

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235826**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **408955**

(51) Int.Cl.
A61K 39/112 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)

(22) Data zgłoszenia: **22.07.2014**

(54) **Immunogeny koniugat i jego zastosowanie w profilaktyce i leczeniu zakażeń wywołanych przez pałeczki jelitowe z rodziny Enterobacteriaceae**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
01.02.2016 BUP 03/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
02.11.2020 WUP 17/20

(73) Uprawniony z patentu:

**SIEĆ BADAWCZA ŁUKASIEWICZ – PORT
POLSKI OŚRODEK ROZWOJU TECHNOLOGII,
Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANNA JARZĄB, Wrocław, PL
ANDRZEJ GAMIAN, Wrocław, PL
DANUTA WITKOWSKA, Wrocław, PL
EDMUND ZIOMEK, Wrocław, PL**

PL 235826 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest koniugat białka nośnikowego i antygeny peptydowego, stanowiącego epitop białka OmpC, mający zastosowanie jako szczepionka chroniąca przed zakażeniami powodowanymi przez pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae*, szczególnie gatunki z rodzaju *Shigella*. Przedmiotem wynalazku jest również kompozycja farmaceutyczna, kompozycja diagnostyczna i szczepionka zawierająca rzeczony koniugat oraz sposób otrzymywania koniugatu i jego zastosowanie.

Bakterie z rodzaju *Shigella* są jednymi z najniebezpieczniejszych wśród patogennych gatunków należących do rodziny *Enterobacteriaceae*. Shigelozę (dysenteria, czerwonka bakteryjna), to choroba charakteryzująca się ostrym zapaleniem przewodu pokarmowego, wywołanym wnikaniem bakterii do komórek nabłonkowych wyściełających ściany jelit. Do najbardziej charakterystycznych objawów shigelozy należą wodniste, krwawe lub śluzowe biegunki, nudności, wymioty, gorączka i bóle brzucha.

Wśród gatunków *Enterobacteriaceae* na specjalną uwagę zasługuje grupa bezwzględnych patogenów, w szczególności gatunki z rodzajów *Shigella*, *Salmonella* i *Yersinia*, odpowiedzialne za bakteryjne zakażenia pokarmowe, zwłaszcza pałeczki będące bezpośrednią przyczyną biegunek, duru brzuszego, czerwonki bakteryjnej i innych schorzeń jelitowych. Pałeczki jelitowe wraz z paciorkowcami i gronkowcami wymieniane są jako jeden z najczęściej występujących i najpoważniejszych czynników etiologicznych zachorowań o podłożu bakteryjnym. Według raportów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) na 4,5 miliarda przypadków zachorowań, zatrucia pokarmowe są przyczyną śmierci 1,9 miliona osób rocznie i zajmują trzecie miejsce wśród chorób o największym odsetku śmiertelności na świecie. Ponadto szacuje się, że do około 99% wszystkich zgonów dochodzi w krajach rozwijających się, a w szczególności dotyczy to noworodków i dzieci poniżej piątego roku życia. Zakażenia pokarmowe, powodowane przez pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae* stanowią zagrożenie dla ludności na całym świecie, w szczególności wśród uchodźców, żeglarzy i turystów, którzy mogą przenosić zakażenie wskutek geograficznego przemieszczania się ludności. Z danych statystycznych wynika, że około 50% wszystkich podróżujących do krajów Trzeciego Świata choruje na tzw. „biegunkę podróżnych”.

Rozprzestrzenianie się wśród bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* mechanizmów oporności na antybiotyki, a także pojawienie się szczepów wykazujących oporność wielolekową, jest ważnym i trudnym problemem terapeutycznym. Ze względu na duże podobieństwo mikroorganizmów należących do tej rodziny, trudniejsze jest odróżnienie poszczególnych gatunków, szczególnie ich identyfikacja. Komplikuje to podjęcie właściwych procedur terapeutycznych, umożliwiających leczenie, zwłaszcza dobór odpowiedniej, ukierunkowanej i skutecznej antybiotykoterapii. Wydaje się zatem, że działaniem najskuteczniejszym powinna być profilaktyka. W tym pojęciu mieści się zarówno zachowanie odpowiedniej higieny sanitarnej, jak i badania dotyczące nowych leków, lecz także opracowanie i szczegółowa charakterystyka dodatkowych czynników umożliwiających szybką diagnostykę zakażeń oraz działania prewencyjne, zmierzające do opracowania szczepionek chroniących przed zakażeniami wywoływanymi przez te patogeny.

Ze stanu techniki znane są szczepionki złożone z żywych, atenuowanych (osłabionych) szczepów (Barnoy S., Baqar S., Kaminski R.W., Collins T., Nemelka K., Hale T.L., Ranallo R.T., Venkatesan M.M.: *Shigella sonnei* vaccine candidates WRSs2 and WRSs3 are as immunogenic as WRSs1, a clinically tested vaccine candidate, in a primate model of infection. *Vaccine*, 2011; 29(37): 6371–637) lub zabitych komórek bakteryjnych, inaktywowanych wysoką temperaturą, działaniem promieniowania lub czynników chemicznych, wykazujących zdolność do wzbudzania odpowiedzi immunologicznej związanej z przewodem pokarmowym. W przypadku konstrukcji szczepionek zawierających żywe, lecz osłabione szczepy bakteryjne rozważane jest użycie mutantów otrzymanych w wyniku delecji w obrębie genu białka virG, odpowiedzialnego za ruchliwość komórek *Shigella*, wiążącą się z wykorzystaniem włókien aktynowych. Prace ilustrujące rezultaty przeprowadzonych badań klinicznych znajdujących się aktualnie w I i II fazie opublikowali Ranallo R.T., Fonseka S., Boren T.L., Bedford L.A., Kaminski R.W., Thakkar S., Venkatesan M.M.: *Two live attenuated Shigella flexneri 2a strains WRSf2G12 and WRSf2G15: a new combination of gene deletions for 2nd generation live attenuated vaccine candidates*. *Vaccine*. 2012; 30(34): 5159–5171.

Ponadto pałeczki *S. flexneri* 2a pozbawiono genów odpowiedzialnych za ekspresję enterotoksyn (*senA*, *senB*) oraz genu odpowiedzialnego za ekspresję acylotransferazy lipidu A (*msbB2*), który w przypadku użycia do szczepionek otrzymanych w wyniku tych modyfikacji szczepów WRSf2G12 i WRSf2G15 prowadzi do podniesienia bezpieczeństwa szczepionki. Obydwa szczepy są silnie osłabione i zachowują stabilność genetyczną, zarówno w testach *in vitro*, prowadzonych na liniach komór-

kowych jak i *in vivo* na modelach zwierzęcych. Badania przeprowadzone na świnkach morskich wykazały, że po immunizacji zwierząt podanej do oka dochodzi do silnej indukcji zarówno układowej jak i śluzówkowej odpowiedzi immunologicznej. Stwierdzono, że zwierzęta immunizowane atenuowanymi szczepami WRSf2G12 oraz WRSf2G15 są chronione przed infekcją homologicznym dzikim szczepem *Shigella flexneri* (Ranallo R.T., Fonseka S., Boren T.L., Bedford L.A., Kaminski R.W., Thakkar S., Venkatesan M.M.: *Two live attenuated Shigella flexneri 2a strains WRSf2G12 and WRSf2G15: a new combination of gene deletions for 2nd generation live attenuated vaccine candidates. Vaccine. 2012; 30(34); 5159–5171*).

Podobne modyfikacje są wprowadzane w genomie *Shigella sonnei*. Delecje wprowadzone w obrębie genu białka VirG uniemożliwiły temu patogenowi rozprzestrzenianie się w obrębie tkanek gospodarza, a także gwarantowały indukcję ochronnej odpowiedzi immunologicznej przeciwko temu patogenowi. Tak przygotowany szczep był podstawą szczepionki WRSS1, która znalazła się w I fazie badań klinicznych. Jednak pojawienie się u niektórych wolontariuszy skutków ubocznych takich jak gorączka i lekkie biegunki, było przyczyną wprowadzenia dodatkowych mutacji zmierzających do zmniejszenia toksyczności, spowodowanej obecnością w WRSS1 dużych ilości lipopolisacharydu. Podobnie jak w przypadku szczepów *S. flexneri*, mutant szczepu *S. sonnei* WRSS1 został dodatkowo osłabiony przez unieczynnienie genów *senA*, *senB* (WRSS2) oraz dodatkowo *msbB2* (WRSS3). Badania przeprowadzone na małpach rebus wykazały, że zarówno WRSS2 jak i WRSS3 powodują u zwierząt wzbudzenie układowej i śluzówkowej odpowiedzi immunologicznej na podobnym poziomie jak w przypadku użycia szczepu WRSS1, jednocześnie gwarantując użycie bezpieczniejszej szczepionki o porównywalnej immunogenności (Barnoy S., Baqar S., Kaminski R. W., Collins T., Nemelka K., Hale T.L., Ranallo R.T., Venkatesan M.M.: *Shigella sonnei vaccine candidates WRSS2 and WRSS3 are as immunogenic as WRSS1, a clinically tested vaccine candidate, in a primate model of infection. Vaccine, 2011; 29(37); 6371–6378*).

Szczepionki atenuowane składają się więc z odpowiednio osłabionej wersji żywego mikroorganizmu, która nie jest w stanie wywołać zakażenia. Zastosowanie w szczepionce tego typu drobnoustrojów jest zabiegiem najlepiej imitującym wywołanie naturalnej infekcji i prowadzi to do wytworzenia pełnowartościowej pamięci immunologicznej, pozwalającej w przypadku wniknięcia do organizmu tego patogenu na rozpoznanie jego antygenów. Szczepionki te wzbudzają obydwa typy odpowiedzi immunologicznej, zarówno komórkową jak i humoralną i wywołują długotrwałą odporność po podaniu zaledwie 1–2 dawek szczepionki. Niestety zastosowanie szczepionek atenuowanych niesie zawsze pewne ryzyko zakażenia poszczepiennego, związane z możliwością rewersji drobnoustroju do formy zjadliwej na skutek mutacji lub może wynikać również z niedostatecznej inaktywacji zjadliwych patogenów, lub mogą wystąpić reakcje uboczne, między innymi alergię spowodowane obecnością wielu komponentów wchodzących w skład komórek bakteryjnych.

Ponadto, szczepionki zawierające żywe czy osłabione szczepy nie mogą być podawane osobom, z zespołem nabytego upośledzenia odporności (np. chorzy na AIDS) oraz pacjentom, znajdującym się w czasowej niedyspozycji immunologicznej, do których należą chorzy na różnego typu nowotwory, poddawani chemioterapii.

Uzyskiwanie osłabionych szczepów wirusów, których genom jest relatywnie mały, jest procesem znacznie łatwiejszym niż atenuacja komórek bakteryjnych, których genom jest zdecydowanie większy. W przypadku wirusów bardzo często wystarczającym czynnikiem mutagennym prowadzącym do osłabienia drobnoustroju jest hodowla wirusa w niesprzyjających warunkach do jego rozwoju. Natomiast w przypadku wyposażonych w tysiące różnych genów bakterii, proces atenuacji jest dużo bardziej skomplikowany i trudniejszy do kontrolowania. Bardzo często w celu unieczynnienia kluczowych dla patogennych bakterii genów wymagane jest zastosowanie metod inżynierii genetycznej.

Alternatywą do szczepionek atenuowanych są szczepionki inaktywowane, zawierające zabite szczepy mikroorganizmów. Jedną z obiecujących szczepionek, która jest aktualnie w I fazie badań klinicznych, jest szczepionka SsWC złożona z komórek *Shigella sonnei* inaktywowanych formaliną. Badania przedkliniczne nad szczepionką SsWC pokazały, że ma ona właściwości immunogenne i po zakażeniu świnek morskich winilentnym szczepem *Shigella sonnei* działa ochronnie przeciwko zapaleniu rogówki. Przeprowadzone na małej grupie ochotników badania kliniczne pozwoliły stwierdzić, że podanie $2,0 \times 10^8$ inaktywowanych komórek bakteryjnych w różnych odstępach czasowych i w różnej liczbie dawek przez 4 tygodnie, powoduje podwyższenie miana przeciwciał anty-SsWC, anty-LPS oraz anty-IpaC w surowicy i kale wolontariuszy. Ponadto szczepionka ta była dobrze tolerowana przez organizm i nie zanotowano żadnych objawów ubocznych związanych z wystąpieniem gorączki czy

zakażeniem układu pokarmowego. Po szczepieniu SsWC miano przeciwciał klasy IgG oraz IgA w surowicy ochotników wykazywało tendencje wzrostowe. Spośród 7 szczepionych ochotników wzrost przeciwciał anty-SsWC, anty-LPS i anty-IpaC stwierdzono odpowiednio u 6 (86%), 4 (57%) i 5 (61%) osób. Obecność wydzielniczych IgA badano u 5 osób, z których 5 (100%) posiadało przeciwciała skierowane przeciwko SsWC, 3 (42%) przeciwko LPS i 3 (42%) przeciwko IpaC (McKenzie R., Walker R.I., Nabors G.S., Van De Verg L.L., Carpenter C., Gomes G., Forbes E., Tian J.H., Yang H.H., Pace J.L., Jackson W.J., Bourgeois A.L.: *Safety and immunogenicity of an oral, inactivated, whole-cell vaccine for Shigella sonnei: preclinical studies and a Phase I trial. Vaccine. 2006; 24(18): 3735–3745*). Szczepionka ta powoduje wzbudzenie odpowiedzi na LPS, który jest specyficzny dla danego serotypu, wywołuje również specyficzną odpowiedź immunologiczną na białka stanowiące antygeny plazmidu odpowiedzialnego za adhezję i inwazję bakterii na komórki nabłonkowe (Ipa – Invasion plasmid antigen). Zaletą jest fakt, że wzbudza ona odpowiedź śluzówkową związaną z jelitem, a także odpowiedź układową, w dużej mierze zbliżoną do wywoływanej podczas naturalnego zakażenia patogenem. Przygotowanie jej jest stosunkowo tanie, a podanie nieskomplikowane i niewymagające zastosowania igieł. Jednak należy zauważyć, że doustna szczepionka SsWC zawierająca całe, zabite komórki bakteryjne jest jednak o małym stopniu zdefiniowania i standaryzacji, ponieważ zawiera szeroki panel antygenów bakteryjnych (McKenzie R., Walker R.I., Nabors G.S., Van De Verg L.L., Carpenter C., Gomes G., Forbes E., Tian J.H., Yang H.H., Pace J.L., Jackson W.J., Bourgeois A.L.: *Safety and immunogenicity of an oral, inactivated, whole-cell vaccine for Shigella sonnei: preclinical studies and a Phase I trial. Vaccine. 2006; 24(18): 3735–3745*).

W odróżnieniu od żywych i osłabionych szczepów zabite patogeny są bardziej stabilne i bezpieczniejsze, a także łatwiejsze w transporcie i przechowywaniu. Niemniej jednak szczepionki te wywołują słabszą odpowiedź odpornościową, którą charakteryzuje krótsza pamięć immunologiczna. Z tego też względu skuteczna immunizacja wymaga najczęściej podania kilku dawek przypominających. Inaktywacja patogenów może także doprowadzić do zmian konformacji antygenów obecnych na powierzchni komórek, a tym samym do obniżenia ich właściwości immunogennych (Burke C.J., Hsu T.A., Volkin D.B.: *Formulation, stability, and delivery of live attenuated vaccines for human use. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1999;16(1): 1–83*).

Problemy związane ze stosowaniem całych komórek bakteryjnych w szczepionkach nie dotyczą szczepionek nowej generacji, zawierających jedynie zestaw wyselekcjonowanych antygenów wzbudzających specyficzną odpowiedź immunologiczną, co zasadniczo ogranicza występowanie efektów ubocznych. Rozwój nowoczesnych technologii sprawił, że badania związane z rozwojem wielu chorób zakaźnych oraz poszukiwanie antygenów do szczepionek zaczęto rozpatrywać na poziomie genomowym i proteomicznym. Wyselekcjonowane składniki szczepionek podjednostkowych umożliwiają identyfikację czynników bezpośrednio zaangażowanych w indukcję odpowiedzi odpornościowej. Chemiczna synteza antygenów stanowiących sekwencje epitopów peptydowych lub polisacharydowych, jak również izolacja określonych frakcji komórkowych drobnoustrojów oraz ekspresja białek wirulentnych szczepów w innych systemach (np. bakteryjnych, wirusowych, drożdżowych, zwierzęcych, roślinnych) stanowią podstawę w rozwoju szczepionek podjednostkowych i koniugatowych.

W przypadku szczepionek chroniących przed rozwojem czerwonki bakteryjnej pod uwagę brane są szczepionki podjednostkowe, oparte na antygenach powierzchniowych, takich jak np. lipopolisacharydy (LPS) (Lowell G.H., Kaminski R.W., Grate S., Hunt R.E., Charney C., Zimmer S., Colleton C.: *Intranasal and intramuscular proteosome-staphylococcal enterotoxin B (SEB) toxoid vaccines: immunogenicity and efficacy against lethal SEB intoxication in mice. Infect. Immun., 1996; 64: 1706–1713*), czy białka błony zewnętrznej ściany komórkowej (Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: *Białka osłony komórkowej pałeczek jelitowych i ich udział w patogenności oraz odporności przeciwbakteryjnej. Postępy Hig. Med. Dośw. 2009; 63: 176-199*), a także szczepionki hybrydowe, z antygenami pochodzącymi z wielu różnych mikroorganizmów (np. *Shigella*, *E. coli*, *S. typhi*), które mogą chronić organizm przed kilkoma chorobami jednocześnie (Kotloff K.L., Herrington D.A., Hale T.L., Newland J.W., Van De Verg L., Cogan J.P., Snoy P.J., Sadoff J.C., Formal S.B., Levine M.M.: *Safety, immunogenicity, and efficacy in monkeys and humans of invasive Escherichia coli K-12 hybrid vaccine candidates expressing Shigella flexneri 2a somatic antigen. Infect. Immun., 1992; 60: 2218–2224*).

Invaplex 50 stanowiący kompleks inwazyjny: IpaB, IpaC, IpaD wyizolowanych z *Shigella flexneri* 2a oraz LPS, jest typem szczepionki podjednostkowej dobrze rokującej we wzbudzaniu ochronnej odpowiedzi immunologicznej na zakażenia pałeczkami czerwonki bakteryjnej. Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że myszy i świnki morskie immunizowane tym kompleksem były chronione

przed letalną dawką wirulentnego szczepu *S. flexneri* (Turbyfill K.R., Kaminski R.W., Oaks E.V.: *Immunogenicity and efficacy of highly purified invasin complex vaccine from Shigella flexneri 2a*. *Vaccine*, 2008; 26: 1353–1364). Sposobem jej produkcji na dużą skalę będzie uzyskiwanie rekombinowanych form białek inwazyjnych, a wchodzący w jej skład LPS będzie ekstrahowany z natywnych komórek bakteryjnych. Wskazuje to jednak na fakt, że koszty opracowania takiej szczepionki, związane z koniecznością oczyszczania wchodzących w jej skład antygenów będą wysokie (Riddle M.S., Kaminski R. W., Williams C., Porter C., Baqar S., Kordis A., Gilliland T., Lapa J., Coughlin M., Soltis C., Jones E., Saunders J., Keiser P.B., Ranallo R.T., Gormley R., Nelson M., Turbyfill K.R., Tribble D., Oaks E.V.: *Safety and immunogenicity of an intranasal Shigella flexneri 2a Invaplex 50 vaccine*. *Vaccine*, 2011; 29(40): 7009–7019).

Badania nad podjednostkową szczepionką zawierającą TTSS białka IpaB oraz IpaD, zostały także przeprowadzone przez inny zespół, gdzie na modelu mysim potwierdzono immunogenność i właściwości ochronne białek IpaB oraz IpaD. Wykazano, że białka te podane razem z adiuwantem w postaci zmodyfikowanej genetycznie ciepło-labilnej toksyny *E. coli*, mają właściwości immunogenne i ochronne. Myszy immunizowane tylko białkiem IpaB lub białkiem IpaB w kompleksie z IpaD oraz wspomagane w obu przypadkach adiuwantem były chronione przed dawką śmiertelną *S. flexneri* i *S. sonnei*. Donosowa immunizacja zwierząt powoduje wzbudzenie układowej oraz śluzówkowej odpowiedzi immunologicznej, skierowanej przeciwko obu tym białkom, a w szczególności przeciwko IpaB. Wadą tej szczepionki poza wskazanym wyżej wysokim kosztem rekombinowanych składników, są efekty uboczne: problemy związane z podrażnieniem błon śluzowych nosa.

Innymi białkami branyymi pod uwagę jako antygeny szczepionek koniugatowych są białka błony zewnętrznej (OMP). Są one eksponowane na powierzchni bakterii i podczas inwazji patogenów jako pierwsze kontaktują się z komórkami zakażanego organizmu. Z tego względu charakteryzuje je wysoki potencjał dla konstrukcji szczepionek podjednostkowych. Analizy immunochemiczne głównych białek błony zewnętrznej *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* i *S. boydii* wykazały podobny profil białkowy oraz reaktywność krzyżową wśród wszystkich czterech gatunków rodzaju *Shigella* (Mulczyk M., Adamus G., Witkowska D., Romanowska E.: *Studies on virulence of Shigella flexneri. Protective effect of outer membrane proteins*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1981; 29: 85–90, Witkowska D., Adamus G., Mulczyk M., Romanowska E.: *Outer membrane protein composition of Shigella flexneri*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1982; 13: 109–111). Szczepionki te dają nadzieję na selektywną ochronę przed określonymi patogenami. Niestety szczepionki zawierające jedynie wybrane antygeny wymagają najczęściej większej liczby dawek przypominających i adiuwantów.

Ze zgłoszenia P.401502 znany jest epitop białka błony zewnętrznej ściany komórkowej z *Shigella flexneri* 3a o sekwencji A1-A2-A3-A4-A5-A6, gdzie:

- A1 oznacza R,
- A2 oznacza Y,
- A3 oznacza D, R, E, N lub Q,
- A4 oznacza E, D, N lub Q,
- A5 oznacza R,
- A6 oznacza Y, G lub F.

wykazujący immunoreaktywność z surowicą ludzką, szczególnie z surowicą krwi pępowinowej.

Pomimo, że badania nad szczepionką zabezpieczającą przed czerwonką bakteryjną prowadzone są z zastosowaniem praktycznie wszystkich najnowszych metod, aktualnie na rynku farmaceutycznym nie jest dostępna żadna licencjonowana szczepionka. Fakt ten nie tylko podkreśla konieczność jej opracowania, ale pokazuje równocześnie, że szczepionka ta nie jest łatwym celem. Wszystkie powyższe podejścia oraz szczepionki posiadają wady, mianowicie, żywe, pozbawione toksyn, inaktywowane, atenuowane szczepionki komórkowe zawierają całe komórki bakteryjne, gdzie istnieje ryzyko zakażenia poszczepionego, możliwość rewersji drobnoustroju do formy zjadliwej, mutacji, niedostatecznej inaktywacji zjadliwych patogenów, mogą wystąpić reakcje uboczne, alergie przez wiele składników komórkowych, stosowanie konstruktów genetycznych, żywe i osłabione szczepy nie mogą być podawane osobom z obniżoną odpornością. Natomiast wadą proponowanych szczepionek podjednostkowych są wysokie koszty i efekty uboczne w postaci problemów związanych z podrażnieniem błon śluzowych nosa.

Problemem w stanie techniki jest brak bezpiecznej i efektywnej szczepionki przeciwko oportunistycznym bakteryjnym patogenom układu pokarmowego. Aby mogła być zaakceptowana, taka szczepionka powinna spełnić szereg kryteriów, takich jak aktywność w śluzówce jelita, zapewnianie długotrwałej osłony immunologicznej, brak skutków ubocznych. Ponadto pożądane jest aby była łatwa

w podawaniu i stosunkowo tania, ponieważ głównym odbiorcą będą dzieci w krajach o niskim poziomie ekonomicznym.

Jednocześnie dotychczasowe podejścia do konstrukcji szczepionek wykazują wiele wad, jak np. długotrwały proces oczyszczania natywnych antygenów, ich denaturacja podczas izolacji, mała standaryzacja preparatów stanowiących mieszanki różnych antygenów.

Celem wynalazku jest więc dostarczenie składników dla szczepionki przeciwko *Enterobacteriaceae*, szczególnie oportunistycznym bakteryjnym patogenom układu pokarmowego, zwłaszcza bakteriom rodzaju *Shigella*, rozwiązującej istniejące problemy i spełniającej powyższe kryteria.

Celem wynalazku jest również dostarczenie sposobu konstruowania szczepionki, wykluczającego możliwość występowania zakażeń w wyniku rewersji osłabionych szczepów do formy wirulentnej.

Przedmiotem wynalazku jest koniugat złożony z nośnika o charakterze hydrofobowym i antygeny peptydowego będącego epitopem białka OmpC, o sekwencji aminokwasowej A1-A2-A3-A4-A5-A6, gdzie:

- A1 oznacza R,
- A2 oznacza Y,
- A3 oznacza D, R, E, N lub Q,
- A4 oznacza E, D, N lub Q,
- A5 oznacza R,
- A6 oznacza Y, G lub F,

a nośnik stanowi polietylen lub nośnik białkowy wybrany z grupy obejmującej toksoid tężcowy, toksoid dyfterytowy, albuminę surowicy wołowej.

Korzystnie antygen peptydowy wybrany jest z grupy obejmującej peptydy o sekwencji aminokwasowej: RYDERY, RYDDRY, RYEERY, RYQERY lub RYDQRY.

Korzystnie antygen peptydowy posiada sekwencję RYDERYIGC.

Korzystnie antygen peptydowy posiada sekwencję GLNRYDERYIGC.

Korzystnie, antygen peptydowy posiada konformację pętli. Przedmiotem wynalazku jest również kompozycja farmaceutyczna zawierająca rzeczony koniugat i dopuszczalny farmaceutycznie nośnik.

Innym przedmiotem wynalazku jest szczepionka zawierająca rzeczony koniugat, dopuszczalny farmaceutycznie nośnik oraz opcjonalnie adjuwant.

Korzystnie, szczepionka indukuje produkcję przeciwciał skierowanych przeciwko pałeczkom jelitowym z rodziny *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza bakteriom z rodzaju *Shigella*.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest szczepionka zawierająca rzeczony koniugat, dopuszczalny farmaceutycznie nośnik oraz opcjonalnie adjuwant do zapobiegania i leczenia chorób wywołanych przez pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza bakterie z rodzaju *Shigella*.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania rzeczonego koniugatu, obejmujący następujące etapy:

- a) zabezpieczenie grup tiolowych białka nośnikowego w drodze bromoacetylacji;
- b) koniugację peptydu z nośnikiem białkowym;
- c) dezaktywację nieprzereagowanych grup bromoacetylowych białka nośnikowego.

Korzystnie, bromoacetylację białka nośnikowego przeprowadza się w buforze węglanowym o pH 8,3 przy pomocy estru N-hydroksyburstynianowego kwasu bromoacetylowego, korzystnie w stężeniu 1 mg estru na 1 mg białka (utrzymując stężenie białka c = 2 mg/ml). Korzystnie, po bromoacetylacji mieszaninę reakcyjną dializuje się do 0,1 M dwuwęglanu sodu o pH 8,3 i usuwa się ester na kolumnie.

Korzystnie, peptydy zawierające grupy tiolowe do koniugacji zawieszają się w 0,1 M buforze węglanowym z 2 mM EDTA o pH 8,3, następnie do roztworu peptydu dodaje się bromoacetylowane białko, po czym pH doprowadza się za pomocą 0,1 M NaOH do wartości 8,5.

Korzystnie, dezaktywację prowadzi się stosując 10 µl 2-merkaptioetanolu na 1 ml mieszaniny reakcyjnej podczas inkubacji przez 1 h w temperaturze pokojowej.

Kolejnym przedmiotem wynalazku rzeczony koniugat do zastosowania jako szczepionka przeciwko *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza bakteriom rodzaju *Shigella*.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie rzeczonego koniugatu do wytwarzania testu diagnostycznego do wykrywania *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza bakterii rodzaju *Shigella*.

Innym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie rzeczonego koniugatu do wytwarzania krwiopochodnych, immunoglobulinowych preparatów terapeutycznych specyficznych wobec *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza bakterii rodzaju *Shigella*.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie rzeczonoego koniugatu do izolacji przeciwciał do biernej immunizacji w terapii zakażeń wywołanych przez pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Korzystnie, zakażenia wywołane są przez bakterie z rodzaju *Shigella*.

Nieoczekiwanie okazało się, że istnieje duża różnica antygenowości pomiędzy koniugatami epitopu peptydowego OmpC i nośnika, i wynika z charakteru zastosowanego nośnika, co dotychczas nie było spotykane. Mianowicie peptydy syntezowane na nośnikach hydrofobowych jak polietylenowe piny, bądź nośniki białkowe jak toksoid tężcowy, toksoid dyfterytowy lub albumina surowicy wołowej, są znacznie lepiej rozpoznawane przez przeciwciała niż takie same peptydy związane z polilizyną (Fig. 7).

Nieoczekiwanie, zmiana nośnika peptydu z hydrofilowej polilizyny na nośnik bardziej hydrofobowy, na przykład polietylen lub białko toksoid tężcowy (TT), znacznie podwyższyła antygenowość koniugatu z surowicą pępowinową oraz immunogenność u myszy. Nieoczywistym jest więc fakt, że biologicznie aktywna konformacja peptydu jest zależna od rodzaju nośnika użytego w koniugacie. W rezultacie zastosowano dla peptydów o budowie epitopu wyłącznie takie nośniki, które dają wysoce immunogeny koniugat. To sugerowało przyjmowanie przez peptyd właściwej konformacji epitopu w warunkach otoczenia hydrofobowego. Takimi nośnikami o wyraźnej hydrofobowości są toksoid tężcowy, toksoid dyfterytowy, powszechnie stosowane w szczepionkach ludzkich, także albumina surowicy wołowej jako białko modelowe. Nieoczywistym rozwiązaniem okazała się synteza peptydu o konformacji pętli, według modelu występującego w cząsteczce białka OmpC, jako epitopu do koniugacji z nośnikiem. Nieoczywistym jest, że peptyd RYDERY wymaga do utworzenia aktywnego epitopu przyjęcia właściwej konformacji, w postaci pętli. Taki epitop rozpoznawany przez przeciwciała pępowinowe formuje się w otoczeniu hydrofobowym, jakie zapewnia polietylen czy nośniki TT, BSA, lecz nie nośnik polilizynowy.

Dobór właściwego nośnika okazał się niezwykle ważny, pozwolił bowiem na wzbudzenie swojej odpowiedzi skierowanej przeciwko rzeczonemu epitopowi, bez użycia adiuwantu. Wcześniejsze eksperymenty pokazały, że peptyd syntezowany na nośniku polilizynowym nie wykazywał tak dobrych właściwości immunogennych, jak peptyd koniugowany z hydrofobowymi nośnikami TT i BSA, umożliwiającymi syntezę koniugatu z peptydem o konformacji pętli.

Przygotowane koniugaty według wynalazku wykazywały w ten sposób immunogenność, objawiająca się indukowaniem wysokiego miana wysoce swoistych immunoglobulin, rozpoznających antygen peptydowy.

Proponowane rozwiązanie dostarcza więc skuteczną i bezpieczną szczepionkę opartą o epitop peptydowy związany do nośnika, szczepionkę pozbawioną materiału genetycznego oraz toksyn, stabilną oraz znacznie tańszą w produkcji i przechowywaniu.

Wyizolowany epitop, nie tylko bez komórki, ale też bez całej reszty wyjściowego białka stanowi aktywny fragment, element niezbędny do konstrukcji szczepionki, pozbawionej całego balastu wysokocząściowego. Sposób przygotowania odchodzi od tradycyjnych metod uzyskiwania szczepionek atenuowanych lub wykorzystujących całe bakterie, czy całe antygeny białkowe.

Syntetyczna szczepionka peptydowa zawierająca rzeczony epitop reprezentuje sekwencje antygenów białkowych, wykazujących szczególną aktywność antygenową i immunogeną, natomiast skoniugowanie epitopu peptydowego z większymi nośnikami, poprawia ich ekspozycję wobec komórek układu odpornościowego.

Szczepionki podjednostkowe, do których zaliczana jest szczepionka peptydowa według wynalazku jest bezpieczna i nie niesie ryzyka zakażenia poszczepiennego. Ponadto szczepionka taka jest stosunkowo tania w produkcji, a także wykorzystuje technologie nieobarczone ryzykiem zakażenia wirulentnym szczepem. Szczepionka według wynalazku jest pozbawiona składników wywołujących dodatkowy odczyn zapalny oraz nadmierną reaktogenność preparatu, takich jak LPS czy toksyny.

Niewątpliwą zaletą stosowania antygenów peptydowych jest posługiwanie się składnikiem dobrze zdefiniowanym i wystandaryzowanym, o strukturze charakterystycznej dla natywnego antygeny białkowego. Szczepionka według wynalazku może być bardzo łatwo i w sposób kontrolowany modyfikowana na drodze chemicznej, co może mieć kluczowe znaczenie, by zapobiec wystąpieniu alergii lub wzbudzeniu odpowiedzi autoimmunologicznej skierowanej przeciw własnym tkankom.

Zastosowanie koniugatu do immunizacji umożliwia zastąpienie szczepionki klasycznej opartej na użyciu termicznie unieczynnionych bakterii, szczepionką opartą na syntetycznych fragmentach reprezentujących główny antygen powierzchniowy komórek bakteryjnych wyizolowany z białka OmpC. W odróżnieniu od szczepionki klasycznej, syntetyczna szczepionka jest bezpieczna, efektywna, tania

i może być produkowana na dużą skalę. Szczepionka zastąpi wszystkie dotychczasowe szczepionki przeciwko zakażeniom *Shigella* i innych patogennych enterobakterii.

Koniugaty złożone z nośników i immobilizowanych na nich peptydów według wynalazku mogą być następnie wykorzystane do przygotowania żelu powinowactwa do izolacji przeciwciał ochronnych z krwi/surowicy dawców. Uzyskane w ten sposób przeciwciała mogą być wykorzystane do wytwarzania krwiopochodnych, immunoglobulinowych preparatów terapeutycznych specyficznych wobec enterobakterii.

Nośniki zawierające immobilizowane na nich peptydy według wynalazku mogą być również wykorzystane do diagnostyki swoistych niedoborów odporności humoralnej. Dzięki swojej specyficzności, testy diagnostyczne zawierające peptydy według wynalazku nadają się szczególnie do oznaczania poziomu przeciwciał specyficznych wobec ważnych patogenów przewodu pokarmowego, które posiadają istotne znaczenie zwłaszcza w pediatrii.

Opis figur

- Fig 1. A. Obraz elektroforetyczny (SDS-PAGE) monomeru toksoidu tężcowego (5 µg) oraz koniugatów RYDERYIGC:TT (5 µg) i GLNRYDERYIGC:TT (5 µg); B. Obraz elektroforetyczny (SDS-PAGE) BSA (2 µg) oraz koniugatów RYDERYIGC:BSA (2 µg) i GLNRYDERYIGC:BSA (2 µg).
- Fig. 2. A. Widmo MALDI-TOF-MS monomeru TT oraz koniugatów RYDERYIGC:TT i GLNRYDERYIGC:TT, B. Widmo MALDI-TOF-MS BSA oraz koniugatów RYDERYIGC:BSA i GLNRYDERYIGC:BSA.
- Fig. 3. A. Reaktywność absorbowanej przez TT surowicy krwi pępowinowej z białkiem OmpC, TT oraz koniugatami GLNRYDERYIGC:TT i RYDERYIGC:TT. B. Reaktywność surowicy nieabsorbowanej krwi pępowinowej z białkiem OmpC, BSA oraz koniugatami GLNRYDERYIGC:BSA i RYDERYIGC:BSA.
- Fig. 4. Miano przeciwciał anty-OmpC klasy IgG w surowicy mysiej po I, II, III i IV immunizacji zwierząt koniugatami GLNRYDERYIGC:TT oraz RYDERYIGC:TT, białkiem TT oraz PBS.
- Fig.5. A. Poziom przeciwciał IgG w surowicy mysiej* po 4 immunizacjach odpowiednimi antygenami w teście z OmpC. B. Poziom przeciwciał IgG w surowicy mysiej po immunizacji koniugatami peptydu GLNRYDERYIGC z TT/BSA w teście peptydem RYDERY zsyntetyzowanym na 15 identycznych pinach polietylenowych.

Wprowadzone na Fig. 5 oznakowanie grup to odpowiednio:

(Gr.1 na rycinie G1) – po 4-krotnej immunizacji koniugatem GLNRYDERYIGC:TT

(Gr.2 na rycinie G2) – po 4-krotnej immunizacji koniugatem GLNRYDERYIGC:BSA

(Gr.3 na rycinie G3) – po 2-krotnej immunizacji koniugatem GLNRYDERYIGC:TT i po 2-krotnej immunizacji koniugatem GLNRYDERYIGC:BSA

(Gr.4 na rycinie G4) po 4-krotnej immunizacji białkiem nośnikowym TT

(Gr.5 na rycinie G5) po 4-krotnej immunizacji białkiem nośnikowym BSA

(Gr.6 na rycinie G6) po 4-krotnej immunizacji PBS

Fig. 6. Wyniki testu ELISA obrazujące siłę wiązania poszczególnych peptydów po cyklizacji z przeciwciałami ludzkiej krwi pępowinowej.

Fig. 7. Immunizacja myszy koniugatem GLNRYDERYIG-poly-Lys oraz immunizacja myszy koniugatem GLNRYDERYIGC:TT w adiuwancie MPL oraz bez zastosowania dodatkowego adiuwantu.

Przedmiotowy wynalazek przedstawiono w przykładach wykonania nie ograniczających jego zakresu ochrony.

P r z y k ł a d 1 Koniugacja peptydu z białkiem nośnikowym.

Etap 1. Bromoacetylowanie białka. Celem zabezpieczenia przed dimeryzacją peptydy zawierające Cys przed koniugacją do nośnika białkowego, rozpuszczano w metylofosfinie (ok. 10-krotny nadmiar metylofosfiny w stosunku do ilości peptydu) i suszono peptyd pod argonem, szczelnie zamykając fiolkę. Wolne grupy aminowe w białku nośnikowym przed koniugacją bromoacetylowano w 0,1 M buforze węglanowym o pH 8,3 przy pomocy estru N-hydroksybutyrynianowego kwasu bromoacetylowego w stężeniu 1 mg estru na 1 mg białka (utrzymując stężenie białka c = 2 mg/ml) przez 3 godz. w temperaturze pokojowej na mieszadle rotacyjnym. Podczas bromoacetylowania utrzymywano stałe pH w granicach 8,3 przy pomocy 0,1 M NaOH. Po reakcji mieszaninę dializowano do 0,1 M dwuwęglanu sodu o pH 8,3 i usuwano ester na kolumnie PD-10. Bromoacetylowane białko zagęszczano na membranie do stężenia 10–20 mg/ml. Stopień bromoacetylowania określano oznaczając wolne grupy aminowe przed i po bromoacetylowaniu przy pomocy TNBS (kwas 2,4,6-trinitrobenzen sulfonowy).

Etap 2. Koniugacja. Peptydy do koniugacji zawierające grupy tiolowe zawieszano w 0,1 M buforze węglanowym z 2 mM EDTA o pH 8,3 w stężeniu 10–50 mg/ml. Do roztworu peptydu w ciągu 1 min dodawano bromoacetylowane białko, pH doprowadzano za pomocą 0,1 M NaOH do wartości 8,5. Stosunek peptydu do białka zawierał się między 50 a 100 mol/mol. Stężenie białka utrzymywano w granicach 2 mg/ml, dostosowywano natomiast stężenie peptydu. Reakcję koniugacji prowadzono przez noc, ok. 16 godz. w temperaturze pokojowej na mieszadle rotacyjnym w szczelnie zamkniętym naczyniu pod argonem.

Etap 3. Dezaktywacja nieprzereagowanych grup bromoacetylowych białka nośnikowego. Dezaktywację prowadzono stosując 10 µl 2-merkaptoetanolu na 1 ml mieszaniny reakcyjnej przez 1 godz. w temperaturze pokojowej.

Etap 4. Analiza koniugatu. Proces koniugacji monitorowano w 6% (koniugaty z TT) lub 12,5% (koniugaty z BSA) żelu poliakrylamidowym w SDS-PAGE (Fig. 1). Procentowość żelu poliakrylamidowego uzależniono od masy cząsteczkowej białka nośnikowego. Stopień obsadzenia cząsteczki białka peptydami mierzono z wykorzystaniem MALDI-TOF-MS (Fig. 2).

P r z y k ł a d 2 Reaktywność koniugatów peptydowych z przeciwciałami ludzkiej krwi pępowinowej, oznaczana techniką dot-blot.

Membranę Immobilon P zwilżano nanosząc punktowo po 2 µl metanolu. Następnie na zwilżone miejsca nanoszono roztwory antygenów (koniugatów peptydowych, białek nośnikowych – kontrola negatywna, białka OmpC – kontrola pozytywna) w odpowiednim stężeniu i pozostawiano je do całkowitego wyschnięcia. Wolne miejsca na membranie blokowano w 10 ml 1% roztworu BSA w TBS-T przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie membranę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę w 5 ml roztworu przeciwciał/surowicy w odpowiednim rozcieńczeniu w buforze TBS-T z 1% BSA i płukano 3-krotnie w buforze TBS-T. Na kolejnym etapie procedury membranę inkubowano w roztworze przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fosfatazą alkaliczną w rozcieńczeniu 1:10 000 • i płukano 3-krotnie w buforze TBS-T. Następnie membranę umieszczano w roztworze substratu, zawierającym 5 ml buforu do fosfatazy alkalicznej, 15% BCPI, 30% NBT. Reakcję przerywano przez zanurzenie membrany w wodzie.

P r z y k ł a d 3 Oznaczenie immunogenności koniugatów peptydowych na modelu mysim.

Sześciotygodniowe myszy BALB/c w grupach po 6 sztuk każda immunizowano dootrzewnowo antygenami. Antygeny (10 µg) podawano 4-krotnie w 200 µl PBS lub w buforze PBS w odstępach 7-dniowych, zgodnie ze schematem:

Gr.1 – 4-krotna immunizacja koniugatem GLNRYDERYIGC:TT

Gr.2 – 4-krotna immunizacja koniugatem GLNRYDERYIGC:BSA

Gr.3 – 2-krotna immunizacja koniugatem GLNRYDERYIGC:TT i 2-krotna immunizacja koniugatem GLNRYDERYIGC:BSA

Gr.4 – 4-krotna immunizacja białkiem nośnikowym TT (grupa kontrolna)

Gr.5 – 4-krotna immunizacja białkiem nośnikowym BSA (grupa kontrolna)

Gr.6 – 4-krotne podanie PBS (grupa kontrolna)

Stopień wzbudzonej odpowiedzi immunologicznej określano po 4-krotnej immunizacji zwierząt, oznaczając przeciwciała klasy IgG w teście ELISA wobec białka OmpC (Fig. 5a) oraz w teście ELISA na pinach polietylenowych przeciwko epitopowi RYDERY (Fig. 5b). Przygotowano i przetestowano koniugaty oparte na białkach nośnikowych. W tym celu przeprowadzono koniugację peptydów GLNRYDERYIGC oraz RYDERYIGC z białkami toksoid tężcowy (M = 158,5 kDa) i BSA (M = 66,97 kDa), oraz OVA i DT. Wszystkie koniugaty wykazywały właściwości antygenowe, co potwierdziło ich oddziaływanie z przeciwciałami pępowinowymi. Badane na modelu mysim okazały się immunogenami, w szczególności koniugaty zawierające sekwencję przedłużonego epitopu: GLNRYDERYIGC. Peptyd o sekwencji epitopu RYDERY, w szczególności dłuższa wersja GLNRYDERYIG, która ma lepsze właściwości immunogenne, może służyć jako antygen w konstrukcji szczepionki koniugatowej. Potwierdziły to m.in. eksperymenty dotyczące określenia wzrostu poziomu swoistych przeciwciał anti-RYDERY po immunizacji myszy koniugatami GLNRYDERYIGC:TT/BSA. Zastosowanie koniugatów TT skutkowało podniesieniem miana przeciwciał anti-OmpC po immunizacji koniugatem GLNRYDERYIGC:TT. Mniej immunogenny był koniugat zawierający krótszy peptyd RYDERYIGC:TT a peptyd RYDERY bez aminokwasów flankujących, mimo właściwości antygenowych, jest słabszym immunogenem. Do immunizacji nie zastosowano adiuwantów, co oznacza, że wzbudzana odpowiedź jest wysoce specyficzna i skierowana wobec cząsteczki epitopu w koniugacie. Surowice po immunizacji koniugatami zawierały też przeciwciała wobec nośnika (Fig 5a i Fig 5b).

Przykład 4 Badanie struktury przestrzennej cyklicznych peptydów metodami *in silico*.

Analizę konformacji peptydów zbadano z wykorzystaniem modelu ich struktury z wykorzystaniem metod *in silico*. W tym celu, z wykorzystaniem serwisu pep-fold (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/PEP-FOLD/>) wygenerowano szereg modeli peptydów zawierających motyw RYDERY. Przy wyborze najlepszego modelu posłużono się wartością sOPEP (Optimized Potential for Efficient structure Prediction) jako kluczową wartością wskazującą na model jak najbardziej natywny lub bliski natywnemu, stanowiący strukturę przestrzenną peptydu. Z tego względu w badaniach *in silico*, konformacje epitopów w roztworach wodnych zostały wyznaczone tylko na podstawie obliczeń uzyskanych dla modeli peptydów z najniższą energią sOPEP. Analizę konformacji uzyskanych modeli przeprowadzono w programie Chimera.

Przykład 5 Cyklizacja peptydów zsyntezowanych na pinach polietylenowych oraz badanie antygenowości z przeciwciałami ludzkiej krwi pępowinowej.

Syntezę prowadzono rotacyjnie usuwając z aminokwasu blokujące grupy Fmoc i sprzęgając je z kolejnymi aminokwasami. Odblokowanie grupy Fmoc przeprowadzono pod wyciągiem w 20% roztworze piperydiny w DMF (dimetyloformamid) przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie piny płukano w DMF, potem w metanolu i suszono pod wyciągiem. Aminoacylację prowadzono przez 4 godz. lub przez noc w temperaturze pokojowej umieszczając piny w 100 μ l roztworu 60 mM pochodnej Fmoc aminokwasu z 65 mM HoAt (1-hydroksy-7-azabenzotriazol) i 60 mM DIC (diizopropylkarbodiimid) w DMF oraz używając 50 μ M błękitu bromofenolowego, jako wskaźnika zakończenia reakcji acylacji. Po zakończonej syntezie wszystkie peptydy poddawano N-acetylacji za pomocą roztworu acetylującego zawierającego 3% bezwodnik kwasu octowego i 0,5% DIEA (N,N-diizopropyletylamina) w DMF przez 90 min w temperaturze pokojowej. Następnie piny płukano w metanolu i suszono na powietrzu. Usunięcie grup blokujących łańcuchy boczne aminokwasów użytych do syntezy przeprowadzono przez zanurzenie pinów w roztworze odblokującym, zawierającym 5% anizol i 2,5% 1,2-ditioctan w stężonym kwasie trifluoroctowym (TFA). Następnie piny płukano w metanolu, następnie w roztworze 0,5% kwasu octowego w 50% metanolu oraz dwukrotnie w metanolu i suszono. Przed poddaniem peptydów zsyntetyzowanych na pinach polietylenowych procesowi cyklizacji oraz testom biochemicznym, piny zanurzano w roztworze denaturującym, umożliwiającym dokładne rozdzielanie poszczególnych peptydów oraz ich właściwą ekspozycję. W tym celu sonikator wypełniano ogrzonym do 55–65°C 0,1 M buforem fosforanowym (pH 7,2), zawierającym 1% SDS. Bloczki polietylenowe z pinami układano na powierzchni buforu tak, aby były skierowane do dołu oraz sonikowano przez 10 min (7kW/25kHz). Następnie piny płukano w H₂O w 60°C oraz poddano procesowi cyklizacji. Cyklizację przeprowadzono utleniając grupy -SH łańcuchów bocznych Cys za pomocą 0,05% roztworu K₃Fe(CN)₆ w 40% acetonitrylu w 100 mM buforze NH₄HCO₃ przez 4 godz. w temp. pokojowej.

Peptydy zsyntetyzowane na pinach polietylenowych poddano testom aktywności biologicznej w oddziaływaniach z przeciwciałami ludzkiej krwi pępowinowej. W tym celu piny zrównoważono w buforze TBS-T, wolne miejsca blokowano przy użyciu 200 μ l 1% roztworu BSA w TBS-T przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie piny inkubowano w 100 μ l zmieszanych 9 próbek surowicy pępowinowej (1H-9H) w rozcieńczeniu 500-krotnym w roztworze 1% BSA w TBS-T. Piny płukano 3-krotnie po 5 min w 10 ml buforu TBS-T i inkubowano z 100 μ l przeciwciał II-rzędowych anti-ludzkie IgG koniugowane z fosfatazą alkaliczną (Sigma) w rozcieńczeniu 1:10000 przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Piny płukano 3-krotnie po 5 min w 10 ml buforu TBS-T i umieszczano je na 30 min w 200 μ l substratu AP Yellow (pNPP; p-nitrofcnylofosforan)/pin w temperaturze pokojowej. Reakcję barwną przerywano przez usunięcie polietylenowych pinów z roztworu substratu. Absorbancję odczytywano przy $\lambda = 405$ nm. Po zakończeniu testu białka/przeciwciała dysocjowano od peptydów zsyntetyzowanych na pinach w buforze do denaturacji w 55–65°C (0,1 M bufor fosforanowy o pH 7,2 zawierający 1% SDS) przez 10 min przy użyciu ultradźwięków (7kW/25kHz). Następnie piny płukano w wodzie w 60°C, suszono i przechowywano nad żywicą osuszającą. Wyniki ELISA przedstawiono na Fig. 6.

Przykład 6 Porównanie na modelu mysim immunogenności oraz potencjału diagnostycznego koniugatów peptydowych z poli-lizyną oraz toksoidem tężcowym.

Myszy immunizowano 4-krotnie dawkami 10 μ g antygeny. Podczas immunizacji antygenami peptydowymi syntezowanymi na nośniku poli-Lys zastosowano adiuwant MPL ze względu na niską immunogenność. Okazało się wtedy, że sam adiuwant nieswoiście podnosi miano przeciwciał wobec podanego antygeny, zwłaszcza koniugatu peptydowego. Dlatego immunizację koniugatami na nośniku toksoidu tężcowego (TT) przeprowadzono bez zastosowania adiuwantu, gdyż sam adiuwant

MPL podnosił miano badanych przeciwciał. Aktywność surowic mysich po 4-krotnej immunizacji sprawdzano względem antygeny białkowego (OmpC) w standardowym teście ELISA oraz peptydowego (RYDERY) z wykorzystaniem testu ELISA na pinach polietylenowych (Fig. 7). Myszy immunizowano koniugatem GLNRYDERYIG-poly-Lys w adiuwancie MPL. Wykazano indukcję przeciwciał IgG wobec białka OmpC oraz peptydu RYDERY-pin, przy czym poziom przeciwciał wobec białka był wyższy niż wysoce swoistych przeciwciał wobec peptydu RYDERY. Poziom przeciwciał po immunizacji antygenem GLNRYDERYIG-polyLys w adiuwancie MPL był porównywalny z poziomem po podaniu samego MPL. W przypadku immunizacji koniugatem GLNRYDERYIGC:TT bez adiuwantu uzyskano lepszą indukcję przeciwciał o wysokiej swoistości wobec peptydu RYDERY-pin niż w przypadku reaktywności z całym antygenem białkowym. Poziom swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko peptydowi RYDERY-pin był wyższy po immunizacji koniugatem GLNRYDERYIGC:TT niż po immunizacji samym białkiem TT. Miano przeciwciał wobec białka OmpC podniosło się też po immunizacji samym białkiem nośnikowym, co może świadczyć o indukcji dodatkowych przeciwciał krzyżowo reagujących z białkiem OmpC, niekoniecznie korzystnych. Najlepszą korzystną odpowiedź uzyskano po immunizacji peptydem w koniugacie z TT bez adiuwantu.

Przetestowane dotychczas nośniki szczepionki pokazują, że peptyd stanowiący sekwencję epitopu wykazuje właściwości wzbudzania odpowiedzi immunologicznej manifestującej się sekrecją swoistych przeciwciał.

Istotnym jest, że immunizacje na modelach zwierzęcych prowadzono bez zastosowania adiuwantów, aby wykluczyć nieswoiste podniesienie poziomu tych przeciwciał przez sam adiuwant, co obserwowano w tych badaniach.

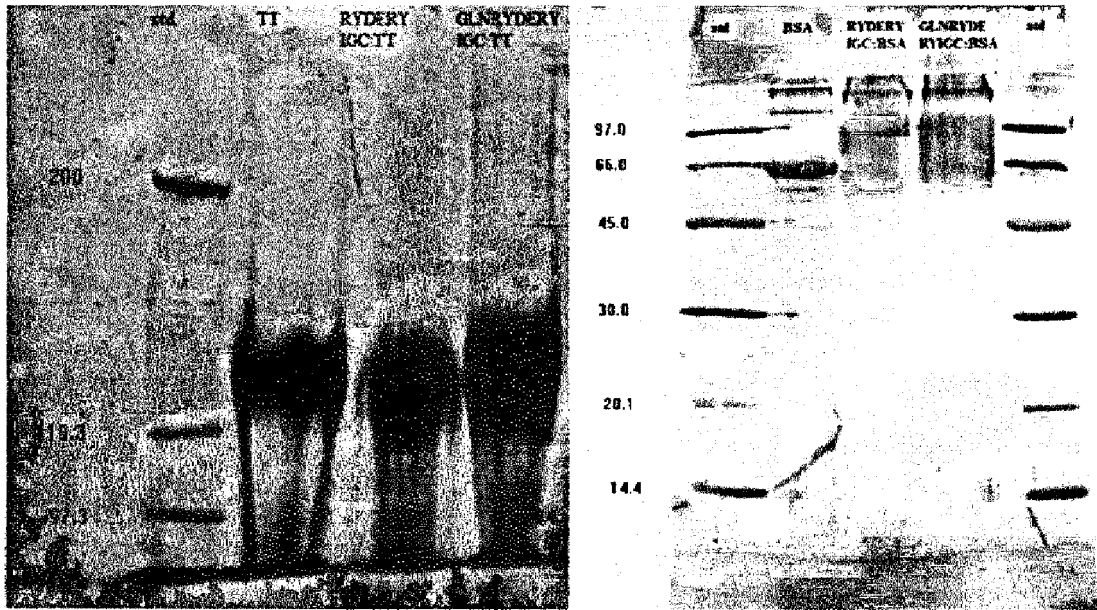
Ujawnione koniugaty nadają się do konstrukcji szczepionki do indukcji ochrony przed patogenymi szczepami *Enterobacteriaceae*, szczególnie gatunkom *Shigella*. Szczepionka aktywnie chroniąca przed rozwojem zakażeń pokarmowych przeznaczona jest dla ludzi zamieszkujących kraje o niskim standardzie życia i higieny sanitarnej. Szczepionka nadaje się również do stosowania dla personelu medycznego, żołnierzy, turystów, w szczególności ludzi posiadających defekt w niedoborach humoralnych odporności, także dla ludzi a zwłaszcza dzieci z humoralnymi niedoborami odporności.

Zastrzeżenia patentowe

1. Koniugat złożony z nośnika o charakterze hydrofobowym i antygeny peptydowy będącego epitopem białka OmpC, o sekwencji aminokwasowej A1-A2-A3-A4-A5-A6, gdzie:
 - A1 oznacza R,
 - A2 oznacza Y,
 - A3 oznacza D, R, E, N lub Q,
 - A4 oznacza E, D, N lub Q,
 - A5 oznacza R,
 - A6 oznacza Y, G lub F,a nośnik stanowi polietylen lub nośnik białkowy wybrany z grupy obejmującej toksoid tężcowy, toksoid dyfterytowy, albuminę surowicy wołowej.
2. Koniugat według zastr. 1, **znamienny tym**, że antygen peptydowy wybrany jest z grupy obejmującej peptydy o sekwencji aminokwasowej: RYDERY, RYDDRY, RYEERY, RYQERY lub RYDQRY i GLNRYDERYIGC oraz cykliczne CGGGRYDERYGGGCGG, CGGRYDERYGGGCGG, CGRYDERYGC GG.
3. Koniugat według zastr. 1, **znamienny tym**, że antygen peptydowy posiada sekwencję RYDERYIGC.
4. Koniugat według zastr. 1, **znamienny tym**, że antygen peptydowy posiada sekwencję GLNRYDERYIGC, CGGGRYDERYGGGCGG, CGGRYDERYGGGCGG, lub CGRYDERYGC GG.
5. Koniugat według zastr. 1 **znamienny tym**, że antygen peptydowy posiada konformację pętli.
6. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca koniugat jak określono w jednym z zastr. 1–5 i dopuszczalny farmaceutycznie nośnik.
7. Szczepionka, **znamienna tym**, że zawiera koniugat jak określono w jednym z zastr. 1–5, dopuszczalny farmaceutycznie nośnik oraz opcjonalnie adiuwant.

8. Szczepionka według zastrz. 7, **znamienna tym**, że indukuje produkcję przeciwciał skierowanych przeciwko pałeczkom jelitowym z rodziny *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza bakteriom z rodzaju *Shigella*.
9. Szczepionka zawierająca koniugat jak określono w jednym z zastrz. 1-5, dopuszczalny farmaceutycznie nośnik oraz opcjonalnie adjuwant do zapobiegania i leczenia chorób wywołanych przez pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza bakterie z rodzaju *Shigella*.
10. Sposób otrzymywania koniugatu jak określono w zastrz. 1–5, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
 - a) zabezpieczenie grup tioiowych białka nośnikowego w drodze bromoacetylacji;
 - b) koniugację peptydu z nośnikiem białkowym;
 - c) dezaktywację nieprzereagowanych grup bromoacetylowych białka nośnikowego.
11. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, bromoacetylację białka nośnikowego przeprowadza się buforze węglanowym o pH 8,3 przy pomocy estru N-hydroksybursztynianowego kwasu bromoacetylowego, korzystnie w stężeniu 1 mg estru na 1 mg białka, utrzymując stężenie białka c = 2 mg/ml.
12. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, po bromoacetylacji mieszaninę reakcyjną dializuje się do 0,1 M dwuwęglanu sodu o pH 8,3 i usuwa się ester na kolumnie.
13. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że peptydy zawierające grupy tiolowe do koniugacji zawieszają się w 0,1 M buforze węglanowym z 2 mM EDTA o pH 8,3, następnie do roztworu peptydu dodaje się bromoacetylowane białko, po czym pH doprowadza się za pomocą 0,1 M NaOH do wartości 8,5.
14. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że dezaktywację prowadzi się stosując 10 µl 2-merkaptoetanolu na 1 ml mieszaniny reakcyjnej podczas inkubacji przez 1 h w temperaturze pokojowej.
15. Koniugat określony w zastrz. 1–5 do zastosowania jako szczepionka przeciwko *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza bakteriom rodzaju *Shigella*.
16. Zastosowanie koniugatu określonego w zastrz. 1–5 do wytwarzania testu diagnostycznego do wykrywania *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza bakterii rodzaju *Shigella*.
17. Zastosowanie koniugatu określonego w zastrz. 1–5 do wytwarzania krwiopochodnych, immunoglobulinowych preparatów terapeutycznych specyficznych wobec *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza bakterii rodzaju *Shigella*.
18. Zastosowanie koniugatu określonego w zastrz. 1–5 do izolacji przeciwciał do biernej immunizacji w terapii zakażeń wywołanych przez pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae*.
19. Zastosowanie koniugatu według zastrz. 18, **znamiennie tym**, że zakażenia wywołane są przez bakterie z rodzaju *Shigella*.

Rysunki

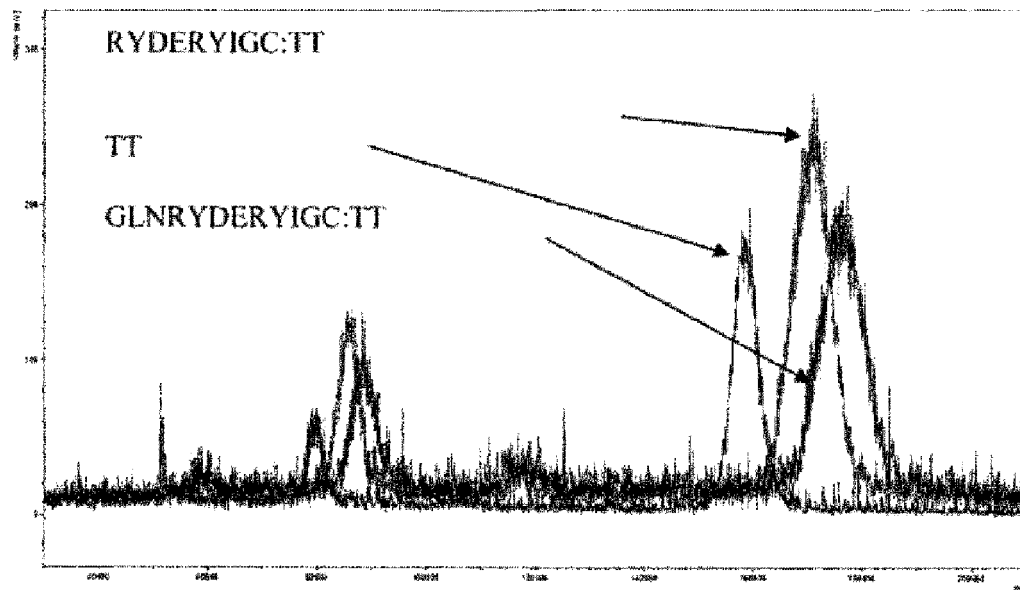


A)

B)

Fig 1

A)



B)

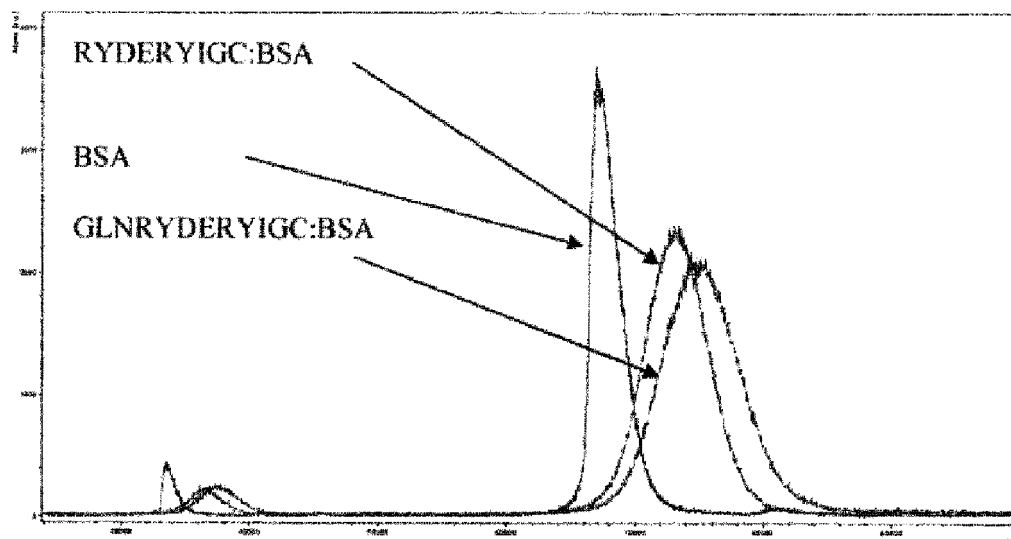


Fig. 2

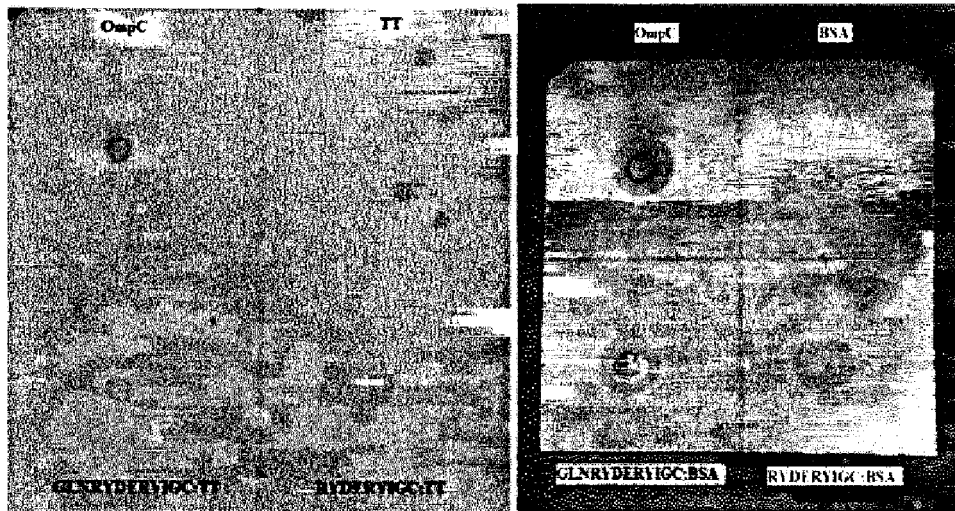


Fig. 3

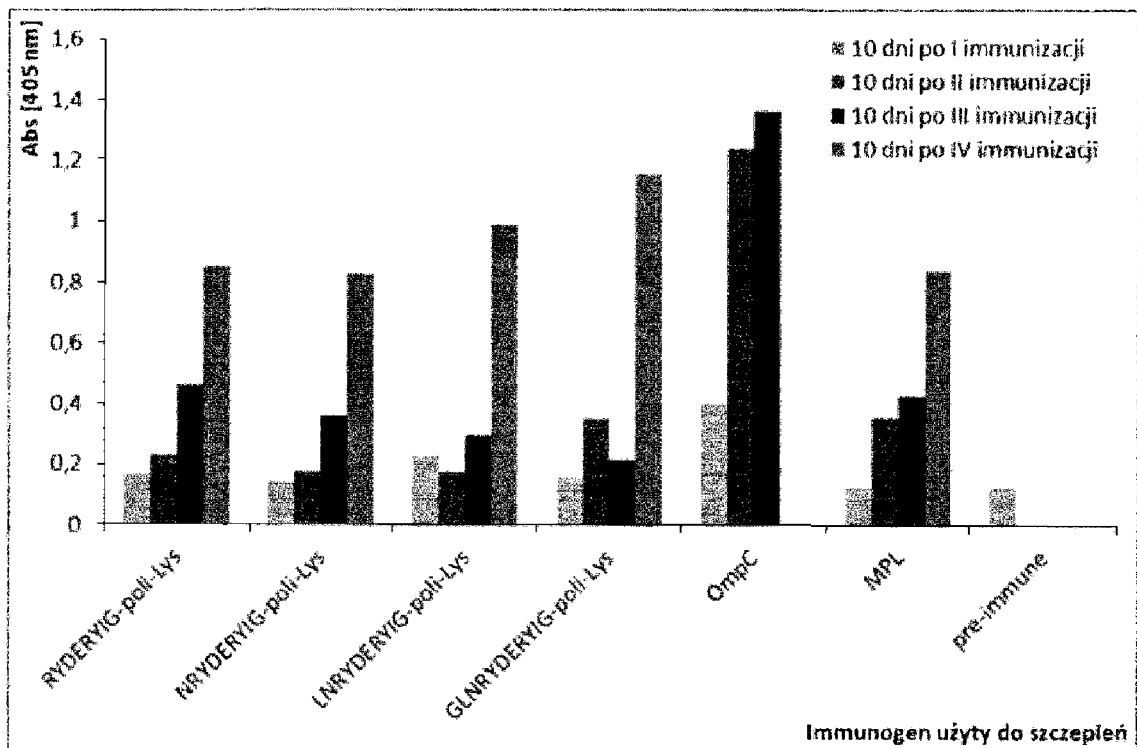


Fig. 4

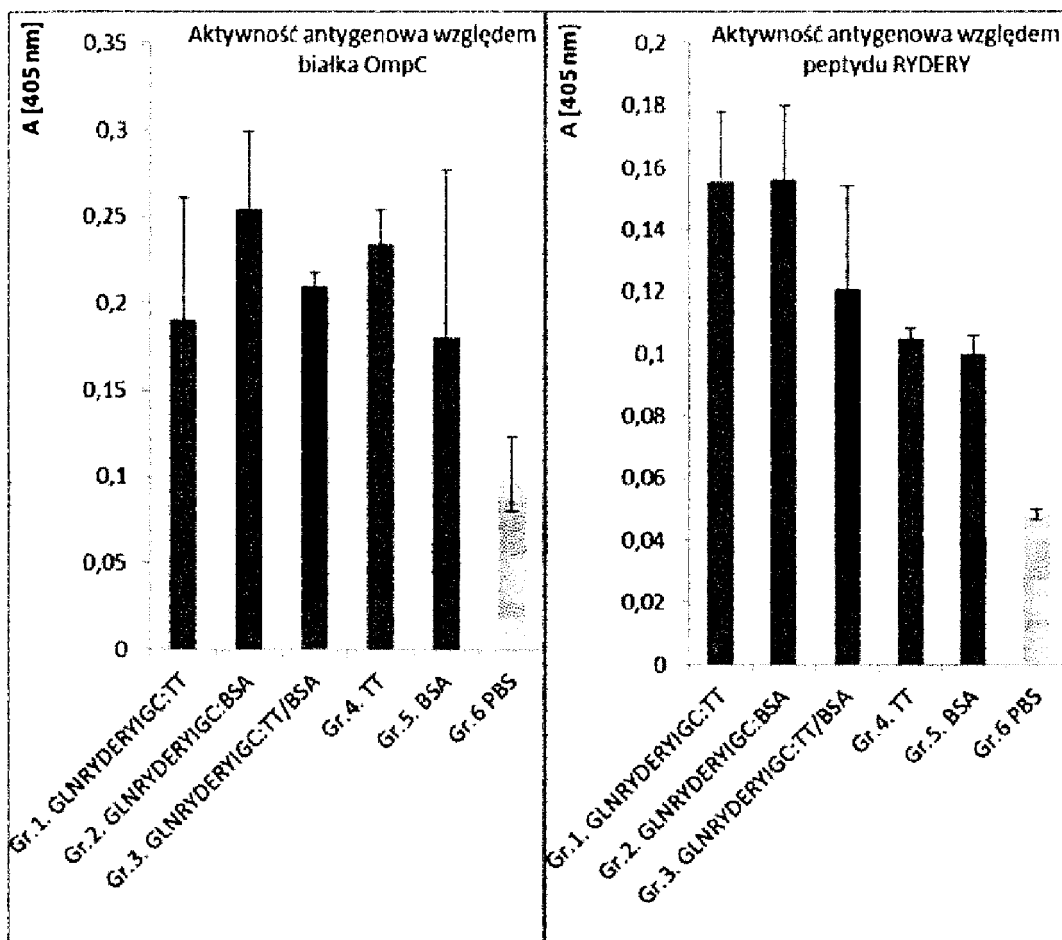


Fig. 5

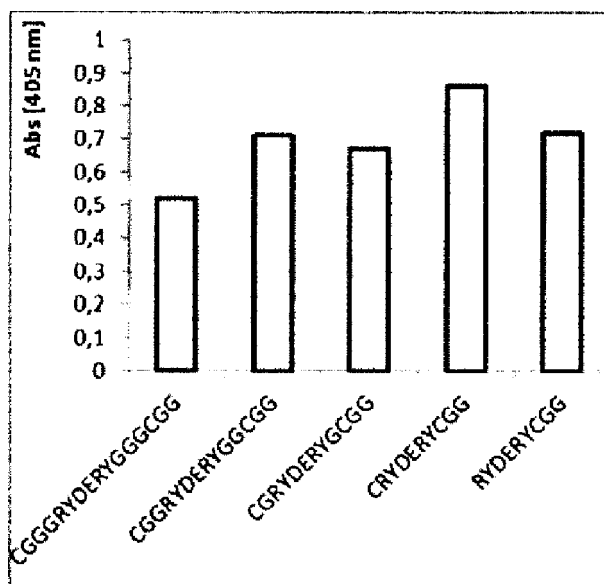


Fig. 6

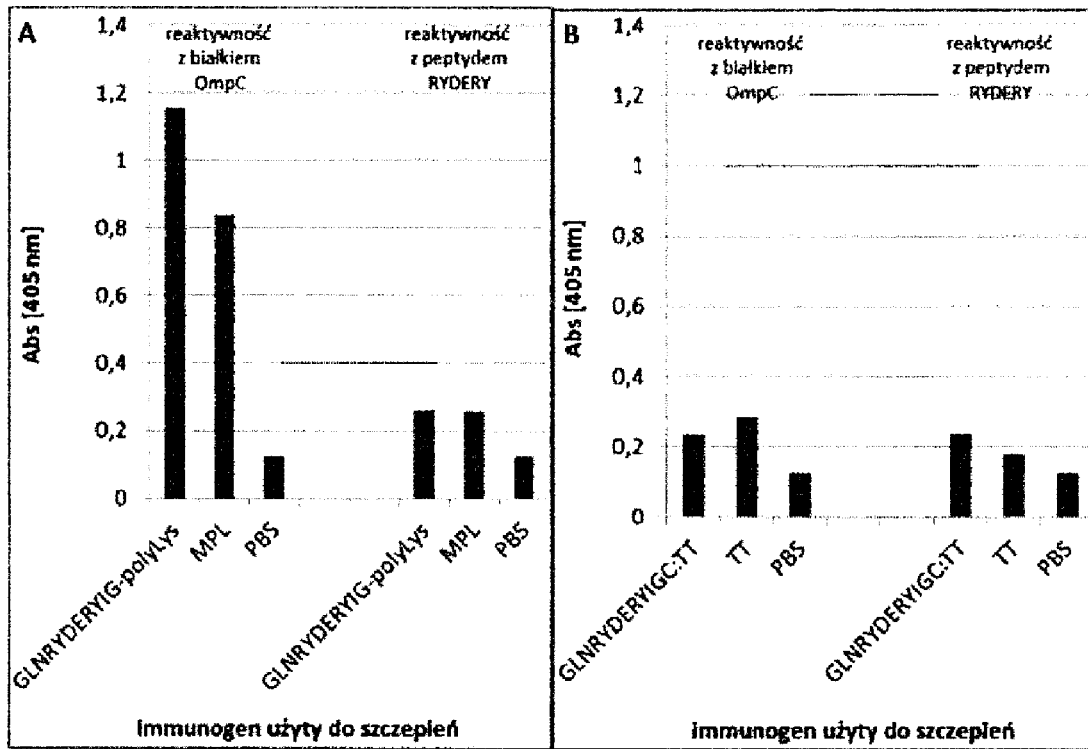


Fig. 7