie zvyšovania koncentrácie biologicky aktívnych zložiek. V predchádzajúcich príkladoch vedie hydrolyza produktu vzorca



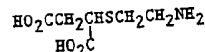
k uvoľneniu S-karboxymetylhomocysteínu vzorca.



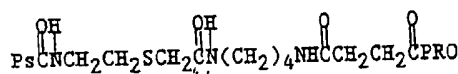
Hydrolyza produktu vzorca



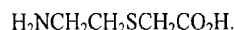
vedie k uvoľneniu aminodikarboxylovej kyseliny vzorca.



Hydrolyza produktu vzorca



vedie k uvoľneniu S-karboxymetylhomocysteínu vzorca



Pritom dochádza k štiepeniu molekuly Ps-A-E-S-B-

-PRO v peptidových väzbách a v iných hydrolyticky nestabilných väzbách. Pomer aminokyselinových stavebných zložiek sa môže výhodne stanoviť chromatograficky, napríklad metódou podľa Spackmana, Moora a Steina.

Optimálna produkcia protilátky IgG vyžaduje spoluprácu B- a T-lymfocytov so špecifitou pre daný systém. T-lymfocyty nie sú schopné rozoznať polysacharidy, ale môžu pomôcť odpovediam antipolysacharidovej protilátky IgG, ak je polysacharid kovalentne viazaný na proteín, ktorý je schopná T-bunka rozoznať.

C. Tvorba vakcín a ich použitie

Prednostne sa konjugátny produkt adsorbuje na gél hydroxidu hlinitého. To sa uskutoční napríklad tak, že sa pripraví zásobný roztok konjugátu s koncentráciou Pn-Ps 20 µg/ml. Z tohto roztoku sa pripravia podiely zriedené sterilnou vodou v pomere 1 : 1, 1 : 5 a 1 : 10. Časť týchto vzoriek a časť zásobného roztoku s koncentráciou 20 µg/ml sa zriedi v pomere 1 : 1 riedidlom, t.j. hydroxidom hlinitým, ktorý obsahuje 0,85 mg/ml Al^{3+} , 17 g/l NaCl a 100 µg/ml timerosolu. Hodnota pH roztoku sa upraví na asi 7,5 roztokom NaOH s koncentráciou 1 mol/l. Tým sa získajú roztoky s koncentráciou Pn-Ps 10, 5, 2 a 1 µg/ml. Dávky s objemom 0, 1 až 0, 75 ml každého z týchto prípravkov sú vhodné na podávanie príjemcom rôzneho veku a s rôznou hmotnosťou. Zistilo sa, že takto vytvorené vakcíny zvyšujú imunitnú odpoveď poddruhovo špecifického antipneumokokového polysacharidu dvoj- až trojmesačných mláďat opice pre Pn6B-Ps-OMPC, Pn14-Ps-OMPC, Pn19F-Ps-OMPC a Pn23F-Ps-OMPC. Konjugátová vakcína Pn-Ps-OMPC je, ako sa zistilo, okrem toho závislá aj od T-buniek atymických myší.

Z tohto opisu by malo byť jasné, že iné polysacharidy s vlastnosťami tu definovanými a spôsobmi výroby týchto Ps s týmito vlastnosťami sa môžu úspešne použiť na prípravu iných konjugátov, ktoré neobsahujú čiastočne hydrolyzované a frakcionované pneumokokové polysacharidy. Tieto konjugáty môžu slúžiť na prevenciu chorôb spôsobených inými patogénnymi mikroorganizmami. Ako zdroj polysacharidov sa môže použiť napríklad skupina B streptokokov, ktorá spôsobuje neonatálnu meningitídu, *Neisseria meningitidis* B alebo C, príčina infantilnej meningitídy alebo *E. coli*, dôležitá príčina infekcií močových ciest alebo iných podobných infekcií. Tieto polysacharidy, ako aj uvedené Pn-Ps a ich kovalentné konjugáty môžu poskytnúť aj dôležité zložky kombinovaných vakcínových prípravkov. Také kombinované prípravky môžu napríklad obsahovať imunologicky účinné množstvo adjuvans, ako je Freundsovo alebo Ribiho adjuvans, alebo imunomodulačných zlúčenín, ako sú interleukíny, interferóny (pozri napríklad zoznam zlúčenín v Market Letter, 30. nov. 1987, str. 26 až 27; Genetic Engineering News, január 1988, zv. 8, str. 23) alebo prídavných imunogénov. Prednostne prídavok obsahujúci imunologicky účinné množstvo konjugátu podľa vynálezu obsahuje aj jednu alebo viac vakcín proti hepatitíde B, hepatitíde A, non-A non-B hepatitíde, AIDS, záškrtu, pertusis, tetanu, osýpkam, príušniciam, rubeole, varicеле, detskej obrnc alebo *Haemophilus influenzae* b. Prednostne prídavné vakcíny práve uvedeného typu sú vakcíny Pevax-HIB^(R), Recombivax HB^(R), M-M-R^(R) a trivalentná vakcína DTP.

Nasledujúce príklady sa uvádzajú na ďalšie vysvetlenie vynálezu a nemienia sa ako obmedzenie tohto vynálezu. Percentuálne údaje sú hmotnostné, pri plynach ide o percentá objemové.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Príprava OMPC z *Neisseria meningitidis* B11, sérotyp 2 A.

Fermentácia

1. *Neisseria meningitidis*, skupina B11

Skúmavka s lyofilizovanou kultúrou *Neisseria meningitidis* (získanou od Dr. M. Artensteina, Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), Washington, D. C.) sa otvorí a pridá sa do nej Eugonbronthovo médium (BBL). Kultúra sa "čiarkovaním" naočkuje na šikmý agar s médium Mueller Hinton. Inkubácia prebieha 36 hodín pri 37 °C v atmosfére s 5 % CO_2 . Po tomto čase sa nárast pozberá do 10 % roztoku média z odstredeného mlieka (Difco). Alikvotné podiely sa zmrazia pri teplote -70 °C. Identita mikroorganizmu sa potvrdí aglutináciou so špecifickým antisérom (dodávateľ WRAIR) a typovacím sérom (Difco).

Nádobka s kultúrou z tohto druhého pasážovania sa rozmrazí a "čiarkovaním" naočkuje na 10 misiek s ovčím krvným agarom (CBAB-BBL). Misky sa inkubujú 18 hodín pri 37 °C v atmosfére s 5 % CO_2 . Po tomto čase sa nárast pozberá do 100 ml 10 % roztoku mliečného média. Odoberejú sa alikvotné podiely s objemom 0,5 ml a sa zmrazia pri teplote -70 °C. Mikroorganizmus sa pozitívne identifikuje aglutináciou so špecifickým antisérom, fermentáciou cukru a Gramovým farbením.

Nádobka s kultúrou z tohto pasážovania sa rozmrazí, zriedi médiom Mueller-Hinton a "čiarkovaním" naočkuje na 40 misiek s Mueller-Hintonovým agarom. Misky sa inkubujú 18 hodín pri 37 °C v atmosfére so 6 % CO_2 . Po tomto čase sa nárast pozberá do 17 ml 10% roztoku mliečného média. Alikvotné podiely s objemom 0,3 ml sa zmrazia pri teplote -70 °C. Mikroorganizmus sa pozitívne identifikuje aglutináciou so špecifickým antisérom, farbením podľa Grama a oxidázovým testom.

2. Fermentácia a vytvorenie bunkovej pasty

a) Vývoj inokula

Inokulum sa vypestuje z obsahu jednej zo zmrazených nádobiek s kultúrou *Neisseria meningitidis*, skupina B, B-11 (4.pasážovaním). Naočkuje sa 10 šikmých agarov s pôdou podľa Muellera-Hintona. Šesť z týchto agarov sa približne o 18 hodín neskôr pozberá a použije ako inokulum na 3 banky s objemom 250 ml s kvasnicovým dialyzovaným médium podľa Gotschlicha s pH 6,35. Optická hustota pri vlnovej dĺžke 660 nm (OD_{660}) sa upraví na hodnotu 0,18. Banky sa inkubujú dovtedy, kým hodnota OD_{660} nie je medzi 1, 0 a 1, 8. Jeden ml tejto kultúry sa použije ako inokulum pre každú z piatich Erlenmeyerových baniek s objemom 2 l (každá banka obsahuje 1 liter média, pozri ďalej). Tieto banky sa inkubujú na trepačke pri 200 otáčkach za min. pri 37 °C. Hodnota OD sa stanovuje v hodinových intervaloch od očkovania. Získajú sa 4 litre kultivačného média s $OD_{660} = 1,28$.

"Seed" fermentér s objemom 70 litrov

Na inkubáciu sterilného sedemdesiatlitrového fermentéra obsahujúceho asi 40 litrov kompletného produkčného média (pozri ďalej) sa použijú približne 4 litre "seed" kultúry. Kultivačné podmienky v tomto fermentéri sú: teplota 37 °C, otáčky 185 min.⁻¹, prítok vzduchu 10 litrov/min. a udržiavanie pH na hodnote 7,0 počas 2 hodín. O dve hodiny je konečná hodnota optickej hustoty vsádzky $OD_{660} = 0,732$.

Produkčný fermentér s objemom 800 litrov

Na inkubáciu sterilného osemstolitrového fermentéra obsahujúceho 568,2 litra kompletného produkčného média (pozri ďalej) sa použije približne 40 litrov "seed" kultúry. Vsádzka sa inkubuje pri teplote 37 °C, otáčkach 100 min.⁻¹, prietoku vzduchu 60 litrov/min. a pri regulácii hodnoty pH na 7,0. Pre túto vsádzku je po 13 hodinách výsledná hodnota optickej hustoty OD₆₆₀ = 5, 58.

3. Kompletné médium pre Erlenmeyerove banky a fermentéry s objemom 70 a 800 litrov

Frakcia A:

	g/l
Kyselina L-glutámová	1,5
NaCl	6,0
Bezvodý Na ₂ HPO ₄	2,5
NH ₄ Cl	1,25
KCl	0,09
L-cysteín.HCl	0,02.

Frakcia B (kvasnicový dialyzát podľa Gotschlicha)

1280 g kvasnicového extraktu Difco sa rozpustí v 6,4 litra destilovanej vody. Roztok sa dialyzuje v dvoch dialyzačných jednotkách s dutými vláknami Amicon DC-30 s tromi zásobníkmi H10SM. 384 g MgSO₄·7H₂O a 3200 g dextrózy sa rozpustí v dialyzáte a doplní destilovanou vodou na objem 15 litrov. Hodnota pH sa upraví pomocou roztoku NaOH na 7,4 a médium sa sterilizuje filtráciou cez filter s priemerom otvorov 0,22 mikrometrov prenesie sa do fermentéra obsahujúceho frakciu A.

Pre Erlenmeyerove banky: 1 liter frakcie A a 25 ml frakcie B, pH sa upraví roztokom NaOH na 7,0 až 7,2.

Pre fermentér s objemom 70 litrov: 41,8 litra frakcie A a 900 ml frakcie B, pH sa upraví roztokom NaOH na 7,0 až 7,2.

Pre fermentér s objemom 800 litrov: 553 litra frakcie A a 15 l frakcie B, pH sa upraví roztokom NaOH na 7,1 až 7,2.

b) Zber buniek a inaktivácia

Po skončení fermentácie sa bunky premiestnia do osbitnej nádoby s fenolom. Výsledná koncentrácia fenolu je 0,5 %. Nádoba sa nechá pri miernom miešaní pri laboratórnej teplote dovtedy, kým sa kultúra neusmrtí (asi 24 hodín).

c) Centrifugácia

Po 24 hodinách pri teplote 4 °C sa 614,4 litra inaktivovanej kultivačnej kvapaliny odstredí na kontinuálnych prietokových odstredivkách Sharples. Hmotnosť výslednej pasty po pôsobení fenolu je 3,875 kg. Alternatívne sa fenolom usmrtené bunky získajú z fermentačného média diafiltráciou, ako sa uvádza ďalej.

B. Izolácia OMPC

Krok 1. Koncentrácia a diafiltrácia

Fenolom inaktivovaná kultúra sa skoncentruje na asi 30 litrov a diafiltruje v sterilnej destilovanej vode použitím filtra v tvare dutých vlákien s priemerom 0,2 µm (ENKA).

Krok 2. Extrakcia

Ku skoncentrovaným diafiltrovaným bunkám sa pridá rovnaký objem tlmivého roztoku 2X TED (tlmivý roztok 0,1 TRIS 0,01 M EDTA, pH 8,5 s 0,5 % roztokom deoxycholátu sodného). Suspenzia sa preniesie do nádrže s regulovanou teplotou na extrakciu OMPC pri teplote 56 °C za miešania 30 minút.

Extrakt sa odstredí v odstredivke s kontinuálnym prietokom Sharples pri otáčkach 18 000 min.⁻¹, rýchlosti prietoku 80 ml/min., pri teplote 4 °C. Potom sa zhromaždi viskózný supernatant a skladuje sa pri 4 °C. Extrahované bunkové pelety sa znova extrahujú v tlmivom roztoku TED, ako sa uvádza. Kvapalina supernatantov sa spojí a skladuje pri 4 °C.

Krok 3. Koncentrácia ultrafiltráciou

Spojený extrakt sa preniesie do nádoby s regulovanou teplotou pripojenou k polysulfónovým filtrom s priemerom pórov 0,1 µm AG-Tech. Teplota extraktu sa počas koncentračného procesu udržiava na 25 °C. Vzorka sa desaťkrát skoncentruje pri priemernom tlaku na membránu 75,57 až 165 kPa.

Krok 4. Zhromaždenie a premytie OMPC

Retentát z kroku 3 sa odstredí v kontinuálnej prietokovej odstredivke pri 160 000 g (otáčky 35 000 min.⁻¹), teplote 37 °C, rýchlosti prietoku 300 až 500 ml/min. Supernatant sa zahodí.

Peleta OMPC sa suspenduje v tlmivom roztoku TED (190 ml tlmivého roztoku, 20 ml/mg pelety) a kroky 2 a 4 sa dvakrát opakujú (krok 3 sa preskočí).

Krok 5. Získanie produktu OMPC

Premyté pelety z kroku 4 sa suspendujú v 100 ml destilovanej vody sklenou tyčinkou a homogenizátorom Dounce, čím sa zaisťujú úplné suspendovanie. Vodná suspenzia OMPC sa potom sterilizuje filtráciou cez filter s priemerom pórov 0,22 µm. Tlmivý roztok TED sa nahradí vodou pri diafiltrácii proti sterilnej destilovanej vode s dutými vláknami s priemerom pórov 0,1 µm.

Priklad 2

Purifikácia podjednotky OMPC

Priprava purifikovanej MIEP z OMPC alebo z rekombinantných buniek pomocou elektroforézy na zvislom polyakrylamidovom géle

Použijú sa gély so zložením akrylamid/BIS (37,5 : 1), s rozmermi 18 x 14 cm, 3 mm hrubé. Koncentrácia polyakrylamidu vo zvislom géle je 4 %, v separačnom géle 12 %. Na gél sa nanesie približne 5 µg proteínu OMPC alebo proteínu z rekombinantnej hostiteľskej bunky. K 1 ml OMPC sa pridá 0,5 ml tlmivého roztoku na vzorku (tlmivý roztok obsahuje 4 % glycerolu, 300 mM DTT, 100 mM TRIS, 0,001 % brómfenolovej modrej, pH 7,0). Pred nanesením na gél sa zmes zohrieva 20 minút pri teplote 105 °C a nechá sa ochladiť na laboratórnu teplotu. Elektroforéza sa uskutočňuje pri 200 až 400 mA za chladenia, kým sa brómfenolová modrá nedostane na spodok gélu. Z gélu sa vyreže vertikálny pásik (asi 1 až 2 cm široký) a zafarbí sa roztokom Coomassie s koncentráciou 0,1 %, v acetáte med'natom. Pásik sa odfarbuje dovtedy, kým sa pás MIEP (približne 38 kDa) nestane viditeľným. Pásik sa potom umiestni na svoje pôvodné miesto do gélu a oblasť s MIEP sa zo zvyšného gélu vyreže skalpelom.

Vyrezaná časť sa nareže na kocky (dĺžka hrany 5 mm) a eluuje sa 0,01M tlmivým roztokom Tris s pH 8,1. Po dvoch elučných cykloch sa hodnotí čistota eluátu pomocou SDS-PAGE. Eluáty sa spoja a dialyzujú 48 hodín proti roztoku amoniaku v kyseline mravčej s koncentráciou 60 mM s pH 10. Alternatívne sa eluovaný proteín môže dialyzovať proti roztoku kyseliny octovej vo vode s koncentráciou 50 %. Po dialýze sa eluovaný proteín odparí dosucha. Tento materiál sa ďalej čistí prechodom kolónou PD10

(Pharmacia, Piscataway, NJ) schopnou rozlíšiť veľkosti molekúl a skladuje sa pri laboratórnej teplote.

Příklad 3

Kultivácia poddruhov *Streptococcus pneumoniae* a izolácia surových Pn-Ps

I. Kultivácia pneumokokov

Spôsoby kultivácie pneumokokov sú v tomto odbore dobre známe [Chase, M. W., Methods of Immunology and Immunochemistry I, 52 (1967)]. Izoláty poddruhov pneumokokov sú dostupné od ATCC. Baktérie sú identifikované ako opuzdrené, nepohyblivé, grampozitívne diplokoky v tvare lancety, ktoré sú alfa-hemolytické na krvnom agar. Poddruhy sa diferencujú na základe Quellingovej reakcie použitím špecifického antiséra. Produkčné a zásobné "seed" kultúry sa uchovávajú prednostne lyofilizované alebo pri teplote nižšej ako 8 °C. Pri prednostných spôsoboch kultivácie sa zásobné kultúry oživujú v srdcovom infúznom médiu (Heart Infusion Broth), na miskách so srdcovým infúznym agarom (Heart Infusion Agar), ktorý obsahuje 10 % defibrinovanej králičej krvi, a inkubujú sa pri teplote 37 °C ± 2 °C približne 18 hodín.

Nárast na miske sa resuspenduje v srdcovom infúznom médiu a alikvotný podiel tejto suspenzie sa použije na inokuláciu 100 ml srdcového infúzneho média obsahujúceho 10 s defibrinovanej králičej krvi. Inkubuje sa stacionárne približne 18 hodín pri teplote 37 °C ± 2 °C. 100 ml kvapalnej kultúry (pracovný "seed") sa kontroluje na čistotu mikroskopickým pozorovaním škvŕn po Gramovom farbení a pomocou rastu na miskách so srdcovým infúznym krvným agarom. Pracovný "seed" sa môže skladovať maximálne 14 dní pri teplote 2 až 8 °C alebo sa môže použiť okamžite. Pracovným "seedom" sa naočkujú Erlenmeyerove banky s objemom 2 litre alebo iné vhodné nádoby obsahujúce pneumokokové inokulačné médium (YUF) s dextrózou (25 g/liter). Inkubuje sa stacionárne približne 8 až 24 hodín pri teplote 37 °C ± 2 °C. Čas inkubácie sa mení v závislosti od druhu pestovaného *Streptococcus pneumoniae*. Hodnota pH pri fermentácii sa upraví tak, aby sa výsledné pH dalo udržiavať v rozmedzí 6,0 až 7,2 periodickými prídavkami roztoku hydrogénuhličitanu sodného s koncentráciou 12 % dovtedy, kým sa nedosiahne optická hustota 1,5 až 4,0. Optická hustota sa stanovuje pri vlnovej dĺžke 660 nm. Vzorka nárastu sa skúma mikroskopicky a skúšanie čistoty sa uskutoční sérologickou aglutinačnou reakciou. Nárast z tohto stupňa sa preniesie do "seed" fermentera obsahujúceho 40 litrov pneumokokového fermentačného média. Toto médium sa skladá z destilovanej vody, suchej dávky zložiek na pneumokokové "seed" médium (YUF), ultrafiltrátu kvasnicového extraktu, UCON a dextrózy (približne 25 g/liter). Kultúra sa inkubuje pri teplote 37 °C ± 2 °C za mierneho miešania 2 až 12 hodín. Hodnota pH sa udržiava v rozmedzí 6,0 až 7,2 periodickými prídavkami roztoku hydroxidu sodného. Fermentér obsahujúci 525 litrov pneumokokového fermentačného média, ktoré je zložené z destilovanej vody, suchej dávky zložiek pneumokokového produkčného média (YUF), ultrafiltrátu kvasnicového extraktu, UCON a dextrózy (približne 25 g/liter), sa naočkuje približne 50 litrami jednej zo "seed" kultúr vypestovanej za 2 až 12 hodín. Kultúra sa inkubuje pri teplote 37 °C ± 2 °C za mierneho miešania 6 až 30 hodín, v závislosti od pestovaného druhu. Hodnota pH sa udržiava v rozmedzí 6,0 až 7,2 periodickými prídavkami roztoku hydroxidu sodného. Fermentácia sa sleduje stanovením optickej hustoty a ukončí sa vtedy, keď je dextróza kompletne utilizovaná, čo sa prejaví tak, že sa pH ďalej nemení.

Patogénne mikroorganizmy sa usmrťia ihneď po skončení fermentácie. Usmrtenie sa uskutoční prídavkom fenolu do koncentrácie 1 % a fenol sa nechá 2 až 12 hodín pôsobiť pri okolitej teplote.

II. Izolácia surového Pn-Ps

K usmrtenej kultúre sa pridá denaturovaný alkohol v dostatočnom množstve, aby sa vyzrážali zvyšky buniek a nukleové kyseliny. Tie sa odstránia odstredením. Surový polysacharid sa potom vyzráža zo supernatantu prídavkom ďalšieho množstva denaturovaného alkoholu. Tuhé časti sa zhromaždia odstredením a supernatant sa vyhodí.

Kontaminácia nukleovými kyselinami sa zníži solubilizáciou polysacharidu v neutrálnom vodnom roztoku, ako je 1 až 5 % roztok octanu sodného alebo fosfátový tlmivý roztok s koncentráciou 0,05 M, ku ktorému sa pridá nukleáza a asi 0,01 M chloridu horečnatého. Po 60 až 120 minútach pri teplote asi 36 °C sa upraví pH na 8,0 a pridá sa proteáza, ako je trypsin, na štiepenie proteínových kontaminantov.

Pridavné nečistoty sa môžu odstrániť novým vyzrážaním polysacharidu v roztoku octanu sodného denaturovaným alkoholom alebo izopropylalkoholom a nasledujúcou solubilizáciou v destilovanej vode. Prídavok cetriamóniumbromidu pri teplote 8 °C vyzráža nečistoty, ktoré sa odstránia odstredením. Prídavok octanu sodného a alikvotného podielu denaturovaného alkoholu alebo izopropylalkoholu umožní odstránenie prídavných nečistôt. Polysacharid sa izoluje pridaním ďalšieho alkoholu a odstredením. Zrazenina sa premýva absolútnym alkoholom, kým sa nezíska biely prášok. Polysacharid sa zhromaždí filtráciou, premyje absolútnym etanolom a acetónom a vysuší sa vo vákuu. Získa sa surový Pn-Ps vo forme prášku.

Příklad 4

Príprava čiastočne hydrolyzovaného purifikovaného Pn6B-Ps

1. Termálna hydrolyza

3,0 g surového Pn6B-Ps vo forme prášku sa rozpustí v 1200 ml fyziologického roztoku (0,9 % roztok NaCl), 4 hodiny sa mieša pri laboratórnej teplote a nechá stáť cez noc pri teplote 4 °C. Potom sa roztok hydrolyzuje v zariadení so spätným chladičom typu chladeného prsta pri 100 °C 24 hodín a ochladí sa na laboratórnu teplotu. Pridá sa 59,7 g octanu sodného, takže jeho výsledná koncentrácia v roztoku je 30 g/liter.

2. Sérologická skúška

Pokusná frakcionácia izopropylalkoholom (IPA) a nefelometrické stanovenie konečného bodu zamerané na protilátku, ktoré sa uskutočňuje s 10 ml vzorky, ukazuje, že Pn6B-Ps sa zráža pri koncentrácii IPA 40 až 50 %.

3. Prvý prídavok IPA

K hydrolyzovanej vzorke s objemom 1200 ml, pripravenej podľa kroku I, sa pridá 932 ml IPA, takže koncentrácia IPA v roztoku je 43,5 %. IPA sa pridáva po kvapkách za miešania pri laboratórnej teplote. Vzorka sa nechá 15 až 30 minút miešať, a potom sa 30 minút odstreďuje pri 11000 g (odstredivka Beckman s rotorom JA-10, otáčky 8000 min.⁻¹, 20 °C). Odpadová peleta sa rozdrví v absolútnom etanole v nádobe Omnimix s objemom 250 ml. Tuhé časti zmesi sa zhromaždia na sklenej sintrovej frite s objemom 60 ml. Zrazenina sa premyje priamo na frite absolútnym etanolom, potom acetónom a vysuší sa vo vákuu po-

mocou CaCl_2 pri laboratórnej teplote v priebehu prípravy na stanovenie.

4. Druhý prídavok IPA a získanie produktu

K supernatantu s koncentráciou IPA 43,5 % (objem 2020 ml, získanému podľa kroku 3, v texte) sa pridá po kvapkách pri laboratórnej teplote za miešania 93,5 ml IPA až do výslednej koncentrácie IPA 46 %. Vzorka sa nechá starnúť, a potom sa odstredí tak ako v kroku 3. Peleta sa rozdrví, zhromaždí, premyje a vysuší ako v kroku 3. Produkt Pn6B-Ps má hmotnosť 1650 mg, jeho K_d má hodnotu 0,62, obsah fosforu je 3,3 %.

Priklad 5

S. pneumoniae 6B-OMPC konjugát, Pn6B-Ps-OMPC

A. Premena živice Dowex 50x2 na tetrabutylamóniovú formu (Dowex 50 (Bu_4N^+)-I)

Dowex 50x2 (200 až 400 mesh) H^+ forma (72 g) sa suspenduje vo vode, naplní sa do kolóny a premyva postupne vodou, roztokom HCl s koncentráciou 6 M a znova vodou, kým nie je reakcia roztoku na pH papierik na výtok z kolóny neutrálny. Potom sa kolóna premyva 10 % vodným roztokom tetrabutylamóniumhydroxidu, kým nie je reakcia roztoku na výtok z kolóny silno alkalická. Nakoniec sa kolóna premyva vodou, kým nie je reakcia roztoku na výtok z kolóny opäť neutrálna.

B. Pn6B(Bu_4N^+)

Pn6B-Ps (600 mg) so zmenšenou veľkosťou molekuly a frakcionovaný (fyzikálne vlastnosti pozri v tabuľke I Pn6B-Ps šarža I) sa rozpustí v 60 ml destilovanej vody. Roztok sa mieša magnetickým miešadlom, kým sa všetky tuhé časti nerozpustia (1,5 hodiny). Roztok polysacharidu sa natrieka na kondicionovanú živicu a nechá pretekať jej vrstvou pôsobením gravitácie (4,5 hodiny). Kolóna sa premyje 10 až 12 ml vody a spojené eluáty sa lyofilizujú. Tým sa získa 640 mg suchej Pn6B-Ps vo forme tetra-n-butylamóniovej soli Pn6B(n- Bu_4N^+).

C. Pn 6B-BuA₂

Pn6B ($\text{N-Bu}_4\text{N}^+$) (640 mg) sa rozpustí v 24 ml dimeylsulfoxidu (DMSO) a 30 minút sa mieša magnetickým miešadlom. Za tento čas sa všetky tuhé časti rozpustia. K tomuto roztoku sa pridá 44,2 mg 1,1'-karbonyldiimidazolu a reakčná zmes sa 60 minút mieša pri laboratórnej teplote. V oddelenej banke sa pripraví pomocou prídavku roztoku NaOH s koncentráciou 10 M zásaditý roztok (pH 10,2) butándiamíndihydrochloridu ($\text{BuA}_2 \cdot 2\text{HCl}$, 1,022 g) v 16 ml vody. Roztok sa prefiltruje cez sterilný filter s priemerom pórov 0,2 μm a ochladí v ľadovom kúpeli. K studenému roztoku $\text{BuA}_2 \cdot 2\text{HCl}$ sa pomalým ustáleným prítokom pridá starnutá zmes DMSO obsahujúca aktivovaný polysacharid. Výsledný roztok sa 15 minút mieša pri teplote 0 °C. Reakčná zmes sa nechá zohriať na laboratórnu teplotu a ďalej sa jednu hodinu mieša. Potom sa prenesie do dialyzačnej trubice a pri teplote 4 °C sa dialyzuje proti nasledujúcim roztokom: 1) proti 15 litrom tlmivého roztoku fosforečnanu sodného s koncentráciou 0,1 M a pH 7,0, 6 hodín; 2) proti 15 litrom tlmivého roztoku fosforečnanu sodného s koncentráciou 0,01 M a pH 7,0, 12 hodín; 3) proti 15 litrom tlmivého roztoku fosforečnanu sodného s koncentráciou 0,01 M a pH 7,0, 9 hodín; 4) proti 15 litrom destilovanej vody, 17,5 hodiny. Obsah dialyzačnej trubice sa lyofilizuje. Získa sa 222 mg Pn6B-1,4-butándiamínu (Pn6B-BuA₂). NMR analýza (300 MHz, D_2O) asi 5 mg tohto materiálu odhalila, že na 100 opakujúcich sa monomérnych jednotiek

Pn6B-Ps pripadá 22 diamínových zvyškov. To sa zistí porovnaním integrálu rezonančných signálov metylénu z butándiamínu s integrálom signálov protónov metylu z ramnozy z Pn6B-Ps.

Pn 6B-BuA₂-BrAc

Pn6B-BuA₂ (210 mg) sa rozpustí v 21 ml Kolthoffovho boráto-fosfátového tlmivého roztoku s koncentráciou 0,1 M a pH 9,04. Zmes sa 30 minút mieša magnetickým miešadlom, aby vznikol roztok. K tomuto vodnému roztoku sa pridá zmes obsahujúca 210 mg *p*-nitrofenylbromacetátu v 2,6 ml acetonitrilu a reakčná zmes sa cez noc mieša (20 hodín pri teplote 4 °C). Roztok sa prenesie do dialyzačnej trubice a pri teplote 4 °C sa dialyzuje proti nasledujúcim roztokom: 1) proti 15 litrom sterilnej destilovanej vody, 12,3 hodiny; 2) proti 15 litrom sterilnej destilovanej vody, 8,25 hodiny; 3) proti 15 litrom sterilnej destilovanej vody, 5,5 hodiny. Z obsahu sa odoberie 1,7 ml na stanovenie (NMR a HPSEC univerzálnu kalibráciu alebo stanovenie veľkosti molekuly). K obsahu sa potom pridá 0,449 g suchej soli fosfátového tlmivého roztoku s pH 8,0 (táto suchá soľ sa pripraví lyofilizáciou roztoku fosforečnanu sodného s koncentráciou 0,1 M a pH 8,0). Po úplnom rozpustení (30 minút) sa roztok prefiltruje cez sterilný filter s priemerom pórov 0,2 μm . Získa sa roztok Pn6B-BuA₂-BrAc s pH 8.

Pn6B-OMPC

Zo 40 ml sterilného OMPC s koncentráciou 4,5 mg/ml sa vytvoria pelety ultracentrifugáciou pri teplote 4 °C, 43 000 otáčok/min., počas 2 hodín v štyroch centrifugačných skúmavkách s objemom 10 ml. Každá peleta sa resuspenduje v 3 ml sterilne prefiltrovanej (cez filter s pórmí 0,22 μm) tiolačnej zmesi, ktorá obsahuje nasledujúce zložky: N-acetylhomocysteíntiolaktónhydrochlorid (164 mg), disodnú soľ kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (255 mg) a ditiotreitol (53 mg) v 30 ml tlmivého roztoku $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ s pH 11,09. Resuspendované pelety sa homogenizujú (homogenizátor Dounce) a spoja. Nádoba so suspenziou sa odplyní, nasýti dusíkom a nechá starnúť cez noc (19 hodín pri laboratórnej teplote). Roztok sa rozdelí medzi tri ultracentrifugačné skúmavky, prevrství roztokom KH_2PO_4 s koncentráciou 1 M a z proteínu sa ultracentrifugáciou (pri 4 °C, 43 000 otáčok/min., po 2 hodinách) vytvoria pelety. Pelety sa resuspendujú v 30 ml tlmivého roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8, homogenizujú sa (homogenizátor Dounce) a znova sa z nich vytvoria pelety ultracentrifugáciou za rovnakých podmienok. Sterilná proteínová peleta sa používa nesuspendovaná v prefiltrovanom roztoku Pn6B-BuA₂-BrAc. Ihneď sa urobí Reakmanov test a zistí sa, že titer skupín SH je 34 μmol . Reakčná zmes sa odplyní, nasýti dusíkom a nechá 91 hodín starnúť pri laboratórnej teplote.

Proteín sa blokuje pridaním 1 ml roztoku filtrovaného cez sterilný filter s 0,22 μm pórmí, ktorý obsahuje 75 mg N-etylmaleinimidu v 5 ml tlmivého roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8,0. Táto zmes sa nechá starnúť 4 hodiny pri laboratórnej teplote, a potom sa k nej pridá 300 μl roztoku N-acetylcysteamínu filtrovaného cez filter s 0,22 μm pórmí. Roztok sa nechá ďalej 19,5 hodiny starnúť.

Sterilný blokovaný konjugát sa rozdelí medzi štyri ultracentrifugačné skúmavky a prevrství tlmivým roztokom na koncentráciu fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 7,0. Ultracentrifugáciou pri 4 °C, 43 000 otáčok/min., počas 2 hodín sa vytvoria pelety. Pelety sa resuspendujú v 42 ml sterilného tlmivého roztoku s koncentráciou Na_3PO_4 0,1 M a pH 7,0 a homogenizujú sa (homogenizátor Dounce). Ďalej

sa uskutoční za rovnakých podmienok ultracentrifugácia. Vzniknuté pelety sa resuspendujú v 50 ml sterilnej destilovanej vody v homogenizátore Dounce. Po starnutí prebiehajúcim 17 hodín pri 4 °C sa konjugovaný preparát odstreďuje v odstredivke TJ-6 s rotorom TH pri otáčkach 1000 min.⁻¹ 3,5 minúty. Malé množstvo sedimentu sa odstráni. Konečný produkt, suspenzia konjugátu, sa testuje na obsah proteínov (podľa Lowryho), Pn6B-polysacharidu (pomocou fenolu/kyseliny sírovej), nekonjugovaného polysacharidu (chromatografia SEC a rozpoznávaním veľkosti molekúl, rýchlostná nefelometria) a aminokyselín (stanovenie aminokyselín). Výsledky sú nasledujúce:

Pn6B-polysacharid	0,33 mg/ml
proteín	2,2 mg/ml
Pn6B-Ps/OMPC	0,15
vol'ný Pn6B-Ps	pod 5 % objemu
S-karboxymetylhomocystein/lyzín	7,7 %
S-karboxymetylhomocysteamín/lyzín	1,6 %

Príklad 6

Príprava čiastočne hydrolyzovaného, purifikovaného Pn14-Ps

1. Čistenie pomocou anexovej živice

2,81 g prášku Pn14-Ps sa rozpustí v 1124 ml destilovanej vody za miešania pri laboratórnej teplote v priebehu asi 4 hodín, a potom sa cez noc skladuje pri 4 °C. Roztok sa pridá k 60 g DE52 (Whatman, dietylamoetylcelulóza), ktorá sa vopred nechá asi 15 hodín napučať v destilovanej vode s pH 5 až 6. Vzniknutá kaša sa jemne trasie na doskovej trepačke pri laboratórnej teplote asi 15 hodín. Potom sa zmes odstreďuje v odstredivke Beckman s rotorom JA-10 pri otáčkach 5000 min.⁻¹ pri teplote 20 °C. Supernatant sa ďalej vyčirí filtráciou cez sklenú sintrovú fritu s objemom 150 ml a strednou pórovitosťou. Filtrát sa zberá v odsávačke s objemom 2 litre.

2. Ultrazvuková hydrolyza

Na Pn14-Ps vyčistený pomocou DE52 podľa kroku 1 s objemom 1100 ml sa pôsobí ultrazvukom v kadičke z umelej hmoty, ktorá je v ľadovom kúpeli, v sonifikátore Branson (sonda 12,7 mm, nastavenie na hodnotu 8) 2 minúty. Vzorka sa nechá 15 minút chladnúť a medzitým sa stanoví jej viskozita. Potom sa pokračuje v sonifikácii v jednominútových intervaloch. Po poslednej sonifikácii sa získa vzorka s konečnou hodnotou viskozity 1,096 · 10⁶ m².s⁻¹. Hydrolyzovaná vzorka sa zohreje na laboratórnu teplotu a pridá sa k nej 18,0 g octanu sodného, takže výsledná koncentrácia acetátu je 10 g/liter.

3. Sérologická skúška

Pokusná frakcionácia izopropylalkoholom (IPA) a nefelometrické stanovenie konečného bodu zamerané na protilátku, ktoré sa uskutočňuje s 10 ml vzorky ukazuje, že Pn14-Ps sa zráža pri koncentrácii IPA 35 až 45 %.

4. Prvý prídavok IPA

K hydrolyzovanej vzorke s objemom 1090 ml, pripravenej podľa kroku 2, sa pridá 706 ml IPA, takže koncentrácia IPA v roztoku je 39,3 %. IPA sa pridáva po kvapkách za miešania pri laboratórnej teplote. Vzorka sa nechá 15 až 30 minút miešať, a potom sa 30 minút odstreďuje pri 11000 g (odstredivka Beckman s rotorom JA-10, otáčky 8000 min.⁻¹, 20 °C). Odpadová peleta sa rozdrví v absolútnom etanole v nádobe Omnimix s objemom 250 ml. Tuhé časti sa zhromaždia na sklenej sintrovej fritě s objemom 60 ml. Zrazenina sa premyje priamo na fritě absolútnym etanolom,

potom acetónom a vysuší sa vo vákuu pomocou CaCl₂ pri laboratórnej teplote v priebehu prípravy na stanovenie.

5. Druhý prídavok IPA a izolácia produktu

K supernatantu s koncentráciou IPA 39,3 % (objem 1712 ml) získanému podľa kroku 4, sa pridá po kvapkách pri laboratórnej teplote za miešania 73,5 ml IPA, takže výsledná koncentrácia IPA je 41,8 %. Vzorka sa nechá starnúť, a potom sa odstreďuje tak ako v kroku 4. Peleta sa rozdrví, zhromaždí, premyje a vysuší ako v kroku 4. Produkt Pn14-Ps má hmotnosť 1,399 mg.

6. Dialýza a lyofilizácia

1 385,6 mg vzorky získanej podľa kroku 5 sa rozpúšťa 2 až 3 hodiny v destilovanej vode (554 ml) pri laboratórnej teplote. Roztok s koncentráciou 2,5 mg/ml sa preniesie do dialyzačnej trubice (s priemerom 45 mm, priepustnosť do molekulovej hmotnosti 12000). Dialyzuje sa 27 hodín proti destilovanej vode s dvoma výmenami destilovanej vody. Potom sa dialyzovaný roztok preniesie do lyofilizačných baniek. Zmrazí sa na "šupu" v kúpeli zo suchého ľadu a metanolu a lyofilizuje sa v lyofilizátore Virtis (Freezemobile) 2,5 dňa až dosucha. Získa sa 1326,8 mg produktu Pn14-Ps s K_d 0,56.

Z tohto opisu by odborníkovi v odbore malo byť jasné, že aj iné neutrálne Pn-Ps iných podtypov, ako napríklad Pn7F-Ps, sa môžu pripraviť podľa tohto postupu, a potom konjugovať rovnako ako Pn14-Ps, ktorý je tiež neutrálnym polysacharidom.

Príklad 7

Konjugácia proteínového komplexu z vonkajšej membrány s pneumokokovým 14 polysacharidom, Pn14-Ps-OMPC

a) Príprava 1,4-butándiamínového derivátu Pn14-Ps (14-BuA₂)

410 mg Pn14-Ps po skladovaní vo vákuu nad P₂O₅ počas 3 hodín sa preleje 26 ml dimetylsulfoxidu (DMSO). Zmes sa rozpúšťa za miešania 0,75 hodiny. Potom sa k roztoku pridá 62 mg karbonyldiimidazolu a výsledný roztok sa 80 minút mieša pri laboratórnej teplote.

Pripraví sa roztok obsahujúci 1,067 g 1,4-butándiamíndihydrochloridu (BuA₂.2HCl) v 38,5 ml H₂O. Jeho pH sa upraví na hodnotu 10,20 roztokom NaOH s koncentráciou 2,5 M. Vzniknutý roztok sa prefiltruje cez filter Millex 0,2 µm GV a ochladí v ľadovom kúpeli.

K studenému roztoku BuA₂ sa pridá zostarnutý roztok v DMSO a zmes sa 10 minút mieša ďalej v ľadovom kúpeli. Potom sa roztok nechá stáť 50 minút pri laboratórnej teplote, a potom sa naplní do dialyzačnej trubice Spectrapor 2 (2 x 312 mm). Trubica sa zasvorkuje 1 cm pod hladinou kvapaliny. Dialyzuje proti:

- 1) 15 litrom tlmivého roztoku s koncentráciou 0,1 M fosforečnanu sodného pri pH 7,0, 16,5 hodiny;
- 2) 15 litrom toho istého tlmivého roztoku 8 hodín;
- 3) ďalším 15 litrom toho istého tlmivého roztoku, 8 hodín;
- 4) 15 litrom destilovanej vody, 17,5 hodiny.

Potom sa roztok lyofilizuje. Získa sa 210 mg 1,4-butándiamínového derivátu Pn14-Ps (Pn14-BuA₂). Zmeraním NMR spektra asi 5 mg vzorky a porovnaním integrálov rezonančných píkov metylénu z butándiamínu s píkmi N-acetylmetylskupiny z Pn14-Ps sa zistí, že na 100 opakujúcich sa jednotiek polysacharidu pripadá približne 31 butándiamínových zvyškov.

b) Príprava brómacylovaných butándiamínových derivátov Pn14-Ps (Pn14-BuA₂-BrAc)

210 mg Pn14-BuA₂ sa preleje 36 ml boráto-fosfátového tlmivého roztoku s koncentráciou 0,1 M a pH 9,0. Zmes sa 2,5 hodiny mieša, aby vznikol roztok. Potom sa pridá 195 mg *p*-nitrofenylbromacetátu rozpusteného v 4 ml acetonitrilu. Vzniknutá zmes sa mieša 21 hodín pri teplote 4 °C. Potom sa roztok dialyzuje v trubiciach Spectrapor 2 proti: 1) 15 litrom destilovanej vody, 6 hodín; 2) ďalším 15 litrom destilovanej vody, 14,5 hodiny a 3) ďalším 15 litrom destilovanej vody, 6 hodín. Z priestoru trubice s dialyzovanou látkou sa odoberú 2 ml na stanovenie, a potom sa pridá 492 mg suchej soli fosfátového tlmivého roztoku s pH 8,0 (táto suchá soľ sa pripraví lyofilizáciou roztoku fosforečnanu sodného s koncentráciou 0,1 M a pH 8,0). Roztok sa prefiltruje cez dva filtre Corning s 0,2 µm pómi. Získa sa 43 ml vodného roztoku Pn14-BuA₂-BrAc s pH 8,0.

c) Konjugácia OMPC s Pn14-BuA₂-BrAc-Ps

50 ml OMPC s koncentráciou 3,2 mg/ml sa naplní do 5 centrifugačných skúmaviek s objemom 10 ml. Odstreduje sa v odstredivke Beckman s rotorom 80Ti pri otáčkach 43 000 min.⁻¹, teplote 4 °C 2 hodiny. Pripraví sa tiolačná zmes rozpustením 350 mg EDTA (disodná soľ kyseliny etyléndiamintetraoctovej) a 64 mg ditiotritolu (DTT) v 30 ml tlmivého roztoku Na₂B₄O₇ s pH 11,0. K zmesi sa pridá *N*-acetylhomocysteíntiolaktón (346 mg), a potom sa zmes prefiltruje cez filter Corning s pómi s veľkosťou 0,2 µm (pohárikový typ).

Materiál sa uvoľní z peliet získaných centrifugáciou podľa postupu uvedeného v texte pomocou 3 ml prefiltrovanej tiolačnej zmesi. Celkový objem jednej skúmavky, 15 ml, sa preniesie do homogenizátora Dounce, kde dôjde k resuspendovaniu. Skúmavky sa prepláchnu ďalšími 15 ml tiolačného roztoku (dvakrát za sebou). Spojené výplachy sa homogenizujú v homogenizátore Dounce. Celý objem resuspendovaného materiálu, 25 ml, sa preniesie do banky s okrúhlym dnom s objemom 100 ml. Po uzavretí septom a nahradení vzduchu dusíkom pomocou ventilu Firestone sa reakčná zmes nechá 21 hodín stáť. 25 ml reakčnej zmesi sa potom rozdelí medzi tri centrifugačné skúmavky. Každá skúmavka sa preleje vodným roztokom KH₂PO₄ s koncentráciou 1 M. Odstreduje sa 2 hodiny pri 43 000 otáčkach/min. a teplote 4 °C. Supernatant sa odstráni a pelety sa resuspendujú v tlmivom roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8 (celkový objem na resuspendovanie je 30 ml).

Uskutoční sa druhá ultracentrigácia za rovnakých podmienok na odstredovanie. Po odstránení supernatantu sa pelety resuspendujú v homogenizátore Dounce v prefiltrovanom roztoku Pn14-BuA₂-BrAc, pripravenom podľa uvedeného postupu. Ellmanovým stanovením sa zistí v tomto okamihu celkové množstvo asi 23 µmol tiolových skupín.

Je treba poznamenať, že filtrácia roztoku Pn14-BuA₂-BrAc sa uskutoční tesne pred resuspendovaním tiolovaného proteínu. Vzniknutá reakčná zmes (t. j. Pn14-BuA₂-BrAc s tiolovaným OMPC) sa nechá starnúť v atmosfére dusíka (s odplyním) v dusíkovom boxe pri laboratórnej teplote 114 hodín.

Reakčná zmes sa potom blokuje (t. j. reaktívne skupiny Pn14-Ps a OMPC sa deaktivujú) nasledujúcim spôsobom. Pridá sa roztok obsahujúci 75 mg *N*-etylmalainimidu (NEM) v 5 ml tlmivého roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8,0. Táto zmes sa nechá stáť 22,5 hodiny. 35 ml blokovanej reakčnej zmesi sa rozdelí medzi štyri centrifugačné skúmavky a odstreduje sa 2 hodiny pri

4 °C a 43 000 otáčkach/min. Pelety sa resuspendujú v 40 ml tlmivého roztoku TED (so zložením 0,1 M Tris, 0,01 M EDTA, 0,5 % DOC, pH 8,5) a roztok sa 19 hodín nechá starnúť pri laboratórnej teplote. Potom sa za rovnakých podmienok ako v predchádzajúcom prípade odstredí. Pelety sa resuspendujú v 40 ml tlmivého roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8,0 a roztok sa opäť rovnakým spôsobom odstredí. Vytvorené pelety sa resuspendujú v 44 ml vody a 17 hodín sa nechajú starnúť pri teplote 4 °C. Uskutoční sa centrifugácia pri nízkych otáčkach, 1000 min.⁻¹, 3,5 min. Pri nej vznikne malá peleta, ktorá sa vyhodí. Supernatant sa odstráni a získa sa 43 ml konjugátu s nasledujúcimi analytickými parametrami:

Test	Výsledky
a) Obsah Ps	387 µg/ml
b) Proteín	1300 µg/ml
Pomer PS/proteín (vypočítaný)	0,30
c) Voľný Ps	pod 5 % plochy
d) analýza aminokyselín	
SCMHC/lyzín	9,8 %
SCMS/lyzín	3,5 %.

Príklad 8

Príprava Pn23F-Ps

Príprava medziproduktu Pn23F-Ps

1. Ultrazvuková hydrolýza

3 g prášku Pn23F-Ps sa rozpúšťa v 1200 ml fyziologického roztoku (0,9 % roztok NaCl) za miešania asi 4 hodiny pri laboratórnej teplote. Na roztok sa pôsobí ultrazvukom v kadičke z umelej hmoty, ktorá je v ľadovom kúpeli, sonifikátorom Branson (sonda 12,7 mm, nastavená hodnota 8) v trojminútových intervaloch celkom 15 minút. Po každom intervale sa sonifikuje ďalších 5 minút, aby sa získala výsledná hodnota viskozity 1, 206 · 10⁻⁶ m² · s⁻¹. Hydrolyzovaná vzorka sa zohreje na laboratórnu teplotu a pridá sa k nej 58,4 g octanu sodného, takže výsledná koncentrácia je 30 g/liter.

2. Sérologická skúška

Pokusná frakcionácia izopropylalkoholom (IPA) a nefelometrické stanovenie konečného bodu zamerané na protilátku, ktoré sa uskutočňuje s 10 ml vzorky, ukazuje, že Pn23F-Ps sa zráža pri koncentrácii IPA 35 až 45 %.

3. Prvý prídavok IPA

K hydrolyzovanej vzorke s objemom 1165 ml, pripravenej podľa kroku 1, sa pridá 810 ml IPA, takže koncentrácia IPA v roztoku je 41,0 %. IPA sa pridáva po kvapkách za miešania pri laboratórnej teplote. Vzorka sa nechá 15 až 20 minút miešať, a potom sa 30 minút odstreduje pri 11000 g (odstredivka Beckman s rotorom JA-10, otáčky 8000 min.⁻¹, 20 °C). Odpadová peleta sa rozdrví v absolútne etanole v nádobe Omnimix s objemom 250 ml. Tuhé časti sa zhromaždia na sklenej sintrovej frite s objemom 60 ml. Zrazenina sa premyje priamo na filteri absolútnym etanolom, potom acetónom a vysuší sa vo vákuu nad CaCl₂ pri laboratórnej teplote v priebehu prípravy na stanovenie.

4. Druhý prídavok IPA a izolácia produktu

K supernatantu s koncentráciou IPA 41,0 % a s objemom 1925 ml, získanému podľa kroku 3, sa pridá po kvapkách pri laboratórnej teplote za miešania 85 ml IPA, takže výsledná koncentrácia IPA je 43,5 %. Vzorka sa nechá starnúť, a potom sa odstredí tak ako v kroku 3. Peleta sa

trituruje, zhromaždí, premyje a vysuší ako v kroku 3. Produkt Pn23F-Ps má hmotnosť 1795 mg.

5. Dialýza a lyofilizácia

1779 mg vzorky Pn-Ps získanej podľa kroku 4 sa rozpúšťa 3 až 4 hodiny v 712 ml destilovanej vody pri laboratórnej teplote. Roztok s koncentráciou 2,5 mg/ml sa prenesie do dialyzačnej trubice (s priemerom 45 mm, priepustnosť do molekuly hmotnosti 12 000). Dialyzuje sa 27 hodín proti destilovanej vode s dvoma výmenami destilovanej vody. Potom sa dialyzovaný roztok prenesie do lyofilizačných baniek. Zmrazí sa na "šupú" v kúpeli zo suchého ľadu a metanolu a lyofilizuje sa v lyofilizátore Virtis (Freezemobile) 2,5 dňa až dosucha. Získa sa 1703 produktu Ps s K_d 0,60.

Príklad 9

Konjugácia proteínového komplexu z vonkajšej membrány s medziproduktom P23F-Ps

a) Premena živice Dowex 50X2 (200 až 400 mesh) na tetrabutylamóniovú formu [$\text{Dowex } 50 (\text{Bu}_4\text{N}^+)$]

Dowex 50X2 (200 až 400 mesh) v H^+ forme (72 g) sa suspenduje vo vode (voda použitá v tomto procese je apyrogénna, sterilná a destilovaná), naplní sa do kolóny a premyje postupne 800 ml vody, 400 ml roztoku HCl s koncentráciou 6 M a 300 ml vody, kým nie je reakcia roztoku na pH papierik na výtok z kolóny neutrálna. Potom sa náplň premyje 250 g 10 % vodného roztoku tetrabutylamóniumhydroxidu, kým nie je reakcia roztoku na výtok z kolóny silno alkalická. Nakoniec sa náplň premyje 750 ml vody.

b) Príprava tetrabutylamóniovej formy Pn23F-Ps [$\text{Pn23F}(\text{Bu}_4\text{N}^+)$]

Stĺpec živice Dowex 50X2 (Bu_4N^+) s objemom 34 ml sa premyje 70 ml vody. 450 mg Pn23F-Ps so zmenšenou veľkosťou molekuly sa preleje 50 ml vody a 0,5 hodiny sa mieša. Tento roztok sa nastrieka na kolónu a nechá pretekať jej náplňou pomocou gravitácie (2 hodiny). Potom sa na dno kolóny pripojí zdroj vaku a elúcia (vákuová) pokračuje ďalšiu hodinu. Kolóna sa premyje 25 ml vody a spojené eluáty sa lyofilizujú. Získa sa 0,5 g Pn23F (Bu_4N^+) soli, ktorá sa skladuje 17 hodín vo vákuovom exsíkátore nad P_2O_5 .

c) Príprava 1,4-butándiamínového derivátu Pn23F-Ps (Pn23F-BuA_2)

0,5 g Pn23F ($\text{N-Bu}_4\text{N}^+$) podľa kroku b) sa preleje 25 ml dimetylsulfoxidu (DMSO) a 15 hodín sa mieša, kým sa nerozpustí. K roztoku sa pridá 22 mg karbonyldiimidazolu (CEI) a výsledný roztok sa 0,5 hodiny mieša pri laboratórnej teplote.

Prípraví sa roztok obsahujúci 507 mg 1,4-butándiamín-dihydrochloridu ($\text{BuA}_2\cdot 2\text{HCl}$) v 32 ml vody a jeho pH sa upraví na 10,23 roztokom NaOH s koncentráciou 2,5 M. Roztok sa prefiltruje cez filter Millex 0,2 μm GV a ochladí v ľadovom kúpeli.

K studenému roztoku BuA_2 sa pridá zostarnutý roztok DMSO a zmes sa ďalšiu hodinu mieša v ľadovom kúpeli. Ďalej sa zmes nechá stáť pri laboratórnej teplote a naplní sa do dialyzačnej trubice Spectrapor (12 x 312 mm). Trubica sa zasvorkuje 1 cm pod hladinou kvapaliny a dialyzuje sa proti: 1) 15 litrom tlmivého roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 7,0, 16 hodín; 2) 15 litrom tlmivého roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,01 M a pH 7,0, 10,5 hodiny; 3) ďalším 15 litrom toho istého

tlmivého roztoku ako v prípade a), 12,5 hodiny; 4) proti 15 litrom destilovanej vody, 10,5 hodiny. Potom sa roztok lyofilizuje. Získa sa 220 mg 1,4-butándiamínového derivátu Pn23F-Ps (Pn23F-BuA_2).

Zmeraním NMR spektra asi 6,9 mg vzorky a porovnaním integrálu rezonančných píkov metylénových skupín butándiamínu s integrálmi píkov metylových skupín z ramény (z Pn23F) sa zistí, že na 100 opakujúcich sa jednotiek polysacharidu pripadá približne 23,5 butándiamínových zvyškov.

d) Príprava brómacetylovaného butándiamínového derivátu Pn23F-Ps ($\text{Pn23F-BuA}_2\text{-BrAc}$)

214 mg Pn23F-BuA_2 sa preleje 23 ml boráto-fosfátového tlmivého roztoku s koncentráciou 0,1 M a pH 9,0. Zmes sa 30 minút mieša, aby vznikol roztok. Potom sa pridá 230 mg *p*-nitrofenylbrómacetátu v 6 ml acetonitrilu a výsledná zmes sa mieša 23 hodín pri teplote 4 °C. Roztok sa potom dialyzuje v trubici Spectrapor 2 trikrát proti 15 litrom v intervaloch 8 hodín, 12 hodín a 6 hodín. Z priestoru obsahujúceho dialyzovaný produkt sa odoberie 1,5 ml na stanovenie. Pridá 490 mg suchej soli fosfátového tlmivého roztoku s pH 8,0 (soľ sa pripraví lyofilizáciou roztoku fosforečnanu sodného s koncentráciou 0,1 M a pH 8,0). Rozpúšťanie trvá 15 minút, a potom sa roztok prefiltruje cez filter Corning s pórmí 0,2 μm . Získa sa vodný roztok $\text{Pn23F-BuA}_2\text{-BrAc}$ s pH 8.

e) Konjugácia OMPC s $\text{Pn23F-BuA}_2\text{-BrAc-Ps}$

60 ml OMPC s koncentráciou 3,1 mg/ml sa naplní do 6 centrifugačných skúmaviek s objemom 10 ml a odstredí sa v odstredivke Beckman s rotorom 80Ti pri otáčkach 43 000 min^{-1} , teplote 4 °C 2 hodiny. Pripraví sa tiolačná zmes rozpustením 260 mg EDTA (disodná soľ kyseliny etyléndiamíntetraoctovej) a 52 mg ditiotreitolu (DTT) v 30 ml tiolačného roztoku $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. Zmes sa prefiltruje cez filter Corning s pórmí s veľkosťou 0,2 μm (pohárikový typ).

Materiál sa uvoľní z peliet získaných centrifugáciou podľa postupu uvedeného v texte pomocou 3 ml prefiltrovanej tiolačnej zmesi. Celkový objem jednej skúmavky, 20 ml, sa prenesie do homogenizátora Dounce, kde dôjde k resuspendovaniu. Skúmavky sa prepláchnu ďalšími 6 ml tiolačného roztoku. Preplachovanie sa opakuje s ďalšími 4 ml tiolačného roztoku. Spojené výplachy sa homogenizujú v homogenizátore Dounce. Celý objem resuspendovaného materiálu, 28 ml, sa prenesie do banky s okrúhlym dnom s objemom 100 ml. Po uzavretí septom a nahradení vzduchu dusíkom pomocou ventilu Firestone sa reakčná zmes nechá 19 hodín stáť. 28 ml reakčnej zmesi sa potom rozdelí medzi tri centrifugačné skúmavky. Každá skúmavka sa preleje vodným roztokom KH_2PO_4 s koncentráciou 1 M. Odstredí sa 2 hodiny pri 43000 otáčok/min. a teplote 4 °C. Supernatant sa odstráni a pelety sa resuspendujú v tlmivom roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8 (celkový objem po resuspendovaní je 30 ml).

Uskutoční sa druhá ultracentrifugácia za rovnakých podmienok na odstredovanie. Po odstránení supernatantu sa pelety resuspendujú v homogenizátore Dounce s prefiltrovaným roztokom $\text{Pn23F-BuA}_2\text{-BrAc}$, pripraveným podľa postupu uvedeného v oddiele 7.1.C.3d). Ellmanovým stanovením sa zistí, že celkové množstvo tiolových skupín vo výslednom roztoku je 28 μmol .

Filtrácia uvedeného roztoku $\text{Pn23F-BuA}_2\text{-BrAc}$ sa uskutoční tesne pred resuspendovaním tiolového proteínu. Vzniknutá reakčná zmes (t. j. $\text{Pn23F-BuA}_2\text{-BrAc}$ s tiolovaným OMPC) sa nechá starnúť v atmosfére dusíka (s odply-

nením) v dusikovom boxe pri laboratórnej teplote 117 hodín.

Reakčná zmes sa potom blokuje (t. j. reaktívne skupiny Pn23F-Ps a OMPC sa deaktivujú) pridaním roztoku obsahujúceho 75 mg N-etylmaleinimidu (NEM) v 5 ml tlmivého roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8,0. (Tento roztok je prefiltrovaný cez filter s pórmí s veľkosťou 0,22 µm.) Táto zmes sa nechá stáť 18 hodín. Celkový objem blokovanej konjugátnej zmesi je 38,5 ml. Zmes sa doplní na objem 40 ml prídavkom 1,5 ml tlmivého roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8,0. 35 ml tohto roztoku sa naplní rovnomerne do štyroch centrifugačných skúmaviek s objemom 10 ml. Každá skúmavka sa preleje tlmivým roztokom fosforečnanu sodného s koncentráciou 0,1 M a pH 8,0. Odstreduje sa 2 hodiny pri 4 °C a 43 000 otáčok/min. Supernatant sa odstráni a každá peleta sa uvoľní 8 ml tlmivého roztoku TED (so zložením 1 M Tris, pH 8,5; 0,01 M EDTA; 0,5 % deoxycholátu sodného) a prenesie sa do homogenizátora Dounce. Centrifugačné skúmavky sa sériovo premyjú prídavkom ďalších 8 ml tlmivého roztoku TED. Pelety sa resuspendujú a nechajú starnúť 20 hodín pri laboratórnej teplote. Celkový objem suspenzie je 40 ml. Zostarnutý materiál sa odstreduje (ako sa uvádza) v štyroch skúmavkách s objemom 10 ml pri otáčkach 43 000 min.⁻¹ 2 hodiny pri 4 °C. Každá peleta sa uvoľní pomocou 8 ml tlmivého roztoku TED, skúmavky sa sériovo premyjú 8 ml tlmivého roztoku TED. Pelety sa resuspendujú a vzniknutá suspenzia sa odstreduje za rovnakých podmienok ako v predchádzajúcom prípade. Vzniknuté pelety sa resuspendujú v celkovom objeme 40 ml tlmivého roztoku fosforečnanu sodného s koncentráciou 0,1 M a pH 7,0. Suspenzia sa znova za rovnakých podmienok odstredí. Pelety sa resuspendujú v 44 ml vody a suspenzia sa nechá stáť 17 hodín pri teplote 4 °C. Malé množstvo nerozpustných látok sa odstráni odstredením pri nízkych otáčkach 1000 min.⁻¹ počas 3,5 min. Získa sa produkt v supernatante.

Výsledným produktom je liečivá látka, konjugátová vakcína. Konjugát má nasledujúce parametre:

Test	Výsledky
a) Obsah Ps	284 µg/ml
b) Proteín	2025 1g/ml
Pomer PS/protein (vypočítaný)	0,14
c) Voľný Ps	pod 5 % plochy
d) analýza aminokyselín	
SCMHC/lyzín	6,7 %
SCMS/lyzín	1,6 %

Príklad 10

Príprava Pn-Ps homogenizáciou podľa Gaulina

Surový Pn-Ps vo forme prášku sa rozpustí vo vode za miešania cez noc pri teplote 4 °C. Pripraví sa roztoky Pn-Ps vo vode s koncentraciami 1,5 mg/ml a 10 mg/ml. Prídavkom 50 mM CaCl₂ sa úspešne zníži viskozita roztoku Pn-Ps s koncentráciou 10 mg/ml na rovnakú hodnotu, ako má roztok Pn-Ps s koncentráciou 1,5 mg/ml. Rozpustený Pn-Ps sa homogenizuje v Gaulinovom homogenizátore pri jednom zo štyroch tlakov: 13,74 MPa; 34,35 MPa; 67,7 MPa a 103,05 MPa. Strižnými silami hydrolyzovaný Pn-Ps sa zhomogenizuje pomocou prídavku 60 % roztoku izopropylalkoholu. Peleta sa premyje 100 % etanolom v mixéri, zmes sa prefiltruje a získa sa vyzrážaný Pn-Ps. Pn-Ps sa na filter premyje acetónom, a potom sa suší nad CaSO₄ (drierit), a pred analýzou sa skladuje pri teplote -70 °C. Alikvotné podiely tohto Pn-Ps sa resuspendujú na koncentráciu 1 mg/ml a stanovia sa ich veľkosť molekuly a polydisperzita

pomocou univerzálnej kalibrácie HPSEC a index antigénnosti rýchlostnou nefelometriou.

Poddruh Pn-Ps	Molekulová hmotnosť, pri ktorej sa začína znižovať antigénnosť	Polydisperzita
6B	500 000	1,19
14	300 000	1,15
19F	250 000	1,09
23F	250 000	1,15

Príklad 11

Stimulácia T-buniek myši

Účelom tejto skúšky je zistiť závislosť od T-buniek imunogenitu Pn-Ps konjugovanej vakcíny na myšiach. Tento model bol prijatý, pretože deti mladšie ako dvojročné normálne dobre odpovedajú na T-dependentné antigény. Atymické myši majú abnormálny tymický epitel a ich odpoveď na T-dependentné antigény je preto podstatne nižšia ako odpoveď ich normálnych súrodencov z jedného hniezda. Raz zriedená vakcína tak, aby dávka polysacharidu bola 0,5 µg, sa intraperitoneálne vstrekuje dospelým atymickým myšiam (nu/nu) a zároveň kontrolnej skupine myši, v ktorej sú súrodenci z jedného hniezda (nu/+). To sa uskutoční 0., 7. a 28. deň. O týždeň neskôr sa myšiam odoberie krv a z ich krvi sa získajú jednotlivé séra, ktoré sa testujú na odpoveď protilátky pomocou rádioimunoanalýzy (RIA).

Pri uskutočňovaní RIA sa každé myšacie sérum spojí s Pn-Ps označeným rádionuklidom ¹⁴C. Akýkoľvek vytvorený komplex antigén-protilátka sa potom vyzráža prídavkom nasýteného roztoku síranu amónneho. Každá taká vzorka sa "počíta" v beta-počítači 1 minútu. Konjugáty Pn6B-Ps-OMPC, Pn14-Ps-OMPC, Pn19F-Ps-OMPC, Pn23F-Ps-OMPC, Pn18C-Ps a Pn4-Ps podľa tohto vynálezu sa testujú týmto spôsobom a zistí sa, že tieto konjugáty dobre stimulujú T-bunky myši Nu/+.

Príklad 12

Imunogénnosť konjugátov Pn-Ps mláďat opíc druhu rhesus

Tento test sa uskutočňuje, aby sa zistila imunogénnosť buď samotného konjugátu, alebo konjugovaných vakcín obsahujúcich Pn-Ps-OMPC alebo Pn-Ps-MIEP mláďat opíc. Ukázalo sa, že mláďatá opíc sú výrobným modelom na klinickú predpoveď správania PedvaxHIB^(R) (konjugátová vakcína) [Vella a ďalší, Pediatrics, doplnok z 5. apríla, str. 668 až 675 (1990)], a preto sa vybrali ako model na hodnotenie konjugovaných vakcín Pn-Ps.

Dávka vakcíny sa aplikuje vnútrošalovo injekčne mláďatám opíc (dvoj- až trojmesačným) 0. a 28. deň. Injekcia sa podáva v množstve 0,25 ml do každého z dvoch miest. Opiciam sa 0., 28. a 42. deň odoberie krv a jednotlivé séra sa testujú na odpoveď protilátky pomocou rádioimunoanalýzy (RIA).

Pri uskutočňovaní RIA sa každé opičie sérum spojí s Pn-Ps označeným rádionuklidom ¹⁴C. Akýkoľvek vytvorený komplex antigén-protilátka sa potom vyzráža prídavkom nasýteného roztoku síranu amónneho. Každá taká vzorka sa "počíta" 1 minútu v beta-počítači. Imunitná odpoveď na vakcínu je uspokojivá, ak je aspoň pri 50 % testovaných zvierat odpoveď protilátky aspoň 1 µg po aplikácii dvoch dávok vakcíny.

Pn6B-Ps-OMPC, Pn23F-Ps-OMPC, Pn19F-Ps-OMPC, Pn18C-Ps-OMPC, Pn4-Ps-OMPC a Pn14-Ps-OMPC prejavujú silné antidruhovo špecifické odpovede protilátky. Okrem toho tetravalentný prípravok obsahujúci Pn6B-Ps-OMPC, Pn23F-Ps-OMPC a Pn14-Ps-OMPC prejavuje dobré anti-Pn-Ps odpovede protilátky na všetky štyri sérotypy.

Príklad 13

Účinnosť ochrany pomocou pneumokokových konjugátov činčíl

Každý činčila sa injekciou podkožne alebo vnútrosvaľovo aplikuje dávka 0, 0,25, 1,0 alebo 4,0 µg Pn6B-Ps-OMPC adsorbovaného na Al(OH)₃. Po 0, 2, 4, 6 a 8 týždňoch sa činčilám odoberie krv. Osem týždňov po injekčnej aplikácii konjugátu sa zvieratám urobí imunologický test so *Streptococcus pneumoniae* 6B. V intervaloch 1 až 3 dni sa zvieratá sledujú pomocou otoskopie a tympanometrie. Výtok zo stredného ucha sa odsaje na kultiváciu a za dva týždne po začatí imunologického testu sa zvieratá usmrť. Pri usmrtených zvieratách sa histopatologicky analyzuje stredné ucho. Pri zvieratách, ktoré nedostali žiadny konjugát, je 60 % úmrtnosť, zatiaľ čo najnižšia dávka konjugátu spôsobí nulovú úmrtnosť. Zvieratá, ktoré nedostali konjugát, nemajú žiadnu ochranu proti purulentnej otitis media, zatiaľ čo tie, ktoré dostali konjugát, sú chránené v 60 až 100 % prípadov pri všetkých veľkostiach dávky.

Príklad 14

Antipneumokokové imunitné odpovede pri dvoj- až päťročných deťoch

Na dvoj- až päťročných deťoch, ktoré dostávali dve dávky, každú v množstve 0,5 alebo 5 µg Pn6B-Ps, sa sleduje produkcia protilátok anti-Pn6B-Ps pomocou testu RIA a ELISA. Zistí sa významné zvýšenie protilátok anti-Pn6B-Ps.

Príklad 15

Rýchlostná nefelometria pneumokokových polysacharidov

Účelom tohto stanovenia je určiť obsah polysacharidu a index antigénnosti voľných Pn-Ps a konjugovaných preparátov pomocou rýchlostnej nefelometrie.

Rozsah štandardnej krivky na rýchlostnú nefelometriu sa líši pri rôznych Pn-Ps, ako sa líši odpoveď na jednotku hmotnosti Pn-Ps a lineárna časť krivky závislosti odpovede na koncentráciu antigénu Pn-Ps pri každom Pn-Ps. Tu uvedený príklad je špecifický pre konjugát Pn6B a nemusí byť aplikovateľný na Pn-Ps iných druhov. Okrem toho vzorky adsorbované na Al(OH)₃ a ich príslušné štandardy sa riedia roztokom citrátového sodného s koncentráciou 3 % a nie 0,9 % roztokom NaCl, ako je uvedené ďalej. Vodné roztoky konjugovaných vzoriek a ich štandardov (t. j. neadsorbované na Al(OH)₃) sa riedia 0,9 % roztokom NaCl a ďalej sa riedia tak, aby ich nominálna očakávaná koncentrácia patrila do rozsahu štandardnej krivky.

a) Reakčné činidlá

Fyziologický roztok: 0,9 % roztok NaCl

Anti-Pn-Ps séra: Antisera (Health Research, Inc., Albany, NY) sa 30x zriedia fyziologickým roztokom. Štandardy: pripravujú sa konjugátové štandardy Pn-Ps s koncentraciami: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 a 4,0 µg/ml zo zásobného roztoku s koncentráciou 387 µg/ml, ktorého koncentrácia sa určí stanovením polysacharidov pomocou fenolu a kyseliny sírovej.

Testované vzorky: pripravujú sa v zásobnom roztoku citrátového sodného s koncentráciou 3 %. Sériovým zriedením sa pripravujú skúšané vzorky s teoretickou koncentráciou 1,0; 2,0 a 3,0 µg Pn-Ps/ml.

b) Postup

Uskutočňuje sa skúška všetkých vzoriek a štandardov v dvoch uskutočneniach s použitím rýchlostného nefelometra Beckman ICS. Zo štandardnej krivky sa určí koncentrácia vzoriek. Koncentrácia vzorky sa vynásobí zriedňovacím

faktorom a vypočíta sa priemerná hodnota pre každú testovanú vzorku.

Ako sa už uviedlo v texte, vzorky, ktorých indexy antigénnosti sú nižšie ako 70 %, sa nenechajú konjugovať. Tým sa zaistí, že použité Pn-Ps majú žiadané imunologické parametre.

Príklad 16

Klonovanie genómovej DNA kódujúcej MIEP

Asi 0,1 g fenolom inaktivovaných buniek *N. meningitidis* (pozri príklad 1) sa umiestni do novej skúmavky. Fenolom inaktivované bunky sa resuspendujú v 567 µl tlmivého roztoku TE (so zložením 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). K resuspendovaným bunkám sa pridá 30 µl 10 % roztoku SDS a 3 µl proteinázy K (Sigma) s koncentráciou 20 mg/ml. Bunky sa premiešajú a inkubujú 1 hodinu pri 37 °C. Potom sa pridá 100 µl roztoku NaCl s koncentráciou 5 M a zmes sa dôkladne premieša. Potom sa pridá 80 µl 1 % roztoku cetyltrimetylamóniumbromidu (CTAB) v roztoku NaCl s koncentráciou 0,7 M. Zmes sa dôkladne premieša a inkubuje 10 minút pri 60 °C. Pridá sa rovnaký objem (asi 0,7 až 0,8 ml) zmesi chloroformu a izoamylalkoholu v pomere 24 : 1, zmes sa dôkladne premieša a 5 minút sa odstredí pri 10 000 g. Vodná (horná) fáza sa preniesie do novej skúmavky a organická fáza sa odstráni. K vodnej fáze sa pridá rovnaký objem zmesi fenol chloroform : izoamylalkohol (25 : 24 : 1). Zmes sa dôkladne premieša a 5 minút sa odstredí pri 10 000 g. Vodná (horná) fáza sa preniesie do novej skúmavky a pridá sa k nej 0,6 objemu (asi 420 µl) izopropylalkoholu. Zmes sa dôkladne premieša a vyzrážaná DNA sa odstredí 10 minút pri 10 000 g. Supernatant sa odstráni a peleta sa premyje 70 % roztokom etanolu. Peleta DNA sa vysuší a resuspenduje v 100 µl tlmivého roztoku TE. Takto sa získa genómová DNA z *N. meningitidis*.

Syntetizujú sa dva oligonukleotidy DNA, ktoré zodpovedajú 5'-koncu génu MIEP a 3'-koncu génu MIEP [Murakami, E. C. a ďalší (1989), *Infection and Immunity*, 57, str. 2318 až 2323]. Špecifická sekvencia oligonukleotidu DNA pre 5'-koniec génu MIEP je 5'-ACTAGTTGCAATGAAAAATCCCTG-3'; a pre 3'-koniec génu MIEP 5'-GAATTCAGATTAGGAATTGTT-3'. Tieto oligonukleotidy DNA sa použijú ako priméry na amplifikáciu génu MIEP pomocou reťazovej polymerizačnej reakcie (PCR), pri ktorej sa použije 10 ng genómovej DNA z *N. meningitidis*. PCR amplifikácia sa uskutoční podľa postupu dodaného výrobcom (Perkin Elmer).

Amplifikovaná MIEP DNA sa štiepi reštrikčnými endonukleázami SpeI a EcoRI. Fragment DNA s veľkosťou 1,3 kilobázy (kb) obsahujúci celú oblasť kódujúcu MIEP sa izoluje elektroforézou na agarovom géli s koncentráciou 1,5 %. Z gélu sa tento fragment získa elektroelúciou [Súčasná postupy v molekulovej biológii, (1987), Ausubel, R. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G. a Struhl, K., vyd. Greene Publishing Assoc.]. Plazmidový vektor pUC-19 sa štiepi pomocou SpeI a EcoRI.

Fragment DNA SpeI-EcoRI kódujúci MIEP, elektroforeticky vyčistený, sa ligáciou vsunie do SpeI-EcoRI pUC-19 vektora. Tento vektor sa použije na transformáciu kmeňa DH5 *E. coli*. Transformanty obsahujúce vektor pUC-19 s MIEP s veľkosťou 1,3 kbp sa identifikujú mapovaním reštrikčnými endonukleázami. MIEP DNA sa sekvenuje, a tým sa potvrdí jej identita.

Príklad 17

Konštrukcia vektora pCI/I.Gal10p(B)ADH1.

Promótor Gal 10 sa izoluje z plazmidu YE_p52 [Broach a ďalší, (1983) v *Experimental Manipulation of Gene Expression*, Inouye, M(Ed) Academic Press, str. 83 až 117] purifikáciou fragmentu s veľkosťou 0,5 tisíc párov báz (kbp) na géli. Fragment sa získa po štiepení pomocou Sau 3A a Hind III. Terminátor ADH1 sa izoluje z vektora pGAP.tADH2 [Kniskern a ďalší, (1986), *Gene*, 46, str. 135 až 141] purifikáciou fragmentu s veľkosťou 0,35 kbp na géli; fragment sa získa štiepením pomocou Hind III a Spe I. Tieto dva fragmenty sa ligáciou za pôsobenia T4-DNA-ligázy spoja s vektorom pUC18ΔHindIII, vyčisteným na géli (Hind III miesto sa eliminuje štiepením PUC18 pomocou Hind III, ukončením "natupo" pomocou Klenowovho fragmentu *E. coli* DNA-polymerázy I a ligáciou za pôsobenia T4-DNA-ligázy. Vektor sa štiepi pôsobením BamHI a SphI, čím sa vytvoril parentálny vektor pGallo.tADH1. Vektor má jednoduché Hind III klonovacie miesto na spojení Gal10p.ADHI.

Jednoduché Hind III klonovacie miesto na Gal10p.tADH1 sa zmení na jednoduché BamHI klonovacie miesto štiepením pGal10p.tADH1 pomocou Hind III gélovou purifikáciou štepu DNA a ligáciou za pôsobenia T4-DNA-ligázy s nasledujúcim linkerom Hind III-BamHI: 5'-AGCTCGGATCCG-3' 3'-GCCTAGGCTCGA-5'.

Výsledný plazmid pGal10(B)tADH1 má vyštiepené miesto Hind III a vytvorené jednoduché BamHI klonovacie miesto.

Fragment Gal10p.tADH1 sa izoluje z pGal10(B)tADH1 štiepením pomocou SmaI a SphI "natupo" zakončením pomocou T4-DNA-polymerázy a na géle sa purifikuje. Kvasinkový "shuttle" vektor pCI/I [Brake a ďalší, (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, str. 4642 až 4646] sa štiepi pomocou SphI, zakončí natupo pomocou T4-DNA-polymerázy a purifikuje sa. Tento fragment sa spojí ligáciou s vektorom za pôsobenia T4-DNA-polymerázy. Ligačná reakčná zmes sa použije na transformáciu buniek HB 101 *E. coli*, čím sa spôsobí rezistencia na ampicilín. Transformanty sa testujú pomocou hybridizácie s jednoduchým vláknom Hind III-BamHI linkera označeného rádionuklidom ³²P. Konštrukcia nového vektora pCI/I.Gal10p(B)ADH1, sa potvrdí štiepením pomocou HindIII a BamHI.

Príklad 18

Konštrukcia kvasinkového vektora na expresiu MIEP s použitím sekvencie DNA MIEP a vedúcej sekvencie DNA

Fragment DNA obsahujúci kompletnú oblasť kódujúcu MIEP sa vytvorí štiepením pUC19.MIEP č. 7 pomocou SpeI a EcoRI, gélovou purifikáciou DNA MIEP a zakončením "natupo" pomocou T4-DNA-polymerázy.

Kvasinkový vnútorný vektor na expresiu pCI/I.Gal10p(B)ADH1, sa štiepi pomocou Bam HI, defosforyluje sa pôsobením tel'acej črevnej alkalické fosfatázy a zakončí "natupo" pôsobením T4-DNA-polymerázy. DNA sa čistí na géli, aby sa odstránil neštiepený vektor.

"Natupo" zakončený fragment kódujúci MIEP s veľkosťou 1,1 kbp sa ligáciou spojí s "natupo" zakončeným vektorom pCI/I.Gal10p(B)ADH1. Ligačná reakčná zmes sa použije na transformáciu kompetentných buniek DH5 *E. coli*, čím sa spôsobí rezistencia na ampicilín. Transformanty sa testujú pomocou hybridizácie s oligonukleotidom DNA označeným rádionuklidom ³²P:

5'... AAGCTCGGATCCTAGTTGCAATG ... 3'.

Tento nukleotid je homológny so sekvenciami prekryvujúcimi spojenie MIEP DNA-vektor. Z transformantov pozitívnych pri hybridizácii sa vytvorí preparáty DNA. Tie sa štiepia pomocou KpnI a Sall, aby sa overilo, že fragment MIEP je v správnej orientácii na expresiu pomocou promótoru Gal10. Ďalšie potvrdenie konštrukcie DNA sa získa sekvenovaním "dideoxy" metódou od promótoru Gal10 cez oblasť kódujúcu MIEP.

Expresia MIEP transformantmi sa deteguje analýzou Western Blot. Rekombinantný MIEP produkovaný v transformantoch migruje na polyakrylamidových géloch spoločne s MIEP purifikovaným z OMPC vezikúl a je imunologicky reaktívny s protilátkami špecifickými proti MIEP.

Príklad 19

Konštrukcia kvasinkového expresívneho vektora pre MIEP s 5'-modifikovanou sekvenciou DNA MIEP

Oligonukleotid DNA obsahujúci miesto Hind III, konzervovanú kvasinkovú 5'-nepreloženú vedúcu sekvenciu (NTL), štart-kodón pre metionín (ATC), prvých 89 kodónov pre zrelý MIEP (počínajúc od Asp v polohe + 20) a miesto KpnI (v polohe +89) sa vytvorí reťazovou polymerizačnou reakciou (PCR). PCR sa uskutoční podľa pokynov výrobcu (Perkin Elmer Cetus) s použitím plazmidu pUC19MIEP42 č. 7 ako templátu a nasledujúcich oligomérov DNA ako primerov:

5'CTAAGCTTAACAAAATGGACGTTACCTTGTACG-GTACAATT^{3'} a
5'ACGGTACCGAAGCCGCTTTCAAG^{3'}.

Aby sa odstránila 5'-oblasť klonu MIEP, štiepi sa plazmid pUC19MIEP42 č. 7 pomocou KpnI a HindIII a fragment vektora s veľkosťou 3,4 kbp sa čistí na agarózovom géli.

Fragment PCR s veľkosťou 280 bp sa štiepi pomocou KpnI a Hind III, čistí na agarózovom géli a ligáciou sa spojí s fragmentom vektora s veľkosťou 3,4 kbp. Transformanty HB101 *E. coli* (BRL) sa testujú pomocou hybridizácie s oligonukleotidom DNA. Pozitívne DNA transformanty sa analyzujú štiepením reštrikčným enzýmom. Na potvrdenie skutočnosti, že počas PCR reakcie nedošlo k žiadnym mutáciám vo vytvorenom fragmente PCR s veľkosťou 280 bp, sa pozitívne transformanty sekvenujú. Výsledný plazmid obsahuje inzert Hind III-EcoRI obsahujúci kvasinkový NTL, kodón ATG a celý otvorený čítací rámec (ORF) úpre MIEP začínajúci od kodónu Asp (aminokyselina +20).

Kvasinkové expresívne vektory MIEP sa konštruujú nasledujúcim spôsobom. Vektory pGal10/pCI/I a pGAP/pCI/I [Vlasuk, G. P. a ďalší, (1989) *J. B. C.*, 264, str. 12, 106-12, 112] sa štiepia pomocou BamHI, zarovnajú sa ("flush-ended") Klenowovým fragmentom DNA-polymerázy I a defosforylujú sa tel'acou črevnou alkalickou fosfatázou. Tieto lineárne vektory sa ligáciou spoja uvedeným fragmentom HindIII-EcoRI, upraveným pomocou Klenowovho fragmentu a vyčisteným na géli. Tento fragment obsahuje kvasinkový NTL, ATG a ORF pre MIEP. Ligáciou sa vytvorí pGal10/pCI/I-MIEP a pGAP/pCI/I-MIEP.

Saccharomyces cerevisiae, kmeň U9 (gal10pga14-) sa transformuje plazmidom pGal10/pCI/I-MIEP). Rekombinantné klony sa izolujú a testujú na expresiu MIEP. Klony sa pestujú pri teplote 37 °C za trepania v syntetickom médiu (leu-)obsahujúcom glukózu s koncentráciou 2 g/l do vtedy, kým sa nedosiahne hodnota ODE₆₆₀ približne 6,0. Potom sa pridá galaktóza tak, aby jej koncentrácia v roztoku bola 20 g/l, a tým sa indukuje expresia MIEP od pro-

mótoru Gal10. Bunky sa po indukcii galaktózou pestujú ďalších 45 hodín, kým sa nedosiahne hodnota ODH_{600} asi 9,0. Bunky sa potom pozberajú centrifugáciou. Bunková peleta sa premyje destilovanou vodou a zmrazi.

Test "Western Blot" pre rekombinantný MIEP

Western Blot analýza sa uskutoční preto, aby sa určilo, či v kvasinkách skutočne došlo k expresii MIEP. Použije sa gél Novex Laemmli s koncentráciou 12 %, hrúbkou 1 mm, s 10 až 15 jamkami. Kvasinkové bunky sa rozbijú vo vode použitím sklenených guľôčok (počas rozbijania sa môže pridať 2 % roztok dodecylsulfátu sodného (SDS)). Bunkové zvyšky sa odstránia odstredením pri 10 000 g, 1 minúta.

Supernatant sa zmieša s elektroforetickým tlmivým roztokom na vzorku; tlmivý roztok sa opisuje v časti opisujúcej čistenie MIEP na polyakrylamidovom géli. Elektroforéza sa uskutočňuje pri 35 mA s použitím OMPC ako porovnávacej kontroly. Ukončí sa vtedy, keď farbiaca značka (brómfenolová modrá) "prebehne" okraj gélu. Proteíny sa preniesú na nitrocelulózový papier s veľkosťou pórov 0,45 μm použitím prenosového prístroja NOVEX. Po prenose sa nitrocelulózový papier jednu hodinu "blokuje" pomocou 5 % roztoku hovädzieho sérového albumínu vo fyziologickom roztoku s fosfátovým tlmivým roztokom. Potom sa pridá 15 ml králičieho anti-MIEP antiséra zriedeného 1 : 1000; sérum sa vytvorí imunizáciou a purifikáciou MIEP na géli s použitím štandardných postupov. Inkubuje sa cez noc pri laboratórnej teplote a pridá sa 15 ml kozieho anti-králičieho IgG konjugovaného alkalickou fosfatázou a zriedeného 1 : 1000. Po dvoch hodinách inkubácie sa "blot" vyvíja pomocou FAST RED TR SALT (Sigma) a NaIol-AS-MX fosfátu (Sigma).

Príklad 20

Bakteriálna expresia rekombinantného MIEP

Plazmid pUC19-MIEP obsahujúci génový inzert MIEP s veľkosťou 1,3 kbp sa štiepi reštrikčnými endonukleázami SpeI a EcoRI. Fragment s veľkosťou 1,1 kbp sa izoluje a purifikuje na agarózovom géli s použitím štandardných techník známych v odbore. Plazmid pTACSD obsahujúci promótor TAC s dvoma cisónmi a jednoduché miesto EcoRI sa štiepi pomocou EcoRI. Na oboch koncoch fragmentu MIEP DNA s veľkosťou 1,3 kbp a vektora pTACSD sa vytvoria "tupé" konce pomocou T4-DNA-polymerázy (Boehringer Mannheim) podľa pokynov výrobcu. "Natupo" zakončený fragment MIEP DNA s veľkosťou 1,3 kbp sa ligáciou spojí s "natupo" zakončeným vektorom s použitím T4-DNA-ligázy podľa pokynov výrobcu. "Ligovaná" DNA sa použije na transformáciu buniek *E. coli*, kmeň DH5 α QMAX (BRL) podľa pokynov výrobcu. Transformované bunky sa naočkujú na agarové misky obsahujúce 25 μg kanamycínu/ml a 50 μg penicilínu/ml. Inkubácia prebieha 15 hodín pri teplote 37 °C. Oligonukleotid DNA so sekvenciou homológou s MIEP sa označí rádionuklidom ^{32}P . Tento oligonukleotid sa použije pri štandardnej DNA hybridizačnej technike, keď sa s ním hybridizujú lyzované denaturované kolónie transformovaných buniek na nitrocelulózovom filtri. Kolónie pozitívne pri hybridizácii sa mapujú s použitím reštrikčných endonukleáz, aby sa určila orientácia génu MIEP.

Expresia MIEP v transformantoch sa zistí analýzou "Western blot". Rekombinantný MIEP produkovaný v transformantoch má rovnakú pohyblivosť v polyakrylamidových géloch ako MIEP purifikovaný z OMPC vezikul a je imunologicky reaktívny s protilátkami špecifickými pre MIEP.

Príklad 21

Konjugácia Pn-PS s MIEP z *N. meningitidis*

Chemické konjugácie sa uskutočnia spôsobom uvedeným v americkom patente č. 4 882 317.

10 mg MIEP v 3 ml borátového tlmivého roztoku s koncentráciou 0,1 M a pH 11,5 sa zmieša s 10 mg disodnej soli kyseliny etyléndiamintetraoctovej (EDTA, Sigma Chemicals) a 4 m M ditiotritolu (Sigma Chemicals). Roztok proteínu sa dôkladne prebublá dusíkom. 125 g N-acetylhomocysteintiolaktónu (Aldrich Chemicals) sa pridá k roztoku MIEP a zmes sa 16 hodín inkubuje pri laboratórnej teplote. Potom sa roztok v dusíkovej atmosfére dvakrát dialyzuje proti 2 litrom borátového tlmivého roztoku s koncentráciou 0,1 M a pH 9,5, ktorý obsahuje 4 mM EDTA. Dialýza prebieha pri laboratórnej teplote vždy 24 hodín. Obsah tiolových skupín v tiolovanom proteíne sa stanoví Ellmanovým reakčným činidlom (Sigma Chemicals) a koncentrácia proteínu Bradfordovým činidlom (Pierce Chemicals). Na konjugáciu MIEP s Pn-PS sa pridá 1,5-násobný nadbytok (hmotnostný) brómocetylovaného Pn-PS k roztoku MIEP a pH sa upraví roztokom 1M NaOH na hodnotu 9 až 9,5. Zmes sa nechá inkubovať v atmosfére dusíka 6 až 8 hodín pri laboratórnej teplote. Roztok konjugátu sa okyslí roztokom HCl s koncentráciou 1 M na pH 3 až 4. Desať minút sa odstredí pri 10 000 g. Jeden mililitr kvapalného supernatantu sa nastrieka priamo na kolónu FPLC Superose 6B (rozmery 1,6 x 50 cm, Pharmacia) a konjugát sa eluuje pomocou PBS. Pík "mŕtveho" objemu, ktorý obsahuje konjugát polysacharid-proteín (Pn-PS-MIEP) sa zhromažďí. Roztok konjugátu sa potom filtruje cez filter s pórmí s veľkosťou 0,22 μm s cieľom sterilizácie.

Príklad 22

Demonštrácia imunogénnosti konjugátov Pn-PS-MIEP

Imunizácia: Samce myši Balb/c (Charles River, Wilmington, MA) sa imunizujú IP s Pn-PS kovalentne konjugovaným s MIEP použitím 2,5 μg Pn-PS v 0,5 ml vopred vytvoreného hydroxidu hlinitého. Kontrolné myši sa imunizujú rovnakým množstvom Pn-PS podaného ako Pn-PS CRM [Anderson, M. E. a ďalší, (1985), J. Pediatrics, 107, str. 346 až 351] (2,5 μg Pn-PS (6, 25 μg CRM; 1/4 dávky pre ľudí), Pn-PS-DT (2,5 μg Pn-PS/1,8 μg DT; 1/10 dávky pre ľudí, takže sa použije konštantné množstvo Pn-PS) a Pn-PS-OMPC (2,5 μg /3,5 μg OMPC; 1/4 dávky pre ľudí).

6- až 13,5-týždňové mláďatá opíc Rhesus sa imunizujú konjugátmi Pn-PS-MIEP adsorbovanými na hydroxide hliniteho. Každá opica dostane 0,25 ml konjugátu injekčne do dvoch rôznych miest, takže celková dávka je 0,5 ml. Opice sa imunizujú 0., 28. a 56. deň a vzorky krvi sa odoberajú každý druhý až štvrtý týždeň.

Protilátkové odpovede sa merajú pomocou testu ELISA, ktorý rozlišuje triedu a podtriedu imunoglobulínovej odpovede. Na hodnotenie odpovede opíc sa používa aj test RIA, pri ktorom sa stanoví celkové množstvo protilátky anti-Pn-PS.

Konjugáty Pn-PS-MIEP sú schopné vyvolať imunitnú odpoveď myši, čo spočíva v tvorbe protilátky IgG anti-Pn-PS a zapamätaní si odpovede. To je rozdiel oproti Pn-PS-CRM a Pn-PS-DT, pri ktorých aplikácii sa nedá zistiť žiadna protilátka anti-Pn-PS. Takže MIEP fungujúci ako imunologický nosičový proteín pre Pn-PS je schopný vyvolať protilátkovú anti-Pn-PS odpoveď, ak je kovalentne konjugovaný s antigénom Pn-PS. Purifikovaný MIEP je preto účinným imunologickým nosičovým proteínom, ktorý nahrádza heterogénny OMPC pri konštrukcii bakteriálnych polysacharidových konjugovaných vakcín.

Príklad 23

Kvantitatívne stanovenie obsahu C-polysacharidu v preparátoch Pn-Ps

Systémy vyvinuté na kvantifikáciu C-polysacharidu spočívajú v NMR, enzýmových alebo chromatografických spôsoboch. V tomto prípade sa používa chromatografická separácia cholínu (zložky C-Ps) zo vzoriek hydrolyzovaných Pn-Ps a použitý spôsob sa porovnáva s ostatnými metódami. Cholín sa separuje na kolóne s katexom, pričom detekcia sa uskutočňuje na základe zníženia vodivosti.

Vzorky Pn-Ps sa úplne hydrolyzujú pôsobením 36 % kyseliny fluorovodíkovej počas 2 hodín pri teplote 45 až 65 °C a ďalej pôsobením kyseliny trifluóroctovej s koncentráciou 2 M počas 16 hodín pri 100 °C. Po hydrolyze sa 200 až 300 µg vzorky nastrieka do chromatografického systému Dionex BioLC s analytickou kolónou Omnipac PCX-500 a predkolónou s Ion Pac CTC-1-katexovou zachytávacou kolónou, s mikromembránovým supresorom CMMS-2. Regenerácia sa uskutočňuje roztokom tetrabutylamónium-hydroxidu s koncentráciou 50 mM pri prietoku 10 ml/min. Systém má vodivostný detektor s citlivosťou 1 µS. Vzorka sa eluuje izokratickým spôsobom roztokom obsahujúcim 200 mM roztok HCl, 20 % roztok acetonitrilu, roztok MilliQ vody, 20 mM roztok kyseliny diaminopropiónovej; zložky sú v pomere 5 : 5 : 85 : 5. Cholín sa eluuje vo forme ostrého píku asi po 10 min.

Purifikovaný C-Ps (získaný zo Statens Serum Institut) sa uvedeným spôsobom analyzuje na obsah cholínu. Nameňovaný výsledok 5,4 % hmotnostného cholínu súhlasí s publikovanými hodnotami obsahu cholínu v C-Ps.

Tento faktor sa použije na výpočet koncentrácie C-Ps v rôznych vzorkách preparátu Pn-Ps, prepočítaním nanomolových množstiev cholínu zisteného stanovením HPLC na jednotky hmotnosti. Použitím hodnoty 5,4 % hmotnostného cholínu v C-Ps sa vypočíta obsah C-Ps v hmotnostných percentách. Vzorky, ktoré majú koncentrácie C-Ps väčšie ako 3 %, sa odmietnu ako neprijateľné pre konjugáciu. Tabuľka uvedená ďalej ukazuje koreláciu tejto metódy s NMR a enzýmovými metódami a ukazuje typické množstvá kontaminácie C-Ps v preparátoch Pn-Ps s rôznymi stupňami čistoty.

Vzorka	NMR (% hmotn.)	Enzýmová metóda (% hmotn.)	HPLC (% hmotn.)
Pn6B-Ps	20	nestanovené	18,4
Pn6B-Ps	1,6	0,3 až 1,0	1,2
Pn23F-Ps	nestanovené	2,8	3,7
Pn14-Ps	2,9	2,4	3,2
Pn19F-Ps	2,7	2,6	2,6.

Príklad 24

Príprava čiastočne hydrolyzovaného, purifikovaného Pn18C-Ps

1. Ultrazvuková hydrolyza

3 g prášku Pn18C-Ps sa rozpúšťa v 1200 ml fyziologického roztoku (0,9 % roztok NaCl) za miešania 3 až 4 hodiny pri laboratórnej teplote, potom sa roztok prikryje a cez noc uloží pri 4 °C. Na roztok sa potom pôsobí ultrazvukom v kadičke z plastu, ktorá je v ľadovom kúpeli, v sonifikátore Bronson (kyveta 1,27 cm, nastavená hodnota 8) v 20-minútových intervaloch (pôsobenie 5 minút) celkom 40 minút. Po každom intervale sa kontroluje viskozita. Po 40 minútach sonifikácie sa sonifikuje ďalších 10 minút, aby sa získala konečná hodnota viskozity vzorky $1,218 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Hydrolyzovaná vzorka (1188 ml) sa zohreje na laboratórnu

teplotu a pridá sa k nej 59,2 g octanu sodného, takže výsledná koncentrácia acetátu je 30 g/liter.

2. Sérologická skúška

Pokusná frakcionácia izopropylalkoholom (IPA) a nefelometrické stanovenie konečného bodu zamerané na protilátku, ktoré sa uskutočňuje s 10 ml vzorky ukazuje, že Pn18C-Ps sa zráža pri koncentrácii IPA 40 až 50 %.

3. Prvý prídavok IPA

K hydrolyzovanej vzorke s objemom 1200 ml, pripravenej podľa kroku 1, sa pridá 894 ml IPA, takže koncentrácia IPA v roztoku je 42,7 %. IPA sa pridáva po kvapkách za miešania pri laboratórnej teplote. Vzorka sa nechá 15 až 30 minút miešať, a potom sa 30 minút odstredí pri 11000 g (odstredivka Beckman s rotorom JA-10, otáčky 8000 min⁻¹, 20 °C). Odpadová peleta sa rozdrví v absolútnom etanole v nádobe Omnimix s objemom 250 ml. Tuhé časti sa zhromaždia na sklenej sintrovej frite s objemom 60 ml. Zrazenina sa premyje priamo na frite absolútnym etanolom, potom acetónom a vysuší sa vo vákuu nad CaCl₂ pri laboratórnej teplote v priebehu prípravy na stanovenie.

4. Druhý prídavok IPA a získanie produktu

K supernatantu s koncentráciou IPA 42,7 % (objem 2016 ml) získanému podľa kroku 3 sa pridá po kvapkách pri laboratórnej teplote 92,0 ml IPA, takže výsledná koncentrácia IPA je 42,5 %. Vzorka sa nechá starnúť, a potom sa odstredí tak ako v kroku 3. Peleta sa rozdrví, zhromaždí, premyje a vysuší ako v kroku 3. Medziprodukt Pn18C-Ps váži 1609 mg.

5. Dialýza a lyofilizácia

1612,5 mg vzorky získanej podľa kroku 4 sa rozpúšťa 2 hodiny v destilovanej vode (645 ml) pri laboratórnej teplote. Roztok s koncentráciou 2,5 mg/ml sa prenesie do dialyzačnej trubice (s priemerom 45 mm, priepustnosť do molekulyovej hmotnosti 12000). Dialyzuje sa 30 hodín proti destilovanej vode s dvoma výmenami destilovanej vody. Potom sa dialyzovaná vzorka prenesie do lyofilizačných baniek. Zmrazí sa na "šupú" v kúpeli zo suchého ľadu a metanolu a lyofilizuje sa v lyofilizátore Virtis (Freezemobile) 2 až 3 dni až dosucha. Získa sa 1487 mg produktu Ps.

Príklad 25

Konjugát *S. Pneumoniae* 18C-OMPC, Pn18C-Ps-OMPC

A. Premena živice Dowex 50x2 (200 až 400 mesh) na tetrabutylamóniovú formu [Dowex 50 (Bu₄N⁺)]

Dowex 50x2 (200 až 400 mesh) v H⁺ forme (500 g) sa suspenduje vo vode, naplní sa do kolóny a premyva postupne 600 ml vody, 1000 ml roztoku HCl s koncentráciou 6 M a 400 ml vody, kým nie je reakcia roztoku na pH papierik na výtoku z kolóny neutrálna. Potom sa premyva 72 g 10 % roztoku tetrabutylamóniumhydroxidu dovtedy, kým nie je reakcia roztoku na výtoku z kolóny silno alkalická. Nakoniec sa kolóna premyje 1000 ml vody, aby bol premývací roztok na výtoku z kolóny neutrálny.

B. Príprava tetrabutylamóniovej formy polysacharidu zo *S. Pneumoniae* druhu 18 C [Pn18C (Bu₄N⁺)]

Dowex 50x2 (Bu₄N⁺) v kolóne s objemom 60 ml sa premyje 250 ml vody. 650 mg Pn18C-polysacharidu (so zmenšenou veľkosťou molekuly) sa preleje 65 ml vody a 1 hodinu sa mieša, čím vznikne roztok. Tento roztok sa nastrieka na kolónu a nechá pretekať jej náplňou pomocou gravitácie (2 hodiny). Potom sa uskutoční elúcia pomocou

vákua (1 hodinu). Kolóna sa premyje 150 ml vody a spojené eluáty sa lyofilizujú. Získa sa 655 mg 18C (Bu_4N^+) soli. 25 mg sa odoberie na NMR analýzu a zvyšok sa uschová.

C. Príprava 1,4-butándiamínového derivátu 18C (18C-BuA₂)

18C ($\text{N-Bu}_4\text{N}^+$) (630 mg) sa preleje 143 ml DMSO (dimetylsulfoxidu) a zmes sa 3,25 hodiny mieša. V priebehu tohto času sa všetky tuhé častice rozpustia. Jeden ml roztoku sa odoberie na titračné stanovenie obsahu vody podľa Karla Fischera. Zistí sa obsah vody 28,2 $\mu\text{mol/ml}$ (celkom 4 mmol). K tomuto roztoku sa pridá 165,1 mg karbonyldiimidazolu (CDI) a vzniknutý roztok sa 2 hodiny mieša pri laboratórnej teplote. Pripraví sa roztok obsahujúci 1,260 g 1,4-butándiamíndihydrochloridu ($\text{BuA}_2\cdot 2\text{HCl}$) v 40 ml vody a jeho pH sa upraví na 10,20 roztokom NaOH s koncentráciou 2,5 M. Tento roztok sa ochladí v ľadovom kúpeli. K studenému roztoku BuA₂ sa pomaly pridá zastarutý roztok DMSO a zmes sa 10 minút mieša v ľadovom kúpeli, a potom 50 minút pri laboratórnej teplote. Potom sa roztok naplní do dialyzačnej trubice Spectrapor 2, trubica sa zaškrtí 1,27 cm od hornej hladiny kvapaliny a dialyzuje sa proti nasledujúcim roztokom: 1) 15 litrom tlmivého roztoku s koncentráciou Na_3PO_4 0,1 M a pH 7,0, 13 hodín; 2) 15 litrom tlmivého roztoku s koncentráciou Na_3PO_4 0,01 M a pH 7,0, 11 hodín; 3) 15 litrom toho istého tlmivého roztoku ako v prípade 2, 10,8 hodiny; 4) 15 litrom vody, 9,5 hodiny.

Objem po dialýze je 190 ml. Odoberie sa alikvotný podiel s objemom 7,5 ml a ten sa oddelene lyofilizuje na NMR stanovenie. Zvyšných 182,5 ml roztoku sa lyofilizuje, a tým sa získa sa 416 mg 1,4-butándiamínového derivátu 18C (Pn18C-BuA₂). Odmeraním NMR spektra asi 5 mg vzorky a porovnaním integrálov rezonančných píkov vnútorných metylenových skupín butándiamínu s integrálmi píkov metylových skupín z ramnózy (z 18C) sa zistí, že na 100 opakujúcich sa jednotiek polysacharidu pripadá približne 10 butándiamínových zvyškov.

D. Príprava brómacetylovaného butándiamínového derivátu 18C (Pn18C-BuA₂-BrAc)

Pn18C-BuA₂ (416 mg) sa preleje 36 ml tlmivého roztoku (Kolthoffov boráto-fosfátový tlmivý roztok) s koncentráciou 0,1 M a pH 9,04. Zmes sa mieša dovtedy, kým nevznikne roztok. Potom sa pridá 256 mg *p*-nitrofenylbrómacetátu v 4,48 ml acetonitrilu. Výsledná zmes sa mieša 20 hodín pri teplote 4 °C. Potom sa dialyzuje v trubici Spectrapor 2 trikrát za sebou proti 15 litrom vody vždy 6 hodín. Po dialýze je objem dialyzovaného roztoku 60 ml. 1,7 ml tohto roztoku sa odoberie na stanovenie (NMR, Ouchterlonyho stanovenie), stanovenie na viskozimetri Viscotek). K zvyšnému roztoku sa pridá 2,42 g suchej soli fosfátového tlmivého roztoku s pH 8,0 (táto soľ sa pripraví lyofilizáciou roztoku fosforečnanu sodného s koncentráciou 0,1 M a pH 8,0). Po rozpustení sa roztok prefiltruje cez filter Corning s pórmí s veľkosťou 0,2 μm . Získa sa vodný roztok 18C-BuA₂-BrAc s pH 8. Filtrácia prebieha pomaly a je treba na ňu 4 filtre pohárikového typu.

E. Konjugácia OMPC (z *N.meningitidis*) s Pn18C-BuA₂-BrAc

80 ml roztoku s proteínom z vonkajšej membrány (OMPC) z *N. meningitidis* s koncentráciou 3,2 mg OMPC/ml sa naplní do 4 centrifugačných skúmaviek. Odstreďuje sa v odstredivke Beckman s rotorom 80Ti pri otáčkach 43 000 min.⁻¹ pri teplote 4 °C 2 hodiny. Pripraví sa tiolačná zmes rozpustením 680 mg EDTA (disodná soľ ky-

seliny diamíntetraoctovej) a 120 mg ditiotreitolu (DTT) v 40 ml tlmivého roztoku $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ s pH 11,09. Pridá sa 320 *N*-acetylhomocysteíntiolaktónu, a roztok sa potom prefiltruje cez filter Corning s pórmí s veľkosťou 0,2 μm (pohárikový typ). Materiál sa uvoľní z peliet získaných centrifugáciou podľa uvedeného postupu pomocou 5 ml prefiltrovanej tiolačnej zmesi. Celkový objem jednej skúmavky, 20 ml, sa preniesie do homogenizátora Dounce, kde sa dôjde k resuspendovaniu. Skúmavky sa prepláchnu ďalšími 2 a 10 ml tiolačnej zmesi. Spojené roztoky sa homogenizujú v homogenizátore Dounce. Celý objem resuspendovaného materiálu (40 ml) sa preniesie do banky s okrúhlym dnom s objemom 100 ml. Po uzavretí septom a nahradení vzduchu dusíkom pomocou ventilu Firestone sa reakčná zmes nechá 18,5 hodín stáť. 60 ml reakčnej zmesi sa potom rozdelí do štyroch centrifugačných skúmaviek. Každá skúmavka sa preleje vodným roztokom KH_2PO_4 s koncentráciou 1 M. Odstreďuje sa 2 hodiny pri 43000 otáčkach/min. a teplote 4 °C. Supernatanty sa odstránia a pelety sa resuspendujú v tlmivom roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8 (celkový objem pri resuspendovaní je 40 ml). Tento roztok sa preniesie rovnomerne do dvoch centrifugačných skúmaviek z polykarbonátu s objemom 25 ml. Sklené nádoby (homogenizátor Dounce atď.) sa prepláchnu 10 ml fosfátového tlmivého roztoku s pH 8,0. Tento výplach sa použije na doliatie centrifugačných skúmaviek. Uskutoční sa druhá ultracentrifugácia za rovnakých podmienok ako predchádzajúca. Pelety resuspendujú v 30 ml fosfátového tlmivého roztoku s koncentráciou 0,1 M a pH 8,0. Ellmanovou skúškou sa zistí, že celkové množstvo skupín SH je 24 μmol , t. j. asi 100 nmol/mg OMPC. Tiolovaný proteín sa preniesie do banky s okrúhlym dnom s objemom 100 ml. K nemu sa pridá prefiltrovaný roztok 18C-BuA₂-BrAc. Vzniknutá reakčná zmes (t. j. 18C-BuA₂-BrAc s tiolovaným OMPC) sa nechá starnúť v atmosfére dusíka (s odplynením) v dusíkovom boxe pri laboratórnej teplote 89 hodín.

Reakčná zmes sa potom blokuje nasledujúcim spôsobom: k zmesi sa pridajú 2 ml roztoku prefiltrovaného cez filter s veľkosťou pórov 0,22 μm , ktorý obsahuje 75 mg *N*-etylmaleinimidu (NEM) v 5 ml tlmivého roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8,0. Zmes sa nechá starnúť 4 hodiny.

K zmesi sa ďalej pridá 1 ml roztoku prefiltrovaného cez filter s veľkosťou pórov 0,22 μm , ktorý obsahuje 0,5 ml *N*-acetylcystamínu v 2,5 ml tlmivého roztoku s koncentráciou PO_4^{3-} 0,1 M a pH 8,0. Zmes sa nechá 22, 5 hodiny starnúť.

Blokovaný produkt sa potom rovnomerne naplní do štyroch centrifugačných skúmaviek s objemom 25 ml a tie sa dolejú 8 ml tlmivého roztoku s koncentráciou PO_4^{3-} 1 M a pH 8,0. Odstreďuje sa pri otáčkach 43 000 min.⁻¹ 2 hodiny pri 4 °C. Po odstránení supernatantov sa pelety resuspendujú v homogenizátore Dounce v 40 ml tlmivého roztoku TED. Sklené nádoby sa prepláchnu ďalšími 10 ml tlmivého roztoku TED a roztok sa preniesie do dvoch skúmaviek s objemom 25 ml. Tieto skúmavky sa skladujú 15,25 hodiny pri laboratórnej teplote a potom sa 2 hodiny odstredujú pri 24 °C a 43 000 otáčkach/min. Vzniknuté pelety sa resuspendujú v homogenizátore Dounce s celkovým objemom 30 ml tlmivého roztoku TED. Suspenzia sa preniesie do dvoch centrifugačných skúmaviek s objemom 25 ml. Sklené nádoby sa prepláchnu ďalšími 20 ml tlmivého roztoku TED. Opäť sa odstreduje pri otáčkach 43000 min.⁻¹ pri 4 °C 2 hodiny. Pelety sa resuspendujú v 50 ml fosfátového tlmivého roztoku s pH 7,0 a uskutoční sa tretie odstredovanie za rovnakých podmienok. Pelety sa resuspendujú

dujú v 82 ml vody a suspenzia sa po častiach s objemom 20,5 ml prenesie do štyroch sterilných centrifugačných skúmaviek (Falcon) z umelej hmoty s objemom 50 ml. Po starnutí 18 hodín pri 4 °C sa konjugovaný preparát odstreďuje pri 1000 otáčkach/min. 3,5 minúty v centrifúge TJ-6, v rotore TH. Suspenzia výsledného konjugovaného produktu sa skúma na obsah proteínov (stanovenie podľa Lowryho), polysacharidov 18C (fenol/kyselina sírová), nekonjugovaného polysacharidu (chromatografia s rozlíšením veľkosti molekúl - rýchlostná nefelometria) a aminokyselín (analýzator SPINCO):

Polysacharid	339 µg/ml
Proteín	2,57 mg/ml
Voľný polysacharid	pod 5 % (limit experimentálnej chyby)
S-karboxymetylhomocystein/lyzín	0,025
S-karboxymetylcysteamín/lyzín	0,005.

Príklad 26

Príprava medziproduktu Pn4-Ps

1. Ultrazvuková hydrolýza

1,0 g prášku Pn-Ps sa rozpúšťa v 400 ml fyziologického roztoku (0,9 % roztok NaCl) za miešania 4 hodiny pri laboratórnej teplote. Na roztok sa potom pôsobí ultrazvukom v kadičke z plastu, ktorá je v ľadovom kúpeli, sonifikátorom Bronson (kyveta 12,7 mm, nastavená hodnota 8) v 10-minútových intervaloch celkom 20 minút. Po každom intervale sa kontroluje viskozita. Po 20 minútach sonifikácie sa získa konečná hodnota viskozity vzorky $1,267 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Hydrolyzovaná vzorka sa zohreje na laboratórnu teplotu a pridá sa k nej 18,7 g octanu sodného, takže výsledná koncentrácia acetátu je 30 g/liter.

2. Sérologická skúška

Pokusná frakcionácia izopropylalkoholom (IPA) a nefelometrické stanovenie konečného bodu zamerané na protilátku, ktoré sa uskutočňuje s 10 ml vzorky ukazuje, že Pn4-Ps sa zráža pri koncentrácii IPA 45 až 55 %.

3. Prvý prídavok IPA

K hydrolyzovanej vzorke s objemom 385 ml, pripravenej podľa kroku 1, sa pridá 379 ml IPA, takže koncentrácia IPA v roztoku je 49,7 %. IPA sa pridáva po kvapkách za miešania pri laboratórnej teplote. Vzorka sa nechá 15 až 30 minút miešať, a potom sa 30 minút odstreďuje pri 11 000 g (odstredivka Beckman s rotorom JA-10, otáčky 8000 min.⁻¹, 20 °C). Odpadová peleta sa rozdrví v absolútnom etanole v nádobe Omnimix s objemom 250 ml. Tuhé časti sa zhromažďia na sklenej sintrovej frite s objemom 60 ml. Zrazenina sa premyje priamo na frite absolútnym etanolom, potom acetónom a vysuší sa vo vákuu nad CaCl₂ pri laboratórnej teplote v priebehu prípravy na stanovenie.

4. Druhý prídavok IPA a izolácia produktu

K supernatantu s koncentráciou IPA 49,7 % (objem 727 ml) získanému podľa kroku 3 sa pridá po kvapkách za miešania pri laboratórnej teplote 38 ml IPA, takže výsledná koncentrácia IPA je 52,5 %. Vzorka sa nechá starnúť, a potom sa odstreďuje tak ako v kroku 3. Peleta sa rozdrví, zhromažďuje, premyje a vysuší ako v kroku 3. Produkt Pn4-Ps má hmotnosť 516 mg.

5. Dialýza a lyofilizácia

500 mg vzorky Pn-Ps získanej podľa kroku 4 sa rozpúšťa 2 až 3 hodiny v destilovanej vode (200 ml) pri laboratórnej teplote. Roztok s koncentráciou 2,5 mg/ml sa pre-

nesie do dialyzačnej trubice (s priemerom 45 mm, priepustnosť do molekulovej hmotnosti 12 000). Dialyzuje sa 30 hodín proti destilovanej vode s dvoma výmenami destilovanej vody. Potom sa dialyzovaná vzorka prenesie do lyofilizačných baniek. Zmrazí sa na "šupú" v kúpeli zo suchého ľadu a metanolu a lyofilizuje sa v lyofilizátore Virtis (Freezemobile) 2 až 3 dni až do sucha. Získa sa 491 mg produktu Ps s K_d 0,69.

Z tohto opisu by odborníkom v odbore malo byť jasné, že aj iné poddruhy Pn-Ps obsahujúce karboxyskupinu, ako sú Pn1-Ps alebo Pn5-Ps, sa môžu pripraviť a konjugovať uvedeným spôsobom pre Pn4-Ps alebo Pn9V-Ps, ktoré sú aj kyslími polysacharidmi.

Príklad 27

S. *Pneumoniae* druh 4-OMPC konjugát, Pn4-Ps-OMPC

a) Premena živice Dowex 50x2 (200 až 400 mesh) na tetrabutylamóniovú formu [Dowex 50 (Bu₄N⁺)]

Dowex 50x2 (200 až 400 mesh) v H⁺ forme (500 g) sa suspenduje vo vode Cm-66), naplní sa do kolóny a premyva postupne 600 ml vody, 1000 ml roztoku HCl s koncentráciou 6 M a 400 ml vody, kým nie je reakcia roztoku na pH papierik na výtok z kolóny neutrálna. Potom sa premyva 72 g 10 % roztoku tetrabutylamóniumhydroxidu do vtedy, kým nie je reakcia roztoku na pH papierik na výtok z kolóny silno alkalická. Nakoniec sa kolóna premyje 1000 ml vody, aby bol premyvací roztok na výtok z kolóny neutrálny.

b) Príprava tetrabutylamóniovej formy polysacharidu zo S. *Pneumoniae* druh 4 [Pn4 (Bu₄N⁺)]

Živica Dowex 50x2 (Bu₄N⁺) v kolóne s objemom 65 ml sa premyje 520 ml vody. 400 mg Pn4-Ps (so zmenšenou veľkosťou molekuly) sa preleje 35 ml vody a 20 minút sa mieša, čím vznikne roztok. V miešaní sa pokračuje cez noc. Tento roztok sa nastrieka na kolónu a nechá pretekať jej náplňou pomocou gravitácie. Kolóna sa premyje 150 ml vody a spojené eluáty sa lyofilizujú. Získa sa 504 mg Pn4 (Bu₄N⁺) soli.

c) Príprava 1,4-butándiamínového derivátu Pn4 (Pn4-BuA₂)

Pn4 (N-Bu₄N⁺) (97 mg) sa preleje 16 ml DMSO (dimetylsulfoxidu) a zmes sa mieša pri teplote 52 °C 15 minút, aby vznikol roztok. V priebehu tohto času sa všetky tuhé častice rozpustia. Roztok sa ochladí na laboratórnu teplotu.

K tomuto roztoku sa pridajú 2 mg karbonyldiimidazolu (CDI) rozpusteného v 160 µl DMSO a výsledný roztok sa 1 hodinu mieša pri laboratórnej teplote. Pripraví sa roztok obsahujúci 0,500 g 1,4-butándiamíndihydrochloridu (BuA₂·2HCl) v 5 ml vody a jeho pH sa upraví na 10,20 roztokom NaOH s koncentráciou 5 M. Tento roztok sa ochladí v ľadovom kúpeli. K studenému roztoku BuA₂ sa pomaly pridá starnutý roztok DMSO a zmes sa 5 minút mieša v ľadovom kúpeli, a potom 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Potom sa roztok naplní do dialyzačnej trubice Spectrapor 2, trubica sa zaškrtní 13 mm od okraja kvapaliny a dialyzuje sa proti: 1) 4 litrom tlmivého roztoku s koncentráciou Na₂PO₄ 0,1 M a pH 7,0, 15 hodín; 2) 4 litrom tlmivého roztoku s koncentráciou Na₂PO₄ 0,01 M a pH 7,0, 9 hodín; 3) 4 litrom toho istého tlmivého roztoku ako v prípade 2, 21 hodín; 4) 4 litrom vody, 20 hodín. Roztok sa lyofilizuje, a tým sa získa sa 70 mg 1,4-butándiamínového derivátu Pn4 (Pn4-BuA₂). Odmeraním NMR spektra asi 5 mg vzorky a porovnaním integrálu rezonančných pík

vnútorných metylénových skupín butándiamínu s integrálnymi píkami *N*-acetylmetylových skupín z Pn4 sa zistí, že na 100 opakujúcich sa jednotiek polysacharidu pripadá 22 butándiamínových zvyškov.

d) Príprava brómacetylovaných butándiamínových derivátov Pn4 (Pn4-BuA₂-BrAc)

Pn4-BuA₂ (54 mg) sa preleje 5,5 ml tlmivého roztoku (Kolthoffov boráto-fosfátový tlmivý roztok) s koncentráciou 0,1 M a pH 9,04. Zmes sa mieša dovtedy, kým nevznikne roztok. Potom sa pridá 55 mg *p*-nitrofenylbrómacetátu v 1,0 ml acetonitrilu. Výsledná zmes sa mieša 17 hodín pri teplote 4 °C. Potom sa dialyzuje v trubici Spectrapor 2 proti 16 litrom vody trikrát za sebou 24, 8 a 23 hodín. Po dialýze je objem roztoku 12,5 ml. 1,0 ml z tohto roztoku sa odoberie na stanovenie (NMR, Ouchterlonyho stanovenie, stanovenie na viskozimetri Viscotec). K zvyšnému roztoku sa pridá 275 mg suchej soli fosfátového tlmivého roztoku s pH 8,0 (táto soľ sa pripraví lyofilizáciou roztoku fosforečnanu sodného s koncentráciou 0,1 M a pH 8,0). Po rozpustení sa roztok prefiltruje cez filter Corning s pórmí s veľkosťou 0,2 µm. Získa sa vodný roztok Pn4-BuA₂-BrAc s pH 8.

e) Konjugácia OMPC (z *N. meningitidis*) s Pn4-BuA₂-BrAc

5 ml roztoku s proteínovým komplexom z vonkajšej membrány (OMPC) z *N. meningitidis* s koncentráciou 4,34 mg/ml sa odstreďuje v odstredivke Beckman s rotorom 80Ti pri otáčkach 43000 min.⁻¹ pri teplote 4 °C 2 hodiny. Pripraví sa tiolačná zmes rozpustením 85 mg EDTA (disodná soľ kyseliny etyléndiamíntetraoctovej) a 15 mg ditiotritolu (DTT) v 10 ml tlmivého roztoku Na₂B₄O₇ s pH 11,09. K roztoku sa pridá 50 mg *N*-acetylhomocysteíntiolaktónu, a roztok sa potom prefiltruje cez filter s pórmí s veľkosťou 0,2 µm. Pelety získané centrifugáciou podľa postupu uvedeného v texte sa uvoľnia pomocou 5 ml prefiltrovanej tiolačnej zmesi, prenesú sa do homogenizátora Dounce a resuspendujú sa. Resuspendovaný roztok sa preniesie do centrifugačnej skúmavky; tá sa uzavrie septom a vzduch sa nahradí dusíkom pomocou ventilu Firestone. Reakčná zmes nechá 19 hodín starnúť a potom sa preniesie do centrifugačnej skúmavky. Tá sa preleje vodným roztokom KH₂PO₄ s koncentráciou 1 M. Odstredzuje sa 2 hodiny pri 43 000 otáčkach/min. a teplote 4 °C. Supernatanty sa odstránia a pelety sa resuspendujú v 10 ml tlmivého roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8. Tento roztok sa preniesie do centrifugačnej skúmavky a uskutoční sa druhé odstredenie za rovnakých podmienok. Pelety resuspendujú v 11,5 ml roztoku Pn4-BuA₂-BrAc, pripravenom podľa odstavca d). Ellmanovou skúškou sa zistí celkové množstvo 3,44 µmol skupín SH, t. j. 158 nmol SH/mg OMPC. Vzniknutá reakčná zmes (t. j. Pn4-BuA₂-BrAc s tiolovaným OMPC) sa nechá starnúť v atmosfére dusíka (s odplynením) v dusíkovom boxe pri laboratórnej teplote 66 hodín.

Reakčný produkt sa potom blokuje nasledujúcim spôsobom: k zmesi sa pridá roztok prefiltrovaný cez filter s veľkosťou pórov 0,22 µm, ktorý obsahuje 5 mg *N*-etyl-maleinimidu (NEM) v 1 ml tlmivého roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8,0. Zmes sa nechá starnúť 5 hodiny. K zmesi sa ďalej pridá roztok prefiltrovaný cez filter s veľkosťou pórov 0,22 µm, obsahujúci 0,1 ml *N*-acetylcysteaminu v 0,4 ml tlmivého roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 8,0. Zmes sa nechá starnúť 14,5 hodiny.

Reakčná zmes sa potom odstreďuje 2 hodiny pri 43 000 otáčkach/min. a teplote 4 °C. Peleta sa resuspenduje v 8 ml

tlmivého roztoku 1 X TED. Roztok sa nechá starnúť pri laboratórnej teplote cez noc, a potom sa odstreďuje 2 hodiny pri 43000 otáčkach/min. a teplote 4 °C. Peleta sa resuspenduje v 8 ml tlmivého roztoku TED a ihneď za rovnakých podmienok sa odstredí. Peleta sa opäť resuspenduje v 10 ml tlmivého roztoku s koncentráciou PO₄ 0,1 M a pH 7,0 a odstredí sa za rovnakých podmienok. Výsledná peleta sa resuspenduje v 7,5 ml vody. Po starnutí cez noc pri 4 °C sa suspenzia odstreďuje 3 minúty pri 1000 ot./min. Odtiahnutý supernatant obsahuje výsledný konjugát.

Stanovenie:

Obsah proteínov podľa Lowryho: 0,920 mg/ml

Obsah polysacharidov

(fenol/kyselina sírová): 0,212 mg/ml

Ps/Pro = 0,23

SCMHC/lys = 0,031

SCMC/lys = 0,022

Ked' sa tento konjugát podá myšiam alebo africkým zeleným opiciam, vyvolá sa pri nich vysoká tvorba protilátok anti-Pn4-Ps, čo sa zistí pomocou stanovenia ELISA, ktoré je špecifické proti Pn4-Ps.

Priklad 28

Príprava medziproduktu Pn9V-Ps

1. Ultrazvuková hydrolýza

1,0 g prášku Pn9V-Ps sa rozpúšťa v 400 ml fyziologického roztoku (0,9 % roztok NaCl) za miešania 4 hodiny pri laboratórnej teplote. Na roztok sa potom pôsobí ultrazvukom v kadičke z plastu, ktorá je v ľadovom kúpeli, sonifikátorom Bronson (kyveta 1,27 cm, nastavená hodnota 8) vždy 3 minúty. Po tejto úprave sa kontroluje viskozita. Po 13 minútach sonifikácie sa uskutočňuje sonifikácia ďalšiu jednu minútu, aby sa dosiahla konečná hodnota viskozity produktu 1,117.10⁻⁶ m².s⁻¹. Hydrolyzovaná vzorka sa zohreje na laboratórnu teplotu a pridá sa k nej 19,5 g octanu sodného, takže výsledná koncentrácia acetátu je 30 g/liter.

2. Sérologická skúška

Pokusná frakcionácia izopropylalkoholom (IPA) a nefelometrické stanovenie konečného bodu zamerané na protilátku, ktoré sa uskutočňuje s 10 ml vzorky, ukazuje, že Pn9V-Ps sa zráža pri koncentrácii IPA 40 až 45 %.

3. Prvý prídavok IPA

K hydrolyzovanej vzorke s objemom 391 ml, pripravejnej podľa kroku 1, sa pridá 281 ml IPA, takže koncentrácia IPA v roztoku je 41,8 %. IPA sa pridáva po kvapkách za miešania pri laboratórnej teplote. Vzorka sa nechá 15 až 20 minút miešať, a potom sa 30 minút odstreďuje pri 11 000 g (odstredivka Beckman s rotorom JA-10, otáčky 8000 min.⁻¹, 20 °C). Odpadová peleta sa rozdrví v absolútnom etanole v nádobe Omnimix s objemom 250 ml. Tuhé časti sa zhromaždia na sklenej sintrovej frite s objemom 60 ml. Zrazenina sa premyje priamo na frite absolútnym etanolom, potom acetónom a vysuší sa vo vákuu nad CaCl₂ pri laboratórnej teplote v priebehu prípravy na stanovenie.

4. Druhý prídavok IPA a získanie produktu

K supernatantu s koncentráciou IPA 41,8 % (objem 637 ml), získanému podľa kroku 3, sa pridá po kvapkách pri laboratórnej teplote 28,6 ml IPA, takže výsledná koncentrácia IPA v roztoku je 44,3 %. Vzorka sa nechá starnúť, a potom sa odstredí tak ako v kroku 3. Peleta sa rozdrví, zhromaždí, premyje a vysuší ako v kroku 3. Produkt Pn9V-

-Ps má hmotnosť 342,2 mg.

5. Dialýza a lyofilizácia

347 mg vzorky Pn-Ps získanej podľa kroku 4 sa rozpúšťa 4 až 5 hodín v destilovanej vode (139 ml) pri laboratórnej teplote. Roztok s koncentráciou 2,5 mg/ml sa preniesie do dialyzačnej trubice (s priemerom 45 mm, priepustnosť do molekulej hmotnosti 12 000). Dialyzuje sa 25 hodín pri 4 °C proti destilovanej vode s dvoma výmenami destilovanej vody. Potom sa dialyzovaná vzorka preniesie do lyofilizačných baniek. Zmrazí sa na "šupu" v kúpeli zo suchého ľadu a metanolu a lyofilizuje sa v lyofilizátore Virtis (Freezemobile) 2 až 3 dni až dosucha. Získa sa 303,5 mg produktu Ps s K_d 0,60.

6. Tretí prídavok IPA a izolácia produktu

K supernatantu s koncentráciou IPA 44,3 % (objem 655 ml), získanému podľa kroku 3, sa pridá po kvapkách pri laboratórnej teplote 30,8 ml IPA, takže výsledná koncentrácia IPA v roztoku je 46,8 %. Vzorka sa nechá starnúť, a potom sa odstredí tak ako v kroku 3. Peleta sa rozdrví, zhromaždí, premyje a vysuší ako v kroku 3. Produkt Pn9V-Ps má hmotnosť 410,8 mg.

7. Dialýza a lyofilizácia

420,4 mg vzorky Pn-Ps získanej podľa kroku 6 sa rozpúšťa 4 až 5 hodín v 168 ml destilovanej vody pri laboratórnej teplote. Roztok s koncentráciou 2,5 mg/ml sa preniesie do dialyzačnej trubice (s priemerom 45 mm, priepustnosť do molekulej hmotnosti 12 000). Dialyzuje sa 25 hodín proti destilovanej vode s dvoma výmenami destilovanej vody. Potom sa dialyzovaná vzorka preniesie do lyofilizačných baniek. Zmrazí sa na "šupu" v kúpeli zo suchého ľadu a metanolu a lyofilizuje sa v lyofilizátore Virtis (Freezemobile) 3 dni až dosucha. Získa sa 342,5 mg produktu s K_d 0,65.

8. Odborníkom v odbore je jasné, že aj produkty podľa krokov 4 a 6 sa môžu izolovať spoločne prídavkom väčšieho množstva IPA, a potom dialyzovať a lyofilizovať ako jediný produkt. Analytické hodnoty takého produktu by potom zodpovedali hmotnostnému priemeru hodnôt jednotlivých frakcií produktu. Ďalej je tiež jasné, že Pn1-Ps alebo Pn5-Ps sa môžu upravovať rovnakým spôsobom, ako sa to opisuje tu pre Pn9V-Ps alebo Pn4-Ps.

Príklad 29

Konjugácia Pn9V-Ps s OMPC

Pn9V-Ps pripravený podľa príkladu 28 sa konjuguje rovnakým spôsobom ako Pn4-Ps v príklade 27.

Príklad 30

Kvantitatívne stanovenie acetátových skupín v Pn9V/18C-Ps a pyruvátových skupín v Pn4-Ps

Spôsob bol vyvinutý na stanovenie stupňa zachovania obsahu O-pyruvátových skupín v Pn4-Ps a O-acetátových skupín v Pn9V-Ps a Pn18C-Ps počas spracovania pneumokokových (Pn) kapsulárnych polysacharidov (ps). O-Acetyl-ové alebo O-pyruvátové skupiny sa najprv uvoľnia z hydrolyzáta Pn-Ps, identifikujú a kvantitatívne stanovia vysokoučinnou chromatografiou na aneoch, pri ktorej sa vyhodnocuje zníženie vodivosti.

Vzorky spracovaného a nespracovaného Pn4, Pn9V a Pn18C sa analyzujú týmto spôsobom. Predbežné výsledky ukazujú molový pomer pyruvátu ku každej opakujúcej sa jednotke Ps

1 : 1 pre nespracovaný Pn4 a 0,8 : 1 pre Ps so zmenšenou veľkosťou molekuly. Molový pomer acetátu ku každej opakujúcej sa jednotke Ps je 1 : 1 pre nespracovaný Pn18-Ps a 0,8 : 1 pre Pn18C-Ps so zmenšenou veľkosťou molekuly a 1,7 : 1 pre nespracovaný Pn9V a 1,5 : 1 pre Pn9V so zmenšenou veľkosťou molekuly. Molový pomer O-acetátu ku každej opakujúcej sa jednotke Pn pre vodný roztok konjugátu Pn18C-Ps-OMPC je približne 0,5 : 1. V literatúre sa uvádza, že pyruvátová skupina je silným imunodeterminantom pri druhu 4 kapsulárnych polysacharidov a že jej odstránenie vyvoláva značné zmeny v imunologickej špecifite [Heidelberger, M.; Dudman, W. R. a Nimmich, M., "Immunochemical relationships of certain capsular polysaccharides of *Klebsiella, pneumococci* and *Rhizobium*", *J. Immunol.*, 104:1321-1328, (1970); Higginbotham, J. D., Heidelberger, M. a Gotschlich, E., "Degradation of pneumococcal type-specific polysaccharide with exposure of group-specificity" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67: 138-143, (1970)]. Podobne odstránenie O-acetátovej skupiny pri druhu Pn18C-Ps polysacharidu ničí jeho imunologickú špecifitu [Estrada-Parra, S. a Heidelberger, M., "The specific polysaccharide of type XVIII pneumococcus" *Biochemistry*, 2:1288-1294 (1963)]. Preto bolo dôležité vyvinúť na kvantitatívny spôsob stanovenia acetátu a pyruvátu v Pn18C-Ps a Pn4. O-Acetyl-ové skupiny v Pn9V môžu tiež hrať dôležitú úlohu v imunologickej štruktúre Pn9V, pretože de-O-acetyl-ovaný Pn9V nemá antigénnu reaktivitu, čo sa zistilo rýchlostnou nefelometriou.

V súvislosti s prácou na vynáleze sa zistilo, že O-acetát sa ľahko uvoľní z Pn9V a Pn18C-Ps v alkalických podmienkach (pH 11) pri 4 °C a že O-pyruvát sa ľahko uvoľní z Pn4 pri zohrievaní pri teplote 65 °C. Zistilo sa aj to, že acetát a pyruvát sa dajú oddeliť od hydrolyzovanej vzorky Pn-Ps použitím stĺpca Omnipac PAX500 pri rýchlosti prietoku 1 ml/min., pričom ako mobilná fáza sa použije roztok NaOH s koncentráciou 0,98 mM a 2 % roztok MeOH. Detekcia sa uskutočňuje na základe potlačenia vodivosti použitím roztoku H_2SO_4 s koncentráciou 25 mM ako regeneračného činidla pri rýchlosti prietoku 10 ml/min. Optimálne podmienky hydrolyzy na kvantitatívnu HPLC analýzu O-acetátu Pn18C-Ps a Pn9V a O-pyruvátu z Pn4 sa uvádzajú v tomto príklade.

Vybavenie

Prístroj Dionex BioLC je vybavený predkolónou Omnipac PAX-500 a analytickou kolónou (rozmery 4,6 x 250 mm). Detekcia na základe zníženia vodivosti sa uskutočňuje s použitím roztoku kyseliny sírovej s koncentráciou 25 mM ako regeneračného činidla. Prietoková rýchlosť sa nastaví na 10 ml/min. pomocou autoreglačnej jednotky Dionex. Program pre mobilnú fázu a gradientový program na separáciu acetátu a pyruvátu zo vzorky hydrolyzovaného Pn-Ps uvádza nasledujúca tabuľka:

Čas	% fázy 1	% fázy 2	% fázy 3	% fázy 4	prietok (ml/min.)
0	98	2	0	0	1
12,5	98	2	0	0	1
12,6	58	2	0	40	1,5
20,0	58	2	0	40	1,5
20,1	98	2	0	0	1,5
30,0	98	2	0	0	1,5
30,1	98	2	0	0	1
50,0	98	2	0	0	1

fáza 1 - 1 mM roztok hydroxidu sodného

fáza 2 - 100 % metanol

fáza 3 - 200 mM roztok hydroxidu sodného

fáza 4 - voda.

Za týchto podmienok a použitím detektora s citlivosťou 3 μ S sa môžu ľahko detegovať množstvá 4 nmol acetátu s retenčným časom približne 5,2 min. alebo 4 nmol pyruvátu s retenčným časom približne 9,5 min.

Príprava vzorky

Uskutoční sa titrácia purifikovaných vzoriek Pn-Ps (získaných z Merck Manufacturing Division) podľa Karl-Fischerova použitia volumetrického titrátora vlhkosti Aqua-star V 300. Touto titráciou sa stanoví zvyšková voda. Potom sa vzorky rozpustia vo vode Milli-Q tak, aby ich koncentrácia bola 1,0 mg sušiny/ml. Aby sa zo vzoriek Pn9V-Ps a Pn18C-Ps s koncentráciou 100 μ g/ml odstránil O-acetát, pôsobí sa na ne 16 hodín pri laboratórnej teplote roztokom NaOH s koncentráciou 2 mM. Vzorky Pn4-Ps sa 16 hodín hydrolyzujú roztokom HCl s koncentráciou 1 mM pri teplote 65 °C, aby sa z nich odstránil O-pyruvát. Vo vzorkách Pn9V a Pn18C-Ps so zmenšenou veľkosťou molekuly a vo vodnom roztoku konjugátu Pn18C-Ps-OMPC sa uskutoční aj stanovenie obsahu monosacharidov pomocou ionexovej chromatografie na anexe pri vysokom pH s pulznou amperometrickou detekciou. Stanovenie obsahu monosacharidov sa uskutočňuje na to, aby sa zistila správna koncentrácia Pn-Ps vo vzorke so zmenšenou veľkosťou molekuly a vo vzorke vodného roztoku konjugátu.

Standarty acetátu, pyruvátu a N-acetylmanozamínu sa rozpustia v Milli-Q H₂O na koncentráciu 200 nmol/ml.

Hydrolyza vzoriek a štandardov

Podmienky na de-O-acetyláciu Pn18C-Ps sa skúmajú tak, že sa na Pn18C-Ps pôsobí roztokom NaOH so štyrmi rôznymi koncentraciami (1, 2, 5 a 50 mM) pri rôznych teplotách (4, 25, 45 a 65 °C) a v priebehu rôzneho časového intervalu (3, 5 a 16 hodín). Pri štandardných roztokoch acetátu, pyruvátu a N-acetylmanozamínu sa sleduje, či podmienky nevyhnutné na de-O-acetyláciu nespôsobia aj degradáciu acetátu/pyruvátu alebo stratu N-acetylových skupín.

Odstránenie pyruvátu z Pn4 sa sleduje po spracovaní buď roztokom NaOH (s koncentráciou 50 mM pri 100 °C, 16 hodín), alebo roztokom HCl s rôznymi koncentraciami (1, 10 a 100 mM) pri rôznych teplotách (65, 85 a 100 °C) a v priebehu rôznych časových intervalov (3, 5 a 16 hodín).

Rýchlostná nefelometria

Meria sa aktivita vzoriek Pn9V-Ps, Pn18C-Ps a Pn4-Ps pred a po de-O-acetylácii alebo de-O-pyruvylácii pri rýchlostnej nefelometrii. Vzorky sa zriedia na koncentráciu 1; 1,5; 2 a 2,5 μ g/ml.

Vysokoučinná chromatografia na princípe rozlíšenia veľkosti molekúl [High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC)]

Stanovenie pomocou HPSEC pri Pn9V-Ps, Pn18C-Ps a Pn4 sa uskutočňuje pred a po de-O-acetylácii alebo de-O-pyruvylácii. Kolóna TSK G6000PW s rozmermi 7,5 x 600 mm s obmedzovačom toku, temperovaná na teplotu 50 °C pri tlaku 5,5 až 6,9 MPa sa privedie do rovnovážneho stavu roztokom octanu sodného s koncentráciou 0,2 M pri prietoku 0,3 ml/min. Na kolónu sa nasťieka 60 μ g vzorky (vo forme roztoku s koncentráciou 1 mg/ml) a eluuje sa mobilnou fázou pri prietoku 0,3 ml/min. Po prechode kolónou sa do eluátu dávkuje roztok NaOH s koncentráciou 0,5 M rýchlosťou 0,5 ml/min. Takto zriedený eluát sa sleduje v pulznom amperometrickom detektore Dionex a meria sa jeho K_d.

Skúška citlivosti a linearity

Linearita a citlivosť detektora sa stanoví pre pyruvát aj pre acetát pri 3 μ S. Najnižšie stanovitelné množstvo pyruvátu a acetátu je 0,125 nmol. Odpoveď detektora pre obidve zložky je lineárna do množstva 2 nmol, pričom korelačný koeficient pre pyruvát je 0,9999 a pre acetát 0,9992.

Optimalizácia na vyštípenie O-acetátu z Pn18C-Ps

Predbežné štúdie časového priebehu hydrolyzy Pn18C-Ps ukázali citlivosť O-acetyl skupiny na alkalickú hydrolyzu pri nízkych teplotách. Na úplnú de-O-acetyláciu Pn18C-Ps pri 4 °C stačí roztok NaOH s koncentráciou 2 mM pri 16 hodinách inkubácie. Hydrolyza pri vyšších teplotách (nad 25 °C) spôsobí uvoľnenie N-acetátu z N-acetylmanozamínu, ktorý interferuje so stanovením O-acetátu z Pn9V. Optimálnymi podmienkami hydrolyzy na stanovenie O-acetátu z Pn-Ps sú teplota 4 °C a čas 16 hodín. Pri pôsobení roztoku NaOH s koncentráciou 2 mM na štandard N-acetylmanozamín pri laboratórnej teplote počas 16 hodín sa odstráni menej ako 1 % acetátu.

Optimalizácia odstránenia O-pyruvátu z Pn4

Počiatkové hydrolytické štúdie sa pri Pn4 uskutočňovali s použitím roztoku NaOH. Rýchlo sa však zistilo, že pri použití roztoku NaOH sa uvoľní len veľmi malé množstvo pyruvátu. Počiatkové kontrolné pokusy ukázali, že pyruvát sa odštiepuje z Pn4 vo vode pri teplote 100 °C. Po získaní tejto informácie sa rozhodlo uskutočňovať optimalizačné pokusy na uvoľnenie O-pyruvátu z Pn4 hydrolyzou roztokom HCl pri zvýšenej teplote. Pri vyšších teplotách dochádza k určitej degradácii pyruvátu. To sa môže demonštrovať na vzorke pyruvátového štandardu, ktorý hydrolyzuje za rovnakých podmienok ako Pn4. Maximum pyruvátu sa získa vtedy, keď sa hydrolyza uskutočňuje roztokom HCl s koncentráciou 1 mM 16 hodín pri 65 °C.

Stanovenie O-acetátu a O-pyruvátu vo vzorkách Pn-Ps

Rôzne vzorky reprezentujúce Pn-Ps, Pn-Ps so zmenšenou veľkosťou molekuly a jeden konjugát Pn18C-Ps-OMPC sa analyzujú na obsah O-acetátu a pyruvátu HPLC stanovením uvedeným v texte. HPLC analýza sa uskutočňuje po uvoľnení O-acetátu z Pn9V-Ps/18C roztokom NaOH s koncentráciou 2 mM pri laboratórnej teplote alebo po uvoľnení O-pyruvátu z Pn4-Ps roztokom HCl s koncentráciou 1 mM pri teplote 65 °C. Výsledky tohto pokusu sú uvedené ďalej:

Vzorka	Pomer pyruvát/acetát ku každej opakujucej sa jednotke Ps
Pn4, vzorka 1	1,0
Pn4, vzorka 2	0,8
Pn9V, vzorka 1	1,7
Pn9V, vzorka 2	1,5
Pn18C-Ps, vzorka 1	1,0
Pn18C-Ps, vzorka 2	0,8
Pn18C-Ps, vodný roztok	0,5

Výsledky ukazujú, že retencia vedľajších skupín v Pn-Ps so zmenšenou veľkosťou molekuly je približne 90 % pre Pn9V a 80 % pre Pn4 a 18C. Retencia O-acetátu v konjugátovom vodnom roztoku Pn18C-Ps-OMPC je približne 50 %. Teoretické hodnoty pre Pn18C-Ps a Pn4 sú 1 mol acetátu alebo pyruvátu na mol Ps opakujucej sa jednotky a pre Pn9V je tento pomer 2 : 1. [(Jansson, P.-E., Lindberg, B. a Lindquist, U. "Structural studies of the capsular polysaccharides from Streptococcus pneumoniae Type 4"

Carbohydr. Res., 95: 73 - 80, (1981). Lugrowski, C. a Jennings, H. J. "Structural determination of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 18C." Carbohydr. Res. 131: 119 - 129 (1984). Perry, M. B., Daoust, V. a Carlos, D. J. "The specific capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 9V." Can. J. Biochem. 59: 524 - 533, (1981)]. Nižšia retencia O-acetátu v konjugáte Pn18C-Ps-OMPC je pravdepodobne spôsobená citlivosťou O-acetyllových skupín na hydrolýzu v alkoholových podmienkach pri nízkych teplotách.

Meria sa aj aktivita vzoriek Pn4, Pn9V a Pn18C-Ps a príslušných de-O-acetylovaných a de-O-pyruvylovaných vzoriek pri rýchlostnej nefelometrii. Výsledky ukazujú, že po odstránení týchto bočných skupín (acetátu a pyruvátu) je strata aktivity úplná, dokonca aj pri vzorkách s nezmeneňnou hodnotou K_d . Hodnoty K_d sa získajú stanovením pomocou HPSEC, ktoré je uvedené. No hodnota K_d vzorky Pn4 po de-O-pyruvylácii miernou kyslou hydrolýzou sa zvýši z 0,60 na 0,68. Údaje antigénnosti pre Pn4 a Pn18C-Ps podporujú štúdie tých autorov, ktorí považujú prítomnosť týchto skupín (acetátu a pyruvátu) za dôležitú pre imunologickú reaktivitu pneumokokových polysacharidov. Výsledky získané pre Pn9V ponúkajú hypotézu, že okrem kyseliny glukurónovej sú dôležitými imunologickými determinantmi aj O-acetyl skupiny tejto molekuly.

Uvedeným spôsobom sa podarilo vyvinúť citlivú metódu kvantitatívneho stanovenia O-pyruvylovaných skupín v Pn4 a O-acetátových skupín v Pn9V a Pn18C-Ps. Táto metóda je cenná na určenie správneho postupu pri znižovaní molekuly a konjugácii Pn4, Pn9V a Pn18C-Ps tak, aby sa zachovala antigénna štruktúra týchto polysacharidov.

Príklad 31

Izolácia konjugátu Pn6BC-Ps-MIEP

1. Dve vzorky konjugátvej reakčnej zmesi (jedna dialyzovaná proti vode, druhá nedialyzovaná) sa skladujú pri teplote 3 až 8 °C až do použitia.

2. K vzorkám sa pridá tlmivý roztok (0,2 MOPS, pH 7,2) tak, aby sa získala konečná koncentrácia približne 7 mM. K vzorke sa pridá tuhý Gu HCl až po konečnú koncentráciu 4,2 M.

(Poznámka: malo by sa pridať množstvo 1,42 Gu HCl/ml vzorky, aby sa kompenzovalo zväčšenie objemu spôsobené prídavkom tuhého Gu HCl. Podobne prídavok tlmivého roztoku by sa mal upraviť s ohľadom na zväčšenie objemu tak, aby sa zloženie vzorky viac podobalo zloženiu eluentu pre kolónu. Alternatívne sa vzorka môže dialyzovať proti eluentu pre kolónu pred chromatografiou).

3. 2,8 ml vzorky (obsahujúcej 1 mg proteínu, čo sa zistí stanovením proteínov podľa Lowryho) sa nasťrie na kolónu s rozmermi 2,6 x 96 cm s náplňou Sephacryl S-1000. Kolóna sa privedie do rovnovážneho stavu 10 mM tlmivým roztokom MOPS s pH 7,2 a 6 M GuHCl pri rýchlosti prietoku 0,6 ml/min. Eluát z kolóny sa sleduje kontinuálne pri vlnovej dĺžke 280 nm pomocou detektora Perkin Elmer LC235 so sústavou diód. Zberajú sa frakcie s objemom 3 ml.

4. Rozdelenie proteínov je podobné ako pri spektre založené na A 280 a rozdelenie Pn6B-Ps je založené na teste RIA špecifickom pre Pn6B-Ps. Na základe poznania elučných polôh samotného Pn6B-Ps-BrAc a jeho fyzikálnych zmesí s inaktivovaným MIEP sa spoja frakcie obsahujúce Ps aj proteín a tie, ktoré sa elujú z iných polôh ako polôh poz-

rovaných pri Pn6B-Ps-BrAc, sa predbežne označia za konjugát Pn6B-Ps-MIEP.

5. Spojené roztoky konjugátu sa skoncentrujú ultrafiltráciou použitím membrány YM-30 a diafiltrujú sa použitím Milli-Q vody. Obsah proteínu a Pn6B-Ps sa odhadne podľa kvantitatívnych analýz zloženia. Prítomnosť SCMHC sa stanoví analýzou aminokyselín.

Príklad 32

Priame RIA stanovenie pneumokokového polysacharidu Pn18C-Ps

Toto stanovenie sa používa na kvantitatívne stanovenie pneumokokového polysacharidu druhu 18C. Ide o RIA stanovenie mnohovrstvové, sendvičového typu (multilayer sandwich RIA). Králičí anti-Pn18C-Ps sa zachytí na guľôčkach z polystyrénu. Guľôčky sa inkubujú v roztoku vzorky obsahujúcej Pn18C-Ps. Po inkubácii sa guľôčky premyjú a inkubujú sa ešte raz v druhom roztoku, ktorý obsahuje myšiacu protilátku na Pn18C-OMPC. Po tejto inkubácii sa guľôčky premyjú a inkubujú sa tretí raz v roztoku, ktorý obsahuje označený ^{125} I-koží anti-myšiaci IgG. Guľôčky sa ešte raz premyjú, a potom sa prenású do skúmaviek z plastu na počítanie. Pri kvantitatívnom stanovení sa neznáme vzorky Pn18C-Ps porovnávajú so štandardnou krivkou.

Vybavenie

1. Súprava na RIA stanovenie: Abbot Labs, Diagnostic Div., katalógové číslo 6171-10;
2. Systém Qwik Wash (Abbot Labs, Diagnostic Div.);
3. Upraviteľné pipety a pipetové špičky na jedno použitie (Eppendorf digital);
4. Gama-počítač (Abbott Autologic);
5. 6,35mm polystyrénové perly so zrkadlovým leskom (Precision Plastic Ball Co., 3000 N. Cicero Ave., Chicago, Illinois 60641, USA).

Činidlá

1. Anti-Pn18C-Ps protilátka šarža R18-44 alebo jej ekvivalent (New York State Health Services);
2. Myšacie anti-Pn18C-Ps OMPC antisérum (spojený produkt 11260-235 alebo jeho ekvivalent);
3. Kozie anti-myšacie IgG ^{125} I-označené antisérum (NEX 159, New England Nuclear 549 Albany Street, Boston, MA, 02118, USA);
4. Inkubačný tlmivý roztok: RCM8 obsahujúci
1,0 % BSA Sigma A2153
0,1 % azidu Sigma 52002

5. Riedidlo

- | | |
|-----------------------------------|-------------|
| 8 dielov fetálneho telacieho séra | Sigma F3885 |
| 1 diel kozieho séra | Sigma G6767 |
| 1 diel králičieho séra | Sigma R4505 |
| 0,05 % TWEEN 20 | Sigma P1379 |
| 0,1 g azidu | Sigma 52002 |

3. Pridá sa jedna guľôčka so zachyteným anti-Pn18C-Ps do každej jamky na miske, ktorá obsahuje vzorku alebo štandard, a miska sa mierne mieša, aby sa zaistilo úplné pokrytie všetkých guľôčok tlmivým roztokom.

4. Miska sa zakryje lepivým krytom zo súpravy RIA a 6 hodín sa inkubuje pri laboratórnej teplote.

5. Miska sa premyje v prístroji Qwik Wash deionizovanou vodou.

6. Myšacie anti-18C protilátka sa zriedi riedidlom 1 : 1000.

7. 200 µl tohto roztoku sa pridá do každej jamky obsahujúcej guľôčku.

8. Miska sa zakryje a inkubuje cez noc pri laboratórnej teplote.

9. Miska sa premyje v prístroji Qwik Wash deionizovanou vodou.

10. Kozia antitýmšacia protilátka označená ^{125}I sa zriedi riedidlom asi 1 : 160 na koncentráciu 15 000 cpm/µl.

11. 20 µl tohto roztoku sa pridá do každej jamky obsahujúcej guľôčku.

12. Miska sa zakryje a inkubuje 2 hodiny pri teplote 37 °C.

13. Miska sa premyje v prístroji Qwik Wash deionizovanou vodou.

14. Guľôčky sa prenesú do skúmaviek z plastu zo súpravy RIA a na vhodnom gama-počítači sa určí počet rozpadov.

Výpočet

1. Z meraní uskutočňovaných dvakrát pre každú vzorku, štandard a slepý pokus (inkubačný tlmivý roztok) sa vypočíta priemer. Od hodnôt vypočítaných pre štandardy a vzorky sa odčíta hodnota pre slepý pokus.

2. Do kalkulátora vybaveného na štatistické výpočty sa vložia údaje pre štandardnú krivku a vypočíta sa korelačný koeficient a smernica priamky.

3. Použitím vhodnej štandardnej krivky (zvláštna pre voľné a konjugované vzorky) sa vypočíta odpoveď vzoriek a uskutočnia sa korekcie na zriedenie.

Rovnaký postup ako opísaný postup sa môže použiť pri akomkoľvek Pn-Ps s tým, že sa príslušným spôsobom nahradia druhovo špecifické činidlá.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Konjugát obsahujúci imunogénny proteín, ktorým je proteínový komplex vonkajšej membrány (OMPC) *Neisseria meningitidis* b, alebo jeho podjednotka MIEP, kde MIEP znamená hlavný proteín zvyšujúci imunitu, pričom tento proteín je kovalentne viazaný s polysacharidom odvodeným od jedného alebo viacerých poddruhov *Streptococcus pneumoniae*, pričom uvedený polysacharid obsahuje v priemere menej ako 1200 opakujúcich sa jednotiek na molekulu, jeho molekulová hmotnosť je medzi 1×10^5 a 1×10^6 , polydisperzita medzi 1,0 a 3,0 a hladina kontaminácie pneumokokovým skupinovo špecifickým C-polysacharidom je nižšia ako 3 % tohto druhovo špecifického polysacharidu.

2. Konjugát podľa nároku 1, v ktorom má uvedený polysacharid hodnotu antigénnosti medzi 0,4 a 1,1.

3. Konjugát podľa nároku 1, v ktorom má uvedený polysacharid hodnotu indexu antigénnosti medzi 0,7 a 1 a vnútornú viskozitu medzi 0,6 a 3,0 dl/q.

4. Konjugát podľa nároku 1 alebo 3, v ktorom je uvedený polysacharid odvodený od akéhokoľvek poddruhu *Streptococcus pneumoniae* vybraného zo skupiny 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F a 33F.

5. Konjugát podľa nároku 4, v ktorom uvedený polysacharid má polydisperzitu medzi 1,0 a 3,0, hladinu kontaminácie C-polysacharidom nižšiu ako 3 % vzhľadom na druhovo špecifický polysacharid a je odvodený od

i) *Streptococcus pneumoniae* 6B, pričom v tomto prípade má polysacharid

a) hodnotu M_N medzi 3×10^5 a 6×10^5 ;

b) hodnotu K_d pík, $0,60 \pm 0,05$;

c) hodnotu M_w medzi 3×10^5 a 7×10^5 ;

d) vnútornú viskozitu v roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 7,2 medzi 1,0 a 2,0 dl/q a

e) v priemere menej ako 1000 opakujúcich sa jednotiek na molekulu;

ii) *Streptococcus pneumoniae* 14, pričom v tomto prípade má polysacharid

a) hodnotu M_N medzi 3×10^5 a 8×10^5 ;

b) hodnotu K_d pík, $0,60 \pm 0,05$;

c) hodnotu M_w medzi 4×10^5 a 1×10^6 ;

d) vnútornú viskozitu v roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 7,2 medzi 0,6 a 1,6 dl/q a

e) v priemere menej ako 1200 opakujúcich sa jednotiek na molekulu;

iii) *Streptococcus pneumoniae* 19F, pričom v tomto prípade má polysacharid

a) hodnotu M_N medzi 2×10^5 a 6×10^5 ;

b) hodnotu K_d pík, $0,65 \pm 0,05$;

c) hodnotu M_w medzi 2×10^5 a 6×10^5 ;

d) vnútornú viskozitu v roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 7,2 medzi 1,0 a 2,0 dl/g a

e) v priemere menej ako 1000 opakujúcich sa monomérnych jednotiek na molekulu;

iv) *Streptococcus pneumoniae* 23F, pričom v tomto prípade má polysacharid

a) hodnotu M_N medzi 2×10^5 a 6×10^5 ;

b) hodnotu K_d pík, $0,54 \pm 0,05$;

c) hodnotu M_w medzi 4×10^5 a 8×10^5 ;

d) vnútornú viskozitu v roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 7,2 medzi 1,5 a 3,0 dl/g a

e) v priemere menej ako 1000 opakujúcich sa monomérnych jednotiek na molekulu;

v) *Streptococcus pneumoniae* 4, pričom v tomto prípade má polysacharid

a) hodnotu M_N medzi 2×10^5 a 4×10^5 ;

b) hodnotu K_d pík, $0,65 \pm 0,05$;

c) hodnotu M_w medzi 2×10^5 a 5×10^5 ;

d) vnútornú viskozitu v roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 7,2 medzi 1,0 a 3,0 dl/g a

e) v priemere menej ako 600 opakujúcich sa monomérnych jednotiek na molekulu;

vi) *Streptococcus pneumoniae* 9V, pričom v tomto prípade má polysacharid

a) hodnotu M_N medzi 3×10^5 a 6×10^5 ;

b) hodnotu K_d pík, $0,65 \pm 0,05$;

c) hodnotu M_w medzi 3×10^5 a 7×10^5 ;

d) vnútornú viskozitu v roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 7,2 medzi 1,0 a 2,0 dl/g a

e) v priemere menej ako 800 opakujúcich sa monomérnych jednotiek na molekulu;

vii) *Streptococcus pneumoniae* 18C, pričom v tomto prípade má polysacharid

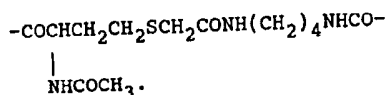
a) hodnotu M_N medzi 2×10^5 a 6×10^5 ;

- b) hodnotu K_d pík, $0,65 \pm 0,05$;
 c) hodnotu M_w , medzi 2×10^5 a 6×10^5 ;
 d) vnútornú viskozitu v roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 7,2 medzi 1,5 a 3,0 dI/g a
 e) v priemere menej ako 700 opakujúcich sa monomérnych jednotiek na molekulu;
 alebo zmes ktorýchkoľvek z týchto polysacharidov.

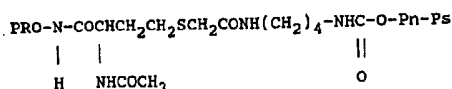
6. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, v ktorom má uvedený polysacharid hodnotu polydisperzity medzi 1,0 a 1,4.

7. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, v ktorom je proteín viazaný na uvedený polysacharid pomocou dvojväzbových medzerníkov obsahujúcich tioéterovú skupinu a primárnu aminoskupinu, ktoré tvoria hydrolytický labilné kovalentné väzby medzi polysacharidom a proteínom.

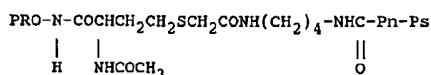
8. Konjugát podľa nároku 7, v ktorom je proteín viazaný na pneumokokový polysacharid pomocou medzerníka obsahujúceho reťazec vzorca



9. Konjugát podľa nároku 7, v ktorom je proteín PRO viazaný na pneumokokový polysacharid Pn-Ps pomocou medzerníka, ktorého zloženie je zrejme zo vzorca



v prípade väzieb sprostredkovaných hydroxylovými skupinami polysacharidu alebo



v prípade polysacharidov nesúcich karboxylové skupiny.

10. Konjugát podľa nároku 7, 8 alebo 9, kde v konjugáte je hmotnostný pomer Pn-Ps : OMPC alebo Pn-Ps : MIEP medzi asi 0,05 a 0,5 a po hydrolyze a analýze aminokyselín je pomer SCMHC/lys medzi 0,01 a 0,15, pričom SCMHC znamená S-karboxymetylhomocystein a lys znamená lyzín.

11. Spôsob výroby konjugátu podľa nároku 1, v y z n a ě u j ú c i s a t ý m , že zahŕňa

- a) izoláciu surového pneumokokového polysacharidu Pn-Ps;
 b) čiastočnú hydrolyzu alebo mechanické šmykové spracovanie surového Pn-Ps;
 c) derivatizáciu frakcionovaného Pn-Ps odvodeného od jedného alebo viacerých pneumokokových poddruhov, získaného podľa krokov a) až b) s cieľom zaviesť vyčnievajúce bočné nukleofilné alebo elektrofilné skupiny;
 d) izoláciu OMPC alebo jeho podjednotky z *Neisseria meningitidis*;
 e) funkcionalizáciu OMPC alebo jeho podjednotky s cieľom zaviesť reaktívne elektrofilné alebo nukleofilné skupiny;
 f) konjugáciu polysacharidu z kroku c) proteínom z kroku e);

g) blokovanie konjugátu na odstránenie zvyškových funkčných skupín;

h) izoláciu konjugátového produktu, kde OMPC a Pn-Ps majú uvedený význam.

12. Spôsob výroby konjugátu podľa nároku 1, v y z n a ě u j ú c i s a t ý m , že zahŕňa

a) kultiváciu pneumokokov a izoláciu surového pneumokokového polysacharidu alebo solubilizáciu práškoveho pneumokokového polysacharidu;

b) purifikáciu a čiastočnú hydrolyzu polysacharidu z kroku a) až po vopred stanovenú hranicu za vzniku polysacharidu schopného konjugácie, ktorý nestratil viac ako 30 % polysacharidovej druhovo špecifickej antigénnosti v porovnaní so surovým polysacharidom z kroku a) a

c) konjugáciu produktu z kroku b) s imunogénnym proteínom;

príčom pneumokoky kultivované v kroku a) zahŕňajú aspoň jeden poddruh zvolený zo skupiny obsahujúcej poddruhy 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F a 23F; Pn-Ps si zachováva svoju antigénnu integritu podľa merania Ouchterlonyho dvojitou imunodifúznou skúškou alebo rýchlostnou nefelometriou s použitím anti-Pn-Ps druhovo špecifickej protilátky; a Pn-Ps sa pred konjugáciou fyzikálne spracováva šmykom v Gaulinovom lise pri tlaku medzi 13,74 a 103,05 MPa alebo sa hydrolyzuje zahrievaním pri 100 °C 24 hodín alebo pôsobením ultrazvuku dovtedy, kým sa nedosiahne pri koncentrácii Pn-Ps 1 mg/ml v roztoku chloridu sodného s koncentráciou 0,9 M konečná hodnota viskozity alebo K_d pík, ktoré sú pre každý poddruh Pn-Ps uvedené v tabuľke II a III.

13. Spôsob podľa nároku 12, v y z n a ě u j ú c i s a t ý m , že kroky b) a c) zahŕňajú

b) 1. prípadnú adsorpciu aniónových nečistôt na dietylami-noetylcelulóze, pričom pH roztoku je 5;

2. čiastočnú hydrolyzu Pn-Ps v roztoku na vopred stanovenú konečnú hodnotu viskozity, ktorá je zvolená tak, že po hydrolyze sa schopnosť Pn-Ps viazať antipneumokokovú druhovo špecifickú protilátku nezníži o viac ako 30 % v porovnaní so surovým Pn-Ps, pričom táto hydrolyza sa usku-točňuje:

*) zahrievaním pri teplote 50 až 150 °C počas jednej až 48 hodín alebo

**) sonifikáciou počas 5 s až 5 min., v závislosti od nastave-nej hodnoty sonifikácie, nasledovanou ochladením a ďal-šou sonifikáciou;

***) pôsobením strižných síl v Gaulinovom lise pri tlaku 13,74 až 103,05 MPa;

c) frakcionáciu hydrolyzovaného Pn-Ps a výber frakcie s molekulovou hmotnosťou medzi 1×10^5 a 1×10^6 pomocou

i) postupu založeného na rozličnej rozpustnosti v alkohole s použitím izopropylalkoholu s koncentraciami vopred určenými na zrážanie Pn-Ps so žiadanou veľkosťou molekúl a-lebo

ii) frakcionácie s využitím kvapalinovej chromatografie na kolóne schopnej zachytiť a rozlíšiť molekuly polysacharidu s veľkosťou v rozmedzí 5×10^4 až 1×10^6 ;

príčom konečná hranica pre hydrolyzu alebo pôsobenie strižných síl sa stanoví viskozimetricky pri koncentrácii Pn-Ps 1 mg/ml v roztoku s koncentráciou fosforečnanu sodného 0,1 M a pH 7,2 alebo chromatograficky pre každý u-vedený polysacharid podľa konečných hodnôt viskozity a-

lebo K_d pík, ktoré sú pre jednotlivé poddruhy Pn-Ps uvedené v tabuľke II a III.

14. Vakcínový prípravok, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje konjugát podľa nároku 1 a inertný nosič, ktorým je oxid hlinitý, fosforečnan hlinitý alebo oxid hlinitý, pričom konjugát obsahuje jeden až všetky konjugáty vybrané zo skupiny obsahujúcej Pn4-Ps-OMPC, Pn6B-Ps-OMPC, Pn9V-Ps-OMPC, Pn14-Ps-OMPC, Pn18C-Ps-OMPC, Pn19F-Ps-OMPC, Pn23F-Ps-OMPC, Pn1-Ps-OMPC, Pn5-Ps-OMPC, Pn7F-Ps-OMPC.

15. Použitie konjugátu podľa niektorého z nárokov 1 až 10, pričom konjugát obsahuje jeden až všetky konjugáty vybrané zo skupiny obsahujúcej Pn4-Ps-OMPC, Pn6B-Ps-OMPC, Pn9V-Ps-OMPC, Pn14-Ps-OMPC, Pn18C-Ps-OMPC, Pn19F-Ps-OMPC, Pn23F-Ps-OMPC, Pn1-Ps-OMPC, Pn5-Ps-OMPC, Pn7F-Ps-OMPC, na výrobu kombinovaného vakcínového prípravku proti *Pneumococcus* a jednej až všetkým chorobám zvoleným zo súboru zahŕňajúceho hepatitis B, hepatitis A, hepatitis non-A non-B, AIDS, záškrt-čierny kašeľ-tetanus, osýpky, príušnice, ružienku, ovčie kiahne, detskú obrnu a *Haemophilus influenzae b*.

Koniec dokumentu
