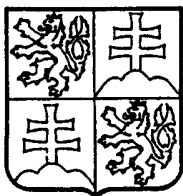


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 02969-91.F

(13) A3

(22) 27.09.91

(32) 28.09.90

(31) 90/590649

(33) US

(40) 15.04.92

5(51) A 61 K 39/385  
//(A 61 K 39/385,  
31:715)

(71) American Cyanamid Company, Wayne, New Jersey, US

(72) Porro Massimo, Siena, IT

(54) Způsob přípravy kovalentního konjugátu oligosacharidu a nosičového proteinu

(57) Předložený vynález se týká zlepšeného způsobu přípravy vakcín oligosacharidových konjugátů. Z dalšího aspektu vynálezu, jsou připravovány oligosacharidové vakcíny, které vyvolávají monospecifickou a homogenní imunitní odezvu ke kapsulárnímu polysacharidu. Specifické provedení vynálezu poskytuje vakcíny, které indukují imunitu k prevalentním serotypům *Streptococcus pneumoniae*.



## Zlepšené vakcíny oligosacharidových konjugátů

### Oblast vynálezu

Předložený vynález se týká zlepšeného způsobu přípravy vakcín oligosacharidových konjugátů a dalším aspektem vynálezu jsou připravované vakcíny na bázi oligosacharidů, které dávají monospecifickou a homogenní imunitní odpověď na kapsulární polysacharidy. Specifické provedení vynálezu poskytuje vakcíny, které indukují imunitu k zavedeným serotypům, *Streptococcus pneumoniae*, které mohou být důležité pro použití u dětských pacientů jakož i u pacientů starších a pacientů s oslabenou imunitou, způsobenou slabostí nebo chorobou /včetně např. pacientů s AIDS/.

### Dosavadní stav techniky

*Pneumococcus /Streptococcus pneumoniae/* je gram-pozitivní kapsulující kok, který obvykle roste v párech nebo krátkých řetězcích. V diplokokové formě jsou přilehlé okraje zaoblené a opačné konce nepatrně zašpičatělé a organismus dostává lancetovitý tvar.

Pneumokoky mohou být rozdělena do serotypů podle komplexních polysacharidů, které tvoří jejich kapsule. Bylo identifikováno 84 serotypů působením typově-specifického antisera, Neufeldovou potlačovací reakcí. Všechny jsou pro člověka patogenní, ale typy 1,3,4,7,8,9 a 12 jsou nejčastěji nadezeny v klinické praxi. Typy 6, 14, 19 a 23 často způsobují pneumonii a otitis media u dětí, ale jsou méně běžné než u dospělých /Austrian, 1983, v "Harrison's Principles of Internal Medicine", Petersdorf a spol., vyd., 10. vydání, McGraw Hill Book Co., New York str, 918-922/. Pneumokokus je jedním ze tří patogenů, odpovídajících za pneumonii,

sepsi a meningitidu dětí /McMillan, 1982, v "Core Text-book of Pediatrics, Kaye a spol., vyd., Second Edition, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, str. 498/.

Mezi osoby s vyšším rizikem rozvinutí pneumokokové infekce patří pacienti s chronickými systémovými chorobami jako jsou choroby srdeční, chronické bronchopulmonální choroby, jaterní choroby, ledvinové nedostatečnosti a nádory. Je doporučováno, aby těmto osobám byla podána vakcína proti pneumokokové infekci. Pro tento účel jsou vhodné dvacet tři vakcíny, obsahující kapsulární polysacharidy pneumokokových typů 1,2,3,4,5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F a 33F /které zahrnují serotypy nebo skupiny odpovědné za 90 procent vážných pneumokokových onemocnění v USA a zbytku světa/ dostupné od/Pneumovax<sup>R</sup> Merck, Sharpe a Dohme, a Pnu-Immune<sup>R</sup>, Lederle Laboratories/. Účinnost těchto vakcín u dětí je sporná, protože u dětí mladších šesti let se imunologické odpovědi na různé kapsulární antigeny rozvíjejí v různou dobu jako výsledek charakteristiky zrání imunitního systému a ochrana může mít kratší trvání než je pozorováno u dospělých /Harrison a spol., ibid/. Ačkoliv relativně málo pneumokokovým serotypů, je přičítána takový význam pro většinu pediatrických pneumokokových infekcí /Gray a spol., 1979, J.Infect.Disease 140:979-983/, tyto zahrnují typy, pro které vývoj lidské protilátkové odpovědi na čištěné kapsulární polysacharidy použité jako vakcíny je pomalejší /Anderson a Betts, 1989, Pediatric Infec.Dis. J. 8:S50-S53; Borgono a spol., 1978, Proc.Soc.Exp. Biol. Med. 157:148-154/.

Imunní odpovědi u dětí na Haemophilus Influenzae b kapsulární polysacharidy byly dosaženy spojením kapsulárního antigenu s proteinovým nosičem za vzniku "konjugátu" vakcíny, předpokládá se, že helper efekt T-lymfocytů je indukován proteinovým nosičem a je odpovědný za rozvinutí

imunity /Robbins a spol., 1984 v "Bacterial Vaccines", Germanier, vyd. Academic Press, New York, str.289-316/, viz také Cruse a Lewis, 1989 v "Conjugate Vaccines" vyd. Cruse a Lewis, Karger, Basel, str.1-10/. Podobný postup byl řízen směrem k produkci pneumokokových vakcin.

Různí badatelé izolovali a čistili intaktní kapsulární polymery, které mohou být použité v nebo jako vakciny. Např. US patent č. 4220717 popisuje postup pro izolaci a čištění imunologicky aktivního polyribosyl-ribitol-fosfátu /PRP/ z kapsulárního polymeru H-influenzae b. Úále US patent 4210641 se týká polysacharidových extraktů z H.Influenzae, majících zjevnou molekulovou hmotnost větší než 200 000 daltonů a složených hlavně z galaktozy, glukozy a mannozy a obsahujících malé množství oseminů.

Několik výzkumníků využilo těchto a jiných intaktních kapsulárních polymerů k formulacím pro dosažení lepších imunologických odpovědí. Například US patent 4196192 uvádí vakcínu, obsahující čištěný intaktní PRP a celé buňky Bordetella pertussis ve vakcinovém přípravku. Tento postup ke zvýšení imunogenicity dosáhl zvýšených hladin anti-PRP a anti-pertussis protilátek u mladých savců.

Nosičové proteiny mohou působit více než zvýšení imunogenicity konjugovaných kapsulárních polymerů. Mohou také učinit hepteny imunogenickými. Hapteny jsou definovány jako molekuly, které se mohou vázat specificky na protilátku nebo lymfocytový receptor, ale nemohou samy způsobit imunitní odpověď /tj. samy nejsou imunogenní/. K vyvolání imunní odpovědi musí být malé molekuly nízké molekulové hmotnosti a slabé imunogenicity, nazývané hapteny, spojovány ve větší molekuly nebo připojovány na nosič, kterým je obvykle heterologní protein. Injekce komplexu haptenu-nosič vyvolá pak zvýšení produkce protilátek B-lymfocyty, z nichž

některé budou schopné vazby na volné, nespojené hapténové molekuly.

Mezi prvními haptény, které byly studovány, byly azobarvivové sloučeniny jako je anilin nebo o-aminobenzoová kyselina. Landsteiner a Lampl /1918. Z.Immun.Forsch 26: 293/ připojovali tyto sloučeniny diazotací k sérovým proteinům. Po injekci těchto uměle připravených azoproteinů králíkům se rozvinulo srážení protilátek, které byly specifické pro připojené chemické skupiny.

Jinými příklady hapténových sloučenin jsou dinitrofenol, který se stává imunogenním připojením jako dinitrofenylová /DNP/ skupina k hovězímu sérovému albuminu nebo k hovězímu gamma globulinu /BGG/ a diethylamid kyseliny lysergové. Dokonce formaldehyd se může chovat jako haptén, osoby vystavené výparům formaldehydu z produktů nebo v laboratorních se stávají citlivými na tuto sloučeninu, následující formylací jejich endogenních makromolekul in vivo.

Hapténické chování není omezeno na malé organické molekuly a polypeptidové hormony až do velikosti inzulinu jsou často slabě, pokud vůbec jsou, imunogenní. K získání vysokých titrů protilátek k těmto hormonům je tedy nezbytné je konjugovat na nosičovou molekulu /nebo vytvořit molekuly spojováním mnoha těchto polypeptidů dohromady/.

Volba nosičové molekuly je zejména zajímavá v tom, že nosič hraje více než transportní roli. Ovary a Benaceraff /1963, Proc.Soc.Exp.Biol.Med.114:723/ toto prokázali injikováním DNP-BCG králíkům. Injekce množství imunogenního materiálu zvířatům vyprodukuje imunologickou "paměť" působení. Jestliže je druhá injekce dána později, pak je zde mnohem více mohutných imunitních odpovědí. Vskutku, když

Ovary a Benaceraff injikovali DNP-BCG znovu, byla zde silná sekundární odpověď, která vedla k výrazně zvýšené hladině protilátek jak proti DNP tak BCG. Ale když byla provedena druhá injekce místo uvedené s DNP-vaječným albuminem, byla zaznamenána slabší anti-DNP protilátková odpověď. Rozdíly v odpovědi byly způsobeny tím, co nazýváme nosičový efekt a zdá se, že zahrnuje T-helper lymfocyty.

Předběžné důkazy ukazují, že všechny proteiny nemohou být stejně efektivními nosičovými proteiny pro dané hapteny. Robbins a spol., /Infect. Immun. 40:245-256/ předkládá data z experimentálních vakcín protein-polysacharidových konjugátů, ve kterých stejný polysacharidový hapten byl konjugován s různými proteinovými nosiči a pak byla kvantifikována protilátková odpověď. Významné rozdíly byly zaznamenány v množství generovaných anti-haptenových protilátek, a indikovaly významnou roli nosičů.

Pokud jde o pneumokokální vakcíny podrobněji, Lin a Lee /1982, Immunology 46:333/ studovali imunní odpovědi dospělých a mladých myší, vystavených typu 6A a 19F polysacharidů jakož i 19F konjugovanému na protein. Významně vyšší IgM a IgG2 titry protilátek byly indukovány u myší, které obdržely 19F-polysacharid-protein konjugáty, než u kontrolní skupiny, která dostala 19F polysacharid samostatně.

U jiní badatelé studovali konjugáty kapsulárních polymerů s přenašečovými proteiny za účelem zvýšení protilátkové formace tak zvaným "nosičovým efektem". Například Schneerson a spol., Journal of Experimental Medicine 152:361-376 /1980/ popisují H.influenzae b polymer-protein konjugáty, u kterých objevili, že vyvolávají imunitu k invazním chorobám vyvolaným H.influenzae b. Odkazy, dokumentující imunologické chování kapsulárních polymerů vztažené na věk dětí

a snaží se překonat tuto závislost na věku konjugací intactních kapsulárních polymerů s různými proteiny, včetně sérového albuminu, *Limulus polyphemus* hemocyaninu a difterického toxinu. Metoda konjugace zahrnuje použití spojovacího činidla jako je adipický dihydrazid.

Geyer a spol., *Med. Microbiol. Immunol.* 165:171-288 /1979/, připravili konjugáty určitých fragmentů kapsulárních polysacharidů *Klebsiella pneumoniae* s nitrofenyl-ethylaminovým linkerem redukční aminací a derivatizovaný cukr byl pak připojen k proteinům za použití azo-kopulace.

US patent 4057685 McIntirea z 9. května 1974 se týká *Escherichia coli* lipopolysacharidů se sníženou toxicitou kovalentně navázaných na proteinový antigen reakcí s halogenacylhalogenidem.

US patent 4356170 Jenningse a spol., ze 27. května 1981, zveř. 26. října 1982 se týká přípravy polysacharid-proteinových konjugátů redukční aminací.

Andersen /1983, *Infection and Immunity* 39:233-238/ se týká konjugátů mezi oligosacharidy z kapsulárního polysacharidu *Haemophilus influenzae* typ b a CRM<sub>197</sub>, netoxickým ale antigenně identickou variantou difterického toxinu.

Snippe a spol. /1983, *Infection and Immunity* 42:842-844/ se týká semisyntetické vakcíny pro *Streptococcus pneumoniae* typ 3, ve které hexasacharid izolovaný z částečného kyselého hydrolyzátu kapsulárního polysacharidu S3 byl navázán ke stearylaminu redukční aminací a pak inkorporován do liposomů. U výsledné vakcíny konjugát/liposom bylo pozorováno, že indukuje ochranu pro *S. pneumoniae* typ 3 u myší.

US patent 4663160 Tsaye a spol., podaný 14.března 1983, udělený 5.května 1987, se týká bakterie, ve které je detoxifikovaný polysacharid z gram-negativní bakterie kovalentně navázán k detoxifikovanému proteinu ze stejného druhu gram-negativní bakterie spojením uhlíku 4-12.

US patent 4619828 Gordona, podaný 5.ledna 1984, udělený 28.října 1986 se týká konjugátů mezi polysacharidovými molekulami z patogenních bakterií jako je *Haemophilus influenzae B*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* a *Escherichia coli* a antigenů závislých na T buňkách jako jsou difterické a tetanové toxoidy.

US patent 4808700 Andersona a Clementse, podaný 10. srpna 1984, udělený 28. února 1989 a US patent 4761283 Andersona, podaný 28.března 1986, udělený 2.srpna 1988 se týká kovalentního spojení fragmentů kapsulárních polymerů k bakteriálním toxinům, toxinům nebo vazebným podjednotkám pomocí redukční aminace.

US patent č. 4711779 Porroa a spol, podaný 2.července 1986, udělený 8. prosince 1987 se týká vakcín glykoproteinových konjugátů, majících trivalentní imunogenickou aktivitu a zahrnujících antigenní determinanty z kapsulárních polysacharidů gram-pozitivních bakterií a gram-negativních bakterií jakož i buď CRM<sub>197</sub>, tetanický toxoid nebo pertusis toxin.

Příprava konjugátových vakcín, ve kterých hapteny kapsulárních polysacharidů jsou připojeny k nosičovým proteinům, zahrnuje následující postupy:

- i/ musí být připraven kapsulární polysacharid,
- ii/ Jestliže má být použit fragment polysacharidu, musí být separován z intaktního polysacharidu

- iii/ sacharid musí být aktivován nebo učiněn být schopným konjugace, tj. musí být generovány skupiny schopné kovalentní vazby k proteinu
- iv/ sacharid je konjugován k proteinu.

Různé metody známé v oboru pro provedení těchto čtyř kroků jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka 1

Odkaz	příprava	stěpení	aktivace	konjugace
	polysacharidu	polysacharidu	polysacharidu	k proteinu
US patent 4356170, Jennings, pod.27.5.1981, uděl. 25.10.1982			využívá kyselinu jodistou ke genero- vání aldehydových sku- pin	redukční emince využí- vající kya- noborohydrid
US patent 4663160, Tsay a spol., pod.14.3.1983, uděl. 5.5.1987			využívá kyselinu jodistou ke genero- vání aldehydových skupin	1/ 4-12 uhlí- kové skupiny při- pojeny k pro- teinu za pří- tomnosti kon- denzčního či- nidla, např. kerbodlimidu

11/ polysacharid  
připojen k deriva-  
tizovanému pro-  
teinu 4-12 uhlí-  
kovými skupi-  
nami reakcí Schiffo-  
vy báze za pří-  
tomnosti redukč-  
ního činidla, např.  
kyanoborohydridu

Tabulka 1 /pokračování/

US patent  
4619828, Gordon,  
pod.5.1.1984, uděl.  
28.10.1986

polysacharidy	#bromkvan	#konjugován
upraveny tepel- ným zpracováním na molekulovou velikost mezi 200000 a 2000000 daltony		spacer můstkem 4-8 atomů uhlíku jako existuje v de- rivátu hydrázidu adipové kyseliny v proteinu

US patent  
4808700, Anderson  
a Clements, pod.  
10.8.1984, uděl.  
28.2.1989

Byly použity různé metody pro přípravu antigenních fragmentů s alespoň jedním redukovaným koncem, nepř. limitní oxidáč- ní štěpení jodistanem, hydrolýza glykosidázou nebo kyselá hydrolýza	konjugace redukční aminací za přít- omnosti kyano- borohydridu /přib- ližně 2-3 týdny/
---	--

sekcce 6.5 výše,  
nazvaná "Conjugation  
of Capsular Polymer  
Fragment of Streptoco-  
ccus Pneumoniae to  
CRM<sub>197</sub>"

Danish typ  
6A, Eli Lilly  
Co.  
kyselá hydrolýza v 0,1N HCl po  
10 minut při 100 °C pro vznik  
redukčních fragmentů

konjugováno k  
CRM<sub>197</sub> ve fosfá-  
tovém pufru za  
použití kyanoboro-  
hydridu sodného  
po 18 dní při  
37 °C

Tabulka 1 /pokračování/

US patent  
4711779, Porro a  
Constantino, pod.  
2.7.1986, uděl.  
8.12.1987

kyselá hydrolýza  
při 100 °C po 6-  
40 hodin. Hepteny  
o mol. hmotn.  
1000 až 2000  
daltonů.

aktivováno konjugováno k  
zavedením pri- toxoidu za pří-  
márních amino- tomnosti  
skupin do termi- organického roz-  
nálních redukčních pouštědla, nepř.  
skupin /nepř. po- dimethylsulfoxi-  
užitím kyenoboro- du  
hydridu sodného/  
s následující  
konverzí na estery  
/nepř. za přítom-  
nosti derivátů  
kyseliny adipové/

pro Streptococcus  
pneumoniae typ 6A

kyselá hydrolýza  
při 100 °C po  
39 hodin

aktivováno v amo- konjugováno k CRM<sub>197</sub>  
niakálním pufru za za přítomnosti di-  
přítomnosti kyeno- methylsulfoxidu  
borohydridu sodného při teplotě míst-  
/pro zavedení primár- nosti po 15  
ních aminoskupin/ hodin  
po dva týdny; převedeno  
na odpovídající mono-  
funkční estery ve  
vodném roztoku dimethyl-  
sulfoxidu, obsahujícím di-  
sukcinimidylester adipové  
kyseliny po 4 hodiny

### Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká kovalentního navázání oligosacharidů odvozených z bakteriálních kapsulárních polysacharidů na proteinový nosič za použití nové metody.

Tento postup dovoluje účinnou syntézu glykokonjugátů při produkční rychlosti i výrazně vyšší než dříve používané metody. Glykokonjugáty podle vynálezu mohou být užity v přípravě vakcín a mohou se projevit jako imunogenní.

Ve výhodném provedení se předložený vynález týká produkce glykokonjugátů, které inkorporovaly oligosacharidy odvozené z kapsulárních polysacharidů *Streptococcus pneumoniae*. Metoda podle vynálezu má za výsledek účinnou produkci glykokonjugátů *S. pneumoniae* ve vysokých výtěžcích, které mohou být použity ve vakcínových přípravcích značné důležitosti pro pediatriickou populaci, ve které velká část nejrozšířenějších chorob je spojena s infekcí *S. pneumoniae*. Bylo objeveno, že imunogenní konjugáty jsou méně závislé na věku než kapsulární polysacharidy samotné a že jsou užitečné pro aktivní imunizaci velmi mladých teplokrevných savců proti systémovým infekcím příslušnou enkapsulovanou bakterií.

V dalším aspektu vynálezu bylo objeveno, že glykokonjugáty podle vynálezu překvapivě vyvolávají monospecifickou a homogenní imunitní odpověď, která může výhodně zabránit vyvolání autoimunních reakcí a odvozených post-vakcínových syndromů.

Důležité je, že imunogenní konjugáty podle vynálezu neobsahují potenciálně toxická spojovací činidla jako je dihydrazid kyseliny adipové nebo p-nitrofenylethylamin, které byly použity v konjugaci karbohydrátu k proteinu.

Zkratky a definice:

CRM <sub>197</sub>	netoxický protein antigenně křížově reaktivní s difterickým toxinem
DMSO	dimethylsulfoxid
DP	stupeň polymerace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
SD	stupeň substituce
SIDEA	sukcinimidyl-diester kyseliny adipové
SIDES	sukcinimidyl-diester kyseliny jantarové

Popis připojených obrázků

Obr.1 Obecná strategie syntézy konjugátů oligosacharid-protein

- A. Polysacharidy o vysoké molekulové hmotnosti se kyselé hydrolyzují za vzniku oligosacharidů o průměrné molekulové hmotnosti  $2,5 \times 10^3$ .
- B. Oligosacharidy jsou /1/ aktivovány reakcí s diaminoethanem  $/H_2N/CH_2/2NH_2/$  při pH=9, redukovány pyridinborohydridem  $/PyBH_3/$ , pak /2/ reagují se sukcinimidyl-diesterem adipové kyseliny /SIDEA/ v dimethylsulfoxidu /DMSO/.
- C. Aktivované oligosacharidy jsou připojeny k proteínovému nosiči přes lysinové zbytky.

Obr.2 Použití "na míru šitého" spaceru ve spojovacím postupu

- A. Glykokonjugát připravený dřívějším způsobem jak je popsáno Porroem a spol., /1985/, Mol.Immunol. 22:907-919, s amidovým spojením /šipka/ mezi oligosacharidem a linkerem čtyř atomů kyseliny adipové. Celková délka spaceru je přibližně  $10,4 \text{ \AA}$ .
- B. Glykokonjugát vytvořený podle předloženého vynálezu, ve kterém dva uhlíkové zbytky /šipka, formované diaminoethanem/ a amidová vazba, existují mezi oligosacharidem

a linkery dvou atomů kyseliny jantarové, vytvořenými reakcí se SIDES. Celková délka spaceru je přibližně 10 nm.

C. Glykokonjugát vytvořený podle předloženého vynálezu, ve kterém dva uhlíkové zbytky /šipka, vytvořené diaminoethanem/ a amidová vazba, existují mezi oligosacharidem a čtyřuhlíkatým zbytkem adipové kyseliny, vytvořeným reakcí se SIDEA. Celková délka spaceru je přibližně 14,5 nm.

Obr.3. Schopnost konjugace CRM<sub>197</sub> k aktivovaným oligosacharidům, obsahujícím spacery adipová kyselina versus jantarová kyselina. Elektroforéza produktů konjugačních reakcí na SDS-polyakrylamidovém gelu /vybarveno stříbrem/.

A. Dráha 1 -standardy molekulové hmotnosti /92,5 K, 66,2 K, 45,0 K, 31,0 K, 21,5 K/.

Dráha 2: CRM<sub>197</sub> /1  $\mu$ g/ referenční.

Dráha 3: Konjugovaný oligosacharid 6A-CRM<sub>197</sub> s kyselinou jantarovou jako spacerem /2  $\mu$ g/ /poměr 1:1 monoester/celkové aminoskupiny CRM<sub>197</sub> v 50% DMSO/.

Dráha 4: Konjugovaný oligosacharid 6A-CRM<sub>197</sub> s kyselinou jantarovou jako spacerem /2  $\mu$ g/ /poměr 1:2 monoester/celkové aminoskupiny CRM<sub>197</sub> v 50% DMSO/.

Dráha 5: Konjugovaný oligosacharid 6A-CRM<sub>197</sub> s kyselinou adipovou jako spacerem /2  $\mu$ g/ /poměr 1:2 monoester/celkové aminoskupiny CRM<sub>197</sub> v 50% DMSO/.

Dráha 6: konjugovaný oligosacharid 14-CRM<sub>197</sub> s kyselinou jantarovou jako spacerem /2  $\mu$ g/ /poměr 1:4 monoester/celkové aminoskupiny CRM<sub>197</sub> v 50% DMSO/.

Dráha 7: konjugovaný oligosacharid 19F-CRM<sub>197</sub> s kyselinou jantarovou jako spacerem /2  $\mu$ g/ /poměr:1:4 monoester/celkové aminoskupiny CRM<sub>197</sub> za nepřítomnosti 50% DMSO/.

Dráha 8: Konjugovaný oligosacharid 23F-CRM<sub>197</sub> s kyselinou jantarovou jako spacerem /2  $\mu$ g/ /poměr: 1:2 monoester/celkové aminoskupiny CRM<sub>197</sub> v 50% DMSO/.

Dráha 9: CRM<sub>197</sub> /1  $\mu$ g/ referenční.

B.

Dráha 1: CRM<sub>197</sub> /1  $\mu$ g/ referenční.

Dráha 2: CRM<sub>197</sub> referenční /1  $\mu$ g, rozdílný od dráhy 1/

Dráha 3: konjugovaný oligosacharid 23F-CRM<sub>197</sub> s kyselinou adipovou jako spacerem /2  $\mu$ g/ /poměr: 1:2 monoester/celkové aminoskupiny CRM<sub>197</sub> v 50% DMSO/.

Dráha 4: Standardy mol. hmotnosti /92,5 K, 66,2 K, 45,0 K, 31,0 K, 21,5 K/.

Dráha 5: Konjugovaný oligosacharid 23F-CRM<sub>197</sub> s kyselinou adipovou jako spacerem /2  $\mu$ g/ /poměr: 1:2 monoester/celkové aminoskupiny CRM:M<sub>197</sub> v 50 % DMSO/.

Dráha 6: CRM<sub>197</sub> /1  $\mu$ g/ referenční

CRM<sub>197</sub> referenční /1  $\mu$ g, rozdílný od srovnávací dráhy 1/

Dráha 7: Konjugovaný oligosacharid 6A-CRM<sub>197</sub> s kyselinou adipovou jako spacerem /2  $\mu$ g/.

C.

Dráha 1: Standardy molekulové hmotnosti /92,5 K, 66,2 K, 45,0 K, 31,0 K, 21,5 K/

Dráha 2: CRM<sub>197</sub> /1  $\mu$ g/ referenční.

Dráha 3: konjugovaný oligosacharid 6A-CRM<sub>197</sub> s kyselinou adipovou jako spacerem /2  $\mu$ g/

Dráha 4: konjugovaný oligosacharid 14-CRM<sub>197</sub> s kyselinou adipovou jako spacerem /2  $\mu$ g/

Dráha 5: Konjugovaný oligosacharid 19F-CRM<sub>197</sub> s kyselinou adipovou jako spacerem /2  $\mu$ g/

Dráha 6: Konjugovaný oligosacharid 23F-CRM<sub>197</sub> s kyselinou adipovou jako spacerem /2 µg/

Dráha 7: "arkery molekulové hmotnosti /92,5 K, 66,2 K, 45,0 K, 31,0 K, 21,5 K/

Obr.4 Králičí IgG odpověď na konjugáty *S.pneumoniae* oligosacharid 6A-CRM<sub>197</sub>. Inhibiční ELISA analýza hodnoty afinity IgG isotypu indukované kapsulárními polysacharidy.

- A. Typ 6A kapsulárního polysacharidu
- B. Typ 6A oligosacharidu / $\overline{DP} = 107$  ve volné formě nebo konjugovaný k CRM<sub>197</sub>
- C. Typ 14 oligosacharidu / $\overline{DP} = 12$ / aktivovaný molekulovým spacerem nebo konjugovaný k CRM<sub>197</sub>.

Detailní popis vynálezu:

Předložený vynález se týká kovalentního připojení oligosacharidů odvozených od bakteriálních kapsulárních polysacharidů k proteinovým nosičům; způsob podle vynálezu generuje nové glykokonjugáty novými způsoby.

Pro zřejmost a bez jakéhokoliv omezení, je detailní popis vynálezu rozdělen na následující sekce:

- i/ příprava oligosacharidů
- ii/ aktivace oligosacharidů
- iii/ konjugace oligosacharidů k proteinu
- iv/ imunochemická charakterizace glykokonjugátů
- v/ vakcinový přípravek a podání
- vi/ využití vakcin konjugátů pneumokokálních oligosacharidů.

Příprava oligosacharidů.

Kapsulární polysacharidy vysoké molekulové hmotnosti mohou být obchodně dostupné /American Type Culture Collection /ATCC/ /Rockville, MD//, nebo získány metodami popsány

Porroem a spol., 1983, J.Biol.Stand. 11:65-71. Mohou být použity jakékoliv polysacharidy zahrnující, ale neomezu-  
jící se na ně, ty, které byly nalezeny v pouzdrech *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus mutans*, *Cryptococcus neoformans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*.

Antigenní fragmenty s nejméně jedním redukujícím koncem mohou být získány z kapsulárních polymerů různými metodami, závisějícími na strukturních vlastnostech jednotlivých kapsulárních polymerů. Limitní oxidační štěpení jodistanem /nebo podobnými činidly/ oddělí aldehydové konce; dojde tak k omezení na polymery, mající vicinální dihydroxyskupiny na necyklických zbytcích. Hydrolyza glykosidických vazeb poskytne redukovaný cukerný konec. Taková hydrolyza může být nejspecifičtěji provedena enzymatickou cestou glykosidázami, ale toto použití je omezeno na relativně malý počet kapsulárních polymerů, např. *Streptococcus pneumoniae* 8, pro které jsou glykosidázy známé. Kyselá hydrolyza je běžně používána pro hydrolyzu glykosidických vazeb. Užití tohoto postupu je omezeno, jestliže polymer obsahuje vůči kyselině citlivé neglykosodické vazby nebo když polymer obsahuje na kyselinu citlivé můstkové vazby důležité pro antigenní specifitu.

Ve specifických provedeních podle vynálezu *S. pneumoniae* typ 6A kapsulární polysacharid může být hydrolyzován v přibližně  $10^{-2}$  M octové kyselině při asi 100 °C po asi 30 hodin; kapsulární polysacharid *S. pneumoniae* typ 14 může být hydrolyzován v přibližně 0,5 M kyselině trifluoroctové při asi 70 °C po asi 7 hodin; polysacharid *S. pneumoniae* typ 19F může být hydrolyzován v přibližně  $10^{-2}$  M

kyselině octové při asi 50 °C po dobu asi 48 hodin; a polysacharid *S. pneumoniae* typ 23F může být hydrolyzován v přibližně 0,25 M kyselině trifluoroctové při asi 70 °C po asi 3 hodiny.

Podle předloženého vynálezu, oligosacharidy, které jsou konjugovány k proteinu, výhodně obsahují mezi třemi a šesti opakujícími se jednotkami /nebo mezi asi deseti a třiceti monosacharidovými zbytky/ a nejvýhodněji obsahuje mezi třemi a čtyřmi opakujícími se jednotkami /nebo asi patnáct monosacharidových zbytků/ jako oligosacharidy této délky inkorporované do glykokonjugátů, se projevíly jako optimálně imunogenné.

Oligosacharidy mohou být aktivovány způsobem redukční aminace s následující reakcí s bifunkční molekulou jako je diester, aniž by byl považován za omezení. Uznání metody podle vynálezu je uvedeno na obr. 1 a v tabulce II, která porovnává metodu popsanou Porroem a spol., 1985, *Mol. Immunol.* 22:907-919. Doba pro aktivaci za použití předchozího postupu byla 7 až 14 dnů, podle předloženého vynálezu byla zkrácena na 15 minut. Doba pro redukci podle předchozího postupu byla 7 až 14 dnů, podle předloženého vynálezu byla zkrácena na 48 hodin. Předložený vynález tedy vyžaduje o 12 až 26 dnů méně pro kompletní průběh než proces předcházející. Toto je důležitá výhoda, protože vystavení karbohydrátů zvýšené teplotě jako je 50 °C, může vést k degradaci.

Tabulka II

Chemická aktivace koncové redukční jednotky S.pneumonie oligosacharidů

Parametry	dřívější postup	navrhovaný postup
zaváděná skupina	NH <sub>2</sub>	NH/CH <sub>2</sub> /2NH <sub>2</sub>
čínidlo /pH/	amoniakální pufr	di-aminoethan /9/
teplota aktivace	50 °C	100 °C
dobu aktivace	7-14 dnů	15 minut
redukční činidlo	Na kyanoborohydrid	pyridinboran
teplota redukce	50 °C	50 °C
doba redukce	7-14 dnů	48 hodin
výsledný produkt	oligo-NH <sub>2</sub>	oligo-NH/CH <sub>2</sub> /2NH <sub>2</sub>
aktivační bifunkční spacer	SIDEA /sukcinimidyl-diester adipové kyseliny	SIDES nebo SIDEA /sukcinimidyl diester jantarové nebo adipové kyseliny/
teplota reakce	25 °C	4 °C
reakční doba	4 hodiny	2 hodiny
výsledný produkt	oligo-NH-monoester	oligo-NH/CH <sub>2</sub> /2NH-monoester
účinnost reakce	25-30 %	79 %

Podle metody podle vynálezu je redukční aminace koncové redukční skupiny oligosacharidu provedena za použití molekuly, obsahující dvě aminoskupiny. Ve výhodném provedení vynálezu je redukční aminace provedena reakcí daného molárního množství oligosacharidu s diaminoethanovým roztokem v 10X molárním přebytku v 0,2M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  při pH asi 9 a při teplotě přibližně 25 až 100 °C a výhodně 100 °C po dobu mezi asi 1 až 60 minutami a výhodně asi 15 minut. Poté může být přidáno molární množství pyridinboranu ekvivalentní 25násobku molární koncentrace oligosacharidu v použitém postupu a reakce se provede při teplotě 25 až 100 °C, výhodně při 50 °C po dobu 1 až 72 hodin, výhodně přibližně 48 hodin.

Výsledný produkt redukční aminace může pak reagovat s bifunkční molekulou, kde každá funkční skupina je schopná reakce jak s koncovou aminoskupinou aktivovaného oligosacharidu tak i s aminoskupinou přítomnou ve struktuře proteinového nosiče. Tato bifunkční molekula může tak posloužit ke vzájemnému spojení oligosacharidů a proteinového nosiče. Ve výhodném provedení vynálezu je touto bifunkční skupinou diester, přesněji diester kyseliny adipové, u kterého bylo prokázáno spojení s účinnější glykosylací proteinu. Výhodně se ve specifickém provedení vynálezu oligosacharid, podrobený redukční aminaci jak je popsána výše, dále podrobí reakci se sukcinimidyldiesterem kyseliny jantarové nebo výhodněji adipové. Tato reakce může být nejlépe provedena s aminovaným oligosacharidem v molární koncentraci /jako aminoskupin/ ekvivalentní asi 1 až 5 násobku molární koncentrace SIDEA /nebo SIDES/ v roztoku dimethylsulfoxidu /DMSO/ při teplotě 0 až 25 °C a výhodně asi 4 °C po dobu 0,5 až 5 hodin, nejlépe asi 2 hodiny. Aktivovaný oligosacharid může být pak oddělen srážením za použití 1,4-dioxanu /80 % obj./obj./, který také oddělí v supernatantu přebytek SIDEA /nebo SIDES/.

Proteiny, které mohou být použity podle vynálezu, zahrnují protein, jehož podání mladým savcům je bez rizika a který může posloužit jako imunologicky účinný proteinový nosič. V provedení podle vynálezu mohou být použity proteiny buněčného povrchu, membránové proteiny, toxiny a toxoidy. Kritéria pro bezpečnost budou zahrnovat absenci primární toxicity a minimální riziko alergické reakce. Difterické a tetanické toxoidy plně splňují tato kritéria; tyto jsou po vhodné přípravě netoxické a výskyt alergických reakcí je přijatelně nízký. Ačkoliv riziko alergické reakce může být určující pro dospělé, je minimální pro děti. V souladu s dalším výhodným provedením vynálezu, vhodné proteinové nosiče zahrnují, ale nejsou na ně omezeny *Salmonella* flagelin, *Hemophilis pilin*, *Hemophilus* 15 kDa, 28-30 kDa a 40 kDa membránové proteiny, tepelně labilní enterotoxin LTB *Escherichia coli*, cholera toxin a virové proteiny, zahrnující proteiny rotaviru VP7 a respirační syncytiální virus F a G.

V "nosičovém efektu" se stává slabý antigen navázáním na silnější antigen jako nosič /tj. na heterologní protein/ více imunogenickým, než když byl přítomen sám. Jestliže zvíře bylo dříve imunizováno samotným nosičem, může být zvíře "prámed" a produkovat zvýšenou imunitní odpověď nejen na nosičový antigen, ale také na navázanou hapténovou skupinu. Děti jsou pravidelně imunizovány tetanickými a difterickými toxoidy. Tak mohou být vybaveny pro příští přítomnost kapsulárních antigenů konjugovaných s jedním z těchto toxoidů.

Obecně, každý heterologní protein může posloužit jako nosičový antigen. Nicméně jisté bakteriální toxiny jako tetanický a difterický, mohou mít navíc výhodu v tom, že jsou složeny ze dvou částí, z nichž jedna /vazebná podjednotka/ má vysokou afinitu pro navázání na buněčné povrchy buněk savců. Pochopitelně, konjugace na takový "vazebný protein"

může dovolit navázanému antigenu efektivnější iniciaci odpovědi v buňkách imunitního systému.

Proteinovými nosiči, na které jsou konjugovány kapsulární polymery, mohou být přirozené toxiny nebo detoxifikované toxiny /toxoidy/. Tak mohou být relativně novými mutačními technikami produkovány geneticky změněné proteiny, které jsou antigenně podobné toxinům již netoxickým. Tyto jsou nazývány "křížově reaktivní materiály" /cross reacting materials/ nebo CRM. CRM<sub>197</sub> je však bezcenný, neboť má jedinou změnu aminokyseliny vzhledem k nativnímu difterickému toxinu a imunologicky se od něj neliší.

Konjugace kapsulárních polymerů s přírodními toxiny může redukovat toxicitu, ale významná toxicita může být zachována. Tak další detoxifikace proteinových toxinů používá formalín, který reaguje s volnou aminoskupinou proteinu. Reziduální toxicita může stále být zachována. Mimoto je možná spontánní detoxifikace jednotlivého podílu vakcíny a zachovává se výsledek spojený s tímto postupem.

Alternativně může být přírodní toxin detoxifikován formalinem za vzniku konvenčního toxoidu před konjugací s kapsulárními polymery. Nicméně prvotní zpracování formalinem redukuje počet volných aminoskupin vhodných pro reakci s redukujícími skupinami fragmentu kapsulárního polymeru. CRM tak mají významné výhody v tom, že nemají žádnou toxicitu dokud žádná z jejich aminoskupin není obsazena formalinem. Další výhodou je, že při práci s CRM neexistuje žádné bionebezpečí.

V případě CRM<sub>197</sub>, který je imunologicky identický s nativním toxinem, zpracování s formalinem /ačkoliv zde není

nutná detoxifikace/ značně zvyšuje imunologickou odpověď. Je zde domněnka, že je to způsobeno stabilizací molekuly proti degradaci mechanismem látky a/nebo agregace křížové vazby /imunogenicita částic se zvyšuje s velikostí/

Ze všech výše uvedených důvodů jsou tetanické a difterické toxiny prvními kandidáty pro proteinové nosiče, ještě jsou zde další, které mohou být vhodné. Ačkoliv tyto další nemusí mít průběh bezpečnosti objevený pro difterii a tetanus, mohou zde být jiné nepřekonatelné důvody k jejich použití. "spříklad mohou být efektivnější jako nosiče, nebo může být rozhodující ekonomika produkce. Další kandidáti pro nosiče zahrnují toxiny pseudomonas, staphylococcus, streptococcus, pertussis a Escherichia coli.

Ve specifickém provedení vynálezu, mohou být aktivované oligosacharidy připojeny k CRM<sub>197</sub> proteinu, který byl čištěn následovně:

CRM<sub>197</sub>, produkováný kmenem Corynebacterium diptheriae, může být oddělen z kultivačního media průchodem bakteriální kultury membránou Millipore, vysrážením proteinu z filtrátu a čištěním CRM<sub>197</sub> iontovýměnnou chromatografií, jak je popsáno výše. Alternativně, v podstatě čistý CRM<sub>197</sub> může být získán metodou známou v oboru.

Aktivované oligosacharidy mohou být kovalentně navázány na nosičivý protein za přítomnosti organického rozpouštědla a popřípadě dalšího činidla /jako je kondenzační činidlo/ za účelem podpory spojení terminálních funkčních skupin s aktivovaným oligosacharidu k proteinu. Ve specifickém, výhodném provedení podle vynálezu, aktivovaný oligosacharid nesoucí terminální esterovou skupinu může být kovalentně navázán na volné aminoskupiny, které jsou přítomny na proteinovém nosiči následovně:

Aktivovaný oligosacharid může být rozpuštěn v dimethylsulfoxidu a pak přidán do vodného roztoku proteinového nosiče /například, ale bez omezení, do CRM<sub>197</sub> v koncentraci asi 2 mg/ml/ tak, že molární poměr monoester-aktivovaný oligosacharid/celkové aminoskupiny v proteinovém nosiči je asi 1:2 a konečná koncentrace DMSO je asi 50 % obj./obj. Konjugační reakce se provádí při 4 °C a ačkoliv je reakce téměř kompletní za asi 2 hodiny, je vhodné nechat reakci probíhat přes noc za účelem zvýšení výtěžku reakce na nejvyšší hodnoty pro každý typ specifického glykokonjugátu. Takto získaný glykokonjugát se pak čistí gelovou chromatografií.

Pro syntézu monovalentní vakcíny může být k proteinu konjugován oligosacharid získaný z jednoho serotypu bakterie. Pro syntézu multivalentních vakcín, mohou být glykokonjugáty získány připojením směsi oligosacharidů, získaných s bakterií různých druhů nebo rozdílných serotypů, k proteinovému nosiči. Alternativně, glykokonjugáty získané reakcí jednoho typu oligosacharidů s proteinovým nosičem v separátních reakcích za použití různých oligosacharidů, mohou být smíseny. Multivalentní vakcína může obsahovat proteinový nosič, nesoucí homogenní nebo heterologní populaci připojených oligosacharidů.

Ověření imunogenicity glykokonjugátů produkovaných výše uvedenou metodou může být testováno na vhodném zvířecím systému dříve, než budou podány lidem. Mezi tato zvířata patří/bez omezení na ně/ králíci, prasata, morčata, myši, krysy nebo kozy. Ve specifickém provedení vynálezu mohou být králíci /přibližně 2 kg/ podkožně neočkováni glykoproteinovými konjugáty za nebo bez přítomnosti aluminiumfosfátu nebo hydroxidu. Přibližně 2,5 µg oligosacharidů vytvoří dávku pro 2kg králíka. Titr protilátek pak může být hodnocen testem ELISA nebo jinou metodou v oboru známou. Protože protilátky, vytvářené ke glykokonjugátům podle vy-

nálezu mohou být neschopné imunoprecipitace antigenu, nejsou doporučovány pro zjištění titrů protilátkové zkoušky, závislé na imunoprecipitaci.

Vhodným nosným médiem pro formulaci vakcín jsou salinický roztok řufovaný fosforečnanem sodným /pH 7,4/ nebo 0,125M gel fosfátu hlinitého suspendovaný v salinickém roztoku pufovaném fosforečnanem sodným na pH 6 a jiná běžná media.

Obecně, vakcíny, obsahující od asi 5 do asi 100  $\mu\text{g}$ , výhodně asi 10 až 50  $\mu\text{g}$  oligosacharidu, jsou vhodné pro zvýšení účinné hladiny protilátek proti kapsulárním polymerům u mladých teplokrevných savců. \*ochopitelně, přesná dávka bude určena rutinními experimenty dávka/odpověď. Koncentrace glykoproteinových konjugátů pro přípravu vakcín pro děti je zahrnuta v rozmezí 25 až 200  $\mu\text{g}$  oligosacharidu. Větší dávky mohou být podávány na základě tělesné hmotnosti. U několika menších dávek podávaných postupně se očekávají vyšší účinky než u stejného množství konjugátu podaného v jedné injekci.

Vakcíny podle vynálezu mohou být podávány teplokrevným savcům jakéhokoliv věku a jsou zejména přizpůsobeny k indukci aktivní imunizace proti systémovým infekcím u mladých savců, vyvolané patogeny *Haemophilus influenzae* typ b, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* a *Pseudomonas aeruginosa*.

Podle vynálezu mohou být vakcíny podávány subkutánně, intravenózně, intramuskulárně, intraperitoneálně, orálně, nebo intranasálně. Vakcíny mohou obsahovat glykokonjugát v rozpuštěné nebo mikroparticulární formě nebo inkorporovaný do mikrokuličen nebo mikrovesikul, včetně liposomů.

Ve výhodných provedích podle vynálezu jsou glykokonjugátové vakcíny namířené proti opouzdřeným patogenním bakteriím použity pro ochranu citlivých jedinců před rozvitím infekcí, způsobených těmito agens. Mezi citlivé jedince jsou zařazeny děti s nezralým imunitním systémem, aspleničtí jedinci jakož i další jedinci s oslabeným imunitním systémem nebo chronickou chorobou, zejména syndromem získané imunodeficiency /AIDS/, hematopoetickou malignitou, diabetem, chronickými srdečními chorobami, chronickými plicními chorobami a srpkovitou anémií. Glykokonjugáty podle vynálezu, podle síly jejich konjugace na proteinový nosič, zvyšují imunogenicitu oligosacharidů, které nesou.

Tak mohou být glykokonjugáty podle vynálezu použity v očkování k získání ochrany proti infekci kteroukoliv z bakterií, která vlastní polysacharidové pouzdro, zahrnující *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus mutans*, *Cryptococcus neoformans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Kmeny *S. pneumoniae* zvláště virulentní u dětí, specifické pro tento vynález zahrnují typy 1,2,3,4,5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23 a 33F.

Vakcíny podle vynálezu mohou být použity k indukci monospecifické a homogenní imunitní odpovědi. Monospecifická imunitní odpověď je spojena s množstvím výhod, zahrnující v to poskytnutí protilátek s

- i/ homogenní specifitou, ve které vlastně všechny protilátky jsou namířeny proti specifickému epitopu a jsou charakterizovány stejnou afinitou konstantní hodnoty,
- ii/ vysokou afinitou konstantní hodnoty s vyšší antibakteriální aktivitou,

iii/ zvýšenou cílovou specifitou a absencí křížové reaktivity s hostitelem se týkajícími antigeny a iv/ sníženou aktivací komplementu způsobenou snížením srážecí aktivity monospecifických protilátek, také vedoucí k bezpečné vakcíně.

Dále může být předložený vynález použit k produkci vakcín, které rozpoznávají peptidy nebo lipooligosacharidy nebo jiné povrchové oligosacharidové hapteny navázané, metodami podle vynálezu, na proteinový nosič. Takové vakcíny mohou být například použity k indukci imunity k nádorovým buňkám, nebo v produkci protinádorových protilátek konjugovaných na chemoterapeutické nebo bioaktivní činidlo. Anti-nádorová aktivita může být vyvolána navázáním nádor-specifického antigenu, nebo jeho epitopu, na proteinový nosič použitím metod podle vynálezu.

#### Příklad provedení vynálezu

Vývoj multivalentní vakcíny pneumokokálních oligosacharidových konjugátů

##### 1. Příprava polysacharidu

Kapsulární polysacharid *S.pneumoniae* typ 6A, kapsulární polysacharid *S.pneumoniae* typ 14, kapsulární polysacharid *S.pneumoniae* typ 19F a kapsulární polysacharid *S.pneumoniae* typ 23F byly získány z American Type Culture Collection.

##### 2. Hydrolýza polysacharidu

###### 2.1. Hydrolýza polysacharidu *S.pneumoniae* typ 6A

Dva miligramy kapsulárního polysacharidu typu 6A *S.pneumoniae* byly rozpuštěny v 1 ml vodného roztoku, obsahujícího 10 mM kyseliny octové o pH = 3,4, pak hydrolyzovány v zatavených ampulích ponořených do olejové lázně při

teplotě 100 °C po dobu 30 hodin. Výsledné oligosacharidy byly pak odděleny z reakční směsi chromatografií přes Sephadex G15 /Pharmacia, Uppsala/ kondiciovaný 15 mM roztokem NaCl při pH 7,0 a 4 °C.

Chromatografické eluenty pak byly analyzovány postupem podle Kabata /1964 v "Experimental Immunochemistry", vyd. E. A. Rabat a Mayer, str. 538-541/, Chen a spol. /1956, Anal. Chem. 28:1756-1758/ a Porré a spol. /1981? Anal. Biochem. 118:301-306/ pro zjištění přítomnosti methyl-pentóz, fosforu a redukujících skupin, např. aldehydových skupin. Anazou byl zjištěn poměr methylpentoza/aldehyd 3,96, methylpentoza/fosfor 0,96 a fosfor aldehyd 4,12.

Gelová chromatografie na Sephadexu G-50 Superfine /Pharmacia/ za použití pufru potvrdila distribuční konstantu /kd/ 0,538 /hexozou/, odpovídající molekulové hmotnosti přibližně 2,500.

NMR, plynová chromatografie a stechiometrická analýza indikují, že oligosacharidy obsahují asi 3 až 4 záhlavní opakující se jednotky, mezi kterými byla nalezena galaktoza, která je imunodominantním cukrem.

## 2.2. Hydrolýza polysacharidu S.pneumoniae typ 14

Dva miligramy kapsulárního polysacharidu typu 14 S. pneumoniae byly rozpuštěny v 1 ml vodného roztoku, obsahujícího 0,5 M trifluoroctové kyseliny, pak byly hydrolyzovány v zatavených ampulích ponořených do olejové lázně při teplotě 70 °C po sedm hodin. Výsledné oligosacharidy pak byly odděleny z reakční směsi chromatografií na Sephadexu G15 /Pharmacia, Uppsala/, kondiciovaném 15 mM roztokem NaCl při pH 7,0 při 4 °C.

Chromatografické eluenty pak byly analyzovány na ob-

sah hexosaminu a aldehydu a bylo zjištěno, že poměr hexosaminu k aldehydu je 3,17. Plynová chromatografie a stechiometrická analýza indikují molekulovou velikost odpovídající třem až čtyřem základním opakujícím se jednotkám. Odstranění větvení galaktozy podle plynové chromatografie bylo pod 10 %. Gelová chromatografie na Sephadexu G-50 Superfine /Pharmacia/ za použití 15 mM NaCl při pH 7,0 zjistila pro oligosacharidy, distribuční konstantu /Kd/ 0,30 definovanou jako celková hexoza.

### 2.3. Hydrolýza polysacharidu *S.pneumoniae* typ 19F

Dva miligramy kapsulárního polysacharidu typu 19F *S.pneumoniae* byly rozpuštěny v 1 ml vodného roztoku, obsahujícího kyselinu octovou /10 mM/, pH = 3,4, pak byly hydrolyzovány v zatavených ampulích ponořených do olejové lázně při teplotě 50 °C po dobu třicetdevět hodin. Výsledné oligosacharidy pak byly odděleny z reakční směsi chromatografií na Sephadexu G-15 /Pharmacia, Uppsala/, kondiciovaném 15 mM roztokem NaCl při pH 7,0 při 4 °C.

Chromatografické eluenty pak byly analyzovány postupem podle Kabata /1964, v "Experimental Immunochemistry", vyd E. A. Rabat a Mayer, str. 538-541/, Chen a spol. /1956, Anal.Chem. 28:1756-1758/ a Porroa spol. /1981/, Anal. Biochem. 118:301-306/ pro zjištění přítomnosti methyl-pentoz, fosforu a redukujících skupin, např. aldehydových skupin. Analýza zjistila poměr methyl-pentoza/redukovaná methylpentoza 3,5 a poměr methyl-pentoza/fosfor 3,2.

Gelová chromatografie na Sephadexu G-50 Superfine /Pharmacia/ zjistila oligosacharidovou Kd=0,46 /celková hexoza/ a kombinovaná analýza plynová chromatografie a stechiometrie potvrzují velikost odpovídající třem až čtyřem opakujícím se jednotkám.

#### 2.4. Hydrolýza polysacharidu *S.pneumoniae* typ 23F

Dva miligramy kapsulárního polysacharidu *S.pneumoniae* typ 23F bylo rozpuštěno v 1 ml vodného roztoku 0,25M kyseliny trifluoroctové, pak hydrolyzováno v zatavených ampulích ponořených v olejové lázni při teplotě 70 °C po dobu tří hodin. Vzniklé oligosacharidy byly pak z reakční směsi odděleny chromatografií přes Sephadex G15 /Pharmacia, Uppsala/ kondiciovaný 15 mM roztokem NaCl při pH = 7,0 při 4 °C.

Chromatografické eluenty pak byly analyzovány postupy podle Kabata /1964, v "Experimental Immunochemistry," vyd. E. A. Rabat a Mayer, str. 538-541/, Chena a spol./1956, Anal. Chem. 28:1756-1758/ a Porroa a spol. /1981, Anal. Biochem. 118\_301-306/, pro zjištění přítomnosti methylpentoz, fosforu a redukčních skupin, např. aldehydových skupin. Analýza zjistila poměr hexoza/aldehyd 4,5 - 4,5, poměr hexoza/methylpentoza 2,3 a poměr fosfor/ aldehyd 2,9.

Plynověchromatografická a stechiometrická analýza potvrzují přítomnost mezi 3,5 a 4,5 základními opakujícími se jednotkami. Odstranění rozvětvení ramnozy bylo podle plynové chromatografie menší než devět procent.

Gelová chromatografie na Sephadexu G-50 Superfine /Pharmacia/ stanovila distribuční konstantu /Kd/ 0,38 /jako hexoza/.

Imunochemická charakteristika oligosacharidových haptenu *S.pneumoniae*

Schopnost oligosacharidů typu 6A, 14, 19F a 22F *S.pneumoniae* reagovat s protilátkami nemířenými proti intaktním kapsulárním polysacharidům byla testována, jak je popsáno

Porroem a spol. /1985, Mol.Immunol.22:907-919/, použitím techniky, která měří schopnost haptenu /tj. oligosacharidu/ inhibovat homologní antigeny /kapsulární polysacharidy/ v protilátkové imunoprecipitační reakci /nízká molekulová hmotnost haptenu nedává imunoprecipitační reakci při testování na homologní protilátky/.

Metoda nazývaná "diferenciální elektroforéza" byla provedena následovně: detičkový nosič z plastické hmoty pro imuno elektroforézu obsahuje tři 1% /hmotn./obj./ agarozové kompartmenty /Agarosa M-LKB, Bromma, Švédsko/. První kompartment obsahuje 0,05 % /obj./obj./ referenčního antiséra ke kapsulárnímu polysacharidu. Druhý kompartment obsahuje 0,05 % /obj./obj./ referenčního antiséra ke kapsulárnímu polysacharidu, který byl před tím inkubován se známým množstvím referenčního kapsulárního polysacharidu při 37 °C po 15 minut. Třetí kompartment obsahuje 0,05 % /obj./obj./ referenčního antiséra ke kapsulárnímu polysacharidu, který byl dříve inkubován se známým množstvím oligosacharidového haptenu. Pak byla provedena elektroforetická separace kapsulárního polysacharidu ve čtyřech pokusech dvojnásobně řaděných roztoků při 70 V/cm ve 20 mM tris-barbituratovém pufru, pH=8,8 po dobu 90 minut. Po elektroforéze byly destičky vybarveny stříbrem, sušeny a vyhodnoceny. Inhibice oligosacharidovými molekulami byla zjištěna při vyšším "raketovém" imunoprecipitaci, které se objevilo v kompartmentu, obsahujícím referenční antisérum pre-inkubované s haptenu. Minimální inhibiční koncentrace haptenu byla vy počtena jako

$$MIC_{Ha} = C_{Ha} \frac{h_{Ag}}{h_{Ha}}$$

kde  $C_{Ha}$  = koncentrace haptenu zkoušená v gelu  
 $h_{Ag}$  = úsek na přímce stanovený jako výška získaných "raketových" imunoprecipitátů, jestliže byl

v gelu referenční antigen a

$h_{Ha}$  = úsek na přímce determinovaný výškou  
"raketových" imunoprecipitátů, získaných,  
jestliže byl zkoušený haptén v gelu.

$$\text{Podobně, } MIC_{Ag} = C_{Ag} \cdot h_{Ag}$$
$$\text{Specifita} = \frac{MIC_{Ag}}{MIC_{Ha}}$$

Byly testovány oligosacharidové haptény různé veli-  
kosti.

Schopnost oligosacharidů blokovat imunoprecipitaci  
kapsulárních polysacharidů specifickými protilátkami by-  
la také testována neelektroforetickou metodou radiální  
imunodifuze. Podle této metody inhibice oligosacharido-  
vou molekulou byla zřejmá z většího poloměru imunopreci-  
pitátu vytvořeného difuzí antigenu /kapsulárního polysacha-  
ridu/ 1 % hmotn./obj. agarozou, obsahující specifickou  
protilátku předem inkubovanou s daným množstvím inhibitoru  
/oligosacharidu/. Jakmile je experimentálně nalezena mini-  
mální slučovací koncentrace /Minimal Combining Concentra-  
tion - MCC/, vypočte se specifita podle uvedeného vzorce:

$$\text{Specifita} = \frac{MCC_{Ag/Ps/}}{MCC_{Ha/oligo/}}$$

Tabulka III

Imunochemická charakterizace oligosacharidových haptenu  
*S. pneumoniae*

Oligosacharid typ	-- DP	-- MH	/MIC <sub>Ps</sub> /MIC <sub>Hp</sub> / DIEP	/MCC <sub>Ps</sub> /MCC <sub>Hp</sub> / IRID
6A	2	1,5K	10 <sup>-3</sup>	
	3,5	2,5K	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>
	10	7,0K	10 <sup>-1</sup>	
14	5	3,5K	n.t.	10 <sup>-1</sup>
	15	10,4K	n.t.	10 <sup>-1</sup>
19F	3,5	2,2K	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
23F CH <sub>3</sub> COOH/hyd/ TFA/hyd/	3	2,3K	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>
	6	4,5K	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>
	4,5	3,4K	10 <sup>-4</sup>	5x10 <sup>-3</sup>
	9,5	7,2K	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>

n.t. = netestovatelné

DIEP = diferenciální imuno elektroforéza

IRID = inhibice radiální imunodifuze

MIC = minimální inhibiční koncentrace

MCC = minimální spojovací koncentrace

Aktivace koncové redukující jednotky oligosacharidů *S. pneumoniae*.

Oligosacharidové hapteny, získané výše, byly rozpuštěny ve vodě na konečnou koncentraci asi 5 mg/ml. Ke každému roztoku byl na každý mililitr objemu roztoku přidán 0,1 ml 0,2 M dihydrogenfosforečnanu draselného a pH bylo zvýšeno na 9,2 až 9,4 potřebným množstvím diaminomethanu /obecně je vyžadován objem 2  $\mu$ l diaminomethanu na každý mililitr roztoku/. Směs byla udržována na 100 °C 15 minut, po této době bylo přidáno množství asi 4  $\mu$ l pyridinboranu na každý mililitr objemu roztoku. pH bylo upraveno na 9,2 1N

hydroxidem sodným. Směs pak byla přehesena v zatavené ampuli do olejové lázně udržované na 50 °C pro příštích 48 hodin. Potom byl aminoaktivovaný oligosacharidový roztok neutralizován 1N HCl a čištěn na Sephadexu G-15 Superfine /15 mM NaCl, pH 7,01/. Oddělené chromatografické frakce byly spojeny a lyofilizovány. Pak byl lyofilizovaný zbytek rozpuštěn v DMSO na koncentraci 10 mg/ml a přidán k molárnímu množství SIDEA /nebo SIDES/, odpovídajícímu 5:1 mol/mol poměru s ohledem na množství aminoskupin přítomných v lyofilizované sloučenině. Reakce probíhala při teplotě místnosti po 4 hodiny a pak byla přidána k roztoku 4 objemu 1,4-dioxanu /konečná koncentrace 80 % v 1,4-dioxanu/ za účelem vysrážení esteru aktivovaného oligosacharidu. Sraženina oddělená odstředěním byla promyta třikrát 1,4-dioxanem a udržována při -20 °C nebo nižší než byla použitá teplota v konjugačním procesu. Výtěžek aktivčního procesu pro každý ze čtyř oligosacharidů je uveden v tabulce IV.

Tabulka IV

Aktivace oligosacharidu *S. pneumoniae*: výtěžek procesu  
/% hmotn./hmotn./

Serotyp	oligo-NH/CH <sub>2</sub> / <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	oligo-NH/CH <sub>2</sub> / <sub>2</sub> NH-mono- ester	obecně ester
6A	75	93	70
14	73	90	66
19F	100	100	100
23F	50	90	45
Xg/ <u>s</u> .od./	74,5/ <u>+20</u> /	93,3/ <u>+4,7</u> /	70/ <u>+23</u> /

Konjugace aktivovaného oligosacharidu k CRM<sub>197</sub> proteinu  
Příprava CRM<sub>197</sub> proteinu

CRM<sub>197</sub>, produkovaný *Corynebacterium diphtheriae* C7 /B<sup>tx</sup>-197/, byl oddělen z kultivačního media molekulární filtrací za použití membrány Millipore XM-50 /NMWL 5x10<sup>-4</sup>/. Protein byl pak vysrážen přidáním nasyceného roztoku síranu amonného k filtrátu /až 65% hmotn./obj./. Vysrážený protein byl oddělen odstředěním a znovu rozpuštěn v 0,01M fosfátovém pufru /pH=7,2/.

Další čištění CRM<sub>197</sub> bylo provedeno iontovýmennou chromatografií za použití 2,5 x 100 cm DEAE -Sepharose 6B/CL sloupce /Pharmacia, Uppsala/ kondiciovaného v 0,01M fosfátovém pufru při pH 7,2, za použití 0,09M NaCl v 0,01M fosfátovém pufru jako elučním činidlo.

SDS elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za redukčních podmínek /Pappenheimer a spol., 1972, Immunochem, 9: 891-906/ indikuje, že 80 % získaného CRM<sub>197</sub> bylo ve své nativní molekulární formě. Čistota proteinu byla přibližně 400 flukulačního limitu /Lf/ na miligram.

Konjugace aktivovaných oligosacharidů

Konjugační proces spočívá ve spojování; monosukcinimidylesterem aktivovaných oligosacharidových haptenu k epsilon-aminoskupině lysinových zbytků nosičového proteinu CRM<sub>197</sub>.

Dimethylsulfoxid, obsahující monosukcinimidylesterem /adipové kyseliny/ aktivované oligosacharidy *S.pneumoniae* typ 6A, 14, 19F a 23F kapsulárních polysacharidů byl pak přidán k 0,1M hydrogenuhličitanovému roztoku pH=8,0, obsahujícímu 2 mg/ml CRM<sub>197</sub> pro přípravu, který byl 50% ve vodě a ve kterém je molární poměr esterem aktivovaného oligosacharidu k nosičovému proteinu 1:2.

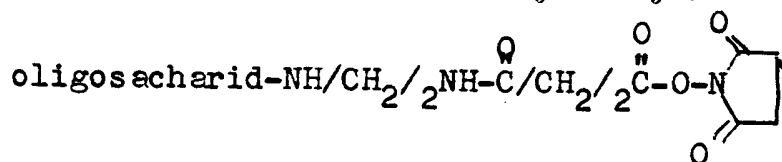
Takto získaná směs byla udržována za mírného míchání při 4 °C po 15 hodin. Oligosaccharidy každého ze čtyř serotypů byly konjugovány na protein v oddělených reakcích. Shrnutí fyzikálně-chemických charakteristik získaných oligosacharidů je uvedeno v tabulce V.

Tabulka V  
Charakteristika glykokonjugátů

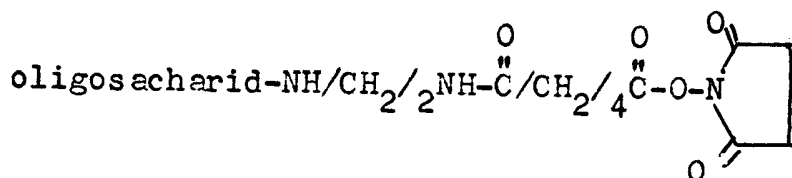
Serotyp	DP oligo	M <sub>H</sub> oligo	M <sub>H</sub> konjugátu /SDS-PAGE/	SD	
				/mol oligo/ mol protein	%/hmotn./hmotn./ konj. prot.
6A	3	2,1K	77,6K	7	100
14	5	3,5K	85,1K	6	100
19F	3	1,9K	69,2K	4	100
23F	6	4,5K	85,0K	5	100

Porovnání účinnosti konjugace používající jako linkeru sukcinimidyl-diesteru adipové kyseliny a sukcinimidyl-diesteru jantarové kyseliny

Aktivované oligosacharidy vzniklé reakcí se sukcinimidyl-diesterem jantarové kyseliny /SIDES/ měly strukturu



zatímco oligosacharidy vzniklé reakcí se sukcinimidyl-diesterem adipové kyseliny /SIDE/ měly strukturu



a získávají se tak vazby různé velikosti mezi oligosacharidem a konjugovaným proteinem /viz obr.2/. Byla hodnocena účinnost konjugace používající SIDES a SIDEA aktivované oligosacharidy. Jak je uvedeno na obr.3A, B a C, jediné když vazba byla odvozena od SIDEA zdál se být protein v plně glykosylované formě /nebyly detegovány žádné nebo málo volných vazeb CRM<sub>197</sub>/.

#### Imunogenicita glykokonjugátů *S.pneumoniae*

Bylo připraveno několik přípravků ze čtyř glykokonjugátů antigenů a testováno na králících / podle seznamu uvedeného v tabulce VI/:typově specifické glykokonjugáty v monovalentním přípravku /2,5 nebo 5,0  $\mu$ g oligosacharidu na dávku/ nebo multivalentním přípravku /2,5  $\mu$ g každého oligosacharidu na dávku/ s a bez hydroxidu hlinitého jako minerálního adjuvans / pouze v multivalentním přípravku v dávce 1 mg byl podáván/. Kompletní absorpce čtyř glykokonjugátů k hydroxidu hlinitému se vyskytla za zvolených podmínek, poněvadž zpracování supernatantu multivalentního přípravku buď elektroforézou SDS na polyakrylamidovém gelu nebo raketovým imunoelktroforézou nezjistilo žádné detegovatelné množství volného proteinu. Průměrná dávka každého glykokonjugátu, obsahuje přibližně 2,5  $\mu$ g oligosacharidu a 13  $\mu$ g nosičového proteinu CRM<sub>197</sub> /srovnatelné s průměrnou dávkou lidské vakcinace difterickým toxidem/. Imunizační soubor zahrnuje primární dávku a dvě boosterové dávky po 4 týdnech. Odběry krve byly provedeny v týdnu 0, 4, 6 a 10.

Tabulka VI

Imunizační soubor pro králíky a myši a dávky vakcín

Imunizace v týdnu 0, 4, 8

odběr krve v týdnu 0, 4, 6, 10

- A. Rozpustný monovalentní /jeden typ/ přípravek  
1 dávka /0,5 ml/: 2,5  $\mu$ g oligosacharid a  
13  $\mu$ g /5 Lf/ CRM<sub>197</sub>  
1 dávka /0,5 ml/: 5,0  $\mu$ g oligosacharid a  
26  $\mu$ g /10 Lf/ CRM<sub>197</sub>
- B. Rozpustný polyvalentní /směs 4 typů/ přípravek  
1 dávka /0,5 ml/: 2,5  $\mu$ g typově specifický oligo  
/Tot = 10  $\mu$ g oligos/ a celkem 52  $\mu$ g  
/20 Lf/ CRM<sub>197</sub>
- C. Al(OH)<sub>3</sub>-ads polyvalentní /směs 4 typů/ přípravek  
1 dávka /0,5 ml/: 2,5  $\mu$ g typově specifický oligo  
/Tot = 10  $\mu$ g oligo/ a celkem 52  $\mu$ g  
/20 Lf/ CRM<sub>197</sub> s 1 mg Al(OH)<sub>3</sub>

Tabulka VII představuje RIA /FARR metoda/ hodnocené množství typově specifických protilátek jakož i počet odpovědí na počet imunizovaných zvířat. Poměr /R/ indikuje násobek zvýšení dosažený po každé imunizační dávce.

Tabulka VIII představuje ELISA titry vyjádřené jako IgG isotyp Ab jakož i počet odezev na počet imunizovaných zvířat. Poměry  $-R_1$   $-R_2$   $-R_3$  znamenají násobek zvýšení titrů po každé imunizační dávce, zatímco poměry  $R_1$ ,  $-R_2$ ,  $-R_3$  indikují násobek zvýšení v titrech pro danou imunizační dávku vzhledem k pre-titru. Tabulka IX uvádí kvalitativní výsledky jako funkci indukovaných IgG protilátek v poznávání polysacharidové kapsule žijících streptokoků /Quellung reakce nebo Nuefeldův test/.

Tabulka X ukazuje neutralizační titry difterického toxinu indukované u králíků proteinovým CRM<sub>197</sub> nosičem, podle zkoušky Vero buňkami. I když jako kontrola bylo použito referenční FDA antisérum, mohou být také titry vyjádřeny v  $\mu$ /ml.

Tabulka VII

RIA-hodnocené titry\* králíků imunizovaných\*\* oligosacharidy\*\*\* S. Pneumoniae typ 6A, 14, 19F, 23F kovalentně vázaných na nosičový protein CRM<sub>197</sub>

	Rozpustná forma			forma s příd. Al/OH/3					
	týden 0	4	6	týden 0	4	6			
typ 6A	n.d.	n.d.	150/2/6/	495/6/6/	n.d.	538/5/5/	3,190/5/5	4,064/5/5/	
							R=0	R=1,3	
typ 14	n.d.	n.d.	230/1/6/	195/2/6/	n.d.	77/3/6/	203/4/5/	216/5/5	
							R=2,6	R=1,1	
typ 19F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	75/6/6/	n.d.	72/6/6/	108/5/5/	188/5/5/
							R=1,5	R=1,7	
typ 23F	n.d.	n.d.	400/1/6/	140/1/5/	n.d.	283/3/6/	n.d.	246/5/5	

\*Data vyjádřena jako geometrický průměr titrů v ngN<sub>Ab</sub>/ml. Respondenti vs. celkový počet zvířat jsou v závorkách.

\*\*Multivalentní přípravky čtyř glykokonjugátů v rozpustné a Al/OH/3-adsorbované formě /1 mg/dávka forma/. Každý glykokonjugát obsahuje průměrně 2,5 µg oligosacharidu a průměrně 13 µg proteinu CRM<sub>197</sub>. Imunizace v týdnu 0, 4 a 9. Vykrvácení v týdnu 0, 4, 6 a 11.

\*\*\*typ 6A a 19F oligosacharidů má průměr  $\overline{DP}$ =3  
typ 14 a 23F oligosacharidů má průměr  $\overline{DP}$ =5

\*\*\*\*Glykokonjugát typ 6A má průměrný stupeň substituce /SD/ oligosacharidů na jednotku nosičového proteinu /mol/mol/ rovný 7.

$\overline{SD}$  pro typ 14 glykokonjugátu je 6, pro typ 19F 4 a pro typ 23F 5.

Tabulka VIII

ELISA výsledky IgG isotypu Ab titrů\* indukovaných multi-valentní vakcinou, obsahující glykokonjugáty *S.pneumoniae* DP=3+6 kapsulárních oligosacharidů typ 6A, 14, 19F, 23F, adsorbované na minerální přísadu Al/OH/3

	Pre-titr /týden 0/	počátek /týden 4/	1.booster /týden 6/	2.booster /týden 11/
typ 6A	< 50/0/5/ R <sub>1</sub> > 96,0	4,800/5/5/ R <sub>2</sub> =10,7	51,200/5/5/ /α < 0,01/	130,000/5/5/ R <sub>3</sub> =2,5 /α < 0,01/
		R <sub>2</sub> ' > 1,027		R <sub>3</sub> ' > 2,600
typ 14	< 50/0/5/ R <sub>1</sub> > 7,2	360/5/5/ R <sub>2</sub> =12,4/α < 0,01/ R <sub>2</sub> ' > 89,3	4,480/5/5/ /α < 0,01/	19,000/5/5/ R <sub>3</sub> =4,4 /α < 0,01/ R <sub>3</sub> ' > 396,0
typ 19F	< 50/0/5/ R <sub>1</sub> > 41,6	2,080/5/5/ R <sub>2</sub> =9,0 /α < 0,01/ R <sub>2</sub> ' > 371,2	18,560/5/5/ /α < 0,01/	35,200/5/5/ R <sub>3</sub> =1,9/α < 0,01/ R <sub>3</sub> ' > 704,0
typ 23F	< 50/0/5/ R <sub>1</sub> > 17,6	880/5/5/ R <sub>2</sub> =1,5 /α < 0,01/ R <sub>2</sub> ' > 25,6	1,280/5/5/ /α < 0,01/	11,880 <sup>**</sup> R <sub>3</sub> =9,3 /α < 0,01/ R <sub>3</sub> ' > 237,6

\*Titry vyjádřeny jako geometrický průměr reciproční hodnoty nejvyššího ředění séra vykazující ABS hodnotu dvojnásobnou vzhledem k reakčnímu základu. V závorkách je uváděn počet zvířat /respondenti k celkově injektovaným/.

\*\*Hodnota představuje titr neobvykle vysokých respondujících králíků. Vyřazením dvou z pěti imunizovaných králíků, nejlepšího a nejhoršího respondenta, jsou získány výsledky zbylých tří králíků pro serotyp 23F:

Pokračování k tabulce VIII:

týden 0	týden 4	týden 6	týden 11
50/0/5/	667/3/3/	1,333/3/3/	2,667/3/3/
$R_1 > 13,3$	$R_2 = 2,0$ / $\alpha < 0,01$ /	$R_3 = 2,0$ / $\alpha < 0,01$ /	
	$R'_2 > 26,7$	$R'_3 > 53,3$	

Tabulka IX

Imunologická funkčnost králičího séra Ab k DP=3-6 oligo-konjugovaným k CRM<sub>197</sub>

Kvalitativní analýza

/potlačení reakce\* pro kapsulární zjištění/

typ 6A S.pneumoniae: pozitivní reakce

typ 14 S.pneumoniae: pozitivní reakce

typ 19F S.pneumoniae: pozitivní reakce

typ 23F S.pneumoniae: pozitivní reakce

\*Provedeno podle metody Austriana /1976/, Mt.Sinai J.med.  
43:699-709.

Tabulka X

Antidifterické titry\* ve zkoušce vero buňkami, indukované u králíků imunizovaných multivalentními glykokonjugáty syntetizovanými s oligosacharidy S.pneumoniae kovalentně připojenými k nosičovému proteinu CRM<sub>197</sub>

	Pre-titr /týden 0/	počátek /týden 4/	1.booster /týden 6/	2.booster /týden 11/
rozpuštěná forma	< 10	< 10	25 /0,019 /u/ml/ R=2,5	1,920/1,4 /u/ml/ R=77,0
Al/OH/3-ads	< 10	20 /0,015 /u/ml/ R=64,0	1,280 R=3,0	3,840 /2,9 /u/ml/

FDA ref.antisérum obsahuje 6 /u/ml a poskytuje 50% ochranu při ředění 1/8000.

\* Titry vyjádřeny jako reciproká hodnota ředění, ke kterému pool antiséra vyzkoušuje 50% ochranu k buňkám, jak je hodnoceno <sup>3</sup>H-leucinemou inkorporací po vystavení buněk difterickému toximu.

Čísla v závorkách znamenají titry v /u/ml stanovené za použití FDA referenčního antiséra jako kontroly.

Oligosacharidy délky řetězce  $\overline{DP} = 10 - 20$  jsou suboptimálně imunogenní.

Byly syntetizovány dvě skupiny vakcín glykokonjugátů v souladu se schematem syntézy, popsáným supra, ale za použití sacharidů typu 6A, 14, 19F a 23F *S.pneumoniae* se dvěma různými "rozsahy hodnot" délky řetězce a to  $\overline{DP} = 3-5$  a  $\overline{DP} = 10 - 20$ . Otázkou pak je, zda oligosacharid s délkou řetězce  $\overline{DP} = 20$  nebo více, bude také optimálně imunogenní /při konjugaci na selektovaný CRM<sub>197</sub> proteinový nosič/ ve vztahu k počátku a zvýšení schopnosti ve srovnání s mnohem kratšími řetězci, jako jsou  $\overline{DP} = 3$  oligosacharidy.

Králíci byli imunizováni podle protokolu popsaného v tabulce VI. Jak vyplývá ze srovnání výsledků uvedených v tabulkách XII a XIII, které se týkají výsledků ELISA IgG isotypových antigenních titrů, indukovaných rozpustnými oligosacharidy *S.pneumoniae* s  $\overline{DP} = 10-14$  a  $\overline{DP} = 3-6$ , jakož i těmi, které jsou uvedeny v tabulkách XIV a XV, které se týkají výsledků ELISA IgG titrů isotypových protilátek indukovaných oligosacharidy *S.pneumoniae* s  $\overline{DP} = 10 - 14$  a  $\overline{DP} = 3-6$ , adsorbovaných na  $Al(OH)_3$ ,  $\overline{DP} = 10-14$  nebylo spojeno se zvýšením imunogenicity. Faktem je, že vyvolání a zvýšení aktivity IgG  $\overline{DP} = 3-5$  oligosacharidovými konjugáty bylo mnohem větší, než aktivita pozorovaná při použití oligosacharidových konjugátů  $\overline{DP} = 10-14$ . Ne náhodou byly všechny čtyři zkoumané karbohydrátové struktury spojeny se stejnými výsledky. Dále, neutralizace difterického toxinu glykokonjugáty s  $\overline{DP} = 10-14$  byla shledána méně efektivní než ta, která byla dosažena použitím glykokonjugátů s  $\overline{DP} = 3-6$  /tabulka XVI/. Tak oligosacharidy délky řetězce  $\overline{DP} = 10-20$  jsou funkční v konjugátech podle předkládaného vynálezu, ačkoliv oligosacharidy  $\overline{DP} = 3-6$  vyvolávají vyšší titry protilátek.

Tabulka XI

Imunizační soubor pro králíky

Modely glykokonjugátů byly injektovány v dávce 2,5  $\mu\text{g}$  karbohydrátu. Poněvadž testované modely se liší pouze v délce řetězce kovalentně spojených oligosacharidů, bylo odpovídající množství proteinového nosiče:

	dávka kar- bohydrátu / $\mu\text{g}$ /	dávka pro- teinového nosiče / $\mu\text{g}$ /	hmotn.po- měr /hmotn./ hmotn./
DP = 3-6 oligo-CRM <sub>197</sub>	2,5	12,5	0,2
DP = 10-14	2,5	2,5	1,0

Imunizace v týdnech 0,4 a 8.

Ňdběr krve v týdnech 0,4 a 10.

Tabulka XII

ELISA výsledky IgG isotypu Ab titrů indukovaných multivalentní vakcínou, obsahující glykokonjugáty *S.pneumoniae* DP= 10-14 kapsulárních oligosacharidů typ 6 A, 14, 19F, 23F v rozpustné formě

	Pre-titr /týden 0/	počátek /týden 4/	1.booster /týden 6/	2.booster /týden 10/
typ 6 A	<100	<100	<1000	500 /2/5/
typ 14	<100	300	2400/3/5/	4600/3/5/
typ 19F	<100	<100	<100	<100
typ 23F	<100	<100	<100	<100

Tabulka XIII

ELISA výsledky IgG isotypu Ab titrů indukovaných multivalentní vakcínou, obsahující glykokonjugáty *S.pneumoniae* DP= 3-6 kapsulárních oligosacharidů typ 6 A, 14, 19F, 23F v rozpustné formě

	Pre-titr /týden 0/	počátek /týden 4/	1.booster /týden 6/	2.booster /týden 11/
typ 6 A	< 50	< 200	967/6/6/	8500/6/6/
			$R_3 = 8,8 / \alpha < 0,01 /$	
typ 14	< 50	1800	3266/3/6/	3650/4/6/
typ 19F	< 50	< 50	675/4/6/	1750/6/6/
typ 23F	< 50	< 50	< 50	< 50

Tabulka XIV

ELISA výsledky IgG isotyp Ab titrů indukovaných multi-  
valentní vakcínou, obsahující glykokonjugáty *S.pneumoniae*  
typ 6A, 14, 19F, 23F adsorbované na minerální  
přísadu  $Al(OH)_3$

	Pre-titr	počátek	1.booster	2.booster
	/týden 0/	/týden 4/	/týden 6/	/týden 10/
typ 6A	< 100	240/5/5/	900/5/5/	500/5/5/
	$R_1 > 2,4$	$R_2 = 3,8 / \ll 0,01 /$		
		$R_2' > 9,0$		
typ 14	< 100	300/5/5/	1040/5/5/	8480/5/5/
	$R_1 > 3,0$	$R_2 = 3,5 / \ll 0,01 /$	$R_3 = 8,2 / \ll 0,01 /$	
		$R_2' > 10,4$	$R_3' > 84,9$	
typ 19F	< 100	< 100	400/1/5/	800/1/5/
typ 23F	< 100	< 100	< 100	200/1/5/

Tabulka XV

Tabulka IV. ELISA výsledky IgG isotyp Ab titrů\* indukovaných multivalentní vakcinou, obsahující glykokonjugáty *S.pneumoniae* DP = 3-6 kapsulárních oligosacharidů typ 6A, 14, 19F, 23F adsorbované na minerální přísadu Al(OH)<sub>3</sub>

	Pre-titr /týden 0/	počátek /týden 4/	1.booster /týden 6/	2.booster /týden 11/
typ 6A	< 50/0/5/ R <sub>1</sub> > 96,0	4800/5/5/ R <sub>2</sub> = 10,7/α < 0,01/ R <sub>2</sub> ' > 1,027	51200/5/5/ R <sub>3</sub> = 2,5/α < 0,01/ R <sub>3</sub> ' > 2,600	130000/5/5/
typ 14	< 50/0/5/ R <sub>1</sub> > 7,2	360/5/5/ R <sub>2</sub> = 12,4/α < 0,01/ R <sub>2</sub> ' > 89,3	4480/5/5/ R <sub>3</sub> = 4,4/α < 0,01/ R <sub>3</sub> ' > 396,0	19800/5/5/
typ 19F	50/0/5/ R <sub>1</sub> > 41,6	2080/5/5/ R <sub>2</sub> = 9,0/α < 0,01/ R <sub>2</sub> ' > 371,2	18560/5/5/ R <sub>3</sub> = 1,9/α < 0,01/ R <sub>3</sub> ' > 704,0	35200/5/5/
typ 23F	50/0/5/ R <sub>1</sub> > 17,6	880/5/5/ R <sub>2</sub> = 1,5/α < 0,01/ R <sub>2</sub> ' > 25,6	1280/5/5/ R <sub>3</sub> = 9,3/α < 0,01/ R <sub>3</sub> ' > 237,6	11880/5/5/

\*Titry vyjádřeny jako geometrický průměr reciproké hodnoty nejvyššího ředění séra, vykazující ABS hodnotu dvojnásobnou k reakčnímu základu. V závorkách je uveden počet zvířat /respondenti k celkem injektovaným/.

Tabulka XVI

In vitro neutralizace\* difterického toxinu sérem krá-  
líků imunizovaných S. pneumoniae oligosacharid-CRM<sub>197</sub>  
glykokonjugáty

	Pre-titr /týden 0/	počátek /týden 4/	1.booster /týden 6/	2.booster /týden 10/
--	-----------------------	----------------------	------------------------	-------------------------

DP= 3-6 oligo-CRM<sub>197</sub>:

rozpustný	< 1/10	< 1/10	1,20	1/1,280
			/0,03 Ø/ml/	/2,05 Ø/ml/

Al/OH/ <sub>3</sub> ads	< 1/10	1/10	1/640	1/2,560
	/0,016 Ø/ml/		/1,02 Ø/ml/	/4,10 Ø/ml/

DP= 10-14 oligo-CRM<sub>197</sub>:

rozpustný	< 1/10	< 1/10	< 1/10	1/10
				/0,016 Ø/ml/

Al/OH/ <sub>3</sub> ads	< 1/10	< 1/10	1/40	1/80/
		/0,06 Ø/ml/	/0,13 Ø/ml/	

\*Titry vyjádřeny jako reciproké hodnoty ředění, jejichž pool králičího antiséra vykazuje 50% ochranu k buňkám, hodnoceno podle <sup>3</sup>H-leucinové inkorporace po vystavení buněk difterického toxinu. Čísla v závorkách vyjadřují titry v µg/ml jak je stanoveno FDA referenčním antisérem jako kontrolou.

MPL hodnoceno u lidí: 0,01 µg/ml

Imunní odpověď na glykokonjugáty je monospecifická a homogenní.

Porovnání výsledků uvedených v tabulce VII a VIII, které se týkají protilátkových titrů určených pomocí radioimunoanalýzy /RIA/ a pomocí testu ELISA odhaluje, že RIA hodnocené titry byly nižší než ELISA hodnocené titry. Toto pozorování společně s absencí imunoprecipitátů v agarozovém gelu, užitém pro radiální imunodifuzi a "raketovou" elektroforézovou analýzu antiglykokonjugátového antiséra, dokázaly, že králičí antiséra k *S.pneumoniae* oligosacharid-CRM<sub>197</sub> konjugáty, obsahují vysoce specifické IgG isotypové protilátky, které byly nevhodné ke srážení vlastních čištěných karbohydrátových polymerů, použitých ke generování oligosacharidů.

Absence srážení protilátek v antiséru je indikací monospecificity, tj. protilátka poznává pouze jeden epitop v antigenním repertoáru dané molekuly /Berzofsky-Schechter, 1981, *Molecular Immunol.* 18:751-763/. Srážení antigen-protilátkových komplexů potřebuje mřížkovou formaci ke generování trojrozměrné, větvené sítě spojených molekul protilátky a antigenu. Pro výskyt tohoto je požadována multivalenčnost jak protilátky tak antigenu, více než jedna protilátka musí být schopna se nevázat na jednu antigenní molekulu současně. Nedostatek pozorovatelné imunoprecipitace ~~xxx~~, vyskytující se mezi králičím antisérem k *S.pneumoniae* oligosacharid-CRM<sub>197</sub> konjugátům a homologním čištěným kapsulárním polysacharidem vysoké molekulární hmotnosti je výrazným indikátorem, že antiséra obsahovala protilátky specifické pro karbohydrátové polymery, jak ukazuje ELISA a inhibiční ELISA analýzy/, ale řízené pouze na jeden determinant /epitop/ polysacharidu.

Kromě projevování imunoprecipitační aktivity je heterogenní populace protilátek také obvykle spojena s následujícími vlastnostmi: jednotlivý epitop antigenu užitý na vyvolání protilátkové odpovědi nemůže kompletně inhibovat vazbu celé populace protilátek na kompletní antigen, ale bude inhibovat pouze ty protilátky, které jsou navázány na jeden epitop, nechávaje ostatní protilátky volně se navázat na zbývající epitopy přítomné na kompletním antigenu. Populace protilátek může být hodnocena díky heterogenitě ELISA-inhibiční zkouškou. V této zkoušce je měřena schopnost populace protilátek vázat se na kompletní antigen za přítomnosti inhibitoru vazby antigen/protilátka tak, jak izoluje epitopy antigenu. Znárodně graficky, když vazba protilátka na značený kompletní antigen je měřena za přítomnosti zvýšené koncentrace neznačeného kompletního antigenu a je generována sigmoidální křivka, která může být použita jako standardní křivka pro vazbu antigen/protilátka. Jestliže je populace protilátek heterogenní, vazba mezi protilátkou a kompletním antigenem může být plně inhibována přidáním jednoho antigenního epitopu a standardní křivka vazby antigen/protilátka je pouze částečně posunuta /částečně přesahující nebo částečně paralelní/ jako jiné interakce antigen/protilátka, zřejmé ze spojení s testovanými epitopy, převažuje. Opačně, vazba homologní populace protilátek na antigen může být plně inhibována přidáním izolovaného epitopu; standardní vazebná křivka antigen/protilátka pro homologní populaci protilátek bude přesahující nebo paralelní ke křivce generované přidáním izolovaného epitopu, odpovídajícímu populační specifitě.

Experimentálně, testováním *S.pneumoniae* glykokonjugáty indukovaly IgG tímto způsobem, byla pozorována afinita vzorku, odpovídající té, která byla předpokládána pro homogenní populaci protilátek /obr.4/. Oligosacharid 6A

*S. pneumoniae* /buď v konjugované nebo v nekonjugované formě/ byl spojen sigmoidální křivkou vazebné inhibice přibližně paralelní s křivkou získanou použitím serotypu 6A kapsulárního polysacharidu s vysokou molekulovou hmotností. Jak bylo očekáváno, heterologní /typ 14/ oligosacharid, v buď volné /linker-aktivované/ nebo konjugované formě, neinhiboval IgG isotypovou populaci specifickou pro typ 6A antigenu.

PROJEKT	27 IX 51
PROJEKT	0300
PROJEKT	041693

## P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy kovalentního konjugátu oligosacharidu a nosičového proteinu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje následující stupně:
  - i/ reakci oligosacharidu, majícího terminální redukující se skupinu s diaminoethanem za přítomnosti pyridinboranu, takže probíhá redukční aminace, a
  - ii/ reakci aminovaného oligosacharidového produktu z odstavce i/ s molekulou, obsahující dvě funkční skupiny, z nichž jedna je schopna reakce s terminální skupinou aktivovaného oligosacharidu a druhá je schopna reakce s uvedeným nosičovým proteinem a
  - iii/ reakci aktivovaného oligosacharidového produktu z odstavce ii/ s uvedeným nosičovým proteinem takže dochází ke spojení.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že redukční aminace se provádí při teplotě asi 100 °C.
3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že reakce s pyridinboranem se provádí za teploty asi 50 °C.
4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že molekula, obsahující dvě funkční skupiny ze stupně ii/ je diester.
5. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že molekula, obsahující dvě funkční skupiny ze stupně ii/ je diester adipové kyseliny nebo diester jantarové kyseliny.

6. Způsob podle nároku 1,2,3,4, nebo 5, v y z n a-  
č u j í c í s e t í m, že oligosacharid je odvozen ze  
*Streptococcus pneumoniae* kapsulárního polysacharidu.

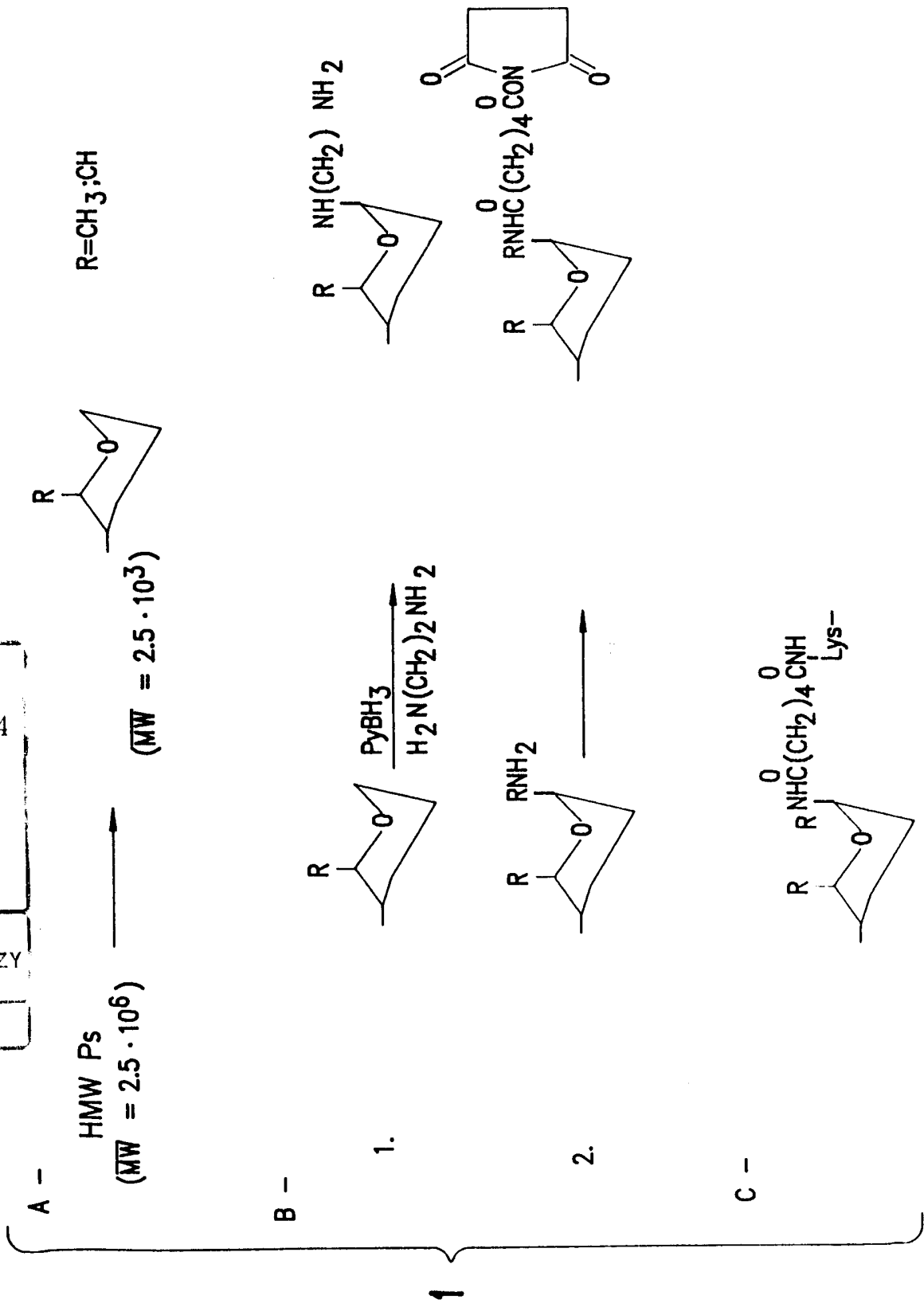
7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e  
t í m, že oligosacharid je odvozen od *Streptococcus pneu-*  
*pneumoniae*, selektivního serotypu vybraného ze skupiny, zahr-  
nující typy 1,2,3,4,5,6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F,  
14., 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F a 33F.

8. Způsob podle nároku 1,2,3,4,5,6,7,<sup>8</sup> nebo 9,  
v y z n a č u j í c í s e t í m, že oligosacharid je odvo-  
zen od kapsulárního polysacharidu z bakterií vybraných ze  
skupiny, zahrnující *Haemophilus influenzae*, *Nisseria menin-*  
*gitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escheri-*  
*chia coli*, *Streptococcus mutans*, *Cryptococcus neoformans*,  
*Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*.

9. Způsob podle nároku 1,2,3,4,5,6,7 nebo 8, v y z n a-  
č u j í c í s e t í m, že nosičovým proteinem je CRM<sub>197</sub>.

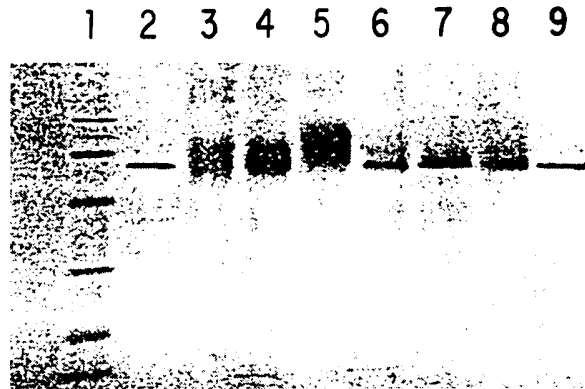
10. Způsob podle nároku 1,2,3,4,5,6,7,8 nebo 9, v y z n a-  
č u j í c í s e t í m, že nosičový protein je vybrán ze  
skupiny, zahrnující *Salmonella flagelin*, *Haemophilus pillin*,  
*Haemophilus* 15 kDa, 28-30 kDa nebo 40 kDa membránový pro-  
tein, *Escherichia coli* tepelně labilní enterotoxin LT<sub>B</sub>, dif-  
terický toxin, tetenový toxin, cholerový toxin, protein  
rotaviru VP7 a protein respiračního syncytiálního viru  
F nebo G.

č.j.  
 0 5 4 0 6 4  
 DOŠLO  
 2 1. XI 91  
 ÚŘAD  
 PRO VĚŘENÍ  
 A OBJEVY  
 PŘÍL.

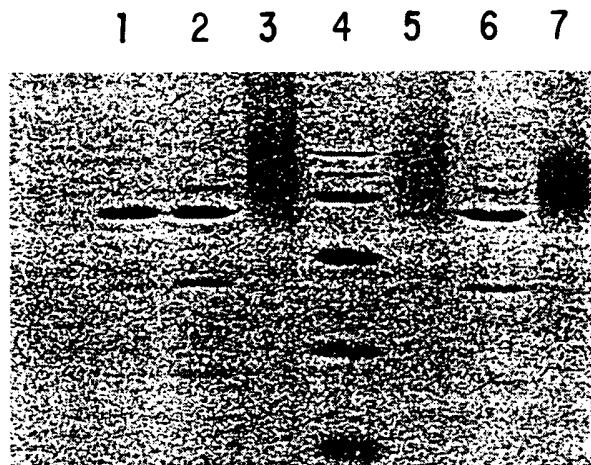




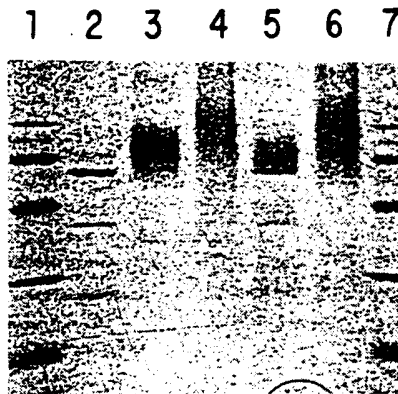
2969-91



3A



3B

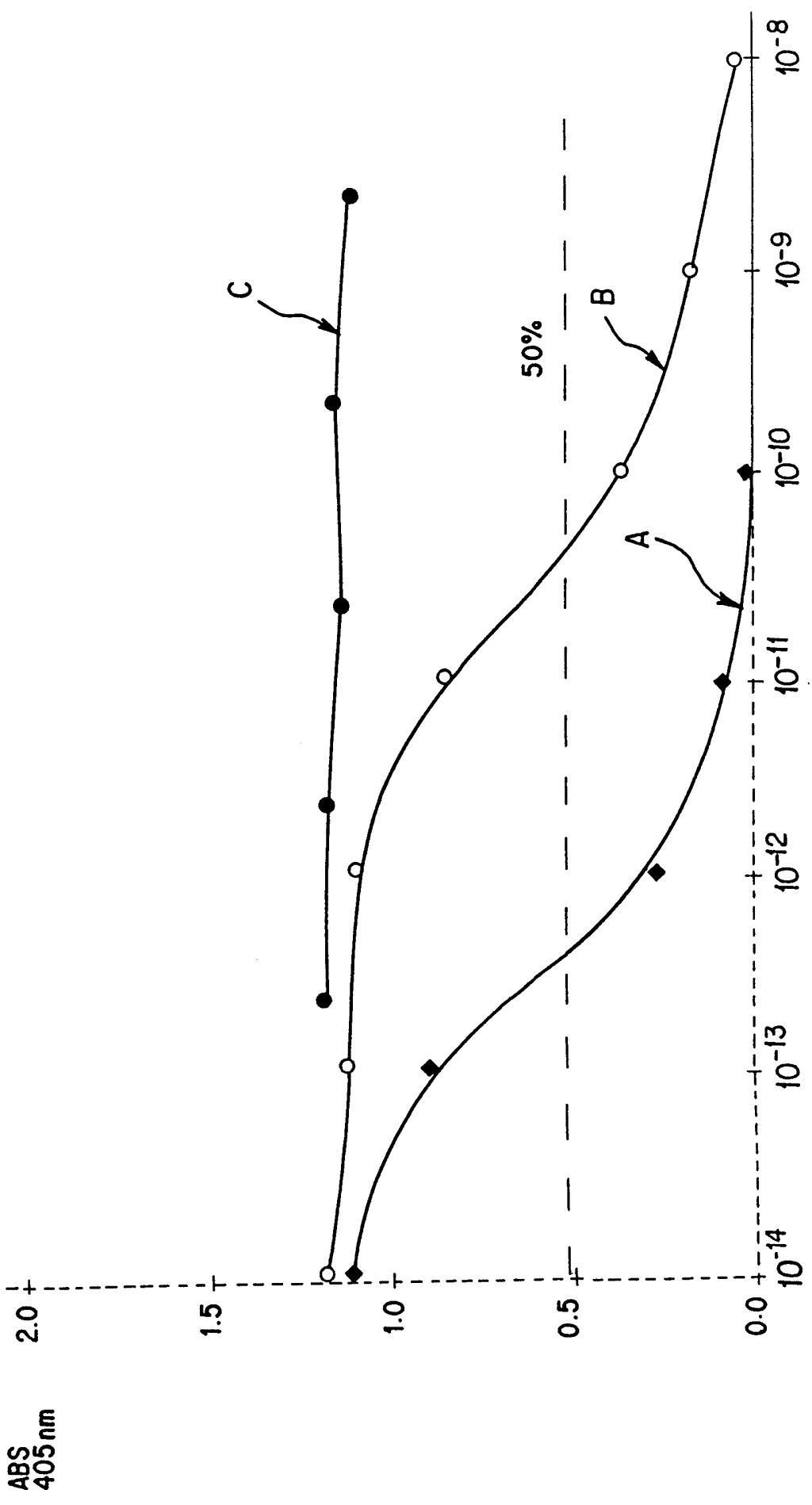


3C

PRIL
PROV. ALLEY
URAD
27 IX 91
0050
044693
3.

L

2969-91



041693	URAD	ARC V. ALEZY	4 OBJEYV	FILE
27 IX 91				

W