



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

218 425 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 95 00270
(22) A bejelentés napja: 1993. 07. 28.
(23) Módosítási elsőbbség: 1995. 01. 27.
(30) Elsőbbségi adatok:
102687 1992. 07. 30. IL
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 93/07096
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/03208

(51) Int. Cl.⁷

A 61 K 39/385

A 61 K 39/02

A 61 K 39/112

C 07 K 17/02

C 07 K 7/08

(40) A közzététel napja: 1995. 11. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 08. 28.

(72) Feltalálók:

Cohen, Irun R., Rehovot (IL)
Fridkin, Matityahu, Rehovot (IL)
Konen-Waisman, Stephanie, Tel Aviv (IL)

(73) Szabadalmaz:

Yeda Research and Development Co. Ltd.,
Rehovot (IL)

(74) Képviselő:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54)

Antigének és szintetikus peptidhordozók konjugátumai és ezeket tartalmazó vakcinák

KIVONAT

A találmány tárgyát gyengén immunogén antigéneknek, azaz peptideknek, fehérjéknek és poliszacharidoknak a humán hsp65 hősokkfehérjéből származó T-sejt-epitópot tartalmazó szintetikus peptidhordozóval vagy annak analógjával képezett konjugátumai és ezeket tartalmazó vakcinák képezik. Az említett peptid vagy analóg képes lényegesen fokozni a gyengén im-

munogén antigén immunogenitását. A találmány szerinti, különösen alkalmas peptid a Pep278h, amely a humán hsp65 458–474-es pozíciójának felel meg, valamint a PepII, amely a humán hsp65 437–448-as pozícióinak felel meg, de amelyben a 442-es és 447-es pozícióban levő két ciszteincsoportot szerincsoport helyettesíti.

HU 218 425 B

A találmány tárgyát T-sejt-epitópokat tartalmazó, szintetikus peptidhordozókon alapuló, fokozott immunogenitással rendelkező konjugátumok, valamint az említett konjugátumokat tartalmazó, immunizálásra alkalmas vakcinák képezik.

Az antitestválaszokat két fő csoportba osztották, a T-sejt-igényük alapján. A T-sejt dependens (T-dep) antigénekre adott primer humorális immunválaszt a B- és T-sejtek aktiválódása és proliferációja jellemzi, ami egyrészt a plazmasejtek és immunglobulinszekréció differenciálódásához, másrészt germinális centrumok és immunológiai memória kialakulásához vezet. Az antigénnel való újrástimulálás után ezek a memóriasejtek játsszák a főszerepet a szekunder immunválaszban. A T-dep antigénekre adott szekunder válasz fő jellemzői az antitesttermelés gyorsasága, a válasznak a primer válaszhoz viszonyított nagyobb mérete, és az immunglobulin osztályváltás az IgM és IgG között.

Van azonban egy kisszámú antigén, amely képes a B-sejteket a T-sejtek segítségével nélkül aktiválni, ezeket nevezzük T-sejtektől független (T-ind) antigéneknek. Ezek közé tartoznak többek között a bakteriális kapszuláris poliszacharidok, mint például a *Streptococcus pneumoniae* kapszuláris poliszacharidja, a polimerizált *Salmonella* flagellin, a poli-D-aminosavak és az *Escherichia coli* lipopoliszacharid. A T-ind antigének jellemző módon nagy molekulásúlyúak, ismétlődő struktúrákat tartalmaznak, és a legtöbb esetben lassan bomlanak le. Hosszú ideig megmaradnak specializált makrofágok felszínén, és nagy aviditással képesek antigénspecifikus B-sejtekhez kapcsolódni a komplementer immunglobulinreceptorokhoz, amelyekkel keresztkötést hoznak létre, való multivalens kapcsolódásuk révén. Elég magas koncentrációban megvan az a képességük, hogy poliklonálisan aktiválják a B-sejt-készletnek egy jelentős részét, azaz anélkül, hogy a felszíni receptor hipervariábilis régiójának antigénspecifitására hagyatkoznának. Általában a T-ind antigének főleg IgM-válaszokat indukálnak, egerben valamennyi IgG3-választ, és viszonylag gyenge, vagy semmi memóriaválaszt.

A kapszulázott baktériumok, azaz például a *Haemophilus influenza* b típus, a *Streptococcus pneumoniae*, a *Neisseria meningitis*, B csoportba tartozó *Streptococcus* és az *Escherichia coli* K1 típus súlyos invazív megbetegedéseket okoz az emberekben, különösen gyerekekben és meggyengült immunrendszerrel rendelkező egyedekben. A plazma antipoliszacharid antitestekről kimutatták, hogy védőhatásuk van a legtöbb említett patogén által okozott invazív megbetegedésekkel szemben, és tisztított kapszuláris poliszacharidokat (CPS) tartalmazó vakcinákat fejlesztettek ki, hogy a kockázatnak kitett egyedekben ilyen antitesteket indukáljanak. A poliszacharidok azonban gyenge antigének a gyerekekben, és ez a vakcinaként való alkalmazásukat jelentősen gátolja. A gyenge immunogenitásról úgy gondolják, hogy az a T-ind antigének csoportjához való tartozás következménye.

Avery és Goebel felfedezését [Avery, O. T. and Goebel, W. F., *J. Exp. Med.*, 50, 533–550 (1929)], azaz hogy a poliszacharidok hordozófehérjéhez való

kapcsolódása fokozza az immunogenitást, újabban humán használatra szánt vakcinák készítésében alkalmazzák. Mind emberekben, mind rágcsálókban ezek a konjugátumok úgy viselkednek, mint T-dep antigének, az immunológiai memória indukciója révén. Vannak hasonlóságok a konjugátum poliszacharid vakcinák és a fehérjehordozó-haptén rendszerek között. Tehát a CPS-konjugátumok képesek gyerekekben CPS-antitestek védőszintjét indukálni, míg a CPS egyedül erre nem képes. Lehetséges, hogy a konjugátumoknak a tiszta poliszacharidokhoz viszonyított sokkal jobb immunizációja a hordozóspecifikus T-sejtek segítségével köszönhető, amint azt a hordozó-haptén rendszerekben rágcsálóknál igazolták.

A legtöbb esetben a T-ind antigéneket nagy immunogén fehérjékhez, mint például tetanusztoxoidhoz, koleratoxinhoz vagy diftériatoxoidhoz kapcsolják. Mindazonáltal a nagy molekulásúlyú, serkentő és szuppresszív T-sejt-epitópokat hordozó molekulákra adott immunológiai válaszok nem nagyon láthatók előre. Kimutatták, hogy egy hordozófehérjéhez kapcsolt haptén által adott antitestválasz is gátolható, ha a befogadót előzőleg a módosítatlan fehérjével immunizálták. Ezt a jelenséget hordozó indukálta epitópszuppresszióknak nevezik, és újabban kimutatták, hogy számos haptén-fehérje konjugátumnál előfordul. Mivel nagyszámú, erősen fertőző organizmus elleni hatékonyabb konjugátumvakcina kifejlesztése még mindig fontos, ezért erőfeszítéseket tesznek annak érdekében, hogy jobb hordozó-molekulákat találjanak, amelyek szolgáltatják a szükséges T-sejt-epitópokat. Az univerzálisan immunogén T-sejt-epitópok, amelyek élesen jellemzett immunológiai jellemzőkkel rendelkező specifikus peptidok formájában határozhatók meg, az ilyen alternatív molekuláknak egy új generációját jelenthetik. Az immunrendszer által jól felismert fehérjék megfelelő forrásai lehetnek az ezt a célt szolgáló peptideknek.

Számos különböző, mind egymással szoros rokonságban levő, mind filogenetikailag egymástól távol álló fehérjével végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a T-sejtek többsége néhány immundomináns epitópra irányul, és egy kisebb rész reagál más, szubdomináns determinánsokkal. A determináns-hasznosításnak ilyen, a T-sejtek által alkalmazott hierarchiája különböző faktörök kombinációjából származhat, amely lehet az elérhető MHC-molekulákhoz való megkülönböztetett affinitás, a T-sejt-repertoár diverzitása, az MHC-kötőhelyekért folytatott belső versengés, és a processzálsában való finom különbségek.

Egyre több információ gyűlik össze arról, hogy a hősokkfehérjék (hsp) családjába tartozó fehérjék számos patogén esetében a fő antigének [Young, D. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 85, 4267–4270 (1988)]. A hsp fehérjéket először annak alapján írták le, illetve annak alapján nevezték el később, hogy a hőmérséklet hirtelen emelésének kitett sejtek termelik. A hsp fehérjék közé különböző molekulatömegű fehérjék tartoznak, azaz például 20 kD, 60 kD, 65–68 kD, 70 kD, 90 kD, 110 kD, és egyéb molekulatömegű fehérjék. Az most már világos, hogy a

hsp fehérjék számos különböző környezeti ártalomnak kitett sejtekben indukálódnak, beleértve az oxidatív károsítást, a tápanyagmegvonást és az intracelluláris patogénekkal való fertőzést. A hsp-válasz lehetővé teszi a sejt számára, hogy egyébként előnytelen körülmények között is túléljen. Jóllehet a celluláris stressz fokozza a hsp fehérjék szintézisét, számos hsp fehérje konstitutíven is expresszálódik és lényeges szerepet játszik a normális sejtfunkciókban. A hsp-válasz megtalálható mind a prokarióták, mind az eukarióták között, és a hsp fehérjék a legjobban konzerválódott molekulák közé tartoznak. A több mint egymilliárd éves evolúciós fejlődés ellenére a humán és a mikobakteriális hsp65 molekulák például aminosavsorrendjüket tekintve körülbelül 50%-ban azonosak. Ez a kémiai konzerválódás számos teljes vagy majdnem teljes aminosavszekvenciára kiterjed. Ennek következtében minden szervezet szükségszerűen immunológiai keresztreakciót ad bármely idegen sejt hsp65 fehérjéjével. Tehát bármely sejt fertőző ágens hsp65 molekulája részben része, illetve részben nem része bármely, immunrendszerrel rendelkező gazdaszervezetnek. Ezen okokból a hsp65 és más hsp fehérjék megjósolhatóan gyenge immunogének. Ezzel éppen ellentétben a bizonyítékok azt sugallják, hogy a hsp fehérjék a legdominánsabb immunogének közé tartoznak.

A hsp65, amely a hsp családba tartozó fehérjék egyik jellemző tagja, domináns antigénnek tekinthető, mivel számos különböző baktérium által okozott fertőzés vagy immunizáció indukál a hsp65 molekulára specifikus antitesteket és T-sejteket [Young, D. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 85, 4267–4270 (1988)]. A *Mycobacterium tuberculosis* szisszal immunizált egerekben a baktériumra reagáló összes T-sejt 20%-a a hsp65-re specifikus. Érdekes módon azokat a T-sejteket, amelyek reagálnak a hsp65 fehérjével, normális egészséges emberekben is azonosították, akiknek semmilyen betegsége utaló klinikai tünetük nincs [Munk, M. E. et al., Eur. J. Immunol., 18, 1835–1838 (1988)]. Szintetikus peptidek alkalmazásával Lamb és munkatársai [Lamb, J. R. et al., EMBO Journal, 6, 1245–1249 (1987)], valamint Munk és munkatársai [Munk, M. E. et al., Eur. J. Immunol., 18, 1835–1838 (1988)] kimutatták, hogy a T-sejtek választanak a mikobakteriális és a humán hsp65 közös epitópjaira; ez formálisan igazolta, a normál egyedekben előforduló hsp65 saját epitópjai ellen léteznek T-sejtek.

Ennek az immundominanciának a következményeképpen nem meglepő, hogy a hsp65 molekula láthatóan részt vesz az autoimmunológiai folyamatokban. A hsp65 elleni immunitás autoimmun diabéteszt okozhat egerekben, és kapcsolható esetleg a patkányokban és emberekben előforduló autoimmun artritiszhez is [Elias, D. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 87, 1576–1580 (1990); Pearson, C. M., Arthritis Rheum., 7, 80–86 (1964)]. Ennek következtében a hsp65 elleni immunitás kapcsolódik az autoimmun betegségekhez, de kapcsolódik az egészséges állapotokhoz is.

Egy fertőzés során mind a patogén, mind a gazdaszervezet jelentősen fokozza a hsp fehérjék szintézisét, hogy védekezzen a másik által okozott stresszhatásokkal szemben. A B-sejteknek az autoantigénre adott válaszával analóg módon el lehet képzelni, hogy a saját hsp-vel reagáló T-sejtek, mint azok a sejtek, amelyek specifikusan felismerik a hsp65-öt, előnyös szerepet játszhatnak a gyulladásos folyamatok elnyomásában, a stresszhatás alatt álló sejtek eltávolításával. Lehetséges azonban, hogy autoimmun betegségek léphetnek fel, ha ez a válasz nincs megfelelőképpen szabályozva. Cohen és Young azt javasolják, hogy az egészséges egyedekben a „természetes immunitás” fölényben van, amit egy olyan immunrendszer biztosít, amely egy sorozat, korlátozott számú ellenőrzött saját antigén elleni, erősen szabályozott és ellenőrzött immunhálózaton alapul [Cohen, I. R. and Young, D. B., Immunol. Today, 12, 105–110 (1991)]. A hsp65 molekuláról azt állítják, hogy azon antigének egyike, amelyekre egy ilyen erősen szervezett immunválasz létezik a természetben [Elias, D. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 87, 1576–1580 (1990)].

Cox és munkatársai kimutatták, hogy a *Mycobacterium tuberculosis* 65 kDa fehérje 65–85 peptidjének dimerje nem érinti a fehérjének azt a tulajdonságát, hogy a T-sejt proliferációját indukálja [Cox et al., Eur. J. Immunol., 18, 2015–2019 (1988)], de fokozza az antitest termelődését, és azt mondják, hogy a heterológ peptideknek és a mikobakteriális 65–84 szekvencia N-terminálisának kombinációja általában használható a peptidvakcinák potenciáljára. Lussow és munkatársai [Lussow A. R. et al., Immunol. Letters, 25, 255–263 (1990)], valamint Barrios és munkatársai [Barrios, C. et al., Eur. J. Immunol., 22, 1365–1372 (1992)] kimutatták, hogy a *Mycobacterium bovis* hsp65 és hsp70 fehérjéje hordozómolekulaként működhet egerekben az antihaptén molekulák indukciójában. Emellett számos T-sejt-epitópot azonosítottak a *Mycobacterium bovis* hsp65 fehérjén, és a teljes fehérjéről kimutatták, hogy immunogén számos különböző egértörzsben, amelyek az MHC haplotípusban térnek el egymástól [Brett, S. J. et al., Eur. J. Immunol., 19, 1303–1310 (1989)].

Feltételezhető, hogy a hsp65 fehérjén (mind a gazdaszervezet, mind a parazita fehérjéje) található T-sejt-epitópok közül néhány immundominanciát mutat, és képes immunológiai memória indukciójára, míg mások nem mutatnak kivételezett immunológiai felismerést, illetve nem játszanak szerepet az autoimmunitás indukciójában. Ezek között a funkcionális T-sejt-epitópok közötti különbségtétel univerzálisan immunogén peptidek azonosításához vezethet, amelyek biztonságos, meghatározott és potenciális alternatívái lehetnek a T-ind antigének hordozómolekuláinak.

Az EP 262 710 számú európai szabadalmi leírásban és az 5,154,923 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban a *Mycobacterium bovis* BCG 64 kD polipeptid 171–240 és 172–192 pozícióinak megfelelő olyan aminosavszekvenciákat írnak le, amelyek jól használhatók immunogénként az autoimmun

arthritis és hasonló autoimmun betegségek elleni rezisztencia indukálásában.

A WO 90/10449 számú PCT közrebecsátási iratban egy olyan, p277 jelű peptidet írnak le, amelynek aminosavszekvenciája megfelel a humán hsp65 molekula 437–460-as pozícióinak, amely jól használható immunogénként az inzulindependens diabetes mellitus (IDDM) elleni rezisztencia indukálásában. Egy p278 jelű kontrollpeptid, amely megfelel a humán hsp65 458–474-es pozícióinak, nem indukált IDDM elleni rezisztenciát.

Lussow és munkatársai kimutatták, hogy ha az egereket élő *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* (BCG) vakcinával oltották be és tisztított fehérjeszarmazékkal (PPD) konjugált ismétlődő szintetikus malária szintetikus peptiddel (NANP) 40 immunizáltak, akkor ez az anti-peptid IgG-antitestek hosszan tartó, magas titerét eredményezte [Lussow A. R. et al., *Immunol. Letters*, 25, 255–263 (1990)]. A későbbiekben Lussow és munkatársai kimutatták, hogy a 65 kDa méretű (GroEL típus) és a 70 kDa méretű [DnaK típus] mikobakteriális hőszokkfehérjék (hsp) hordozómolekulákként működtek olyan egerekben, amelyeket előzőleg *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* (Calmette–Guerin-bacillus, BCG) oltottak be azzal a céllal, hogy az ismétlődő szintetikus malária-peptid (NANP) 40 elleni IgG magas szintű és hosszan tartó titerét indukálják. Az anti-peptid antitestek akkor indukálódtak, amikor a mikobakteriális hsp-vel konjugált malária-peptidet adták be mindenféle adjuváns nélkül.

Barrios és munkatársai kimutatták, hogy a 70 kDa méretű hsp fehérjével konjugált peptidekkel vagy oligoszacharidokkal immunizált egerek magas titerrel termeltek IgG-antitesteket bármely előzetes, BCG-vel való beoltás nélkül is [Barrios, C. et al., *Eur. J. Immunol.*, 22, 1365–1372 (1992)]. Az anti-peptid antitestválasz legalább egy évig megmaradt. A 70 kDa méretű hsp-nek ez az adjuvánsmentes hordozó hatása T-sejt-független, mivel sem anti-peptid, sem anti-70 kDa IgG-antitestek nem indukálódtak atimuszos nu/nu egerekben. Ha az egereket korábban 65 kDa vagy 70 kDa méretű hsp-vel immunizálták, annak nem volt negatív hatása az anti-peptid IgG-antitestek indukációjára hsp-peptid konjugátumokkal adjuvánsok távollétében való immunizáció után. Emellett, a 65 kDa hsp-vel való előimmunizáció helyettesítheti a BCG-t, ezzel hatékony előoltást lehet biztosítani az anti-NANP-antitestek indukációjához. Végezetül, mind a 65 kDa, mind a 70 kDa méretű hsp hordozómolekulaként működött a meningokokkális oligoszacharidok elleni IgG-antitestek indukációjában, adjuvánsok távollétében, sugallva ezzel, hogy a hsp fehérjék hordozóként való használata konjugált konstrukciókban anti-peptid és antioligoszacharid antitestek indukációjában értékes lehet olyan új vakcinák tervezésében, amelyeket végeztek emberekben lehet használni.

Az előzőekben említett referenciák közül egyikben sem írnak le gyengén immunogén molekulákhoz konjugált specifikus T-sejt-epitópokat.

A találmány egyik tárgyát gyengén immunogén anti-gén és humán hsp65-ből, vagy annak analógiájából származó T-sejt-epitópból álló szintetikus peptid hordozó-

konjugátuma képezi, ahol is az említett peptid vagy analóg képes lényegesen fokozni a gyengén immunogén antigén immunogénitását.

5 Az emlős, beleértve a humán és egér hsp65 molekulát gyakran „hsp60” névvel illetik más szerzők, mivel a hsp60 általános családhoz tartoznak. Ebben a specifikációban, akár humán, akár egér hsp65-ről van szó, ezeket a molekulákat a „hsp60” jelzéshez tartozónak tartjuk, illetve bármely más olyan specifikációhoz, amelyet a szakirodalomban ezeknek a molekuláknak adtak.

10 Bármely, a humán hsp65-ből származó T-sejt-epitóp eredetű peptid vagy annak analógja, amely képes lényegesen fokozni a gyengén immunogén antigén immunogénitását, használható a jelen találmányban.

15 A találmány szerinti előnyös peptid, amelyet a továbbiakban Pep278h vagy 278h jelzéssel említünk, megfelel a humán hsp65 molekula 458–474 pozícióinak, szekvenciája pedig az alábbi:

20 458 474
N E D Q K I G I E I I K R T L K I.

A Pep278h előnyös analógjai azok a Pep278m vagy 278m jelű peptidek, amelyekben a Pep278h T471 csoportját A471 helyettesíti, illetve a Pep278mt vagy 278mt jelű peptidek, amelyeknek a szekvenciája az alábbi:

25 E G D E A T G A N I V K V A L E A.

Más, a találmány szerinti T-sejt-epitóp, amely a humán hsp65 molekulából származik, és a továbbiakban Peptid II vagy PepII néven említjük, megfelel a humán hsp65 molekula 437–448-as pozíciójának, amelyben a 442-es és 447-es pozícióban levő két ciszteinmolekulát szerinnel helyettesítettük, szekvenciája pedig az alábbi:

30 35 437 448
V L G G G S A L L R S I.

A gyengén immunogén antigénmolekula lehet egy peptid, egy polipeptid vagy egy fehérje, például a HIV-vírusból vagy maláriaantigénből, vagy egy bakteriális poliszacharidból származó peptid, mint például a *Haemophilus influenzae* b típusból, a *Streptococcus pneumoniae*-ből, a *Neisseria meningitidis*-ből, a B csoportba tartozó *Streptococcus*okból, *Escherichia coli* K1-ből, *Salmonella*-kból, mint például a *Salmonella typhim*ből származó kapszuláris poliszacharidok.

45 A hordozópeptid kovalens kötéssel kapcsolódik a gyengén immunogén antigénmolekulához, akár közvetlenül, akár egy karon keresztül.

50 A találmány tárgyai továbbá a találmány szerinti konjugátumot, vagy az antigén és a megfelelő peptid-hordozó keverékét tartalmazó vakcinák.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a csatolt ábrákat.

55 Az 1–1a. ábrán látható az egerekben csak a Vi által indukált szérum anti-Vi-antitest-válasz, 12 és 24 nappal az első immunizálás után, és 12 nappal a második immunizálás után, 1:50 szérumhígításnál (1), illetve 1:500 szérumhígításnál (1a.).

60 A 2a–f. ábrán látható az egerekben csak a Vi által, illetve a Vi–PepII, Vi–Pep278h és Vi–Pep348h Vi-

konjugátumok által indukált szérum anti-Vi-antitest-válasz, [(a) 2,5 µg, (d–f) 0,25 µg Vi injektálva egerekként], 12 (a és d), illetve 24 (b és e) nappal az első immunizálás után, és 12 nappal a második immunizálás után (c és f)].

A 3a., 3ab., 3b. és 3bb. ábrán látható a Vi-fehérje/peptid konjugátumok (3a. és 3b.) és a Vi által egyedül (3ab. és 3bb. indukált anti-Vi-antitest-termelés kinetikája [(3a. és 3ab. ábra) 2,5 µg, (3b. és 3bb. ábra) 0,25 µg Vi injektálva egerekként], 12, illetve 24 nappal az első immunizálás után, és 12 nappal a második immunizálás után.

A 4a–b. ábrán látható a csak Vi-vel, illetve Vi–PepII és Vi–Pep278h konjugátummal immunizált egerekben kiváltott anti-Vi-antitestek specifikitása. Az antitesteket ELISA-lemezekeken határozzuk meg, amelyeket 2,5 µg (4a. ábra) vagy 1,25 µg (4b. ábra) Vi-vel borítjuk lyukanként.

Az 5a–b. ábrán a csak Vi-vel vagy a Vi–Pep278h konjugátummal egerekben kiváltott anti-Vi-antitestek izotípusjellemzése látható. 5a. ábra – anti-Vi IgM izotípusválasz a Vi-re és a Vi–Pep278h-ra; 5b. ábra – anti-Vi IgG izotípusválasz Vi-re és Vi-278h-ra.

A 6a–b. ábrán a csak Vi-vel, illetve Vi–PepII és Vi–Pep278h konjugátummal immunizált egerekben kiváltott anti-Vi-antitest-termelés időbeni lefutása látható, 1:100 szérumhígítás (6a. ábra) és 1:1000 szérumhígítás (6b. ábra) mellett.

A 7aa., 7ab., 7ba., 7bb., 7ca. és 7cb. ábrán az adjuvánsnak és az immunizálás módjának (7aa., a 7ba. és 7ca. ábra) szubkután (sc.) vagy (7ab., 7bb. és 7cb. ábra) intramuszkulárisan (im) egerekbe injekciózott Vi–PepII által indukált anti-Vi-antitest-termelődésre gyakorolt hatása látható, 12 (7aa. és 7ab. ábra) és 24 (7ba. és 7bb. ábra) nappal az első immunizálás után, és 12 nappal a második immunizálás után (7ca. és 7cb. ábra).

A 8a–c. ábrán egerekben Vi–PepII konjugátummal vagy szabad PepII és Vi keverékével indukált anti-Vi-antitest-termelődés látható, 12 (8a. ábra) és 24 (8b. ábra) nappal az első immunizálás után, és 12 nappal (8c. ábra) a második immunizálás után.

A 9. ábrán a hordozó priming hatása látható az anti-Vi-antitest-termelődésre egerekben, amelyeket konjugált Vi–PepII-vel immunizáltunk, az immunizálás előtt 14 nappal előimmunizálva szabad PepII-vel IFA-ban (bal), illetve előimmunizálás nélkül (jobb).

A 10a–d. ábrán az ugyanabban az egérben indukált anti-Vi-immunválasz látható Vi–Pep277(S) (A antigén), Vi–Pep278h (B antigén, miután az egereket Vi–Pep277(S)-sel injekcióztuk), csak Vi (C antigén, miután az egereket Vi–Pep277(S)-sel és Vi–Pep278h-val (D antigén) anyagokkal szemben 1:50 szérumhígítás (10a. és 10b. ábra) és 1:1000 (10c. és 10d. ábra) szérumhígítás mellett, 12 nappal az első (10a. és 10c. ábra) és 12 nappal a második (10b. és 10d. ábra) immunizálás után.

A 11a–f. ábrán a csak Vi-vel (11b. ábra), illetve a Vi–PepII-vel (11c. ábra), Vi–Pep278h-val (11d. ábra), Vi–PepII*-gal (11e. ábra) és a Vi–PCRP77–83-mal (11f. ábra) borított ELISA-lemezek felismerésének szü-

rővizsgálata látható referencia anti-Vi-szérummal (Burro 260) (11a. ábra).

A 12a–e. ábrán a különböző egértörzseknek a Vi-re és Vi-konjugátumokra adott immunválasza látható (12a. ábra): a BALB/c egerek immunválasza a Vi-re, Vi-278h-ra, Vi-278m-re, Vi-278mt-re, Vi-SRes-re, Vi-348-ra és Vi-277(S)-re; 12b. ábra: a BALB/k egerek immunválasza a Vi-re, Vi-278h-ra, Vi-278m-re, Vi-278mt-re, Vi-SRes-re, Vi-348-ra és Vi-277(S)-re; 12c. ábra: a BALB/b egerek immunválasza a 12b. ábra ugyanezen antigénjeire; a Vi-re, Vi-278h-ra, Vi-278m-re, Vi-278mt-re, Vi-SRes-re; 12d. ábra: NOD egerek immunválasza a Vi-re, Vi-278h-ra, Vi-278m-re, Vi-278mt-re, Vi-SRes-re, Vi-348-ra és Vi-277(S)-re; 12e. ábra: NON.NOD egerek immunválasza Vi-re, Vi-278h-ra és Vi-278mt-re.

A 13a–c. ábrán az IFA-ban emulgeált Vi-278h konjugátummal, Vi és IFA keverékével, valamint IFA/PBS-sel immunizált egerek szérumának IgG izotípuseloszlása látható.

A 14. ábrán egerek immunválasza látható Vi-fragmentekre, illetve Vi-fragment–278h konjugátumra.

A 15. ábrán a Vi, illetve Vi-278h, Vi-278m, Vi-278mt és Vi-SerRes konjugátumok egerekben való immunogenitása látható.

A 16. ábrán az egerekben kapott immunválasz látható csak FEPK polipeptiddel való immunizálás után, illetve 278h és 348h peptidekkel való konjugálás után.

A találmány szerinti előnyös konjugátumokat úgy alakítjuk ki, hogy a Pep278h vagy PepII molekulákat kovalens kötással egy bakteriális poliszacharidhoz kötjük, például a CPS Vi-hez vagy a Salmonella typhihez, amelyet a továbbiakban Vi-nek nevezünk, és amely a C3 pozícióban különbözőképpen O-acetilezett poli-(1–4)-GalNac lineáris homopolimere, amint az az 1. ábrán látható. Egyeül a Vi, csakúgy, mint más CPS-ek, nem fejt ki erősítő választ emlőszőben, sem állatokban sem az emberben, ha újrainjekciózunk, de immunogenitása fokozódik, ha egy, a találmány szerinti konjugátum formájában alkalmazzuk, a humán hsp65-ből származó megfelelő peptidhez, vagy annak analógjához kapcsoljuk, illetve az ilyen peptid vagy analóg keverékéhez. A Vi-peptid konjugátum újrainjekciózása az anti-Vi-antitestek szintjének növekedését okozza (fokozó hatás), amit főleg az IgG izotípus képvisel.

A Pep278h esetében a találmány szerinti aktív peptidket az jellemzi, hogy erősen töltöttek, azaz erős elektromos tulajdonságokkal rendelkeznek (a Pep278h 17 alkotó aminosavja közül 7 vagy erősen negatívan, vagy erősen pozitívan töltött), és erősen hidrofób (6 aminosavcsoport). A Pep278 peptidet továbbá az jellemzi, hogy egy poláris, negatívan töltött N-terminális domént tartalmaz, valamint egy poláris, pozitívan töltött C-terminális domént és egy erősen hidrofób magot. Ezeket az általános tulajdonságokat kell megtartani ahhoz, hogy megőrizzük a hatékonyságot. Tehát a fenti általános jellemzés alapján bizonyos aminosavhelyettesítések aktív peptidket eredményeznek. Még pontosabban, a 6, 8, 10, 11, 15 és 17-es pozíciók a Pep278h peptidláncban (ami megfelel a 463, 465, 467, 468,

472 és 474-es pozícióknak a humán hsp65 molekulában) vagy I, vagy L, vagy egyéb más hidrofób aminosavakkal foglalhatók el, amelyek lehetnek természetes aminosavak, mint például a V, M vagy F, illetve nem természetes aminosavak, mint például a norleucin (Nle) vagy a Norvalin (Nva). A Pep278h láncban az 5, 12, 13 és 16-os pozíciók (amelyek megfelelnek a 462, 469, 470 és 473-as pozícióknak a humán hsp65 molekulában) elfoglalhatók vagy K, vagy R aminosavakkal, vagy nem természetes, pozitívan töltött aminosavakkal, mint például ornitinnel (Orn). Az E és D felcserélése is pozitív származékot eredményez.

Az „analóg” szakkifejezés jelentése a találmányi leírásban olyan peptidekre vonatkozik, amelyeket helyettesítéssel, delációval vagy addícióval kapunk a T-sejt-epitóp szekvenciájából, mindaddig, ameddig megmarad az a képességük, hogy képesek jelentősen fokozni a gyengén immunogén antigénmolekulák immunogenitását. Stabil származékokat például úgy kaphatunk, hogy az eredeti ciszteinscsoportokat szerincsoportokkal helyettesítjük, mint például a PepII esetében. Az analógok, a Pep278h esetében olyan peptidek, amelyekben a peptidmolekula elektromos tulajdonságainak és hidrofobicitásának legalább 70%-a, előnyösen 90–100%-a megmarad. Ezeket a peptideket az alábbi leírás alapján állíthatjuk elő.

A találmány szerinti peptidek tartalmazhatják az optikailag aktív aminosavaknak a D, vagy az L formáját, illetve néhány aminosav lehet D formájú, más aminosavak pedig lehetnek L formájúak.

Az „antigénmolekula immunogenitásának lényeges fokozása” kifejezés alatt értjük azt is, hogy az említett antigén elleni antitestek szintjét indukáljuk, valamint az említett antitestek közül főleg az IgG izotípusúaknak a bemutatását értjük.

A peptidhordozó az antigénmolekulához kapcsolódhat közvetlenül, illetve egy karon keresztül.

A peptid és a Vi közötti közvetlen kapcsolatot az 1. ábrán mutatjuk be, ahol a konjugátumot a későbbiekben ismertetett 3-as eljárással kapjuk.

A kar képlete lehet $-O-R-CO-$ vagy $-NH-R-CO-$, így észter vagy amid jön létre a Vi karboxilcsoportjával, és peptidkötés a peptid terminális aminosocsoportjával; lehet $-O-R-NH-$ vagy $-NH-R-NH-$, így észter vagy amid jön létre a Vi karboxilcsoportjával, és amid jön létre a peptid terminális karboxilcsoportjával; vagy $-NH-R-CH_2-$, amelyben R jelentése telített vagy telítetlen szénhidrogénlánc, amely adott esetben lehet helyettesítve, és/vagy megszakíthatja egy vagy több aromás gyök, vagy heteroatomok, mint például az O, S vagy N atom. R jelentése előnyösen egy alifás szénhidrogénlánc, amely 3–16 szénatomot tartalmaz, mint például az epszilon-amino-kapronsavat.

A 2. képletű konjugátum, amelyben Ac jelentése acetylcsoporthoz, AC jelentése az epszilon-amino-kapronsav, Pep jelentése a Pep278 vagy PepII hordozópeptid, a szacharidcsoport jelentése pedig a Salmonella typhi Vi kapszuláris poliszacharidjának egy ismétlődő egysége, és az 1. reakcióegyenletben leírt három különböző,

1, 2 vagy 4 jelű eljárással állítható elő, amelyeket az alábbiakban részletesen ismertetünk.

Azokat a konjugátumokat, amelyekben a kar képlete $-NH-R-CH_2-$, az $-NH-R-CO-$ csoportok redukciójával kapjuk.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti konjugátumokat tartalmazó vakcinák. Ezeket a vakcinákat előnyösen szubkután lehet beadni, humán és állatgyógyászati célokra alkalmas hordozókban.

A találmányt a továbbiakban példákkal illusztráljuk.

A példákban az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

a. Anyagok: minden használt oldószer és vegyszer analitikai minőségű, és az Aldrich, USA cégtől szereztük be, hacsak külön nem jelezzük az eltérést.

b. Peptidszintézis: a peptideket szilárd fázisú szintézissel állítjuk elő, az N-terminális aminosocsoportok t-Boc védelmét alkalmazva. A 0,5–0,7 meq/g aktív klórt tartalmazó Merrifield gyantát a Chemalog, N. J., USA cégtől vásároljuk. A megfelelő oldalláncvédelemmel rendelkező Boc-védett aminosavakat a Baechem, Ca., USA cégtől vásároljuk. Az első aminosavnak a gyantához való kapcsolását az aminosavak céziúmsóin keresztül végezzük. A peptidlánc meghosszabbítását manuálisan végezzük, a szilárd fázisú eljárás általános elvei alapján [Merrifield, R. B., J. Am. Chem. Soc., 85, 2149–2154 (1963)]. A peptideknek a gyantáról való lehasítását és az oldallánc-védőcsoportok eltávolítását a HF-eljárással végezzük. A megsztetizált peptidek és analógok szekvenciáit az 1. táblázatban foglaljuk össze.

A 278m analóg peptid az egér hsp65 458–474-es pozícióinak felel meg, a 278mt analóg a mikobakteriális hsp65 431–447-es pozíciójának felel meg.

Az alábbi kontrollpeptideket is szintetizáltuk: a 277 (S) peptidet, amely a p277 peptid analógja, és a humán hsp65 437–460-as pozícióinak felel meg (WO 90/10449), amelyben a 342-es és 347-es pozícióban levő Cys (C) csoportokat Ser (S) csoportokkal helyettesítjük. A 348h peptidet, amely a humán hsp65 449–460-as pozícióinak felel meg; a CRP 77–83-as peptidet, amely a humán C-reaktív fehérje 77–83-as pozícióinak felel meg, valamint a SerRes peptidet, amely tengeri sünből származik.

A II, 277(S), SerRes, 278mt és CRP 77–83-as peptideket a fentiek szerint szintetizáltuk. A 278h, 278m és 348h peptideket egy automata szintetizátorral állítottuk elő (Applied Biosystem model 430A), a gyártó cég előírását alkalmazva a t-butiloxi-karbonil (t-Boc) stratégiában.

c. Fordított fázisú HPLC: a peptidtermékek végső tisztítását RP18 félpreparatív HPLC-oszlop (Merck, Darmstadt, Németország) felhasználásával végezzük SP8750 folyadékkromatográfiás rendszer felhasználásával, amelyet egy SP8733 változtatható hullámhosszúságú detektorral láttunk el, 0,1% trifluor-ecetsavat (TFA) tartalmazó víz-acetonitril gradiensben. Az elfolyó oldatot 220 nm-es UV-elnyelés alapján ellenőrizzük. A HPLC-minőségű acetonitrilt a Mercktől vásároljuk (Darmstadt, Németország). A HPLC-tisztaságú peptideket aminosavelemzés alapján jellemezzük.

d. Vi: a *Citrobacter freundii* WR7011-ből tisztított Vi (J.B. Robbins és S. C. Szu ajándéka, National Institute of Health, Bethesda, Maryland) <1%-ot tartal-

maz fehérjéből, nukleinsavból és lipopoliszacharidból. A Vi molekulásúlyát 3x103 kDa-ra becsüljük.

1. táblázat
A szintetikus peptidek szekvenciája

Szám	A peptid eredete	A peptid neve	A peptid szekvenciája
1.	Humán hsp65 (458–474)	278h	NEDQKIGIEIHKRTLKI
2.	hsp65-analóg	278m	NEDQKIGIEIHKRALKI
3.	hsp65-analóg	278mt	EGDEATGANIVKVALEA
4.	Humán hsp65 (437–448)	pepII	VLGGGSALLRSI
5.*		277(S)**	VLGGGSALLRSIPALDSLTPANED
6.	Humán hsp65 (449–460)	348h	PALDSLTPANED
7.	Humán C-reaktív fehérje (77–83)	CRP77–83	VGGSEIL
8.	Tengeri sün	SerRes	LRGGGVCGPAGPAGTVCS

* Az 5., 6., 7. és 8-as peptideket használjuk kontrollnak.

** A 277(S) egy stabil analógja a 277-es peptidnek (WO 90/10449), amely megfelel a humán hsp65 437–460-as pozíciójának, amelyben a 442-es és 447-es pozíciókban levő cisztein- (C) csoportokat szerin- (S) csoportokkal helyettesítettük.

e. A Vi és a szintetikus peptidek konjugációja: a különböző konjugációs eljárásokat az 1. reakcióismében foglaljuk össze

1. eljárás

A Vi és a peptid karon keresztül való kapcsolása (a)

A szilárd fázisú szintézis során a II-es peptidet az N-terminálisán meghosszabbítjuk, egy aminosavcsoport hozzáadásánál alkalmazott szokásos eljárást használva, t-Boc-epszilon-amino-kapronsavval (AC), amely karként működik a Vi-peptid konjugátumban. Azonos mennyiségű Vi-t és II-es peptid-AC vegyületet oldunk minimális mennyiségű kétszer desztillált vízben (ddv), majd a pH értékét körülbelül 6-ra állítjuk. Két ekvivalens (ekv) vízben oldódó karbodiimidet [CDI: 1-(3-dimetil-amino-propil)-3-etil-karbodiimid-hidroklorid] adunk kétszer, többórás intervallumban, majd a reakcióelegyet éjszakán át hagyjuk állni (ÉÁ). A nyers konjugátumot foszfáttal puffertelt sóoldattal (PBS) szemben dializáljuk, majd a peptid sűrűségét a Vi-ben, azaz a peptid és a Vi közötti kötődést aminosavanalízissel meghatározzuk (2. táblázat).

A peptidhez kovalens kötással kötött Vi mennyiségének értékelését Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópiával végezzük.

2. eljárás

Az N-hidroxi-szukcinimiddal aktivált Vi és a peptid kapcsolása egy karon keresztül

Mielőtt a Peptid II-AC-hez konjugáljuk, a Vi karbonsavfunkcióit aktiváljuk, N-hidroxi-szukcinimiddal való reakció elvégzésével (Sigma). Egy ekvivalens Vi-t szuszpendálunk NMP-ben (N-metil-pirrolidon, Riedel de Haen, Németország), vortexeljük, majd 5 percig centrifugáljuk egy Eppendorf-centrifugában. Az üledéket NMP-ben szuszpendáljuk, majd 5-5 ekvivalens N-hidroxi-szukcinimidet és vízben oldódó karbodiimidet (CDI) adunk hozzá, és enyhe kevertetés közben inku-

báljuk. Néhány óra elteltével a reakcióelegyet lecentrifugáljuk, majd a Vi N-hidroxi-szukcinimid észterét tartalmazó felülúszót 1 ekvivalens Peptid II-Ac-vel keverjük össze, pH=7,5-ös vizes oldatban oldva. Néhány órás inkubálás után a konjugátumot ddv-vel szemben dializáljuk, majd a peptid sűrűségét aminosavelemzéssel határozzuk meg (lásd 2. táblázat).

2. táblázat
Immunogénként használt konjugátumok

Vi-peptid konjugátum	Kapcsolási eljárás ¹	Peptid/Vi monomer ² (mólarány)
Vi-Pep II	1	1/127
Vi-PepII*	2	1/400
Vi-Pep 278h	3	1/25
Vi-Pep 348h	3	1/22
Vi-Pep CRP77–83	4	1/14
Vi-Pep 277(S)	4	1/10
Vi-Ova ³	3	1/175

¹ Az 1–4-es kapcsolási eljárásokat az Anyagok és módszerek részben ismertettük.

² A peptidsűrűséget aminosavelemzéssel határozzuk meg.

³ Ova=Ovalbumin.

3. táblázat
Az egerenként injekciózott konjugált peptid mennyisége

Vi-peptid konjugátum	A peptid egerenként injekciózott mennyisége
Vi-Pep II	0,010 µg
Vi-Pep 278h	0,170 µg

a) 2,5 µg konjugált Vi/egér dózissal végzett immunizálás során

Vi-peptid konjugátum	A peptid egerenként injekciózott mennyisége
Vi-Pep II	0,100 µg
Vi-Pep II*	0,030 µg
Vi-Pep 278h	1,000 µg
Vi-Pep 348h	0,600 µg
Vi-Pep CRP77-83	0,510 µg
Vi-Pep 277(S)	2,200 µg
Vi+PepII (keverék)	2,500 µg
Vi-Ova	2,200 µg

3. eljárás

A Vi és a peptid/fehérje kar nélküli kapcsolása

Egy ekvivalens Vi-t és egy ekvivalens fehérje/peptidet oldunk minimális térfogatú ddv-ben, majd 12 óra hosszat szobahőmérsékleten inkubáljuk pH=6 értéken, 2 ekvivalens vízben oldódó CDI jelenlétében (a peptid konjugálása esetében) és 60 ekvivalens vízben oldódó CDI jelenlétében (fehérje konjugálása esetében). A reakcióelegy dializálása után a konjugátumban levő fehérje/peptid sűrűséget aminosavelemzéssel határozzuk meg (2. táblázat).

4. eljárás

A Vi és a peptid kapcsolása, a peptidlánc oldatban egy karral történő meghosszabbítása után (b)

Ahhoz, hogy a t-Boc-epszilon-amino-kapronsav (t-Boc-AC) karboxilfunkcióját N-hidroxi-szukcinimiddel aktiváljuk, 1 mmol t-BOC-AC-t keverünk össze 1,15 mmol N-hidroxi-szukcinimiddel minimális térfogatú dioxánban (Merck, Németország); 1,15 mmol, dioxánban oldott N,N'-diciklohexil-karbodiimidet (DCC) adunk hozzá, majd három óra elteltével a reakcióelegyet megsűrítjük, és dioxánnal mossuk. A kiválasztott peptidből 0,1 mmol kis mennyiségű ddv-ben oldunk, majd 0,2 mmol/l KHCO₃-mal (Merck) elegyítjük. A t-Boc-AC N-hidroxi-szukcinimid észterét, és az elkészített peptidoldatot összekeverjük, majd 1 óra hosszat reagáltatjuk, erős kevertetés közben. A reakcióelegyet azután 10 ml ddv-vel hígítjuk, lehűtjük, és 0,5 mol/l kénsavval megsavanyítjuk. A terméket etil-acetáttal extraháljuk. A szerves oldatot ddv-vel mossuk, Na₂SO₄-en szárítjuk, majd szárazra pároljuk. A terméket két óra hosszat foszfor-pentoxidon szárítjuk, majd 4–5 ml TFA-ban (Merck) oldjuk, és 10 percig reagáltatjuk; a folyadékot 30 °C-on csökkentett nyomáson lepároljuk. Az anyagot kétszer mossuk diklór-metánnal, és a folyadékot lepároljuk, mielőtt az anyagot 2–3 óra hosszat foszfor-pentoxid felett szárítjuk. Ezt követően, a peptid-AC terméket ddv-ben oldjuk, majd a pH-t 8-ra állítjuk. A Vi N-hidroxi-szukcinimid észteréből öt mg-ot (előállítás a 2. eljárás szerint) adunk hozzá. Néhány órás inkubálás után a keletkező Vi-AC-peptid konjugátumot ddv-vel szemben dializáljuk. A peptid sűrűségét a konjugátumban aminosavelemzés alapján becsüljük meg, és az eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be.

f. A Vi-fragmentek és a szintetikus peptidek konjugálása

A Vi-fragmenteket (Dominique Schultz szívessé-
géből, Pasteur-Merieux, Franciaország) az előzőekben

ismertetett 3. eljárás alapján kapcsoljuk szintetikus peptidekhez.

g. A teljesen D szintetikus polipeptid poli(Phe, DGLu)-poli(Pro)-poli(Lys) (a továbbiakban csak FEPK néven említjük) és a szintetikus hsp65 peptidek konjugálása

A szintetikus, random elágazású FEPK-polipeptidet (Prof. Edna Mozes és Michael Sela csoportjának szíves-
ségéből, Weizmann Institute of Science, Izrael) a 3. eljárás alapján kapcsoljuk a szintetikus hsp65 peptidekhez.

h. Immunizálás

2–3 hónapos BALB/c nőstény egereket (az Olac cégtől beszerezve) immunizálunk szubkután (sc.) és intramuszkulárisan (im.), egyszer, kétszer vagy háromszor, 12 napos intervallumokban, csak Vi-vel, Vi-konjugátummal, vagy peptiddel kevert Vi-vel. Az antigén és a használt adjuváns beinjekciózott mennyisége kísérletről kísérletre változott. Az egyes kísérleti csoportból származó egereket az egyes injekciók után 12 nappal elvéreztetjük (72 nappal az utolsó injekció után, az anti-Vi-antitest-termelés hosszútávú megfigyelése során).

i. Szerológia

A természetes vagy konjugált Vi által egerekben kiváltott Vi-antitest-szintet enzimhez kapcsolt immun-
szorbens vizsgálattal (ELISA) határozzuk meg. Mivel a negatívan töltött polisacharidok nem tapadnak jól a szilárd fázisú ELISA-ban általánosan használt polisztirolhoz, pozitívan töltött metilezett szarvasmarhaszérum-albumint használunk a Vi szilárd fázishoz kötésére, nagyon alacsony aspecifikus kötődéssel. Részletesen, 0,5 mg Vi-t oldunk 1 ml PBS-ben, majd 1 óra hosszat szobahőmérsékleten kevertetjük. 10 mg metilezett BSA-t (Sigma) szuszpendálunk 1 ml vízben, majd a kapott oldatot egy 0,8 µm-es szűrőn szűrjük át. A beborítóoldat készítéséhez 1 ml oldott polisacharidot kevertetünk 20 percig szobahőmérsékleten 50 µl metilezett BSA-oldattal, majd ezt követően 1:20 arányban PBS-ben oldjuk. Nunclon delta Si mikrotiterlemezeket borítunk három óra hosszat 37 °C-on 100 µl per lyuk borítóoldattal (2,5 µg Vi per lyuk). A lemezeket ötször mossuk 0,33% Brij35-öt (Sigma) tartalmazó PBS-sel, majd 2 óra hosszat 37 °C-on blokkoljuk szárított fölözött tej PBS-ben készült 1%-os oldatával. Mosás után a hígított ismeretlen szérumból és a hígított standard szérumból (a hígítópuffer 1% fölözött tejet és 0,33% Brij35-öt tartalmaz PBS-ben oldva) 100 µl-es alikvot részeket adunk hozzá, és a lemezeket 1 óra hosszat 37 °C-on inkubáljuk. A referencia és az ismeretlen szérumokat két párhuzamosban visszük a lemezekre. A nem kötött antitesteket mosással eltávolítjuk, és a vizsgált szérumok esetében megfelelő hígítású kecske antiege IgG Fab2-alkalikus foszfátáz konjugátumot (Sigma), míg a standard szérum esetében kecske antiló IgG Fab2 enzim konjugátumot (Sigma) adunk a lemezekhez (100 µl per lyuk). 2 óra hosszat 37 °C-on végzett inkubálás után a lemezeket mossuk, majd a szint 100 µl szubsztrátoldat (0,6 mg/ml p-nitro-fenil-foszfát dietanol-amin-víz elegyben, pH=9,8) hozzáadásával hívjuk elő. Az enzimreakciót 20 perc múlva állítjuk le, lyukanként 10 µl 5 mol/l NaOH-oldattal. Az optikai sűrűségeket 405 nm-en olvassuk le. A Burro

260 anti-Vi standard szérumot, amely 550 mg Vi-antitestet tartalmaz milliliterenként, formalinnal fixált *Salmonella typhi* Ty2 többszörös injekciójával állítják elő (J. B. Robbins and S. C. Szu, NIH, Maryland ajándéka). A kapott eredményeket 405 nm-en leolvasott optikai sűrűség formájában, illetve µg Vi-antitest/ml formájában fejezzük ki.

1. példa

Vi-peptid/fehérje konjugátumok készítése

A Vi Peptid II-vel való konjugátumait az 1-es kapcsolási eljárással állítjuk elő (Vi-PepII), illetve a 2-es

kapcsolási eljárással (Vi-PepII*). A Vi-nek a 278, 278m, 278mt, 348h és ovalbumin (Ova) fehérjékkel való konjugátumait a 3-as kapcsolási eljárással állítjuk elő, míg a Vi CRP 77–83-mal és 277(S)-sel való konjugátumait a 4-es kapcsolási eljárással állítjuk elő.

Néhány Vi-konjugátum összetételét aminosavanalízissel határozzuk meg. A 2. táblázatban bemutatott eredmények azt mutatják, hogy a peptid/fehérje per Vi monomer molarány változik. Az egerenként 0,1–0,2 µg beinjektált peptiddózisok bizonyultak a leghatékonyabbnak.

4. táblázat

Vi-vel vagy Vi-peptid konjugátummal injekciózott nőstény BALB/c egerek szérumban antitestválasza

		Vi-antitest		
Vakcina Vi-Dózis		12 nappal az 1. immunizálás után	24 nappal az 1. immunizálás után	12 nappal a 2. immunizálás után
	mg	mg/ml	mg/ml	mg/ml
Vi	0,25	0,194	0,005	0,053
Vi-Pep 278h	0,25	0,049 (0,000–0,078)	1,455 (0,296–1,906)	2,959 (1,533–3,148)
BALB/c PBS	---	0,223	0,205	0,233

A 2–3 hónapos nőstény BALB/c egereket kéthetenként az egyes vakcinák IFA-oldatából 0,2 ml-rel sc. injekciózunk. Mindegyik kísérleti csoportban 5 egér volt. Tizenkét, illetve huszonegy nappal az első, és 12 nappal a második immunizálás után az egereket elvéreztetjük, és szérumban ELISA-val vizsgáljuk a Vi antitesteket, az Anyagok és módszerek részben leírtak alapján. Az eredményeket mértani átlagban fejezzük ki; a zárójelben az egyes csoportokban mért Vi-antitest-koncentráció variációja látható.

2. példa

A Vi és a Vi-konjugátumok immunológiai jellemzése

2.1 A természetes Vi antigenitása

Ahhoz, hogy vizsgáljuk a Vi által indukált antitestválaszt, 2–3 hónapos nőstény BALB/c egereket (négy-öt egér csoportonként) injekciózunk szubkután (sc), különböző dózisú Vi-antigénnel (önmagában), inkomplett Freund-féle adjuvánsban, kéthetes időközönként. Az egereket 12, illetve 24 nappal az első, illetve 12 nappal a második immunizálás után kivérezetjük. Az összes, egy csoportba tartozó egér szérumát egyesítjük. Az anti-Vi-antitesteket az Anyagok és módszerek részben leírtak alapján ELISA-val mérjük, és a specifikus antitestszinteket 405 nm-en mért abszorbanciában (A405) fejezzük ki.

Amint az az 1–1a. ábrán látható, egy Vi-injekció Vi-antitest-választ váltott ki egerekben. A Vi újrainjekciójára nem váltott ki fokozó hatást, amint az várható a T-ind antigénektől. Egerenként 2,5 µg Vi IFA-oldatával végzett szubkután immunizáció adja a legerősebb antitesttermelést; egy magasabb dózis nem eredményez fokozott immunválaszt.

Az ebben a kísérletben használt Vi készítmény <1%-ban tartalmaz fehérjeszennyeződések. A viszonylag magas Vi-immunválaszt ezzel a ténnyel magyarázhatjuk.

2.2 A Vi-konjugátumok antigenitása

2.2.1 Az antigéndózissal való kapcsolat

A különböző dózisoknak a Vi természetes és konjugált formáinak immunogenitására gyakorolt hatását vizsgáltuk. Anti-Vi-antitestválaszt indukáltunk egerekben 2,5 µg vagy 0,25 µg Vi-vel önmagában, illetve Vi-PepII, Vi-Pep278h, Vi-Pep348h konjugátum formájában, amely 2,5 vagy 0,25 µg Vi-t tartalmazott. Csoportonként négy nőstény BALB/c egeret immunizálunk sc 2,5 µg Vi-vel önmagában, IFA-ban, kéthetes intervallumban (a peptid konjugátum formájában injektált mennyiségét illetően lásd a 3. táblázatot). Az anti-Vi-antitest-választ ELISA-val mérjük, és a specifikus immunválasz méretét a 2a–f. ábrán mutatjuk be A405-ben. Mindegyik panel ugyanazzal az antigénnel injekciózott 4 egerből nyert szérumban geometriai átlagát mutatja. Kontrollként csak Vi-vel, illetve PBS-sel (IFA-ban) immunizált 4 egér egyesített széruma szolgál.

A 2a–f. ábrán bemutatott eredmények azt mutatják, hogy 2,0 µg Vi-vel, illetve Vi-konjugátummal való első injekcióját követően 12 nappal (a megfelelő injekciózott peptidmennyiségeket lásd a 3b. táblázatban) mindegyik Vi-konjugátum alacsonyabb anti-Vi-immunválaszt mutatott, mint amekkora a Vi természetes formája kiváltott (2a. ábra). Ha a Vi-antitest-szintet további 12 napig vizsgáljuk újabb immunizálás végzése nélkül, akkor ez azt mutatja, hogy a Vi-specifikus antitestek mennyisége világosan nőtt Vi-Pep278h-val injekciózott egerekben

(2b. ábra). Az újrainjekciózás határozott erősítő választ vált ki Vi–PepII-vel, illetve Vi–Pep278h-val végzett immunizálásnál, de nem vált ki ilyen választ, ha csak Vi-vel végezzük az immunizálást (2c. ábra).

Ha az injekciózott Vi dózist egerenként 0,25 µg-ra csökkentjük (a megfelelő injekciózott peptidmennyiségeket lásd a 3a. táblázatban), akkor ez csak alacsony Vi-antitest-szintet eredményez csak Vi-vel és Vi-PepII-vel való immunizálás esetén (2d–f. ábra). Ezzel szemben a Vi–Pep278h által kiváltott immunválasz egy második immunizálásra tiszta fokozó hatást mutatott (2f. ábra). Meg kell jegyezni, hogy érdekes módon ebben a kísérletben az injekciózott peptid mennyisége csak 0,17 µg per állat (lásd 3a. táblázat).

2.2.2 A Vi-vel, illetve a Vi-konjugátumokkal indukált anti-Vi-antitest-termelődés kinetikáját az előzőekben ismertetett módon immunizált egerekben vizsgáljuk. Azokat az anti-Vi-szinteket tekintjük pozitív értékeknek, amelyek magasabbak a csak Vi-vel indukáltaknál, az ennél alacsonyabbakat negatív értékeknek tartjuk. A szérumokat Vi-antitest szempontjából ELISA-val vizsgáljuk meg. Az eredményeket a 3a., 3ab., 3b. és 3bb. ábrán mutatjuk be A405 értékekben, és a geometriai átlagot ±SD-t mutatunk az antigénenként beinjektált négy egér esetében.

A 3a., 3ab., 3b. és 3bb. ábrán a Vi-termelődés kifejlődését látjuk Vi és Vi-konjugátumok két egymást követő injekciójának hatására, két különböző antigéndózisban. 3a. ábra: egerenként 2,5 µg Vi injekciózva Vi–PepII, Vi–Pep278h, Vi–Ova, Vi–Pep348 és Vi–CRP 77–83 formájában; 3b. ábra: egerenként 0,25 µg Vi injekciózva Vi–PepII és Vi–Pep278h formájában. 3ab. és 3bb. ábra – összehasonlítás céljából a csak 2,5 µg Vi által indukált Vi-antitest-szintek. Amint az a 3a. ábrán látható, tizenkét nappal az első immunizálás után mindegyik konjugátum tisztán alacsonyabb Vi-antitest-szintet mutatott, mint amit egyedül a Vi váltott ki, jóllehet ugyanazt a Vi-mennyiséget injekcióztuk. Egy körülbelül 12 napos „lag” fázis után a Vi-konjugátumokkal immunizált állatok széruma jelentősen megnövekedett specifikus Vi-antitest-szintet mutatott. Ez a hatás különösen nyilvánvaló a Vi–Pep278h konjugátum esetében, mindkét alkalmazott dózisban (3a–b. ábrák). A 24 nappal későbbi újrainjekciózás a T-dep antigénekre jellemző erősítő választ vált ki (az összehasonlításhoz lásd a 3ab. és 3bb. ábrán). A Vi–PepII, Vi–Pep278h és Vi–Ova magasabb szintű Vi-antitest-szinteket indukált, mint amit akkor kaptunk, amikor csak a Vi-t injekcióztuk. Érdekes megjegyezni, hogy a Vi–Pep278h konjugátum erősebb anti-Vi-immunválaszt ad, mint a Vi–Ova Vi-fehérje konjugátum (3a. ábra).

Egy tízszer kisebb antigéndózissal végzett immunizálás fokozta a Vi–Pep278h által indukált Vi-antitest-termelődés ismertetett hatását (3b. ábra).

Az egerekben a Vi–Pep278h konjugátummal kiváltott Vi-antitest-koncentrációkat a 4. táblázatban adjuk meg. A Vi–Pep278h által indukált specifikus antitest-szint harmincszoros növekedést mutatott a 13. és 24 nap között, az első immunizálás után. Az újrainjek-

ciózás a Vi-antitest-koncentráció megkétszereződését eredményezte, körülbelül 3 µg/ml-re, ami 55-ször magasabb, mint az, amit a Vi egyedül kivált.

2.2.3 Anti-Vi-antitest-specifitás

A T-dep antigénekre adott immunválaszt germinális centrumok létrejötte jellemzi, amelyek az immunológiai memória koncepciójával kapcsolatosak. Ezekről úgy gondolják, hogy egy bizonyos mikrokörnyezetet biztosítanak, amelyek lehetővé teszik a B-sejtek számára, hogy V-gén hipermutáción essenek át, és így magasabb affinitású receptorokkal és megváltozott izotípuseloszlással rendelkező antitesteket expresszáljanak.

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, vajon a Vi-peptid konjugátumok által indukált Vi-specifikus B-sejtek is átesnek-e ezen az érési folyamaton, a Vi természetes és konjugátum formái által kiváltott Vi-antitestek specifikitását hasonlítjuk össze. Négy-öt nőstény BALB/c egeret immunizálunk a Vi, Vi–PepII, és Vi–Pep278h antigénekkel (sc.) IFA-ban, mindegyik 2,5 µg Vi-t tartalmaz, vagy önmagában, vagy konjugátum formájában. Az állatokat a második injekció után 12 nappal elvéreztetjük, és a Vi-antitesteket ELISA-val meghatározzuk. A 4a–b. ábrán látható szimbólumok az egyes csoportok egyedi reprezentatív egereire vonatkoznak. Az ELISA-lemezeket vagy 2,5 µg Vi-vel borítjuk lyukanként (4a. ábra), vagy 1,25 µg Vi-vel borítjuk lyukanként (4b. ábra); a 4a. ábrán az látható, hogy csak a Vi által indukált Vi-specifikus antitesttiter alacsonyabbak, mint amelyeket a Vi–Pep278 indukál. Ha az ELISA-lemez borítására használt antigén mennyiségét csökkentjük (4b. ábra), akkor egy tisztább képet kapunk. A Vi-peptid konjugátumok által indukált Vi-antitestek jelentős szinten felismerik a csökkent mennyiségű Vi-t, míg a természetes Vi-vel immunizált egerek széruma alig valami kötődést mutat.

Ahhoz, hogy tovább megerősítsük a Vi-peptid konjugátumok T-dep jellemzőit, az előzőekben egerekben csak Vi-vel, illetve Vi–Pep278h-val kiváltott Vi-antitestek izotípuseloszlását meghatározzuk. Az immunizált egerekben az anti-Vi-antitestek UGM- és IgG-összetételét ELISA-val vizsgáljuk. A specifikus IgM antitesteket, amelyek felismerik a Vi-t, kecske antieger Fab2 IgM peroxidáz konjugátummal mutatjuk ki (5a. ábra), és a specifikus IgG-antitesteket kecske antieger Fab2 IgG alkalikus foszfatáz konjugátummal mutatjuk ki (5b. ábra). Az eredmények egy jellemző egerre láthatók.

Az ismételt immunizálás után kapott anti-Vi-szérumok izotípus-specifikitását az 5a–b. ábrán mutatjuk be. A természetes Vi molekula elleni antitestekről úgy tűnik, hogy főleg az IgM izotípusra korlátozódnak, míg a Vi–Pep278 konjugátum tiszta Vi-antigén elleni IgG antitestválaszt is kivált, jelezve, hogy ha egy kiválasztott T-sejt-epitóp (ebben az esetben a 278h peptidet) egy T-ind antigénhez kapcsoljuk, mint például a Vi-hez, akkor egy Vi-specifikus B-sejt-populáció izotípus osztályváltást kapunk, ami jellemző módon a T-dep antigén-nél figyelhető meg.

Ahhoz, hogy kövessük az anti-Vi hosszú távú termelődését, állatokat harmadszor is immunizálunk,

majd a specifikus immunválaszt 72 napig követjük. 4–5 nőtény BALB/c egeret injekciózunk sc. csak Vi-vel, Vi–PepII és Vi–Pep278h antigénnel (IFA-ban), a 6a-b. ábrán jelzett időpontokban. Az immunválaszt 108 napig követjük (72 nappal az utolsó immunizálás után), a Vi-antitest szintjét ELISA-val határozva meg a különböző szérumban. A kapott eredményeket geometriai átlag formájában fejezzük ki, és 1:100 (6a. ábra), valamint 1:1000 (6b. ábra) szérumhígításnál mutatjuk be. A Vi–PepII és Vi–Pep278h Vi-peptid konjugátumoknak ezen további injekciójával fokozó hatás nem figyelhető meg. A konjugátumok által indukált anti-Vi-szintek magasabbak, mint a csak Vi által indukáltak, és 2,5 hónapig nem csökkentek (6. ábra), sőt az utolsó injekció után 6 hónap elteltével (nem közölt adatok).

2.2.4 Az adjuváns és az immunizálás módjának hatása a Vi–PepII által indukált anti-Vi-antitest-termelőésre

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az adjuváns hatását a természetes és módosított Vi által indukált Vi-specifikus antitestek képződésére, az antigéneket szubkután injekciózzuk vagy IFA-ban, vagy PBS-ben. A Vi–Pep konjugátumot IFA-ban és PBS-ben is elkészítjük. Egy négy egerből álló csoportot sc. injekciózunk (7aa., 7ba. és 7ca. ábra), míg egy második csoportot is injekciózunk (7ab., 7bb. és 7cb. ábra) az egyes antigénkészítményekkel (egerenként 2,5 µg Vi-t injekciózunk). A szérumokat az első immunizálás után 12 (7aa. és 7ab. ábra) és 24 (7ba. és 7bb. ábra) nappal vesszük, illetve 12 nappal a második immunizálás után (7ca. és 7cb. ábra). Az anti-Vi-antitesteket ELISA-val mérjük, A 405 értékben adjuk meg, (átlag ± SD). A 7aaa., 7bc. és 7ca. ábrán bemutatott eredmények azt mutatják, hogy az IFA szükséges ahhoz, hogy kifejezze egy T-dep immunválasz-kinetikáját.

Ha az immunizálás módját megváltoztatjuk, oly módon, hogy a Vi-t intramuszkulárisan (im) adjuk be, akkor ez két dolgot mutat (amint a 7ab., 7bb. és 7cb. ábrán látható). Először, a Vi-konjugátum intramuszkuláris bevétele magasabb primer Vi-immunválaszt eredményez, mint az, amikor ugyanazt az antigénpreparátumot szubkután adjuk be. Másodszor, ez az injekciós út nem eredményez fokozó hatást, mint az a szubkután immunizálásnál megfigyelhető. Ugyanez a trend figyelhető meg, ha a Vi–PepII-t PBS-ben injekciózzuk, akár szubkután, akár intramuszkulárisan (7aa., 7ab., 7ba., 7bb., 7ca. és 7cb. ábrák).

További kísérletekben, melyekben az egereket Vi–278h-val immunizáljuk IFA-ban, PBS-ben vagy CFA-ban (komplett Freund-féle adjuváns), az anti-Vi-antitestek összehasonlítható titerét kapjuk a három adjuvánssal (nem közölt adatok).

2.2.5 Immunizálás előtt Vi-vel kevert szabad II-es peptid által indukált anti-Vi-antitest-termelőés

Ahhoz, hogy kiértékeljük annak szükségességét, hogy a Vi-t az immunizálás előtt kovalens kötéssel peptiditópokhoz kössük, a Vi-t és a PepII-t fizikailag összekeverjük, és szubkután injekciózzuk IFA-ban nőtény BALB/c egerek csoportjának, majd az eredményt

összehasonlítjuk a Vi–PepII konjugátummal kapott immunizálás eredményével. Mindkét antigénpreparátumot sc. injekciózzuk 4 egerből álló csoportoknak IFA-ban (a PepII és a Vi keverékét egy fecskendőből injekciózzuk). Az állatokat az első immunizálás után 12, illetve 24 nappal (8a. és 8b. ábra), és 12 nappal a második immunizálás után (8c. ábra) elvéreztetjük. Az anti-Vi-antitesteket ELISA-val határozzuk meg, az eredményeket A405-ben adjuk meg. Mindegyik görbe értelme geometriai átlag ± SD.

Amint az a 8a–c. ábráról látható, ha a Vi-t és a II-es peptidet összekeverjük, akkor pontosan ugyanazt az eredményt kapjuk, mint amit a Vi–PepII konjugátumra leírtunk. Az első immunizálás csak alacsony Vi-antitest-szinteket eredményezett, míg az újrainjekciózás tiszta fokozó hatást eredményezett.

2.2.6 A „hordozó” priming hatása az anti-Vi-antitest-termelésre

Ahhoz, hogy vizsgáljuk a szabad peptiddel végzett priming hatását a Vi-peptid konjugátumok által indukált poliszacharidválaszra, egy 4 nőtény BALB/c egerből álló csoportot oltunk be állatonként sc. 1 µg II-es peptiddel, IFA-ban. Két héttel később az állatokat Vi–PepII konjugátummal injekciózzuk, amely 2,5 µg Vi-t tartalmaz. Szérumokat a 9. ábrán jelzett időpontokban vesszünk, és ELISA-val elemezzük. Az antipoliszacharid antitestszinteket, amelyeket a jelzett időpontokban lehet mérni, a 9. ábrán mutatjuk be. Ha egerenként 1 µg II-es peptiddel végezzük a „priming”-ot, akkor erősebb primer immunválaszt kapunk a Vi-re, mint azokban az állatokban, amelyek nem kaptak „priming” kezelést. Mindazonáltal, a szekunder immunválaszt illetően nem figyeltünk meg „priming” hatást.

2.2.7 Anti-Vi-immunválasz indukálható Vi–Pep278h-val, de nem indukálható Vi–Pep277(S)-sel ugyanabban az egerben

4 nőtény BALB/c egerből álló csoportot injekciózunk sc. Vi–Pep277(S)-sel IFA-ban, kéthetenként (az egyes egerekbe injekciózott konjugátum Vi-tartalma 2,5 µg). Az anti-Vi immunválaszt 12 nappal az első és 12 nappal a második injekciózás után ELISA-val határozzuk meg (10a-b. ábra). Ezek közül az állatok közül kettőt újrainjekciózunk Vi–Pep278h-val, míg a másik kettőt csak Vi-vel (2,5 µg Vi egyedül és konjugátumban). Az egereket ismét elvéreztetjük 12 nappal az első (10a. és 10c. ábra) és a második immunizálás (10b. és 10d. ábra) után, és a Vi-antitest-szinteket meghatározzuk. Összehasonlítás céljából az azokban az állatokban indukált immunválaszt, amelyeket csak Vi–Pep278-cal injekcióztunk, ugyanazon az ábrán ábrázoljuk. Az eredményeket A405-ben fejezzük ki, és 2 különböző szérumhígításban mutatjuk be: 1:50 (10a. és 10b. ábra), és 1:1000 (10c. és 10d. ábra). Az adatok geometriai átlagok, ±SD. Az antigén A=Vi–Pep277(S), az antigén B=Vi–Pep278h (miután az egereket Vi–Pep277(S)-sel injekcióztuk), az antigén C=Vi egymagában (miután az egereket Vi–Pep277(S)-sel injekcióztuk, és az antigén D=Vi–Pep278h.

Amint az a 10a–d. ábrán látható, a nőtény BALB/c egerek Vi–Pep277(S)-sel való immunizálása nem ered-

ményez kimutatható Vi-antitest-választ (A antigén). Annak vizsgálatára, hogy a válasz elmaradása az egyes egerek miatt van, illetve a specifikus konjugátum az oka, ugyanazt az egeret, amely nem reagált a Vi-Pep277(S)-re, Vi-Pep278(h)-val (B antigén) immunizáljuk, vagy a természetes Vi-vel (C antigén). A Vi-Pep278h-val való újrainjekciózás határozottan növeli a Vi-antitest-szinteket, amint azt a csak Vi-Pep278h-val (D antigén) injektált egerekre kimutattuk. A csak Vi-vel való újrainjekciózás is emelte a Vi-immunválaszt, azonban kisebb mértékben, mint amennyire a Vi-konjugátum indukálja.

2.2.8 A Vi-peptid konjugátumok felismerése különböző anti-Vi-szérumokkal

A Vi-t és a Vi-PepII, Vi-PepII*, Vi-Pep278h és Vi-CRP77-83 Vi-peptid konjugátumokat használjuk immunogénként ELISA-lemezek borítására, és ellenőriztük a felismerést a megfelelő konjugátummal immunizált állatokból nyert szérumokkal, illetve a többi Vi-konjugátummal immunizált állatból nyert szérumokkal. A megkötött antitest mennyiségét ELISA-val határozzuk meg, és a 11a-f. ábrán A405 értékben fejezzük ki. Standard anti-Vi-szérumot (Burro 260, 11a. ábra) használunk 1:12 000 szérumhígításban, a többi szérumot (11b-f. ábra) 1:200 arányban hígítjuk.

Annak elemzésére, hogy a peptidok hozzákapcsolása megváltoztatja-e a Vi-egység antigénstruktúráját a konjugátumban, a különböző Vi-konjugátumokat, valamint a természetes Vi-t megvizsgáltuk, hogy mennyire ismeri fel a referencia anti-Vi-szérum (Burro 260) (11a. ábra). A peptidnek a Vi-hez való kötése láthatóan befolyásolja a Vi-molekula antigénaktivitását, mivel az összes konjugátum, a természetes Vi-vel összehasonlítva, csökkenő mértékben ismerhető fel a Burro 260 antiszérummal. Nem található korreláció a Vi-molekulára vitt peptid mennyiségével (lásd 2. táblázat). Mindazonáltal, ezek az eredményeit részlegesen magyarázzák a különböző Vi-peptid konjugátumok által expresszált antigénaktivitásban talált különbségeket. A Vi-PepII és a Vi-Pep278h láthatóan nagyobb mennyiségű Vi-antitestet köt meg a Burro 260 antiszérumból, mint a kevésbé immunogén Vi-PepII* és Vi-Pep CRP77-83 konjugátumok.

A különböző konjugátumok által indukált Vi-antitestek jellemzése a 11. ábrán látható, a B-F paneleken. A Vi-PepII és a Vi-Pep278h által indukált antiszérumok mutatják a legmagasabb keresztreaktivitást a természetes Vi-molekulával, de meglepő módon csak gyengén ismerik fel azt a konjugátumot, amely ellen készítettük. A Vi-PepII*-vel és a Vi-Pep CRP 77-83-mal való injektálás után kapott antiszérumok nem mutattak semmilyen kötődést a természetes Vi-molekulához, vagy a bemutatott konjugátumantigénekhez. A választott peptid természete mellett ezek az eredmények a peptid mennyiségének és a kapcsolási eljárásnak a hatását is igazolják a Vi-peptid konjugátum immunogén tulajdonságaira.

2.2.9 Immunválasz különböző egértörzsekben a Vi-peptid konjugátumokra

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a Vi-peptid konjugátumok immunogénitását a csak az MHC-génjeikben kü-

lönöző, kongenikus egértörzsekben, BALB/c (H-2d), BALB/k(H-2k) és BALB/b (H-2b) egereket immunizálunk csak Vi-vel, illetve a Vi-278h-val, Vi-278m-mel, Vi-278mt-vel, Vi-277(S)-sel, Vi-SRes-sel (Vi-SerRes). Az egyes törzsekből (BALB/c, BALB/k, BALB/b, NOD és NON.NOD) öt egerből álló csoportokat (12a-e. ábra) injektálunk szubkután 2 µg Vi-vel az ábrán jelzett konjugátumok formájában, IFA-ban emulgeálva. 4 hét elteltével az egerek ugyanabból az antigéndózisból kapnak egy erősítést, majd 12 nappal később elvégeztetjük őket. Az egyes egerekből kapott szérumoknak ELISA-val vizsgáljuk a Vi-antitestjeit. A specifikus antitestszinteket a 12a-e. ábrán a standard anti-Vi szérum (Burro 260) százalékában fejezzük ki.

A 12. ábrán látható eredmények azt mutatják, hogy a Vi278h, valamint a Vi-278m konjugátum reakciója nem korlátozódik egy bizonyos MHC-restríkción. A peptidnek mind BALB/c, mind BALB/k egerekben antitestitert indukálnak a konjugátum cukorrésze ellen. Ezzel szemben, a BALB/c egerek nem reagálnak egyik injektált konjugátumra sem. Tehát a három MHC genotípus közül kettő reagált.

A NOD és NON.NOD egerek, amelyek ugyanazokat az MHC-géneket tartalmazzák (H-2nod), eltérő immunológiai reakciómintázatot mutatnak a Vi-peptid konjugátumokkal szemben. Csak a mikobakteriális 278mt homológ képes egy Vi-specifikus segítő hatás kifejtésére.

2.2.10 Az anti-Vi szérumok IgG izotípuseloszlása

Csoportonként öt BALB/c egeret immunizálunk sc. 2 µg Vi-vel, illetve Vi-278h konjugátummal, IFA-ban immunizálva. Négy héttel később az egereknek ugyanabból az antigéndózisból adunk egy erősítő injekciót, majd 12 nappal később elvégeztetjük őket. Az egyedi szérummintáknak vizsgáljuk az antipoliszacharid IgG antitestjeit, biotinilezett nyúl antieger alosztály-specifikus antiszérumokkal és sztreptavidinhez konjugált alkalikus foszfatázzal, ELISA-val. A Vi-antitest-szinteket A405-ben fejezzük ki.

A bakteriális szénhidrát elleni rágcsló antitestek alosztályeloszlásának vizsgálata azt a meglepő megfigyelést eredményezte, hogy a szénhidrát önmagában a nagymértékben a ritka IgG3 alosztályra korlátozódó IgG-választ serkent. A hordozófehérjék, mint például a BSA vagy a tetanusztoxoid, bakteriális kapszuláris poliszacharidokhoz konjugálva, hajlamosak egerekben főleg IgG1 izotípusú anticukor antitestválaszt indukálni.

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a Vi-hez konjugált 278h peptid hatását, meghatároztuk az anti-Vi-szérumok IgG alosztály eloszlását. Amint az a 13a-c. ábrán látható, ha csak Vi-t injektálunk, akkor olyan immunválaszt kapunk, amely csak az IgG3 alosztályra korlátozódik, míg a peptid-cukor Vi-278h konjugátum világosan eltolja az alosztályeloszlást egy IgG1 által dominált irányba.

Ha a hsp65-peptidet egy T-ind antigénhez konjugáljuk, akkor ez képesnek látszik arra, hogy jelentős mennyiségi változásokat indukáljon a komplex T-ind egysége elleni immunválaszban.

3. példa

3.1 A Vi-fragment-peptid konjugátumok antigenitása

A poliszacharidok, beleértve a Vi-antigént is, immunogenitása a molekulaméretükhöz kapcsolódik. A Vi-fragmentek (körülbelül 45 kDa), amelyeket ultrahangos hasítással állítunk elő, amely kezelés nem változtatja meg a monomer egységek szerkezetét, és amely viszonylag homogén poliszacharidot eredményez, kevésbé immunogén, mint a természetes Vi (körülbelül 3×103 kD) [Szu, S. C. et al., Infect. Immun., 86, 3823–3827 (1999)]. Csoportonként öt BALB/c egeret injektálunk sc. 2 µg Vi-fragmenttel, illetve a Vi 278h peptiddel való konjugátumával, IFA-ban emulgeálva. Az erősítő injekció utáni 12. napon szérumbintákat veszünk és ELISA-val vizsgáljuk, hogy mennyi Vi-fragment antitest van bennük. A specifikus antitestszinteket a standard anti-Vi-szérum százalékában fejezzük ki.

Amint az a 14. ábrán látható, a BALB/c egerek 2 µg Vi-fragmenttel való immunizálása nem eredményezett semmilyen anti-Vi-immunválaszt. Ezzel szemben, a 278h peptidhez konjugált Vi-fragmentek fokozott antigenitást mutatnak, jelentős mennyiségű anti-Vi-antitest-titert váltva ki.

4. példa

4.1. A 278h peptid homológjaival konjugált Vi antigenitása

Ahhoz, hogy meghatározzuk, hogy vajon a peptidek, amelyek a hsp65-ből származnak, és saját, valamint idegen epitópokat képviselnek, képesek-e egerekben T-sejt-hordozóként funkcionálni T-ind antigének esetében, megszentizáltuk a 278m és 278mt peptideket, amelyek a humán 278 szekvencia egér illetve mikobakteriumvariánsának felelnek meg (lásd 1. táblázat), majd Vi-vel konjugáltuk őket. Négy BALB/c egeret injektálunk szubkután 2 µg Vi-vel, illetve Vi-278h-val, Vi-278m-mel, Vi-278mt-vel és Vi-SerRes konjugátummal, IFA-ban emulgeálva. Tizenkét nappal az erősítőinjekció után az egereket elvéreztetjük, majd a szérumbintákat ELISA-val megvizsgáljuk a Vi-antitesteket. A specifikus antitestszinteket a standard anti-Vi-szérum százalékában fejezzük ki.

A 15. ábrán világosan látható, hogy egy saját epitóp, amelyet az egér 278m homológ képvisel, képes fokozni az immunválaszt a T-ind antigén Vi-vel injektált BALB/c egerekben. A mikobakteriális 278 epitóp nem mutatott semmilyen segítő hatást a BALB/c egerekben, de ez volt az egyetlen peptid, amelyet megvizsgáltunk mint T-sejt-hordozót NOD, valamint NON.NOD egerekben (12. ábra).

5. ábra

5.1 A 278h peptid azon tulajdonsága, hogy képes T-sejt-hordozóként működni szintetikus, random elágazású polipeptidek D izomerjeivel

Az aminosavak D izomerjeiből álló szintetikus polimerekről közismert, hogy a T-ind antigének csoportjába tartoznak. Ahhoz, hogy kiderítsük, hogy a hsp65 eredetű peptidek képesek-e T-sejt-hordozóként működni

az antigének ezen csoportjánál is, megvizsgáltuk az immunválaszt egerekben a hsp65 peptidek közé tartozó 278h vagy 348h konjugátumokkal, valamint a poli(Phe, Glu)-poli(Pro)-poli(Lys) szintetikus polipeptiddel (FEPK) BALB/c egerekben. Három BALB/c egeret immunizáltunk sc. csak a FEPK polipeptiddel, illetve a 278h vagy 348h peptidhez konjugálva, IFA-ban emulgeálva. Tíz nappal az ugyanazzal az antigénpreparátummal végrehajtott erősítő injekció után az egyes egerekből szérumbintákat vettünk, és egy módosított ELISA-eljárással megvizsgáltuk, hogy vannak-e bennük FEPK-specifikus antitestek. A lemezeket 2,5 µg FEPK-val borítjuk, majd éjszaka át 4 °C-on inkubáljuk. Az eljárás többi részét az Anyagok és módszerek részben leírtak alapján végezzük. Az eredményeket OD405-ben fejezzük ki.

A csak a polipeptid által kiváltott IgG1-immunválaszt a 278h peptiddel konjugált polipeptid által indukált immunválasszal összehasonlítva azt tapasztaljuk, hogy a konjugátum immunogenitása sokkal jobb. A 348h kontrollpeptid nem mutat semmilyen segítő hatást, ami megegyezik azokkal az eredményekkel, amelyeket úgy kaptunk, hogy ezt a peptidet a Vi poliszachariddal konjugáltattuk (16. ábra). Tehát a 278h peptid funkcionálhat T-sejt-hordozóként, nemcsak a T-sejtektől független cukorantigének esetében, hanem az aminosavakból álló szintetikus polipeptidek esetében is.

A fenti kísérletek bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a találmány szerinti Vi-peptid konjugátumok képesek részt venni egy T-limfocita segítő hatásában, ami egy T-dependens antigénekre jellemző immunválaszt eredményez. Ezt a bizonyítékot az alábbiakban foglalhatjuk össze.

(i) A Vi immunogenitása fokozódik, ha specifikus peptidjelöltekhez kapcsolt konjugátumként mutatjuk be őket; ez a hatás nem kovalenskötés-függő, mivel a két komponens egyszerű keverése hasonló immunválaszt ad.

(ii) A konjugátum Vi-komponensének az immunogenitása függhet a poliszacharidhoz kapcsolt peptidtől. A találmány szerinti PepII és Pep278 peptidek fokozzák a Vi immunogenitását, míg a kontrollpeptidek, a 348h, a 277(S) és a CRP 77–83 nem képesek szérumbinták anti-Vi-választ indukálni.

(iii) A Vi-peptid konjugátumok többszöri injekciózása az anti-Vi-antitest szintjének emelkedését indukálja (erősítő hatás).

(iv) A Vi-peptid konjugátumok által indukált anti-Vi-antitestek láthatóan nagyobb antigénspecifitással rendelkeznek, mint amelyet a Vi egyedül indukál, és főleg az IgG izotípusba tartoznak.

(v) A „Peptid priming”, amit a II-es peptid okozott, magasabb szérumbinták anti-Vi-antitest-választ eredményezett a megfelelő Vi-peptid konjugátummal végzett kezdeti immunizálásnál.

(vi) Mind az sc. úton végzett antigénbeadagolás, mind az IFA felhasználása láthatóan szükséges egy, a T-dependens antigénekre jellemző anti-Vi-immunválaszt indukálásához.

Az összes, az előzőekben a humán Pep278h-val kapott eredményt megismételtük a Pep278m, egérváriáns szekvenciával, amely a humán Pep278h-tól abban különbözik, hogy a 471-es pozícióban egy T helyett A található. Annak ellenére, hogy a Pep278m az egér egy saját epitópja, T-sejt-hordozóként működik a Vi immunogenitálásának fokozásában. Tehát az egerek reagálnak mind az egér, mind a humán szekvenciákra, amelyek saját, illetve közel saját szekvenciák, jelezve, hogy az emberek ugyanúgy fognak válaszolni a humán szekvenciákra, mint ahogy az egerek válaszolnak az egérszekvenciákra.

Az összes, előzőekben említett tény azt mutatja, hogy a poliszacharid-peptid konjugátum Vi-komponense egy timusztól független immunogénből egy timuszfüggő immunogénre alakult.

Az nem nyilvánvaló, hogy a humán hsp65-ből származó peptidek használhatók gyengén antigén molekulák immunogenitálásának fokozására, először azért, mert egy saját, humán hsp65 fehérje nem tekinthető immunogénnek emberekben, másodsor pedig azért, mivel előzőleg igazolták, hogy a humán szekvenciából származó peptidek, mint például a Pep278, nincsenek hatással az autoimmun válaszok toleranciájára, illetve korlátozására (WO 90/10449).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy egy antigént tartalmaz, amely kovalensen kapcsolódik egy szintetikus peptidhordozóhoz, amely a hsp65 T-sejt-epitópja, mimellett a szintetikus peptidhordozó a következő peptidek valamelyike:

- (a) NEDQKIGIEIIRKTLKI (Pep278h),
- (b) NEDQKIGIEIIRKALKI (Pep278m),
- (c) EGDEATGANIVKVALEA (Pep278mt),
- (d) VLGGGSALLRSI (PepII), és
- (e) a Pep278h analógja:

458 474
N E D Q K I G I E I I K R T L K I,

amely rendelkezik a humán hsp65 458–474 szakasza elektromos és hidrofób/hidrofíl jellemzői legalább 70%-ával.

2. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a szintetikus peptid a Pep278h analógja,

458 474
N E D Q K I G I E I I K R T L K I,

ahol

E459 jelentése E vagy D,

D460 jelentése D vagy E,

K462 jelentése K, R vagy Orn (ornitin),

I463 jelentése I vagy L, V, M, F, Nle (norleucin) vagy NVa (norvalin),

I465 jelentése I vagy L, V, M, F, Nle vagy Nva,

E466 jelentése E vagy D,

I467 jelentése I vagy L, V, M, F, Nle vagy Nva,

I468 jelentése I vagy L, V, M, F, Nle vagy NVa,

K469 jelentése K, R vagy Orn,

R470 jelentése R, K vagy Orn,

L472 jelentése L vagy I, V, M, F, Nle vagy Nva,

K473 jelentése K, R vagy Orn, és

I474 jelentése I vagy L, V, M, F, Nle vagy Nva.

3. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy az antigén egy peptid, fehérje vagy poliszacharid.

4. A 3. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a peptid HIV-vírusból vagy maláriaantigénből származik.

5. A 3. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a poliszacharid egy bakteriális poliszacharid.

6. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a Pep278h szintetikus peptidhordozó a

458 474
N E D Q K I G I E I I K R T L K I

szekvenciájú humán hsp65 molekula 458–474 helyének felel meg.

7. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a Pep278m szintetikus peptidhordozó a humán hsp65 molekula 458–474 helyének felel meg, amelyben a T471 maradékot A471 maradék helyettesíti.

8. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a Pep278m szintetikus peptidhordozó a következő szekvenciájú:

E G D E A T G A N I V K V A L E A.

9. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a Pep II szintetikus peptidhordozó a humán hsp65 molekula 437–448 helyének felel meg, amelyben a 442 és 447 helyen két ciszteinmaradékot szerinmaradékok helyettesítik, és a szekvencia a következő:

437 448
V L G G G S A L L R S I.

10. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a szintetikus peptidhordozó vagy analógja közvetlenül kapcsolódik, kovalens kötással az antigénmolekulához.

11. A 10. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy az antigénmolekula egy bakteriális poliszacharid.

12. A 11. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a bakteriális poliszacharid a Salmonella typhi Vi burokpoliszacharidja (CPS).

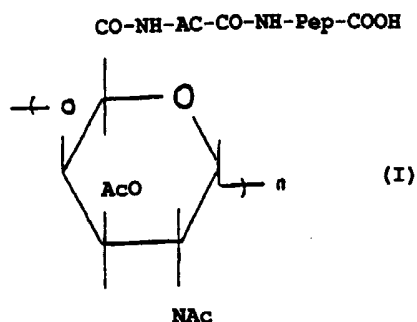
13. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a szintetikus peptidhordozó vagy analógja kovalensen kötődik egy immunogén antigénmolekulához térfogatként $-O-R-CO-$, $-NH-R-CO-$, $-NH-R-NH-$, $-O-R-NH-$ vagy $-NH-R-CH_2$ közbeiktatásával, ahol

R jelentése adott esetben helyettesített és/vagy egy vagy több aromás csoporttal vagy heteroatomokkal – amilyen a N, O vagy S – megszakított telített vagy telítetlen szénhidrogéncsoport.

14. A 13. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy R jelentése 3–16 szénatomos alifás szénhidrogéncsoport.

15. A 14. igénypont szerinti konjugátum, amelyben R jelentése ϵ -amino-kapronsav-maradék.

16. A 15. igénypont szerinti



általános képletű konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy Ac jelentése acetylcsoporthoz, AC jelentése ϵ -amino-kapronsav maradék, Pep a Pep278h peptidhordozó vagy Pep II hordozó maradéka és a szacharidmaradék a Salmonella typhi Vi burokpoliszacharidja (CPS) ismétlődő egysége.

17. Vakcina, *azzal jellemezve*, hogy az 1., 10. vagy 13. igénypontok bármelyike szerinti konjugátumot tartalmazza.

18. A 17. igénypont szerinti vakcina, *azzal jellemezve*, hogy hatásfokozót tartalmaz.

19. Eljárás egy antigénmolekula immunogenitásának fokozására, *azzal jellemezve*, hogy azt hozzákötjük egy-egy szintetikus peptidhordozóhoz, amely a hsp65 T-sejt epitópja, és szintetikus peptidhordozóként a következő peptidek valamelyikét alkalmazzuk:

- (a) NEDQKIGIEIIRTLKI (Pep278h),
- (b) NEDQKIGIEIIRALKI (Pep278m),

(c) EGDEATGANIVKVALEA (Pep278mt),

(d) VLGGGSALLRSI (PepII), és

(e) a Pep278h analógja:

458

474

5 NEDQKIGIEIIRTLKI,

amely rendelkezik a humán hps65 458–474 szakasza elektromos és hidrofób/hidrofil jellemzői legalább 70%-ával.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szintetikus peptidként a Pep278h analógját alkalmazzuk, ahol

E459 jelentése E vagy D,

D460 jelentése D vagy E,

K462 jelentése K, R vagy Orn (ornitin),

15 I463 jelentése I vagy L, V, M, F, Nle (norleucin) vagy NVa (norvalin),

I465 jelentése I vagy L, V, M, F, Nle vagy Nva,

E466 jelentése E vagy D,

I467 jelentése I vagy L, V, M, F, Nle vagy Nva,

20 I468 jelentése I vagy L, V, M, F, Nle vagy NVa,

K469 jelentése K, R vagy Orn,

R470 jelentése R, K vagy Orn,

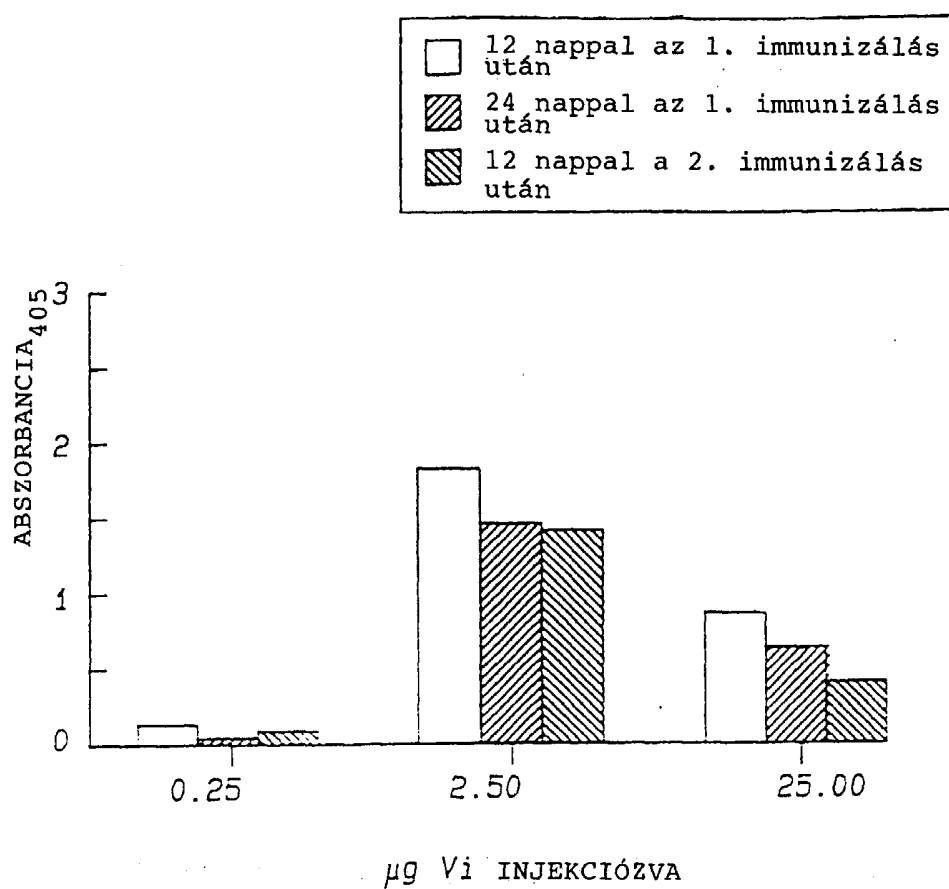
L472 jelentése L vagy I, V, M, F, Nle vagy Nva,

K473 jelentése K, R vagy Orn, és

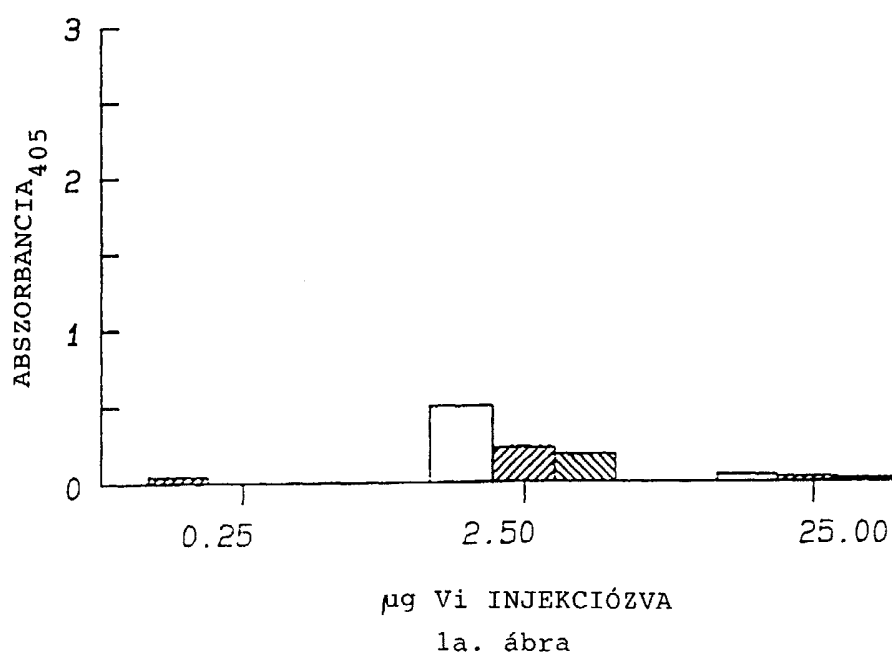
25 I474 jelentése I vagy L, V, M, F, Nle vagy Nva.

21. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antigénmolekulaként egy peptidet, fehérjét vagy poliszacharidot alkalmazzunk.

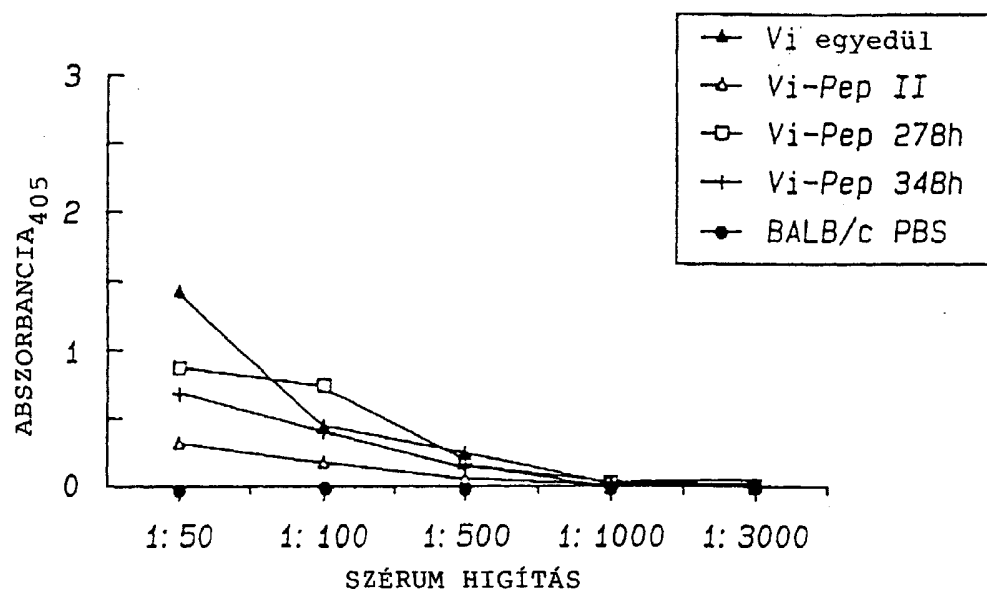
22. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy antigénmolekulaként egy bakteriális poliszacharidot alkalmazzunk.



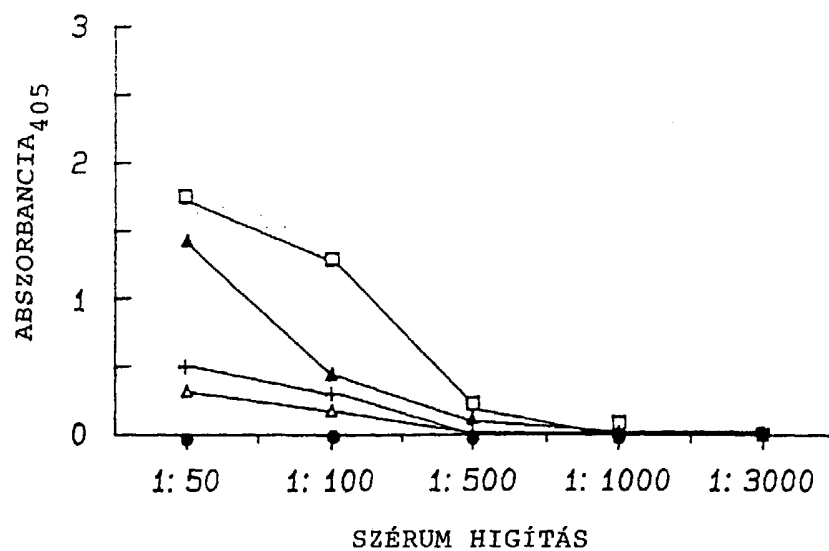
1. ábra



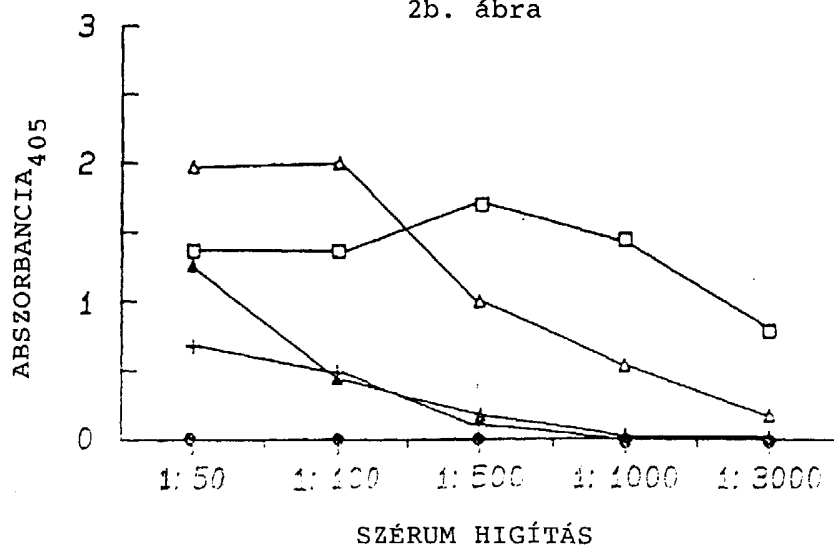
1a. ábra



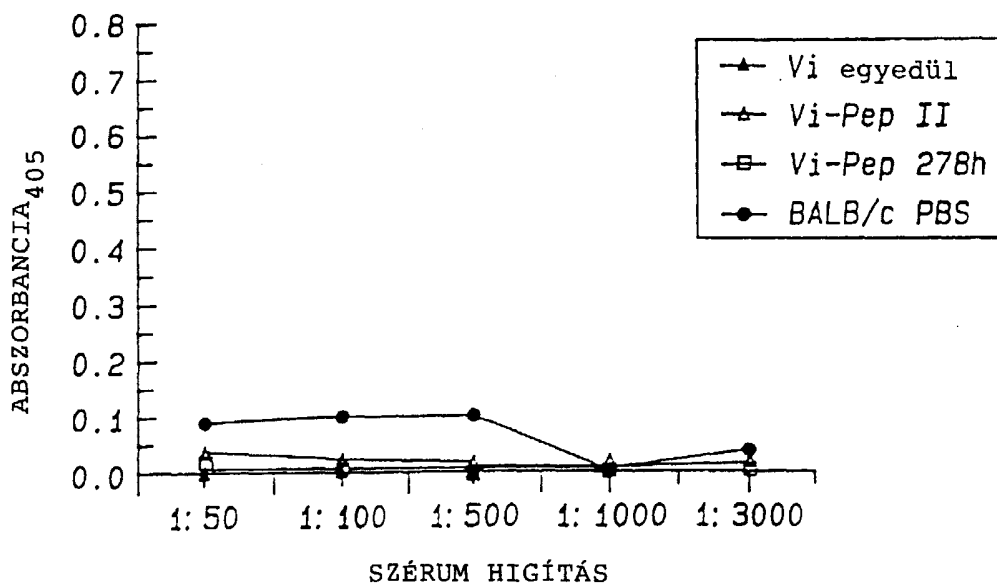
2a. ábra



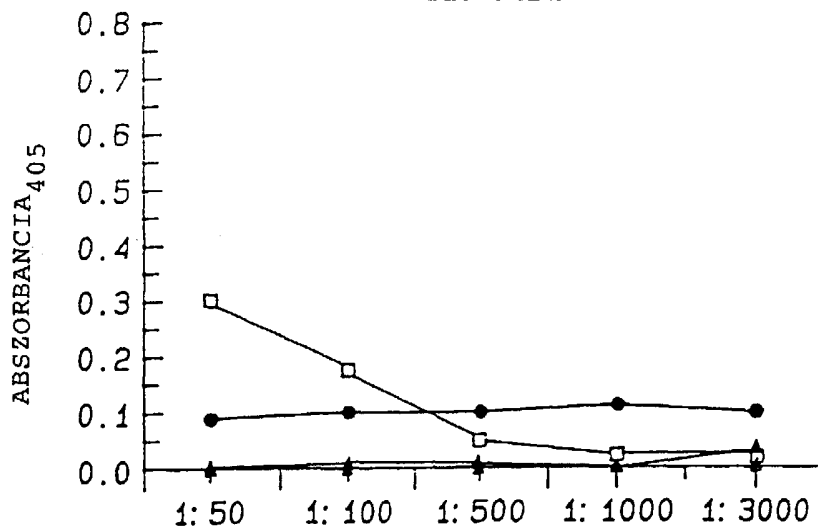
2b. ábra



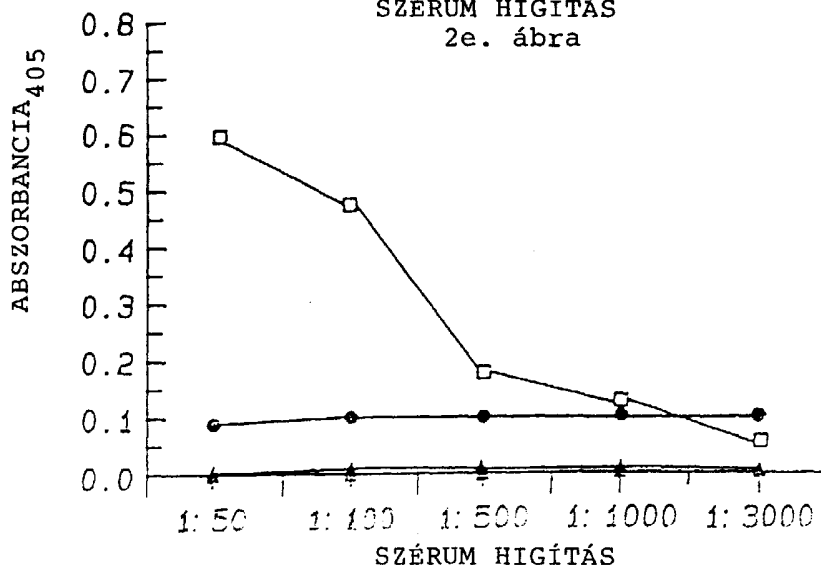
2c. ábra



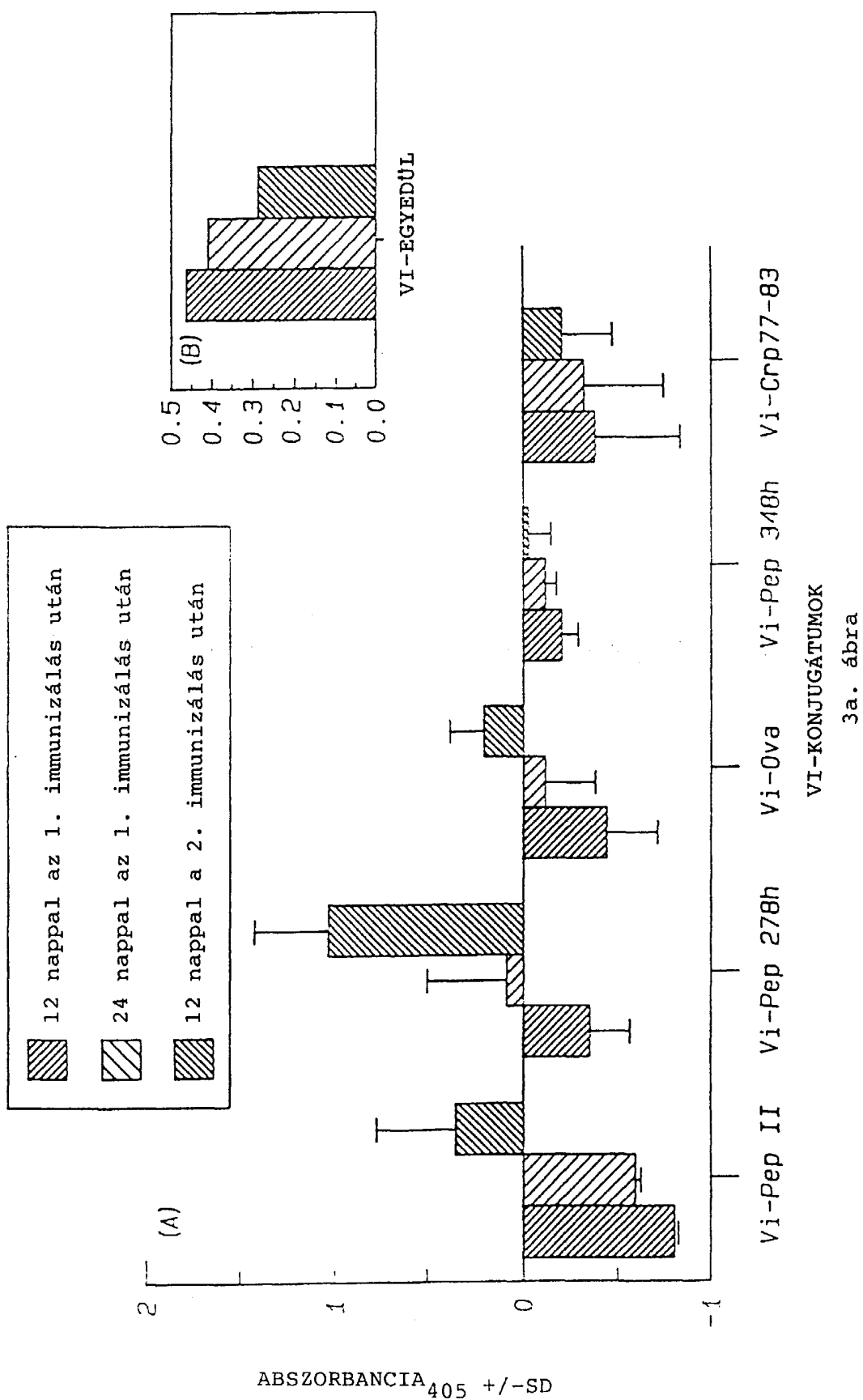
2d. ábra

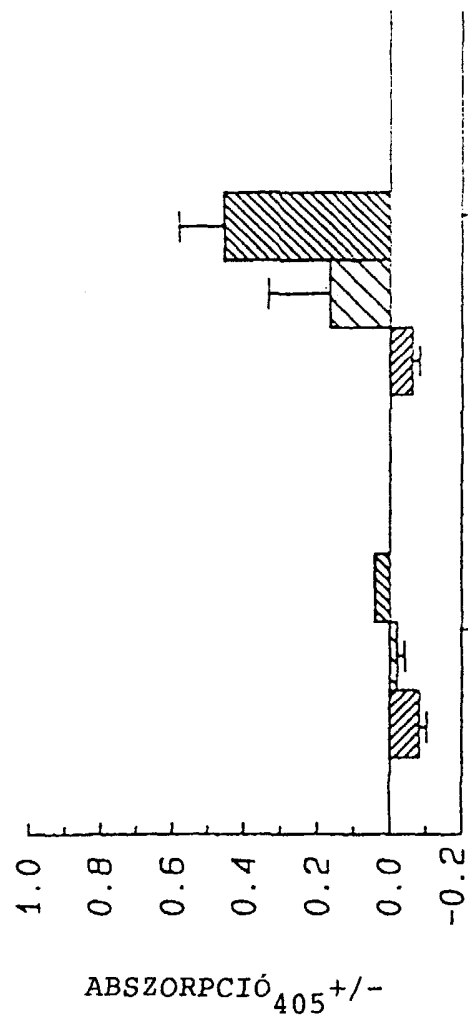
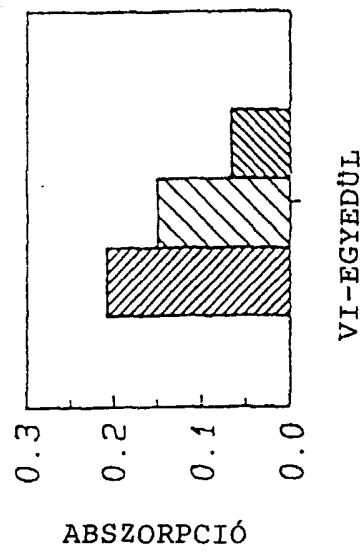
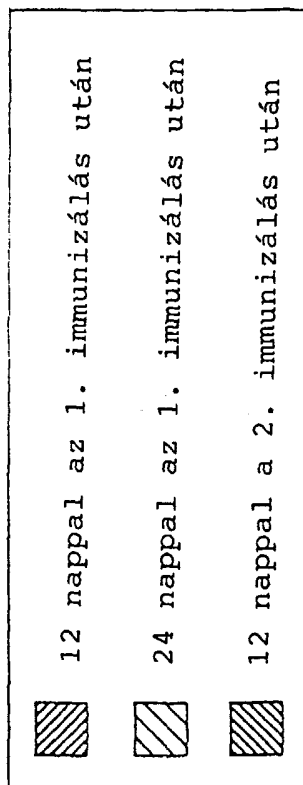


SZÉRUM HIGÍTÁS
2e. ábra

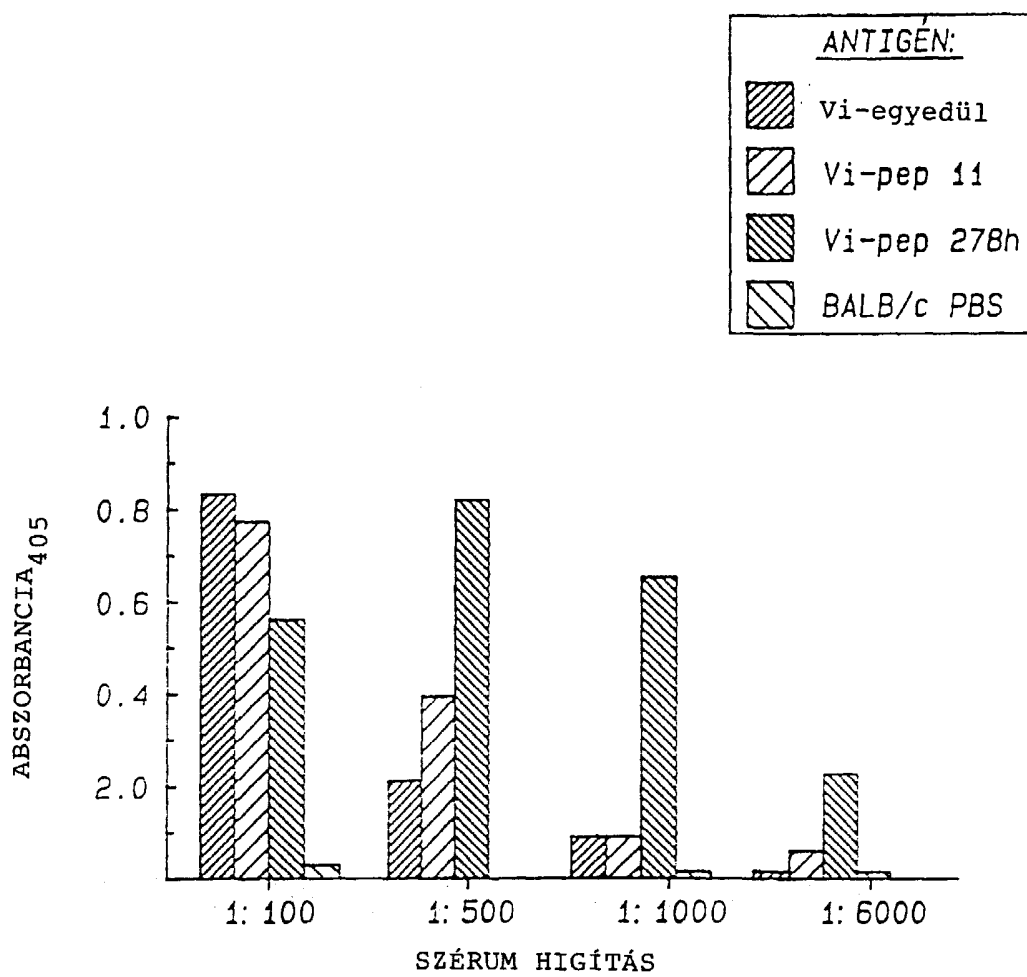


SZÉRUM HIGÍTÁS
2f. ábra

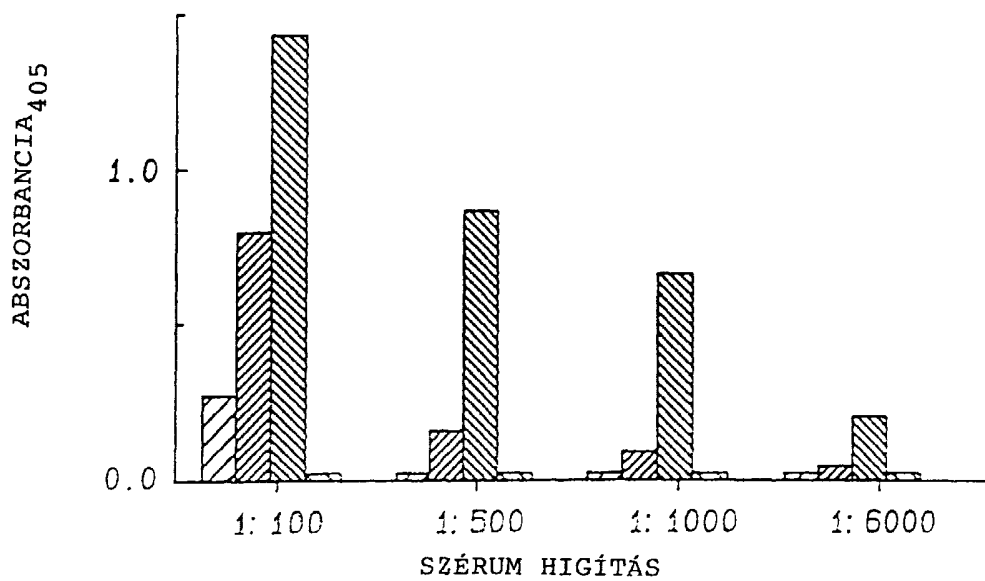




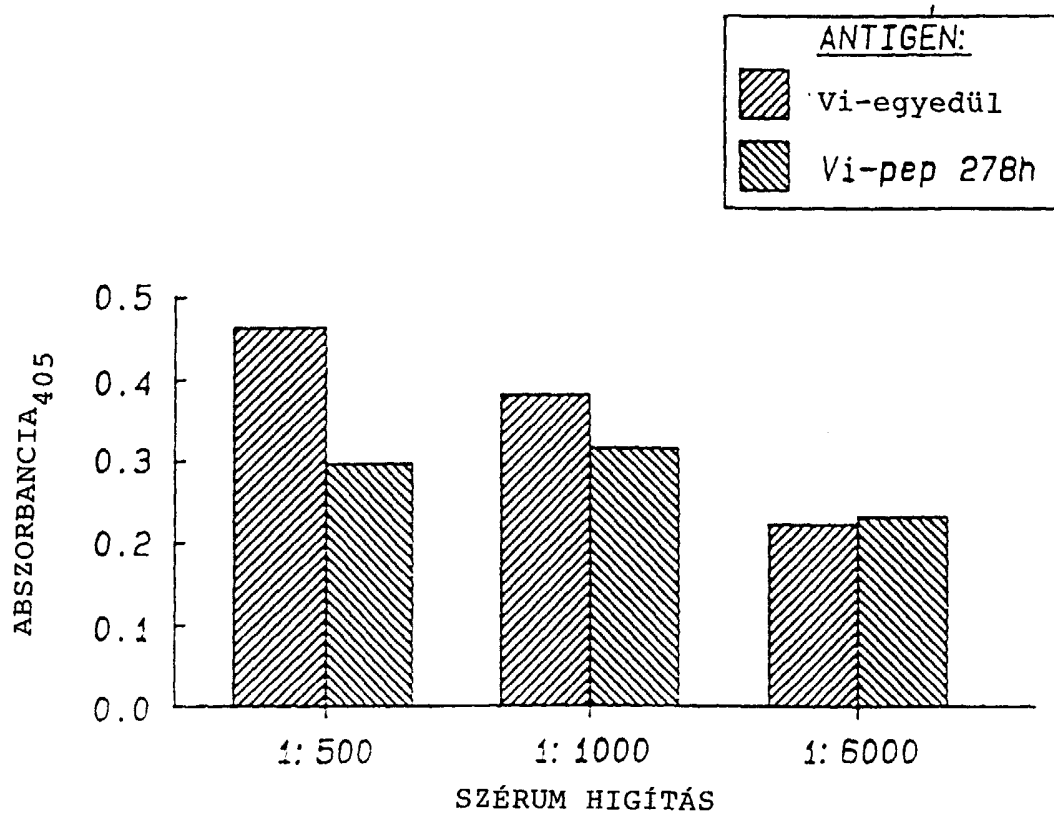
3b. ábra



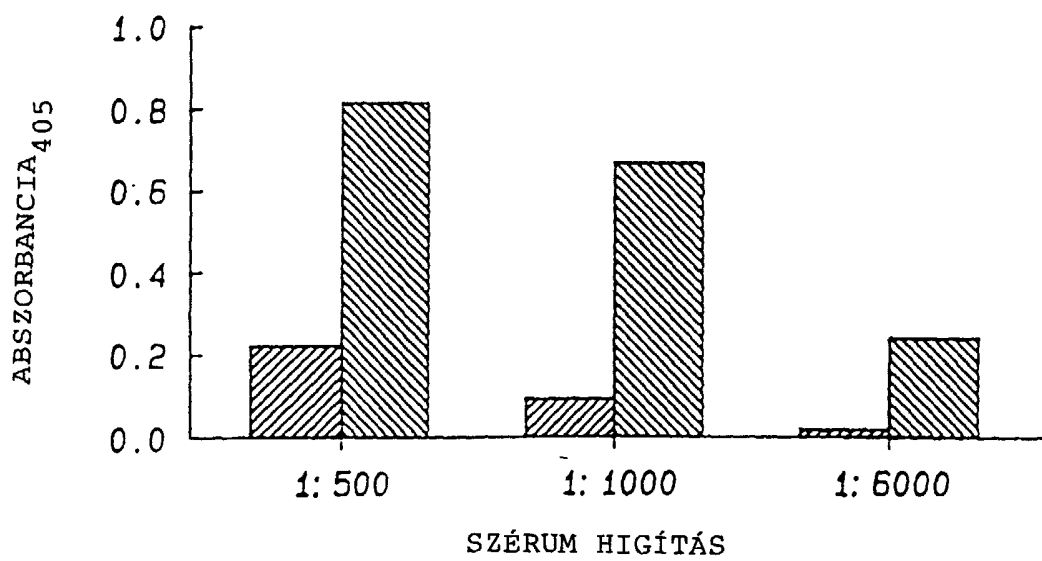
4a. ábra



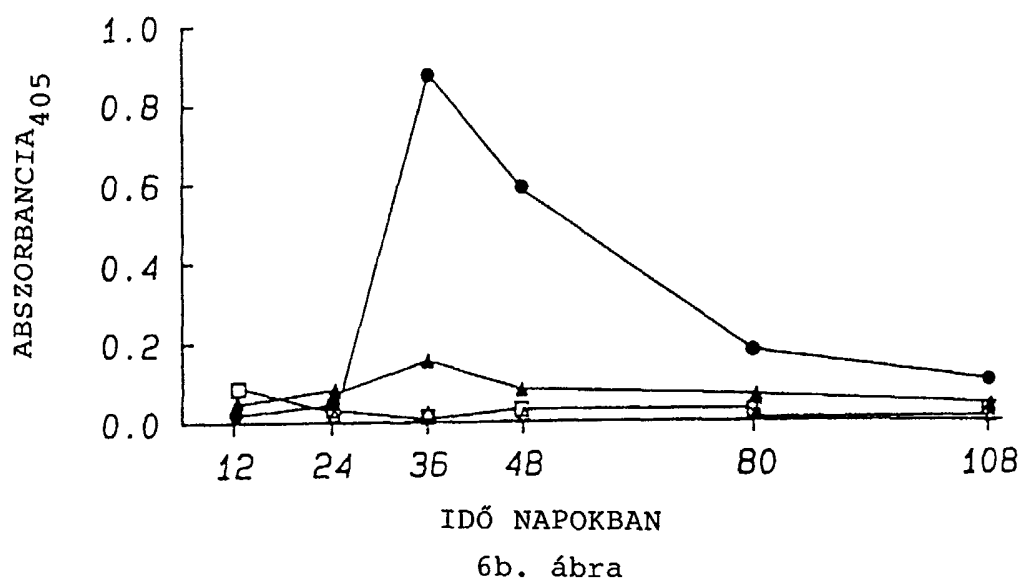
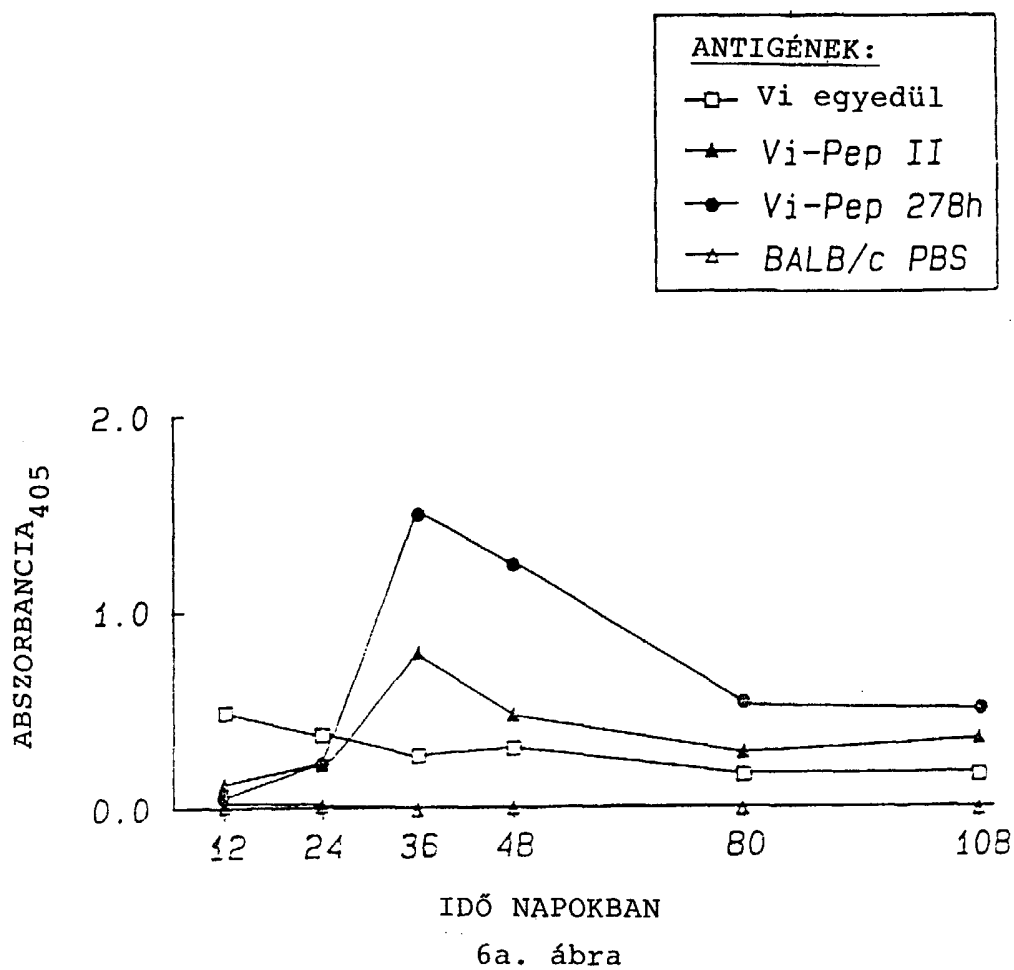
4b. ábra

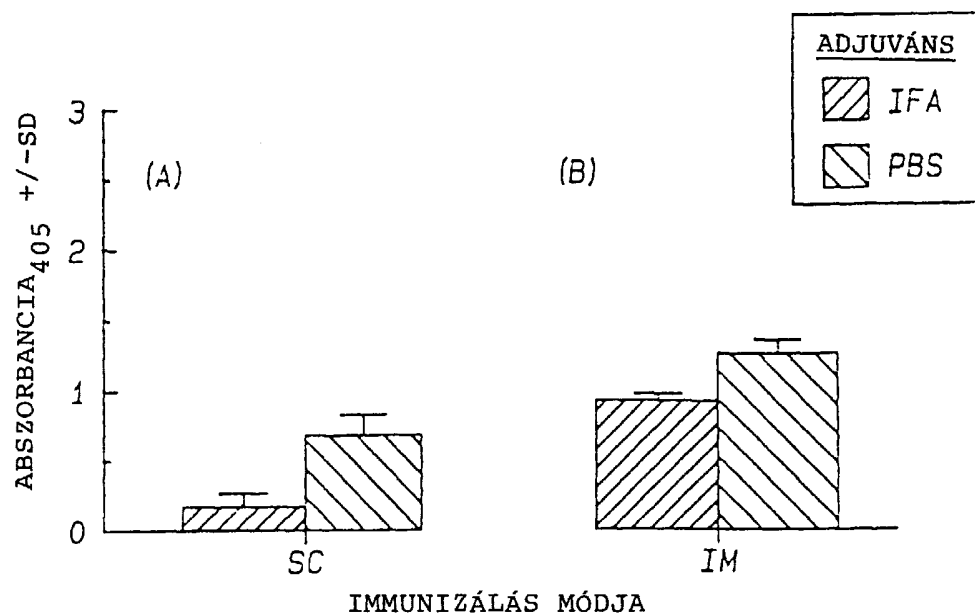


5a. ábra

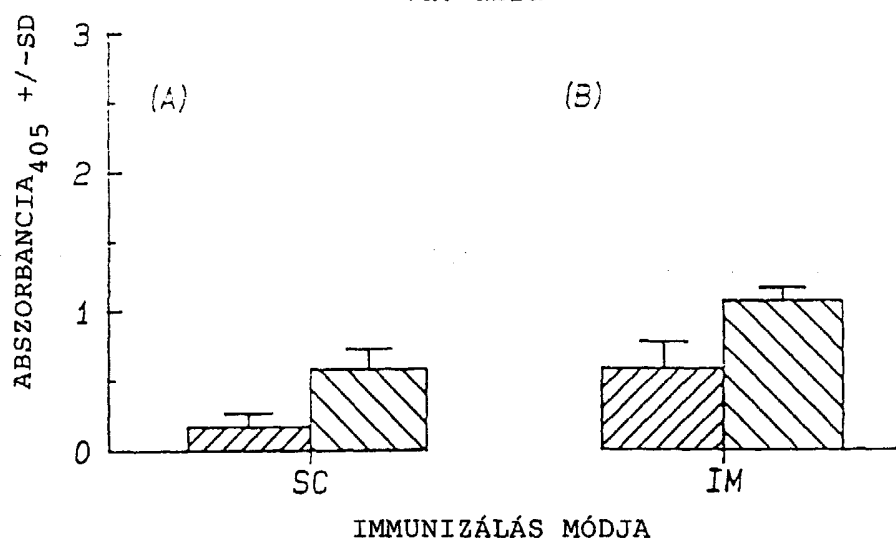


5b. ábra

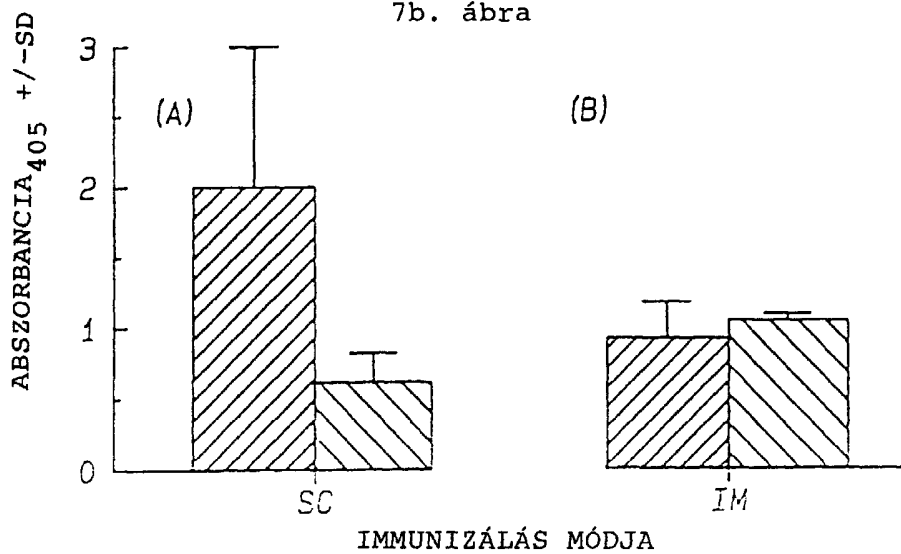




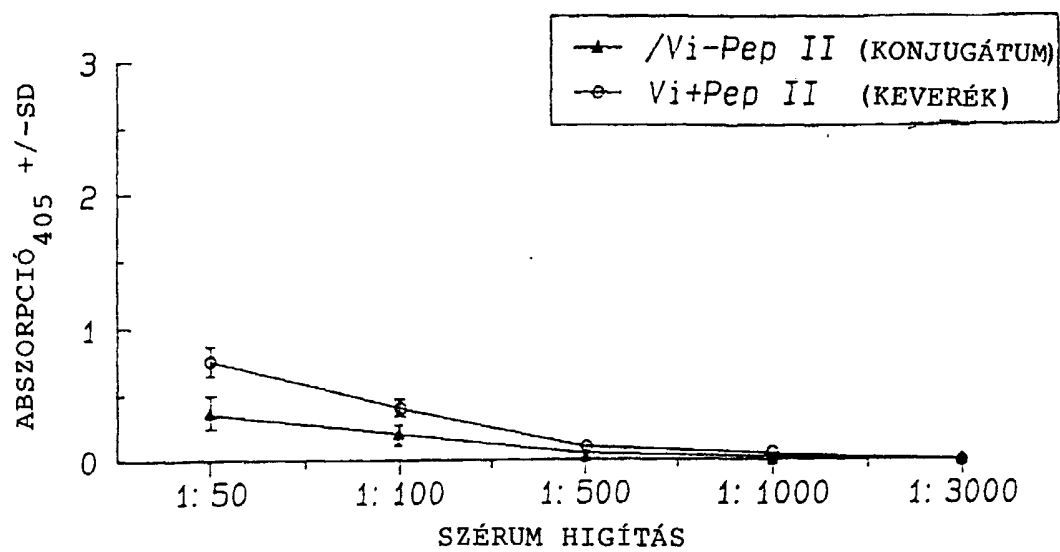
7a. ábra



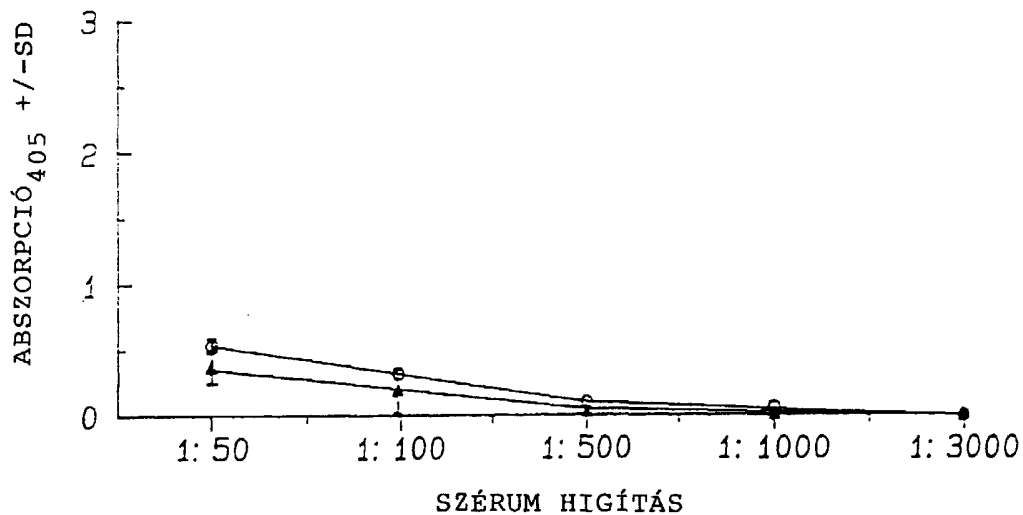
7b. ábra



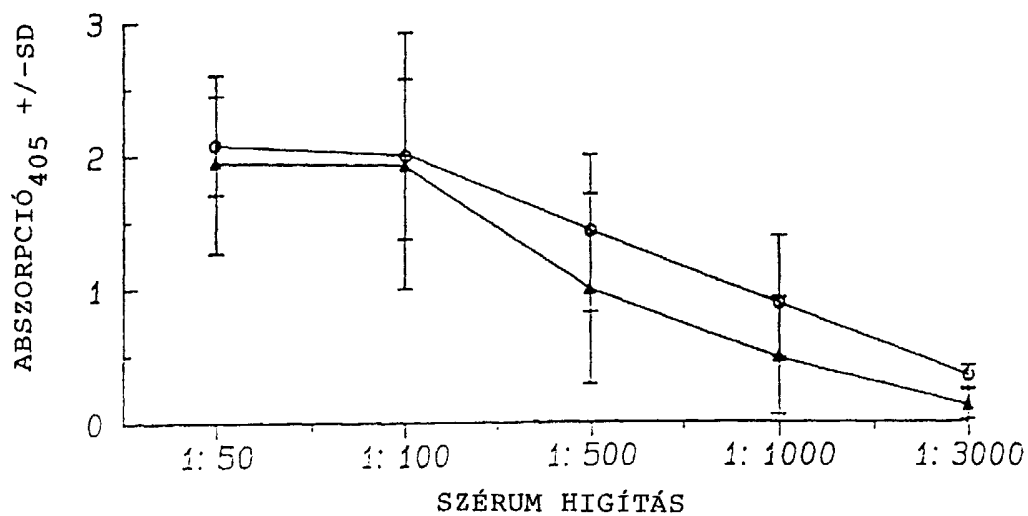
7c. ábra



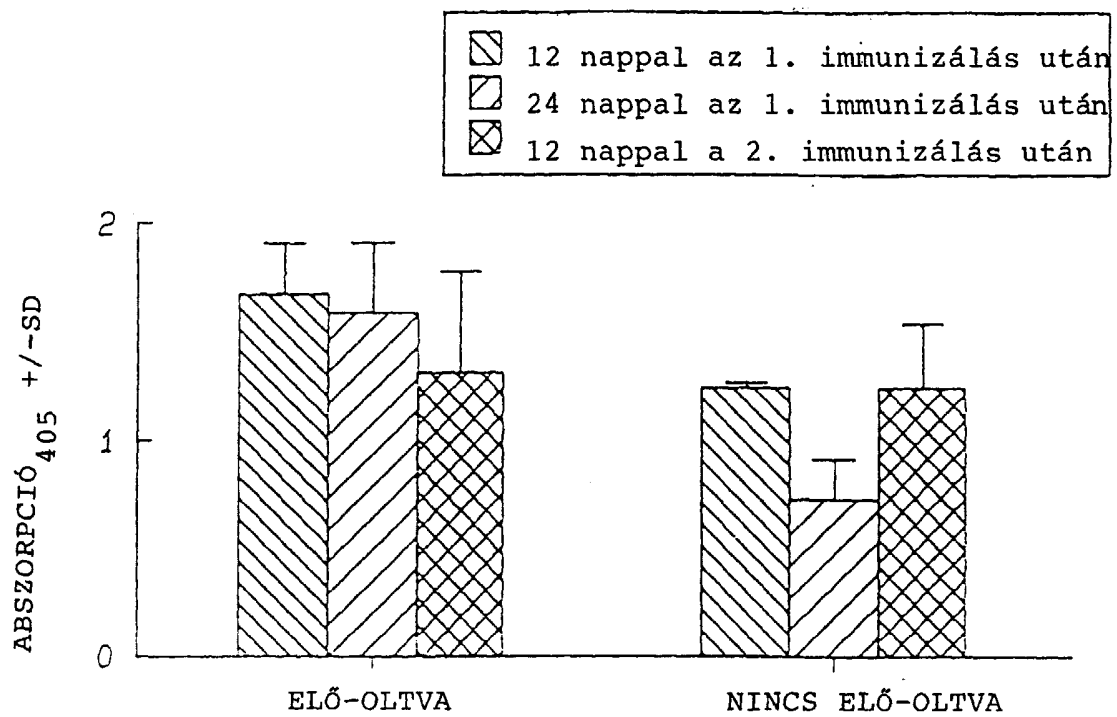
8a. ábra



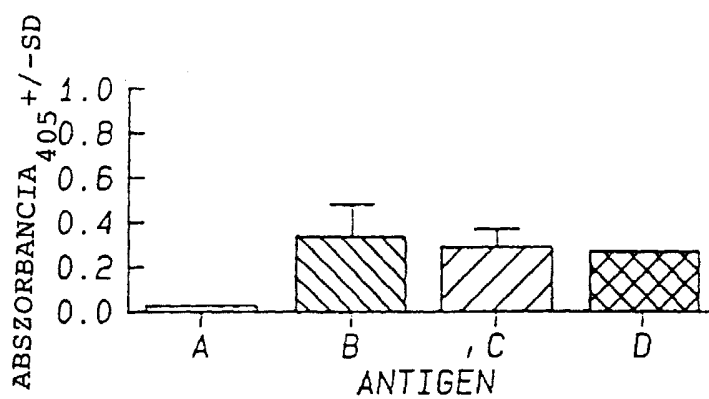
8b. ábra



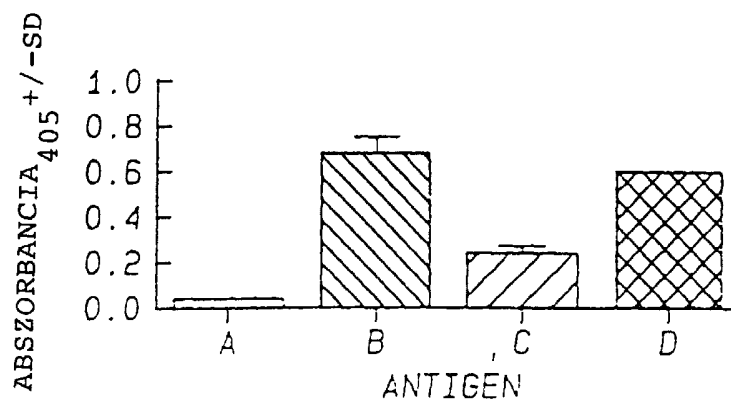
8c. ábra



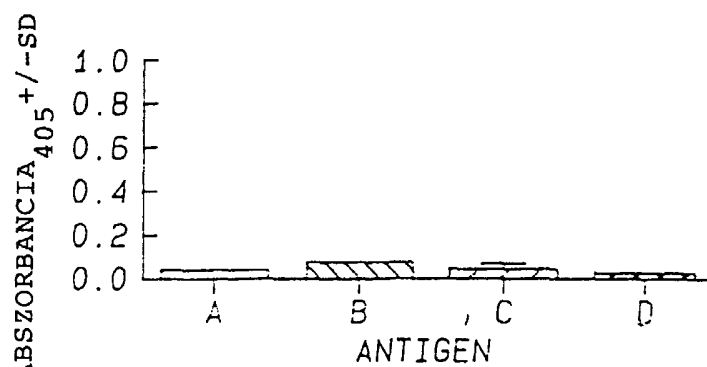
9. ábra



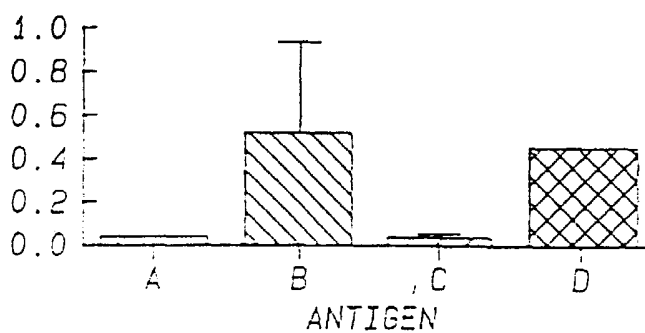
10a. ábra



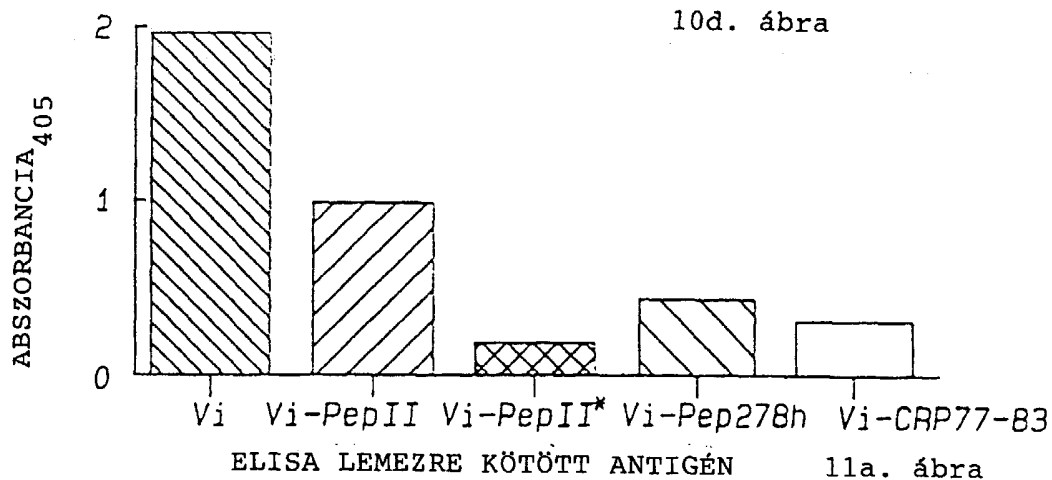
10b. ábra



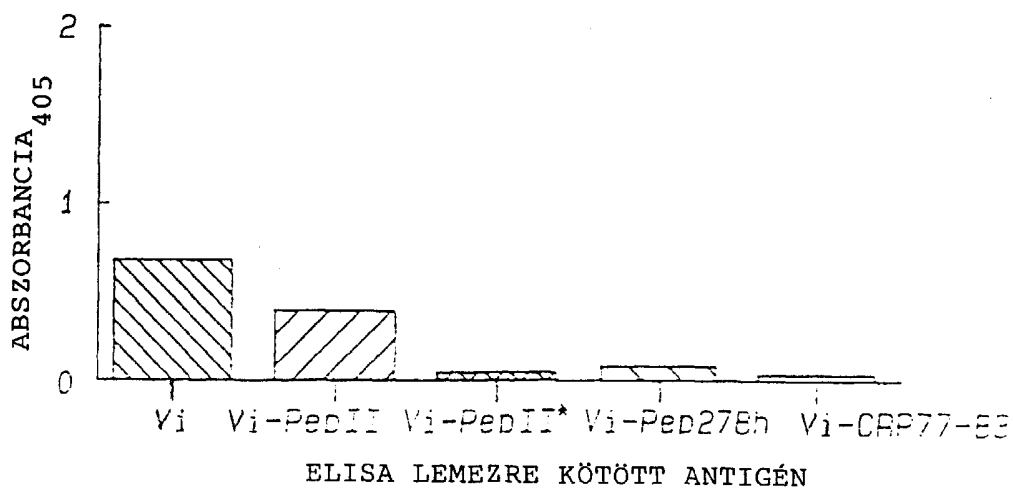
10c. ábra



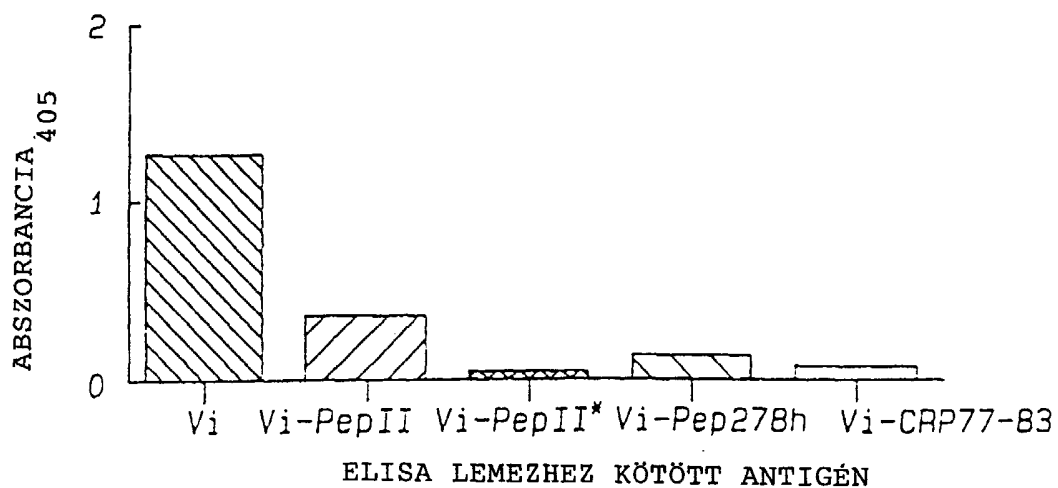
10d. ábra



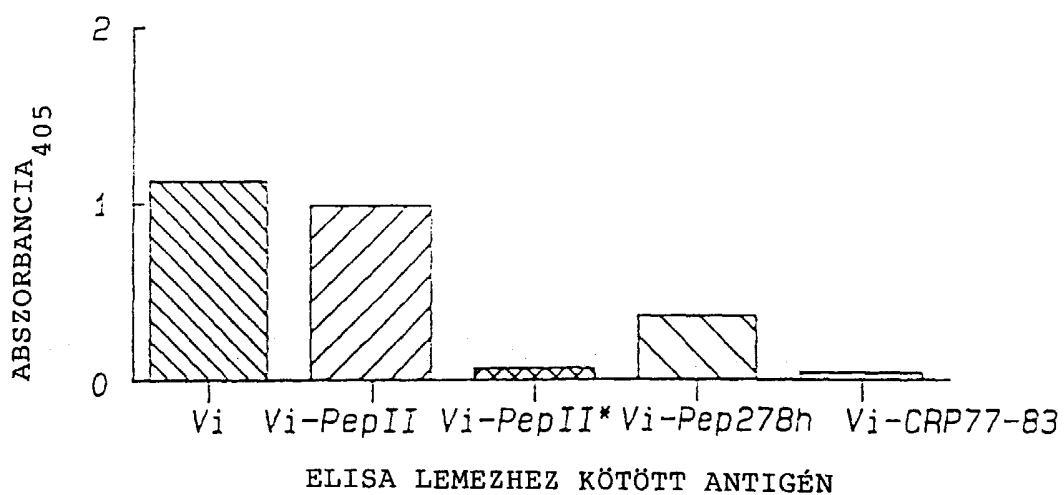
11a. ábra



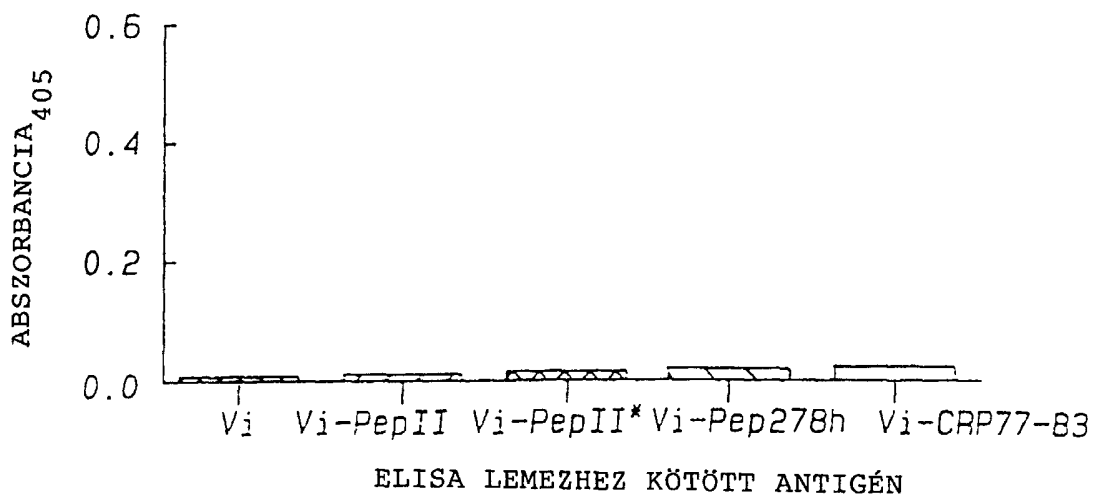
11b. ábra



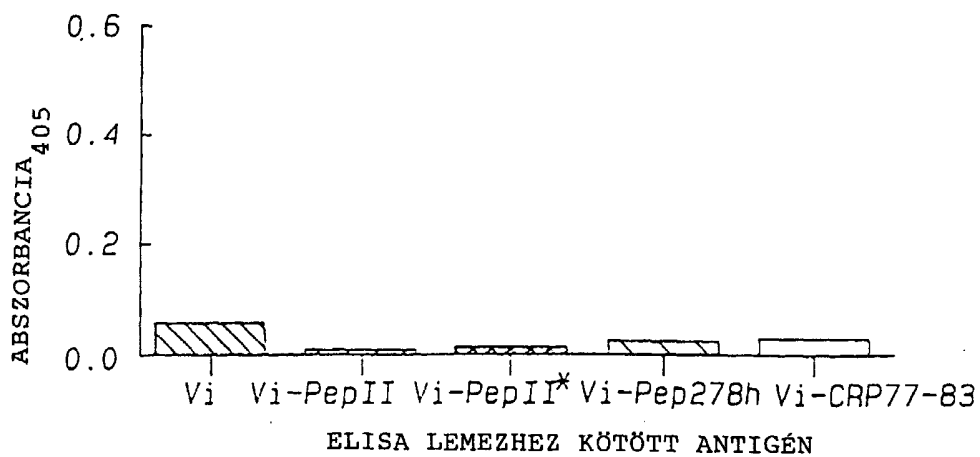
11c. ábra



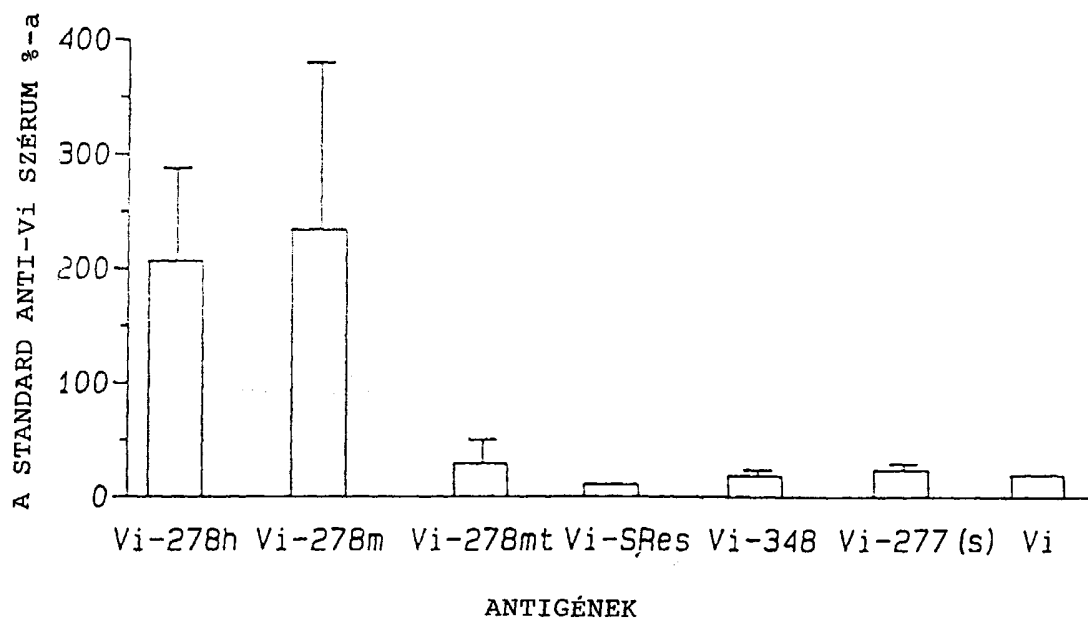
11d. ábra



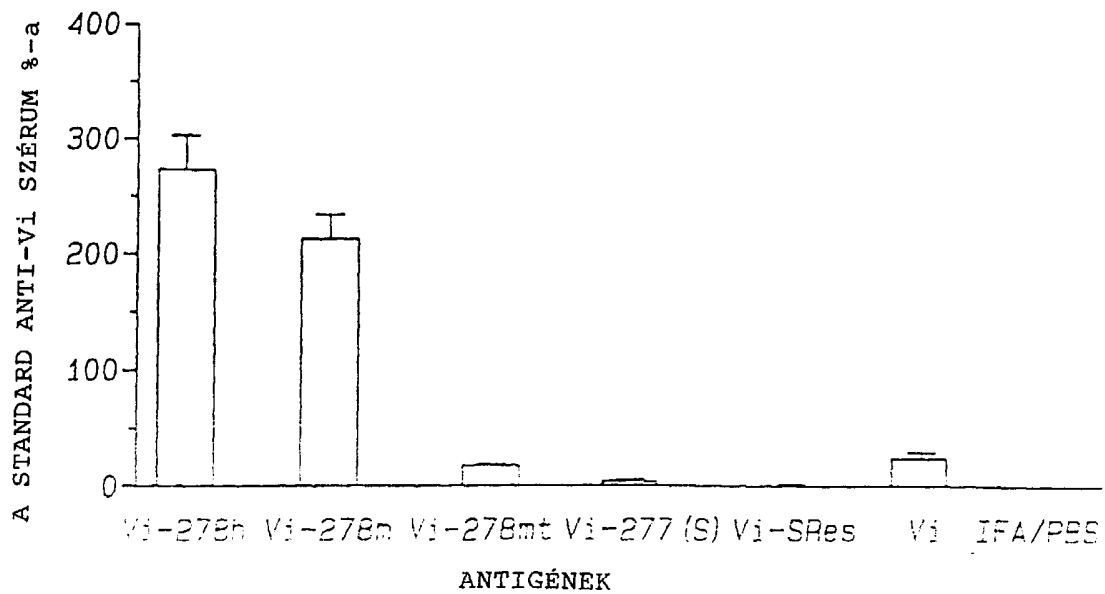
11e. ábra



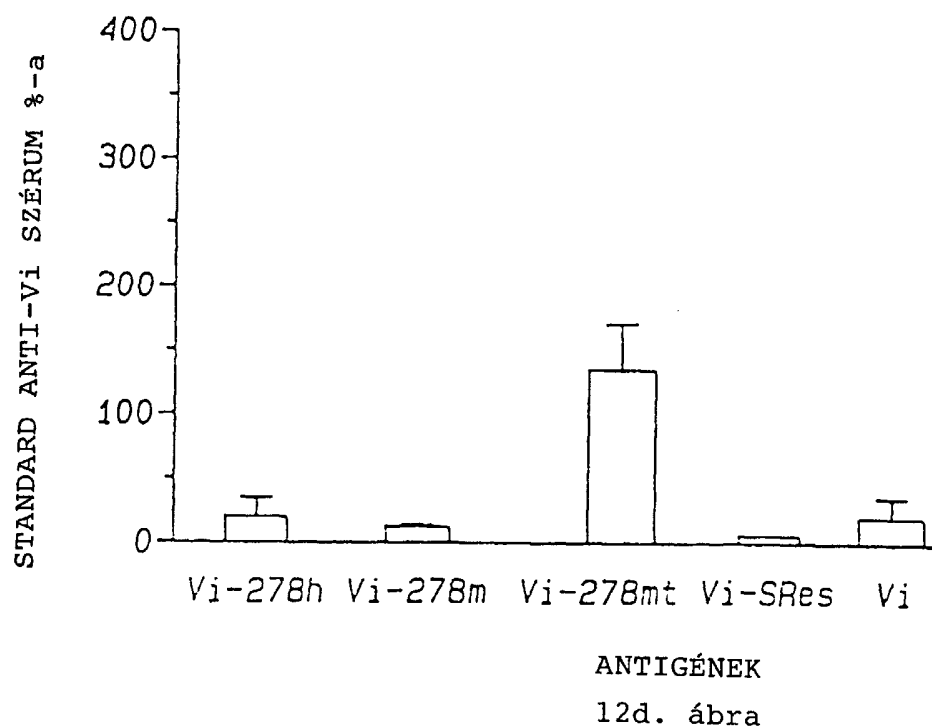
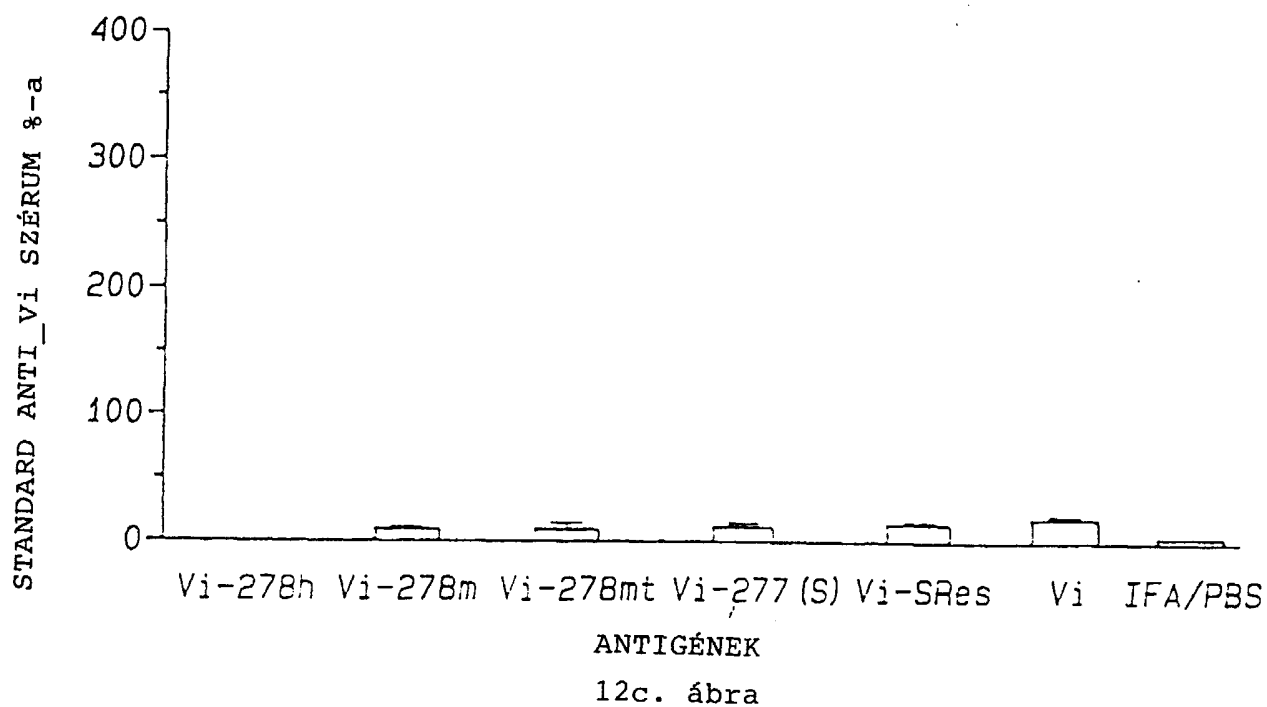
11f. ábra

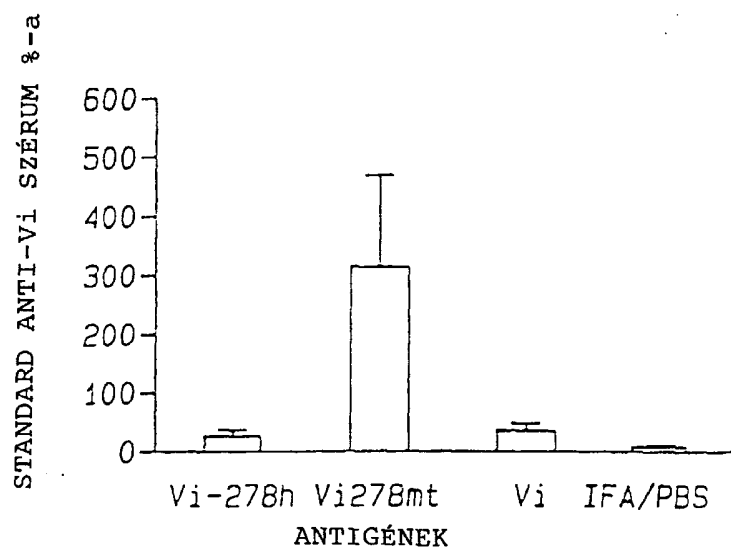


12a. ábra

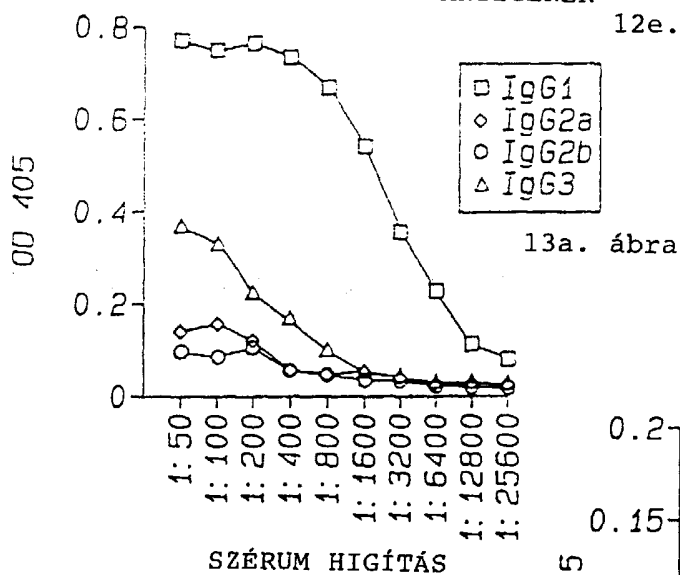


12b. ábra

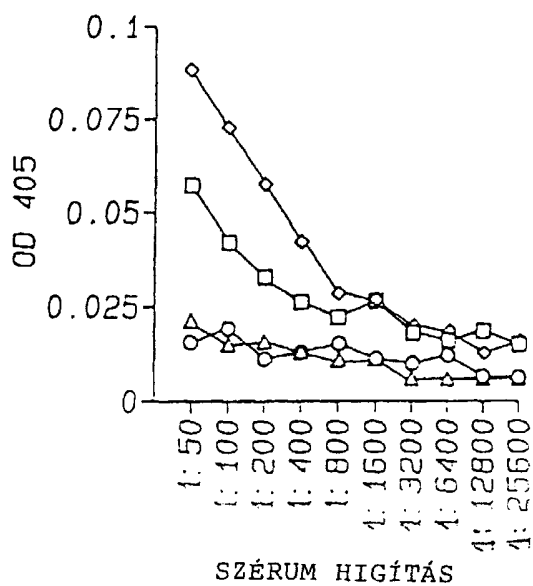




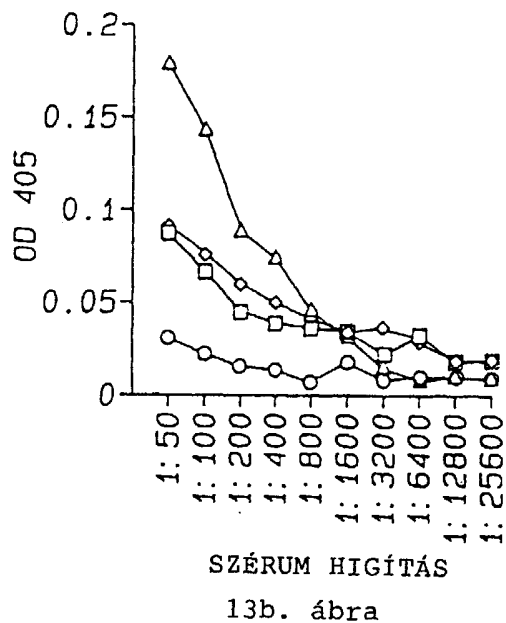
12e. ábra



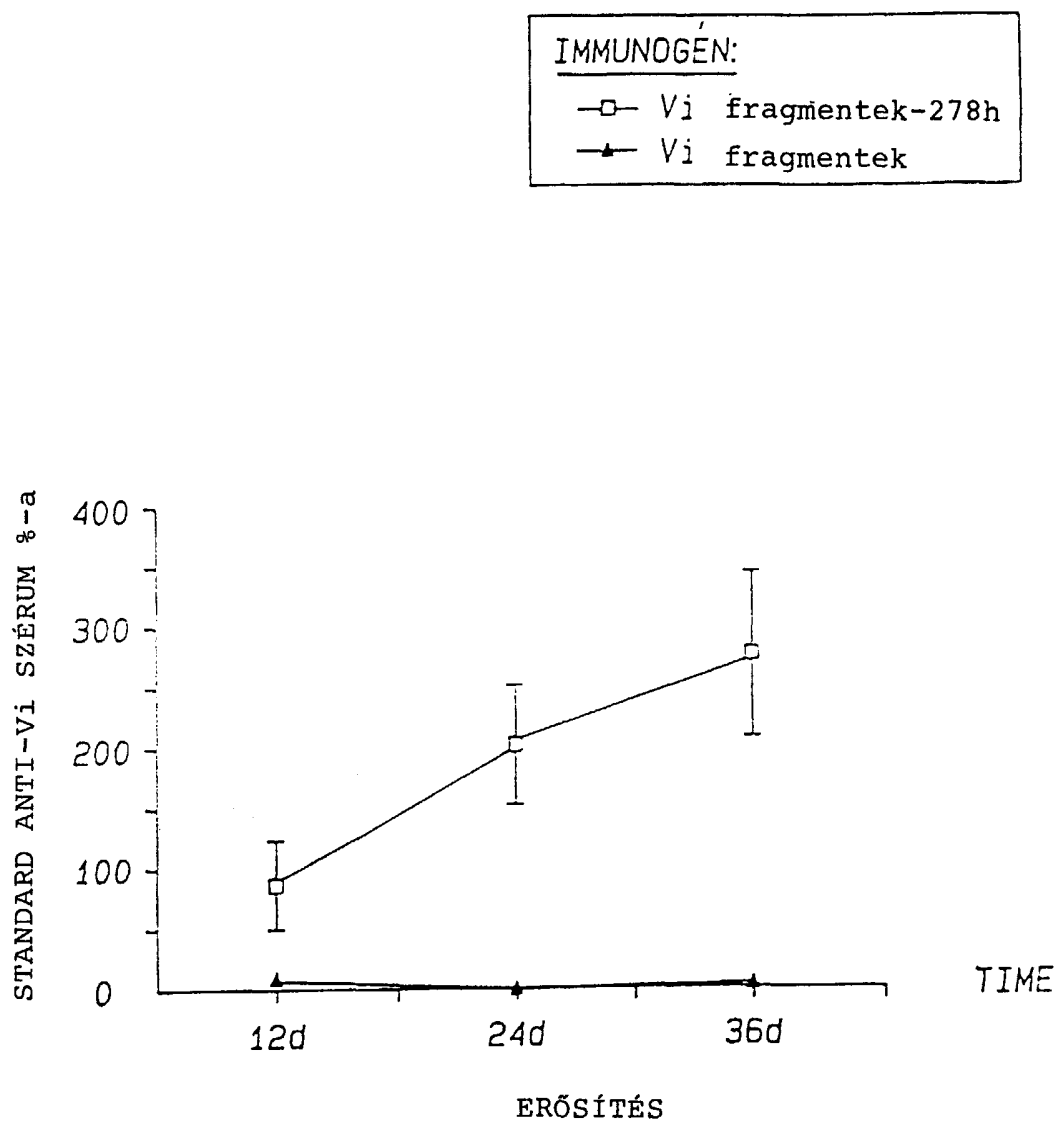
13a. ábra



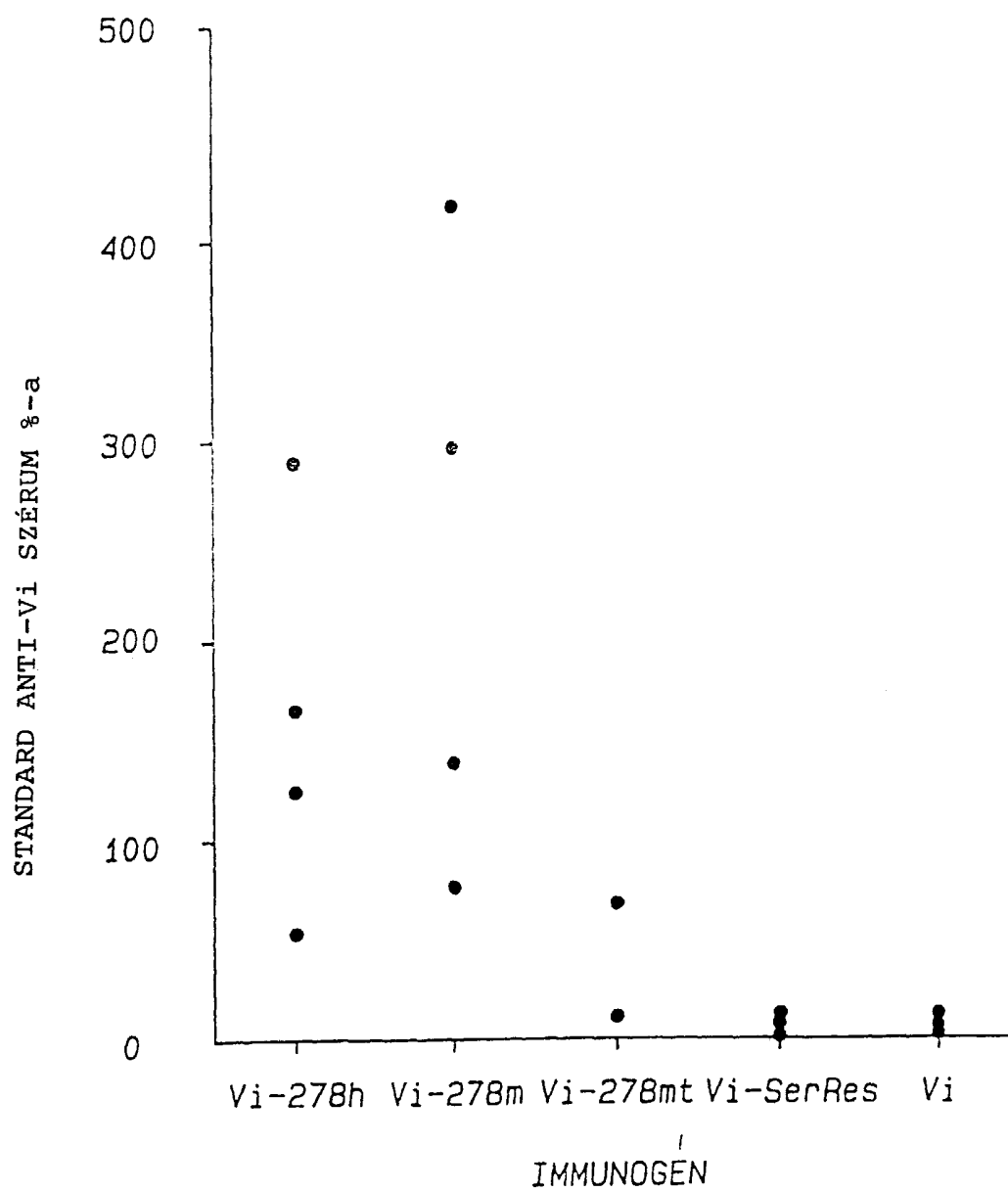
13c. ábra



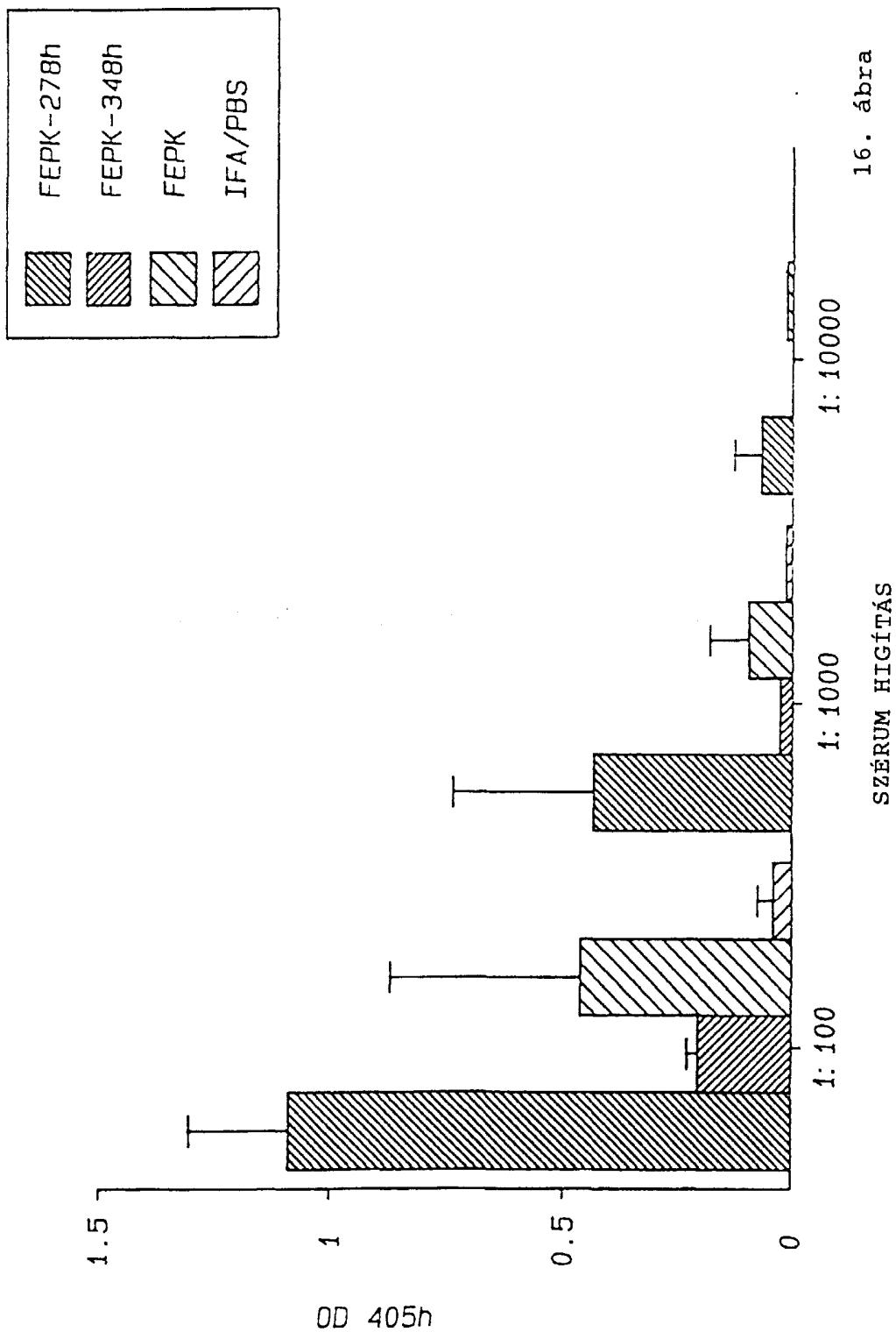
13b. ábra



14. ábra



15. ábra



16. ábra