(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

216 101 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 92 00252
(22) A bejelentés napja: 1992. 01. 27.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/807,942 1991. 12. 19. US
07/646,570 1991. 01. 28. US

(51) Int. Cl.[6]

A 61 K 39/02
A 61 K 39/095
C 07 K 17/10
A 61 K 39/385
A 61 K 39/09
A 61 K 39/295

(40) A közzététel napja: 1995. 09. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 1999. 04. 28.

(72) Feltalálók:
Burke, Pamela D., Rahway, New Jersey (US)
Hagopian, Arpi, Rahway, New Jersey (US)
jr. Henessy, John P., Rahway, New Jersey (US)
Ip, Charlotte C., Rahway, New Jersey (US)
Kniskern, Peter J., Rahway, New Jersey (US)
Kubek, Dennis J., Rahway, New Jersey (US)
Miller, William J., Rahway, New Jersey (US)

(73) Szabadalmas:
Merck and Co. Inc., Rahway, New Jersey (US)

(74) Képviselő:
DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) Eljárás pneumococcus poliszacharid konjugátumok és ezeket tartalmazó vakcinakészítmények előállítására

KIVONAT

A találmány új, pneumococcus poliszacharid konjugátum vakcinakészítmények előállítására vonatkozik, amely vakcinák részlegesen hidrolizált, nagy tisztaságú, Streptococcus pneumoniae organizmusból származó kapszuláris poliszacharidból (Pn-Ps) és ehhez kovalens kötéssel kapcsolódó immunogén proteinből állnak, és a konjugátum poliszacharid tagjának fontosabb jellemzői a következők: átlagosan kevesebb, mint 1200 ismétlődő egységet tartalmaz molekulánként, a molekulatömege 1×10^5 és 1×10^6 közötti érték, a polidiszperzitás 1 és 1,4 közötti érték, és a pneumococcus fajtaspecifikus C-poliszachariddal való szennyezettség mértéke 3% alatti érték.

Az új pneumococcus poliszacharid konjugátum vakcinák alkalmasak különböző pneumococcus fertőzések kezelésére.

HU 216 101 B

A találmány pneumococcus poliszacharid konjugátumok és ezeket tartalmazó vakcinakészítmények előállítási eljárására vonatkozik.

A Streptococcus pneumoniae (Pneumococcus, Pn) patogén baktériumot 84 antigén szerotípus alcsoportba osztották az organizmus kapszuláris poliszacharidja (Pn-Ps) alapján. Ezen organizmusok által kiváltott betegségek közé tartoznak például a következők: tüdőgyulladás, agyhártyagyulladás, középfülgyulladás, baktériumvérűség és a krónikus bronchitis akut formája, továbbá melléküreg-gyulladás, ízületi gyulladás és kötőhártya-gyulladás. Ezen betegségek túlnyomó részét azonban a 84 ismert izolátum egy korlátozott csoportja váltja ki. Ily módon az organizmus leggyakrabban előforduló és patogén izolátumaiból származó Pn-Ps-t tartalmazó polivalens vakcinák védelmet nyújthatnak a csoporthoz tartozó legismertebb patogének nagy százalékával szemben.

A polivalens vakcinák hatásosan alkalmazhatók pneumococcus fertőzött felnőtteknél a védő immunválasz fokozására. A „PNEUMOVAX 23" (pneumococcus polivalens vakcina, MSD, lásd PDR 1990-es kiadás, 1431. oldal) például egy folyékony készítmény, amely 50–50 μg/ml mennyiségben tartalmaz 23 különböző, nem konjugált pneumococcus poliszacharidot, amelyek mindegyike az ATCC-nél deponálva van, és ily módon kiindulási anyagként alkalmazható a jelen találmány szerinti megoldásnál. A PNEUMOVAX 23 a következő szabad, azaz nem konjugált poliszacharidokat tartalmazza: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F és 33F, amelyek a pneumococcus vérizolátumok körülbelül 95%-át alkotják. Azonban ezek a vakcinák kevésbé hatásosak a pneumococcus fertőzések által veszélyeztetett bizonyos népességi csoportoknál: B-sejt immunoegyezéses egyedek, idősebb személyek és 2 évnél fiatalabb gyermekek, akiknél T-sejtválasz függőség áll fenn. Mivel a nem konjugált poliszacharidok kismértékben képesek T-sejt immunválaszt kiváltani, az tűnik a megoldásnak, hogy ezen veszélyeztetett egyedek esetében megfelelő védelmet lehessen kialakítani, hogy a Pn-Ps-t T-sejtválaszt kiváltani képes immunogénekké alakítjuk. Ezek alkalmazása azonban nem korlátozódik a népesség ezen említett csoportjaira. Így például, ha a vakcinákat, amelyek egy vagy több konjugátumot tartalmaznak, nőnemű emlősöknek adagoljuk a terhességet megelőzően vagy a terhesség ideje alatt, az anyában antitestek alakulnak ki, amelyek passzívan védeni képesek a kifejlődő magzatot vagy a csecsemőt akkor is, ha a vakcinákat nem közvetlenül a magzatnak vagy a gyermeknek adagoltuk. Az ilyen konjugátum vakcinák bizonyíthatóan szintén hasznosak bizonyos veszélyeztetett populációk végső, passzív védelmére, így például újszülötteknél vagy fertőzött egyedek utódainál.

Kimutatták azon poliszacharidokról, amelyek önmagukban gyenge immunogenitást mutatnak, hogy azok igen jó immunogénekké válnak, ha valamely immunogén proteinhez, így például PRO-hoz kapcsolják őket [Marburg és munkatársai, 4 695 624 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Schneerson és munkatársai, New Dev. with Hum. & Vet. Vaccines, 77–94 (1980); Schneerson és munkatársai, J. Exptl. Med., *152*, 361 (1980); Anderson, Infection and Immunity, *39*, 233 (1983)].

Ezen konjugátumok előállításánál azonban a fő probléma a poliszacharid kiindulási anyag viszkózussága és nem homogén természete, és ily módon a konjugátumok kémiai meghatározása nehézségekbe ütközik. Ily módon szükség van olyan eljárásra, amelynél a kiindulási anyagok, valamint az előállítási eljárás egyes lépései a lehető legjobban definiálhatók, és a kapott intermedierek vizsgálhatók. A jelen találmány szerinti eljárás kielégíti ezeket a követelményeket oly módon, hogy nagy immunogenitású konjugátumokat biztosít, amelyek immunogén hatásúak azon patogénekkel szemben, amelyekből a Pn-Ps származik. Ezen konjugátumok alkalmasak 2 évnél fiatalabb gyermekeknél való alkalmazásra is.

Marburg és munkatársai [J. Am. Chem. Soc., *108*, 5282 (1986) és 4 695 624, 4 830 852, 4 882 317 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás] olyan megoldást ismertetnek, amelynél a poliszacharidok és az immunogén proteinek egy bigenerikus spaceren keresztül kapcsolódnak. A PRO-t olyan származékká alakítják, amely lelógó nukleofil vagy elektrofil csoportokat tartalmaz (PRO*), míg a partner Ps-t olyan származékká, amely ellenkező reaktivitású lelógó csoportokat tartalmaz (Ps*). A Ps* és a PRO* kombinálásával olyan bigenerikus spacereket nyernek, amelyek kovalens kötéssel kötik a Ps-t a PRO-hoz (Ps–PRO). Savas hidrolízis hatására a bigenerikus spacer nem szokványos aminosav formájában felszabadul, ez aminosav-analízissel meghatározható, és ily módon lehetőséget biztosít a kovalens kötés bizonyítására.

Az alábbi publikációk – melyeket a találmány szerinti megoldástól egyenként elhatárolunk – megoldásunkhoz bizonyos szempontból hasonló megoldásokat ismertetnek, azonban nem ismertetik magát a találmány szerinti megoldást, sem olyan megoldásokat, melyekből kiindulva szakember a találmány szerinti megoldást feltalálói tevékenység nélkül megvalósíthatná.

Fattom és munkatársai [Infection and Immunity, *58*, 2309 (1990)] olyan poliszacharidok alkalmazásáról számolnak be, melyek sajátságai a találmány szerintiekétől jelentősen különböznek. Fattom és munkatársai továbbá immunogén proteinként *diphteria*-toxoidot alkalmaznak, kovalens módon a poliszacharidhoz kapcsolva.

A WO 87/06267 számú közzétételi irat a B-csoporthoz tartozó, *Streptococcus* eredetű poliszacharidokat ismertet.

Az EP 0 161 188 számú leírás ugyan *Streptococcus pneumoniae* eredetű poliszacharid konjugátumokat ismertet, a konjugátumokban található poliszacharidok fizikai sajátságai azonban jelentősen különböznek az általunk igényeltekétől. Az EP 0 161 188 számú leírásban ismertetett *Streptococcus pneumoniae* eredetű poliszacharidokat nem fragmentálták és nem szelektálták méret szerint, és így sajátságaik jelentősen különböznek a találmány szerinti poliszacharidokéitól.

Az EP 0 186 576 számú leírás *Streptococcus pneumoniae* eredetű poliszacharidok fragmentálását ismerteti, azonban nem ismertet olyan fragmentált poliszacharidokat, melyek találmány szerinti sajátságúak lennének. Valószínűtlen, hogy az EP 0 186 576 számú leírásban ismertetett fragmentálási eljárás – amely az általunk ismertetettől jelentősen különbözik – találmány szerinti sajátságú poliszacharidokat eredményezzen. Az EP 0 186 576 számú leírás szerint a poliszacharidokat 30 másodperc és 10 perc közötti ideig kell fragmentálás céljából 70–100 °C-on hevíteni (12. oldal, 18–20. sorok), eljárásunk szerint viszont lényegesen hosszabb ideig. A bejelentésünkben feltárt fragmentálási eljárás szerint azonan nemcsak hevítjük a poliszacharidokat, hanem ultrahangos hidrolízisnek és mechanikai nyírófeszültségnek is kitesszük azokat. Ahol pedig bejelentésünkben hevítéssel történő fragmentálást ismertetünk, az eljárás körülményei ott is jelentősen eltérnek az EP 0 186 576 számú leírásban ismertetettektől. Bejelentésünkben arra vonatkozóan is adunk kitanítást, hogy a találmány szerinti poliszacharidok nem állíthatók elő pusztán fragmentálással. Kitanítást adunk arra vonatkozóan is, hogy szükség van a fragmentált poliszacharidok frakcionálására is. Az EP 0 186 576 számú leírásban adott kitanítás alapján szakember nem képes arra a következtetésre jutni, hogy előnyös 1. igénypont szerinti sajátságú poliszacharidokat alkalmazni, és arra sem, hogy az ilyen poliszacharidok előállításához szükséges frakcionálást végezni.

Snipe és munkatársai [Infection and Immunity, *42*, 842 (1983)] publikációjában leírtak szerint a poliszacharidokat sztearil-aminhoz kell kötni, és liposzómákba kell zárni. Az EP 0 041 897 számú leírás a B-csoporthoz tartozó, *Streptococcus* eredetű poliszacharidokat ismertet, a találmány szerintiek azonban *Streptococcus pneumoniae* eredetű poliszacharidok. Az EP 0 038 265 számú leírás szintén kizárólag a B-csoporthoz tartozó *Streptococcus* eredetű poliszacharidokat ismertet.

Az EP 0097407 számú leírás 2–12, előnyösen 6–10 monoszacharid egységből felépülő poliszacharidokat ismertet (1. oldal, 19–20. sorok), nem ismertet azonban találmány szerinti sajátságú poliszacharidokat. Bár a felhozott irat említést tesz arról, hogy a poliszacharidokat proteinhordozóhoz lehet kapcsolni (1. oldal, 21. sor), a leírásban adott kitanítás fő hangsúlya szerint a poliszacharidokat „liposzómába kell horgonyozni egy 14–22 szénatomos lipofil primer alkil-amin alkalmazásával" (2. oldal, 10–11. sorok). Ez a leírás tehát találmány szerintiektől meglehetősen eltérő sajátságú poliszacharidok alkalmazása tárgyában ad csak kitanítást. Fontos továbbá hangsúlyozni, hogy az EP 0 097 407 számú leírásban adott kitanítás egésze alapján szakember nem jutna arra a következtetésre, hogy érdemes immunogén proteinek alkalmazását megkísérelni, mivel – bár a leírás említést tesz ilyen proteinekről – alkalmazásukat nem tekinti különösebben hatékonynak.

A jelen találmány szerinti eljárás továbbfejlesztett változata a 4 695 624, 4 830 852 és 4 882 317 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban ismertetett eljárásoknak. Ez a továbbfejlesztés magában foglalja a Pn-Ps kiindulási anyag előállítását, amely anyag specifikusabb, reprodukálhatóbb és kezelhetőbb fizikai tulajdonságokkal rendelkezik, mint a nyers Pn-Ps készítmények, így például jellemzők rá a következők: megnövekedett oldhatóság, megnövekedett szűrhetőség, megnövekedett tisztaság [kevesebb csoportspecifikus C-poliszachariddal (C-Ps) való szennyezettség], továbbá csökkent molekulatömeg, polidiszperzitás és viszkozitás. Az így kapott konjugátumok javított tulajdonságúak a 4 695 624 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett eljárással előállított konjugátumokhoz képest konzisztenciájukat, könnyű előállíthatóságukat, valamint antigén képességüket és megnövekedett tisztaságukat illetően. Különösen jellemző a csoportspecifikus C-poliszacharid és peptidoglikán mennyiségének 3–20-szoros csökkenése a Pn-Ps prekonjugátumban a 4 695 624 számú szabadalmi leírás szerint előállított Ps prekonjugátumkészítményhez képest. Bár a C-poliszacharid szennyeződés nem befolyásolja a fajtaspecifikus antigénekkel szembeni immunválaszt, a C–Ps részt vehet a konjugációs reakcióban, és ily módon azt kevésbé specifikussá és szabályozhatóvá teszi a fajtaspecifikus Ps számára. Továbbá az anti-C-poliszacharid antitestek kialakulása összefügghet a szövetkárosodásokkal, amelyeket bizonyos nem megoldott pneumococcus fertőzések esetében figyeltek meg. A találmány vonatkozik továbbá az új konjugátumtermékeken túlmenően egy új eljárásra, amellyel részlegesen hidrolizált, nagy tisztaságú pneumococcus poliszacharid intermediereket állítunk elő, továbbá vonatkozik az 1–10 különböző konjugátumot tartalmazó új készítményekre, valamint ezek alkalmazására. Különösen jelentősek a „PNEUMOVAX 23" (polivalens pneumococcus vakcina, MSD, PDR 1990-es kiadás, 1431. oldal) készítményben található kapszuláris poliszacharidok. Még előnyösebbek a Streptococcus pneumoniae kapszuláris poliszacharidok közé tartozó következő alcsoportok: 6B, 23F, 19F, 14, 18C, 4 és 9V, mivel a pneumococcus altípusok ezen kis csoportjáról tartják, hogy a csecsemőknél és gyermekeknél előforduló pneumococcus fertőzések 75–85%-ért felelősek. A találmány szerinti megoldás pneumococcus és más bakteriális poliszacharidok igen széles típusai esetében alkalmazható.

A találmány vonatkozik tehát kémiailag igen jól definiált pneumococcus poliszacharidra (Pn-Ps), amelyet egy nyers Pn-Ps készítmény részleges hidrolizálásával állítunk elő a hidrolízist egy előre meghatározott olyan végpontig végezve, amelynél a Pn-Ps poliszacharid antigén integritása még fennáll. Az ily módon részlegesen hidrolizált Pn-Ps poliszacharid alapos tisztítás után felhasználható a Pn-Ps immunogén protein (PRO) konjugátumok (Pn-Ps–PRO) előállítására.

Az új és nagy antigén tulajdonságú Pn-Ps–PRO konjugátumok, amelyek a külső membránprotein-komplexet (OPMC) vagy Neisseria meningitidis B-t vagy ezek rekombináns vagy tisztított alegységeit, így például MIEP-t vagy más immunogén hordozó proteineket tartalmaznak a prevalens pneumococcus izolátumokból származó, részlegesen hidrolizált és nagy tisztaságú Pn-

Ps intermedierekhez kovalens kötéssel kapcsolva, alkalmasak emlősöknél a pneumococcus fertőzések megelőzésére. A konjugátumok különösen előnyösen alkalmazhatók vakcinakészítményekben az anti-pneumococcus immunválasz stimulálására emlősöknél különösen a B-sejt immunegyezéses egyedeknél, idősebb, valamint humán, 2 évnél fiatalabb csecsemőknél, mivel a konjugátumok T-sejtválasz kiváltására képesek. A Pn-Ps–OMPC és Pn-Ps–MIEP konjugátumokat úgy állítjuk elő, hogy a Streptococcus pneumoniae (pneumococcusok, Pn) tenyészetből származó kapszuláris Ps-t izoláljuk, a Pn-Ps-t részlegesen hidrolizáljuk vagy fizikailag hasítjuk, az említett Pn-Ps-t frakcionáljuk, amikor is olyan Pn-Ps terméket nyerünk, amely csökkentett molekulatömeggel, diszperzitással és viszkozitással rendelkezik, és az így kapott Pn-Ps intermediert kovalens kötéssel az OMPC-hez vagy MIEP-hez kapcsoljuk.

A fentieknek megfelelően a találmány célja új, részlegesen hidrolizált és nagy tisztaságú, antigén tulajdonságú fajtaspecifikus pneumococcus kapszuláris poliszacharidok (Pn-Ps) biztosítása, amelyek intermedierként alkalmazhatók Pn-Ps és immunogén proteinek T-sejtfüggő konjugátumainak előállításánál. A találmány célja továbbá Pn-Ps és immunogén proteinekből álló T-sejtfüggő konjugátumok biztosítása, amelyek alkalmasak pneumococcus fertőzések elleni vakcinakészítményekben való felhasználásra, különösen 2 évnél fiatalabb gyermekek és B-sejt immunoegyezéses emberek esetében. A találmány célja továbbá egy továbbfejlesztett eljárás biztosítása a kovalens kötésű pneumococcus poliszacharid immunogén protein konjugátumok (Pn-Ps–PRO) előállítására, amely eljárásnál a továbbfejlesztés azt jelenti, hogy kémiailag jobban definiált és nagyobb tisztaságú Pn-Ps kiindulási anyagot, intermediereket alkalmazunk, és a kapott végtermék konzisztenciája jobb és előállítási eljárása egyszerűbb. A találmány célja továbbá egy kémiailag jól definiált Pn-Ps–PRO konjugátum biztosítása a továbbfejlesztett eljárás alkalmazásával, amely konjugátum T-sejtfüggő, alkalmas protektív szérum antitestek kiváltására patogén pneumococcus baktériumokkal szemben, különösen 2 évnél fiatalabb gyermekek és immunegyezéses egyedek esetében. A találmány további célja olyan eljárások biztosítása, melyek szerint ezen konjugátumokat alkalmazzuk immunológiailag hatásos mennyiségben vakcinakészítmények formájában különböző pneumococcus baktériumok által kiváltott betegségeknél, így például a következő esetekben: középfülgyulladás, agyhártyagyulladás, tüdőgyulladás, baktériumvérűség, krónikus ízületi gyulladásos akut esetek, melléküreggyulladás, bronchitis és kötőhártya-gyulladás.

A) Új Pn-Ps–PRO konjugátum és poliszacharid intermedierek

A találmány szerinti Pn-Ps–PRO konjugátumtermékben a Pn-Ps és PRO közötti arány 0,05 és 0,5 mg poliszacharid/mg protein közötti érték, a konjugátum kovalenciája nagymértékű, és a szabad Pn-Ps intermedierrel való szennyezettsége minimális, fizikai és kémiai jellemzői egyedülállóak az új poliszacharidoknak köszönhetően.

A találmány szerinti konjugátum egy immunogén proteint (PRO) tartalmaz kovalens kötéssel egy spaceren keresztül kapcsolódva az új, részlegesen hidrolizált és nagy tisztaságú pneumococcus kapszuláris poliszacharidhoz (Pn-Ps). Az immunogén protein előnyösen a Neisseria meningitidis B tenyészetéből származó külső membránprotein-komplex (OMPC). Az OMPC előállítására eljárást ismertetnek például a 4 271 147 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás 1. példájában. Hasonlóképpen felhasználhatók az OMPC alegységei, így például a MIEP, amelyet az OMPC disszociációjával vagy rekombináns expressziójával állítunk elő. Ilyen eljárásokat ismertetnek például az 555 978, 555 329 és 555 204 számú szabadalmi bejelentések (Merck ügyszám: 18 110, 18 159 és 18 190, benyújtás: 1990. július 19.) 2. és 16–23. példáiban.

Az új, részlegesen hidrolizált és nagy tisztaságú pneumococcus kapszuláris poliszacharid (Pn-Ps) egy készítmény, amely valamely pneumococcus altípus (mint például a következőkben az új konjugációs eljárás ismertetésénél említettek, valamint a 3–10. példában leírtak) tenyészetéből származtatott antigén tulajdonságú poliszacharidot tartalmaz. A Pn-Ps átlagos molekulatömege 1×10^5 és 1×10^6 dalton közötti érték, átlagosan molekulánként 1000-nél kevesebb ismétlődő egységet tartalmaz, a C-poliszacharid szennyezettségi szintje kevesebb, mint 3%, és az antigenitási indexe 0,4 és 1,1, előnyösen 0,7 és 1,1 közötti érték. Ez utóbbi paraméter az új Pn-Ps tömegegységében lévő anti-pneumococcus fajtaspecifikus antitestkötés relatív mennyiségére vonatkozik, a nyers Pn-Ps intermedierre – amely az ATCC-nél van deponálva – vonatkoztatjuk. Továbbá az új Pn-Ps intermedier alkalmas immunogén proteinekkel való konjugálásra és ily módon a találmány szerinti Pn-Ps–PRO termékek előállítására. Két különböző Pn6B-Ps és két különböző Pn23F-Ps készítmény fizikai és kémiai jellemzőit a következőkben az I. táblázatban foglaljuk össze, és a leírás során ismertetjük ezen jellemzők meghatározási módszerét. Az ismertetésre kerülő eljárással a legkülönbözőbb pneumococcus altípusok felhasználásával állíthatók elő a Pn-Ps intermedierek és Pn-Ps–PRO konjugátumok, amely altípusok közül a korlátozás szándéka nélkül említjük például a következőket: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 20, 22F, 23F és 33F. Mint már azt a fentiekben is említettük, az előnyös pneumococcus poliszacharidok közé tartoznak a következő pneumococcus altípusokból származó poliszacharidok: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F és 23F. Szakember számára azonban nyilvánvaló, hogy a fentiekben említett poliszacharidokon kívül vagy azok mellett más egyéb poliszacharid is alkalmazható a veszélyeztetett populációnál felmerülő igény függvényében. Így például a Pn1-Ps és Pn5-Ps hasonlóan kezelhető, mint a Pn4-Ps vagy Pn9V-Ps, a Neisseria meningitidis B, C vagy B-csoport pneumococcus poliszacharidokkal, míg a Pn7F-Ps a Pn14-Ps-hez hasonlóan kezelhető, mint ahogyan azt a későbbiekben ismertetjük, és ezek a polivalens vakcinákba befoglalhatók. Szakember számára nyilvánvaló továbbá, hogy Pn6B-Ps befoglalásával védelmet lehet biztosítani

Pn6A-val szemben is a keresztreaktív antitestek révén. Ez igaz továbbá számos más pneumococcus altípus esetére is.

A találmány szerinti polivalens vakcinák különböző Pn-Ps–PRO konjugátum keverékét tartalmazzák, amelyek külön-külön az adott Pn-Ps altípus felhasználásával lettek előállítva. A találmány szerinti polivalens vakcinák továbbá tartalmazhatnak olyan konjugátumokat is, amelyekben több különböző Pn-Ps altípus van konjugálva egyidejűleg vagy egymást követően egy adott PRO-hoz.

1. Az új poliszacharid intermedierek jellemzése

A részlegesen hidrolizált, tisztított pneumococcus kapszuláris poliszacharid intermedierek fizikai és kémiai jellemzői függnek azon pneumococcus altípustól, amelyből származnak, továbbá azon műveletektől, amelyeknek alá lettek vetve a találmány szerinti eljárás során. Általában a Pn-Ps intermedierek molekulatömege és polidiszperzitása 2–10-szer alacsonyabb, mint a nyers bakteriális tenyészetből származtatott poliszacharidé. Ez a csökkentett méret lehetővé teszi a poliszacharid könnyebb kezelhetőségét a konjugációs műveletek alatt, valamint a szabad Pn-Ps eltávolítását a konjugációs műveletek után, továbbá nagyobb Pn-Ps tisztaságot/homogenitást, alacsonyabb Pn-Ps molekulatömeget és polidiszperzitást, valamint lényegesen nem változott antigenicitást biztosít. Ezen új Pn-Ps jellemzők nagymértékben hozzájárulnak a jól definiálható fajtaspecificitású antigén tulajdonságú Pn-Ps–PRO termékek előállíthatóságához.

i) Pn-Ps molekulatömeg és polidiszperzitás

A tömeg szerinti átlagos molekulatömeg (M_W) meghatározását diffúzióval, szedimentációval vagy kromatográfiával, a szám szerinti molekulatömeg (M_N) meghatározását például viszkozitásméréssel, fagyáspont-csökkenéssel vagy forráspont-emelkedéssel határozzuk meg, míg a Pn-Ps készítmények polidiszperzitását az M_W/M_N aránnyal nyerjük. Minél közelebbi értékűek ezek a számok, annál homogénebb a poliszacharid-készítmény. Néhány Pn-Ps készítmény polidiszperzitását adjuk meg a következőkben, és ismertetjük az előnyös eljárást a megnövekedett homogenitás biztosítása érdekében.

A nyers és részlegesen hidrolizált Pn-Ps készítmények megoszlási koefficiensét méretkizárásos kromatográfiával (SEC) vagy nagy teljesítményű méretkizárásos kromatográfiával (HPSEC) határoztuk meg ismert módszerek szerint a poliszacharid alikvot részét felhasználva. Az említett megoszlási koefficiens

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

ahol V_o=az oszlop üres térfogata
V_i=a teljes átfolyási térfogat
V_e=a minta eluátum térfogata
K_d=a minta megoszlási koefficiense

Az ily módon meghatározott K_d mértéke a poliszacharid-készítmény átlagos hidrodinamikai térfogatának. Mivel a Pn-Ps molekulatömege fizikai hasítás révén vagy termikus vagy ultrahangos hidrolízis hatására az ismertetett eljárások során csökken, a V_e elúciós térfogat növekszik, és ugyancsak növekszik K_d-értéke is.

A fenti célra előnyösen oszlopmátrixként például SEPHAROSE CL2B gélt (Pharmacia No. 17-0120-01) alkalmazunk. Az üres oszloptérfogatot (V_o) Blue Dextran 2000 (Pharmacia No. 17-0306-01) felhasználásával, míg az összpermeációs térfogatot (V_i) a nátrium-klorid-sóval nyert csúcs segítségével határozzuk meg. Az egyik módszernél 2,5 mg/ml koncentrációjú Pn-Ps-oldatot készítünk desztillált vízben, és ebből 1 ml térfogatot viszünk az oszlopra. A V_o/V_i arány 0,31–0,37 között kell, hogy legyen a dextrán T500 (Pharmacia No. 17-0320-01) esetében a K_d-érték 0,37–0,49 között kell, hogy legyen. Az előnyös HPSEC rendszernél 7,5×600 mm méretű TSK G6000 PW oszlopot alkalmazunk 50 °C hőmérsékleten.

Egy különösen előnyös módszernél az SEC vagy HPSEC módszert differenciál refraktométeres módszerrel kombináljuk, amely kimutatja a relatív koncentrációkat az elúciós térfogat függvényében, vagy a fentieket differenciális viszkoziméteres módszerrel kombináljuk, ami a specifikus viszkozitást mutatja ki az elúciós térfogat függvényében. Univerzális kalibrációs görbét készítünk [log(belső viszkozitás×molekulatömeg) a retenciós térfogat függvényében] egy sorozat monodiszperz poli(etilén-oxid) standard analízisével. A koncentráció és specifikus viszkozitás profilokat alkalmazhatjuk a molekulatömeg számítására az elúciós térfogat profilok függvényében, amit viszont felhasználhatunk az M_N és M_W értékek meghatározásához, amelyekből a polidiszperzitási index (M_W/M_N) számolható [Yau, W. W. és Rementer, S. W., J. Liq. Chromatog., *13*, 627–675 (1990); Nagy J., Liq. Chrom., *13*, 677–691 (1990); Benoit és munkatársai, J. Ch. Phys. Tome., *63*, 1507–1514 (1966)]. A találmány során a belső viszkozitást 0,1 mólos nátrium-foszfát-pufferben pH=7,2 értéknél mértük.

Ha a Pn-Ps készítmény átlagos molekulatömegét meghatároztuk, ebből a molekulánkénti ismétlődő egységek átlagos száma könnyen meghatározható a polimer molekulatömegét az ismétlődő egységek molekulatömegével elosztva (lásd II. táblázat).

ii) A Pn-Ps fajtaspecifikus antigenitás megtartása

Igen fontos, hogy minden, fizikai hasításnak vagy kémiai, termikus, ultrahangos vagy enzimatikus hidrolízisnek alávetett nyers Pn-Ps esetében meghatározzuk azt a végpontot, amelynél az antigén integritás kezd szétesni. Ezt a végpontot előnyösen a viszkozitás és bármely ismert immunológiai vizsgálat összevetésével határozhatjuk meg. Egy előnyös módszernél a poliszacharid-oldat alikvot részét a Ouchterlony kettős immunodiffúziós vizsgálattal mérjük pneumococcus altípus-specifikus antitest alkalmazásával. Ha fehér precipitációs sáv jelenik meg az agarlemezen, amely egy bizonyos diffúziós idő elteltével a szomszédos lyukban elhelyezett nyers Pn-Ps minta precipitációs sávjához kötődik, ez kvalitatíve azonosítja a reagenseket, és bizonyítja, hogy a poliszacharid antigén integritása intakt maradt. Még kvantitatívabb immunológiai vizsgálatot biztosíthatunk nefelometriás analízissel vagy RIA-módszerrel.

Az említett nefelometriás módszerrel mérjük az antigén-antitest komplexek kialakulása során létrejövő fényszórás intenzitásának változását vagy a változás sebességét. A reakciót egy reakciócellában játszatjuk le, amelyben egy fénysugarat bocsátunk keresztül. Jelen esetben a komplexek egy immunoprecipitációs reakció során képződnek, amely az oldatban akkor megy végbe, ha a specifikus antitest (Ab) a saját specifikus antigénjével (Ag) reagál, azaz a Pn-Ps-sel. Mivel egy Ag-Ab komplex kialakulása függ az Ag és Ab molekulák megfelelő arányban való jelenlététől, a komplexképződés mértéke konstans mennyiségű Ab esetén az Ag mennyiségével egy adott maximális szintig növekszik, ennél nagyobb mennyiségű Ag kevesebb mennyiségű komplexet eredményez. Ily módon, ha az Ab értékét egy konstans szinten tartjuk, és mérjük a fényszórás mértékét növekvő koncentrációjú Ag mellett, egy standard görbét kapunk. Lehetséges meghatározni a Ps (vagy derivatizált Ps) esetén az Ag-koncentrációt, ha a mintát a saját specifikus Ab-jével reagáltatjuk a standard görbe felvételénél alkalmazott körülmények felhasználásával.

Ha a sebességnefelometriával meghatározott immunologikus koncentrációt a kémiai vagy fizikai módszerrel (kolorimetria, törésmutató vagy teljes hidrolízis és a monoszacharidok meghatározása, lásd alább) meghatározott koncentrációkkal összehasonlítjuk, megkapjuk a Ps minták antigenicitásának mértékét. A poliszacharidok száraz tömegének meghatározása csak akkor megfelelő, ha a porkészítmény illékonyanyag-tartalma ismert. A poliszacharidok ismert módon higroszkópikusak, és 5–30 tömeg% illékony anyagot tartalmazhatnak. Ily módon a száraz tömeg meghatározása önmagában nem különösebben megbízható. A poliszacharid-koncentráció megfelelő pontossággal való meghatározására alkalmas például a kolorimetriás vizsgálat, ahol a vizsgálatot egy, a kérdéses poliszacharid standard oldatával végezzük. Így például a Pn6B-Ps, Pn18C-Ps, Pn19F-Ps és Pn23F-Ps mindegyike meghatározható a metil-pentóz vizsgálattal Dische és Shettles módszere szerint [J. Biol. Chem., *175*, 595–603 (1948)]. A Pn4-Ps, Pn9V-Ps, Pn14-Ps és Pn18F-Ps poliszacharidok mennyiségét a hexóz-amintartalmuk és a Pn9V poliszacharidot még az uronsavtartalmuk alapján is meghatározhatjuk. A fenol-kénsav vizsgálat [Dubois és munkatársai, Anal. Chem., *28*, 350–356 (1956)] alkalmas az összes Pn-Ps készítmények mennyiségi meghatározására az előállítási eljárás alatt. Más módszerként alkalmazhatjuk még a törésmutató-meghatározást, amelyet az adott poliszacharid standard oldataival készített kalibrációs görbe alapján végzünk. Bár a kolorimetriás vizsgálatot a minta poliszacharid-tartalmának kimutatására alkalmazzuk a derivatizálási, valamint a konjugációs műveletek alatt, ez utóbbi módszert a poliszacharid-készítmény HPSEC általános kalibrációs analízisénél és az antigenicitási index meghatározására alkalmazzuk. Nyers Pn-Ps kiindulási anyagot alkalmazva az antigenicitási index értéke 1,0. A kísérleti mintáknál relatív antigenicitási indexet is számoltunk, és 0,4–1,1 közötti értéket elfogadhatónak ítéltünk. Lehetséges 1-nél nagyobb antigenicitási indexet is nyerni, ha a poliszacharidot a hidrolízises és frakcionálási lépés alatt jelentős tisztításnak vetjük alá. Elméletileg lehetséges az is, hogy magával a méret csökkentésével növeljük az antigenicitási indexet a poliszacharid-molekula flexibilitásának növelésével, és ily módon csökkentsük az antigén epitópok körüli sztérikus kölcsönhatást. Ezeket a meghatározásokat a műveletek alatt végezzük a hidrolizált, frakcionált és derivatizált Ps minták ellenőrzésére. Azokat a mintákat, amelyek relatív antigenicitási indexe kisebb, mint 0,4, nem használjuk a konjugációs reakcióban. Az anti-Pn-Ps antitestkészítményeket a Pneumococcus poliszacharidok jellemzésére alkalmazzuk. Anti-Pn-Ps antitest források például a Health Reserach Inc., Albany, NY és Staten Serun Institute helyeken szerezhetők be. Fajtaspecifikus anti-Pn-Ps antitesteket előállíthatunk továbbá kereskedelmi forgalomban beszerezhető Pn-Ps immunogén felhasználásával ismert módszerek szerint is [Baker és munkatársai, Immunology, *20*, 469 (1971); Brooke, M. S., J. Immunol., *95*, 358 (1966); Kearney, R. és Halladay, W. J., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., *48*, 227 (1970); Schneerson, R. és munkatársai, Prog. Allergy, *33*, 144 (1983); Robbins, J. B., Infect. Immun., *26*, 1116 (1979)].

Egy további jele a meglévő antigénintegritásnak a Pn-Ps készítmények helyes kémiai összetételének megmaradása. Így például a Pn6B-Ps a következő ismétlődő egységet tartalmazza: α-Gal(1–3)-α-Glu(1–3)-α-L-Rhap(1–4)-D-Ribitol-5-$Po_{4(2)}$, olyan mennyiségben, hogy a szénhidrátkomponensek aránya a következő: ribitol:ramnóz:galaktóz:glükóz≈1:1:1:1. Ezt az arányt például a poliszacharid 36%-os hidrogén-fluoriddal 2 órán át 45–65 °C hőmérsékleten végzett, majd 2 mólos trifluor-ecetsavval 10–20 órán át 100 °C hőmérsékleten végzett hidrolízisével, majd a kapott minta nagy teljesítményű anioncserés kromatográfiával és pulzáló amperometrikus detektálásával határozhatjuk meg. Négy csúcs esetén, amelyek körülbelül azonos mólmennyiségét jelzik a szénhidrátkomponenseknek, az integritás megmaradt. A találmány szerinti új Pn-Ps vegyületek esetében lényegében a szénhidrátkomponensek között az elméleti arányt lehet megtartani, 20%-os eltérésen belül. Az elméleti értéktől való eltérés elsődlegesen a módszerben adódó korlátoknak tudható be. Így például teljes hidrolízis esetén a következő arányokat határoztuk meg:

Pn23F-Ps: glicerol:ramnóz:galaktóz:glükóz=1:2:1:1;

Pn14-Ps: N-acetil-glükóz-amin:galaktóz:glükóz=1:2:1;

Pn19F-Ps: ramnóz:N-acetil-mannóz-amin:glükóz=1:1:1;

Pn18C-Ps: glükóz:galaktóz:ramnóz:glicerol:acetát=3:1:1:1:1;

Pn9V-Ps: glükóz:galaktóz:N-acetil-mannóz-amin:glükoronsav:galakturonsav:acetát=2:1:1:1:1:1,7;

Pn4-Ps: N-acetil-mannóz-amin:N-acetil-furozamin:galaktóz-amin:galaktóz:piruvát=1:1:1:1:1.

Azt találtuk továbbá, hogy a Pn4-Ps egy további komponenst tartalmaz, amelyet HPLC-analízissel mu-

tattunk ki, és ez feltehetően 2-amino-pneumoz-amin (2-amino-2,6-didezoxi-talóz), mint az a Pn5-Ps esetében van [Barker és munkatársai, Carbohydrate Res., 224–233 (1966)]. A Pn19F-Ps tartalmaz továbbá még egy komponenst, feltehetően hexóz-amint, amelyre az irodalomban eddig még nem utaltak, és amellyel kapcsolatban még konkrét azonosítás nem történt. Ezeket és a további elméleti poliszacharid ismétlődő kompozíciókat ismertetnek például a következő irodalmi helyeken: J. E. G. van Dam és munkatársai, Carbohyd. Res., *187*, 267 (1988); H. J. Jennings, Adv. Carbohyd. Chem., *41*, 155 (1983) és az ebben található referencia; J. C. Richards és M. Perry, Biochem. Cell. Biol., *66*, 758 (1988)]. A szénhidrátkomponensek mellett még találhatók foszfát-, acetát- és piruvát-oldalcsoportok különböző adott Pn-Ps poliszacharidban, amelyek immunodomináns jellemzőkkel rendelkeznek. Mint ilyet, ezeket a komponenseket is kimutathatjuk (lásd 30. példa). A monoszacharidok mennyiségi meghatározása szintén alkalmas a minta poliszacharid-koncentrációjának mennyiségi meghatározására. Egy másik eleme a találmány szerinti poliszacharidok antigenicitásának, amelyet szintén meg kell tartani, az úgynevezett egyező epitópok [Wessels, M. R. és Kasper, D. L., J. Exp. Med., *169*, 2121–2131 (1989)]. Az antigenicitásnak ezt a szintjét a szacharid nagy molekulatömegű formájában lehet csak kifejezni, és az ismertetésre kerülő módszer a poliszacharid immunogenitásának ezen szintjének megtartására is irányul.

iii) Minimális szennyezés C-poliszachariddal

Egy másik kritikus paraméter a C-poliszacharid-szennyezés mértéke. Ezt a jellemzőt a poliszacharid-készítmény teljes savas hidrolízisével, a hidrolizátum kromatográfiájával és a kolin konduktometriás detektálásával mutathatjuk ki [Hermans és munkatársai, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, *107*, 600 (1988)]. Eljárhatunk úgy is, hogy a nem hidrolizált poliszacharidot kolinra NMR-rel analizáljuk. Az NMR-analízisnél a kolinjel és ramnóz-metil-jel arányát használjuk (ramnózt tartalmazó Pn-Ps esetében, egyéb Pn-Ps esetén differenciális jelt használunk) a C-Ps-tartalom meghatározására. A kromatográfiás módszernél a kolinjel vagy a konduktometriás vizsgálattal meghatározott poliszacharid-tartalomhoz viszonyított arányát vagy valamely Pn-Ps komponenscsúcshoz viszonyított arányát alkalmazzuk a C-Ps-tartalom meghatározására. Mindegyik módszernél ismert koncentrációjú kolinnal készített standardok alapján végezzük a poliszacharid-készítményben jelenlévő kolin közvetlen számítását a C-Ps teoretikus ismétlőszerkezetének alkalmazásával (lásd Herman és munkatársai, fenti teljes hivatkozás), és meghatározzuk a poliszacharid-készítményben lévő C-Ps-koncentrációt. A Pn-Ps minták poliszacharid-tartalmának meghatározását a szakterületen ismert módszerek szerint végezzük. Például úgy, hogy a poliszacharidot teljesen hidrolizáljuk, és a teljes poliszacharid-tartalmat egy specifikus monoszacharid koncentrációjának meghatározása alapján állapítjuk meg. A C-Ps-koncentráció és a teljes poliszacharid-tartalom összehasonlításával meghatározzuk a C-poliszacharid-szennyezést (W/W). 3 tömeg% alatti C-poliszacharid-tartalom elfogadható, de még előnyösebb az 1 tömeg% alatti érték.

Két sorozat Pn6B-Ps és Pn23F-Ps poliszacharid kémiai és fizikai tulajdonságait az I. táblázatban foglaljuk össze. Ezek az adatok a paraméterek reprodukálhatóságát mutatják, amelyek a találmány szerinti eljárásnak köszönhetők.

I. táblázat

Hidrolizált és frakcionált Pn-Ps jellemzői

Pn-Ps készítmény	6B–1	6B–2	23F–1	23F–2
Viszkozitás-végpont	1,094	1,147	1,350	1,376
K_d (HPSEC)	0,62	0,62	0,49	0,49
K_d (CL–2B)	0,64	0,60	0,41	N.D.
Monoszacharid	S	S	S	S
Antigenitás				
Ouchterlony	S	S	S	S
Nephelose	S	S	S	S
(Fenol:kénsav)	S	S	S	S

S=kielégítő

A következő II. táblázatban néhány nyers pneumococcus poliszacharid és a megfelelő új, találmány szerinti hidrolizált és frakcionált (Hyd+frac) vegyületek kémiai és fizikai paramétereit foglaljuk össze. A megadott számértékek a kísérleti hibán és a komplex poliszacharid-vegyületek detektálásának határain belül vannak.

II. táblázat

A nyers és az új hidrolizált + frakcionált Pn-Ps vegyületek fizikai és kémiai jellemzői

Pn-Ps altípus	Csúcs, K_d	Belső viszkozitás	Tömeg szerinti móltömeg (M_W)	Szám szerinti móltömeg (M_N)	Polidiszperzitás (M_W/M_N)	Ismétlődő egységek száma/per mól	C-Ps,%
4-nyers	0,55±0,05	4,34±10%	$4,2\times10^5$±20%	$3,3\times10^5$±20%	1,2–1,6	>600	>3
4-hyd+frac	0,69±0,05	1,0–3,0	1×10^5–5×10^5	2×10^5–4×10^5	1,0–1,4	<600	<3
6B-nyers	0,40±0,05	2,67±10%	$1,4\times10^6$±20%	9×10^5±20%	1,5–2,5	>1000	>3
6B-hyd+frac	0,60±0,05	1,0–2,0	3×10^5–7×10^5	3×10^5–6×10^5	1,0–1,4	<1000	<3
9V-nyers	0,53±0,05	2,29±10%	$1,1\times10^6$±20%	9×10^5±20%	1,2–2,5	>800	>3

II. táblázat (folytatás)

Pn-Ps altípus	Csúcs, K_d	Belső viszkozitás	Tömeg szerinti móltömeg (M_W)	Szám szerinti móltömeg (M_N)	Polidiszperzitás (M_W/M_N)	Ismétlődő egységek száma/per mól	C-Ps,%
9V-hyd+frac	0,65±0,05	1,0–2,0	3×10^5–7×10^5	3×10^5–6×10^5	1,0–1,4	<800	<3
14-nyers	0,50±0,05	1,69±10%	$1,1\times10^6$±20%	7×10^5±20%	1,3–2,5	>1200	>3
14-hyd+frac	0,60±0,05	0,6–1,6	4×10^5–1×10^6	3×10^5–8×10^5	1,0–1,4	<1200	<3
18C-nyers	0,50±0,05	5,20±10%	$8,7\times10^5$±20%	6×10^5±20%	1,4–2,5	>700	>3
18C-hyd+frac	0,65±0,05	1,5–3,0	2×10^5–6×10^5	2×10^5–6×10^5	1,0–1,4	<700	<3
19F-nyers	0,44±0,05	2,95±10%	$1,0\times10^6$±20%	6×10^5±20%	1,8–2,5	>1000	>3
19F-hyd+frac	0,65±0,05	1,0–2,0	2×10^5–6×10^5	2×10^5–6×10^5	1,0–1,4	<1000	<3
23F-nyers	0,36±0,05	4,15±10%	$2,2\times10^6$±20%	1×10^6±20%	2,0–3,0	>1000	>3
23F-hyd+frac	0,54±0,10	1,5–3,0	4×10^5–8×10^5	2×10^5–6×10^5	1,0–1,4	<1000	<3

2. Az új Pn-Ps konjugátumok jellemzése

i) Pn-Ps minőségi és mennyiségi meghatározása

Igen hasznos a végső konjugátumban a Pn-Ps mennyiségét és kémiai integritását valamely független eljárással meghatározni az antigenicitás (integritás) bizonyítására, és számítani a Pn-Ps/PRO arányt. Az egyik módszer szerint totális hidrolízist végzünk 2 mólos TFA-oldat alkalmazásával 100 °C hőmérsékleten 5–16 órán át, az optimális hidrolízisidő függ az adott Pn-Ps poliszacharidtól. Azonos mennyiségű Pn-Ps–PRO konjugátumot és PRO hidrolizátumot (a Lowry-protein alapján) analizálunk nagy teljesítményű anioncserés kromatográfiával pulzáló amperometrikus detektálást alkalmazva a monoszacharid profilok meghatározására. A PRO profilt „kivonjuk" a Pn-Ps–PRO konjugátum profiljából a megfelelő számítógépes program, így például a Nelson-program alkalmazásával, annak érdekében, hogy a PRO-kat alkotó monoszacharidokat korrigáljuk, így például kivonjuk az OMPC-ben jelenlévő lipopoliszacharidokból (LPS). Ezután számítjuk a konjugátumban jelenlévő Pn-Ps mennyiségét a derivatizált Pn-Ps hidrolizátum ismert mennyiségével felvett profil és a korrigált Pn-Ps–PRO konjugátum profiljának összehasonlításával. A Pn-Ps–PRO arányt hasonlóképpen határozzuk meg.

ii) A konjugálásra és csatlakozásra jellemző új aminosavak analízise

A Pn-Ps poliszacharidok és a PRO konjugálása után mintát veszünk, a mintát 6 n sósavban hidrolizáljuk, és aminosav-analízisnek vetjük alá. Ezzel a módszerrel kimutatjuk a jellemző aminosavak, így például S-karboxi-metil-homocisztein (S-CMHC) és S-karboxi-metil-ciszteamin (S-CMCA) jelenlétét és mennyiségét. Az elsőként említett aminosav a derivatizált Pn-Ps és PRO kémiai reakciója során kémiai kapcsolódással jön létre, és ez határozott bizonyíték a derivatizált Pn-Ps és PRO között létrejövő kovalens kötés kialakulásának. Az ilyen kovalens kötés kialakulása igen lényeges a konjugátum vakcina T-sejt immunogenitása szempontjából. Közvetlenül a konjugációs reakció végbemenetele után a nem reagált bróm-acetamid részeket N-acetil-ciszteaminnal megkötjük. Ezen kötések hidrolízise S-karboxi-metil-ciszteamint (S-CMCA) eredményez, és szintén kimutatható az aminosav-analízissel. Ezen aminosav kimutatása igazolja a reakcióképes bróm-acetamid-csoportok sikeres megkötését és azt, hogy ily módon ezek tovább nem hozzáférhetők nemkívánatos kémiai reakciók számára. A kovalencia és az említett kötés elfogadható szintje 1–15% S-CMHC/Lys és körülbelül 0–5% S-CMCA/Lys esetén.

iii) Alumínium-hidroxidon adszorbeált vakcina analízise

Egy előnyös kiviteli formánál a Pn-Ps–PRO konjugátumot alumínium-hidroxid gélen [alumínium-oxid, $Al(OH)_3$, lásd alább C szakasz] adszorbeáljuk, ami a vakcinával szembeni immunválaszt fokozza. Más alkalmas készítményformák közé tartozik például a fiziológiailag elfogadható hígítóanyagok alkalmazása vagy más adalékok, immunomodulátorok vagy inert hordozók alkalmazása. Az alumínium-oxidon abszorbeált készítmény analízisét a következőképpen végeztük.

Az alumínium-oxidon abszorbeált Pn-Ps–PRO konjugátumot összetételre és stabilitásra a konjugátumnak az alumínium-oxid hordozóról való deszorpciója után vizsgáljuk. Ezt dialízissel végezzük, amihez 3%-os nátrium-citrát-oldatot alkalmazunk 16 órán át szobahőmérsékleten. A kapott oldható alumínium-citrát-só a dialízismembránról kidiffundál, és visszamarad a Pn-Ps–PRO. Ez a módszer igen fontos annak érdekében, hogy igazolni tudjuk a Pn-Ps–PRO korrekt mennyiségét az alumínium-oxidon abszorbeált készítményben. Azonban bizonyos készítmények esetében, így például Pn6B-Ps–OMPC és Pn23F-Ps–OMPC esetében a koncentráció 10, 5, 2 és 1 mcg Pn-Ps/ml (lásd C szakasz), amely koncentráció értéke jóval a kémiai kimutathatóság értéke alatt van. Ily módon a szénhidrátkészítmények analíziséhez először az adszorbeált Pn-Ps–OMPC vakcinákat pelletizálni kell a vizes folyadék eltávolítására, majd a kapott pelleteket ismételten szuszpendáljuk 1/6 térfogatnyi citrátoldatban. A dialízist követően az oldott Pn-Ps–OMPC készítményekben a koncentráció 50, 25, 10, illetve 5 mcg Pn-Ps/ml. Ezek a koncentrációértékek már alkalmasak mind a Pn-Ps, mind a proteinanalízisek elvégzéséhez.

A citráttal deszorbeált mintákat szintén analizáljuk az esetlegesen jelenlévő Pn-Ps meghatározására, ami igen fontos az immunogenicitás és a gyártás alkalmassága szempontjából. Ezt az analízist SEPHAROSE CL–2B vagy SEPHACRYL S1000SF jelű kromatográfiás oszlopon végezzük, amely során a Pn-Ps–OMPC-t elválasztjuk a Pn-Ps-től. Szabad Pn-Ps jelenlétét és mennyiségét az antigenicitás sebesség-nefelometriával való meghatározásával végezzük. A szabad Pn-Ps szennyezés mennyisége a Pn-Ps–OMPC konjugátumban kevesebb, mint 15% a jelenlévő összes Pn-Ps-re viszonyítva.

iv) Pirogén teszt: a szignifikáns pirogenicitás távolléte

A találmány szerinti konjugátumtermékeket vizsgáltuk arra vonatkozóan, hogy káros hőmérséklet-emelkedést kiváltanak-e. Azt határoztuk meg, hogy a kapott konjugátumtermékek pirogenicitása elfogadható mértékű.

Módszer (IV)

A Pn-Ps konjugátum vakcinákat a 21 CFR szakasz 610.13(b) előírásai szerint vizsgáltuk.

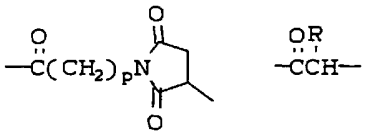
1. Módszer (IM)

Egy másik módszer a pirogenicitás meghatározására a nyúl IM teszt. Ez a vizsgálati módszer közelebbről szimulálja a termék klinikai alkalmazását és pontosabban képes kimutatni a termék endotoxin terhelését.

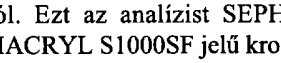
Minden kísérleti állatnak 1 l vakcinát adagoltunk intramuszkuláris injekció formájában, és a vizsgálathoz legalább 3 állatot alkalmaztunk. A hőmérsékletet 5 órán át ellenőriztük az injekció után. Más egyéb vizsgálati módszert ismertetnek a 21 CFR szakasz 310.13(b) előírásai. (A vizsgálatnál alkalmazott dózisokat a poliszacharid-koncentráció alapján határoztuk meg.)

v) A kovalens kötés természete

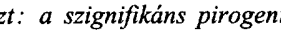
A Pn-Ps–PRO, így például Pn-Ps–OMPC vagy Pn-Ps–MIEP konjugátumok előállításánál a poliszacharid és a PRO, így például OMPC vagy MIEP proteinek kapcsolását végezhetjük bigenerikus spacerek alkalmazásával, amelyek tioétercsoportot és primer amincsoportot tartalmaznak, amelyek hidrolitikusan labilis kovalens kötéseket képeznek a poliszacharidokkal. Előnyösek azok a találmány szerinti konjugátumok, amelyeket a Pn-Ps–A–E–S–B–PRO vagy Pn-Ps–A'–S–E'–B'–PRO általános képlettel jellemezünk. Az A–E–S–B és A'–S–E'–B' tagok képezik a bigenerikus spacert, amelyek hidrolitikusan stabil, kovalens tioéterkötéseket tartalmaznak, és amelyek kovalens kötéseket (így például hidrolitikusan labilis észter- vagy amidkötéseket) alkotnak a makromolekulákkal, a PRO és Pn-Ps molekulákkal. Az A–E–S–B általános képletű spacerben S jelentése kénatom, és E jelentése egy tiofilcsoport transzformációs terméke, amely a tiolcsoporttal lett reagáltatva, és amelyet a következő képlettel írunk le:



amely képletben R jelentése H vagy CH_3, és P értéke 1–3, továbbá A jelentése



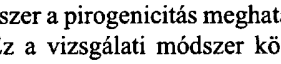
amely képletben W jelentése O vagy NH, m jelentése 0–4, n jelentése 0–3, és Y jelentése CH_2, O, S, NR' és $CHCO_2H$, ahol R' jelentése H vagy 1–2 szénatomos alkilcsoport, oly módon, hogy ha Y jelentése CH_2, akkor m és n értéke nem lehet 0, és ha Y jelentése O vagy S, m jelentése nagyobb, mint 1 és n jelentése nagyobb, mint 1, továbbá B jelentése



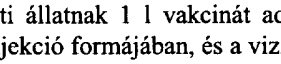
ahol q értéke 0–2, Z jelentése NH_2, CHCOR', COOH vagy H, ahol R' és p jelentése azonos a fentiekben megadottal, és D jelentése

C, NR' vagy $N–C(CH_2)_2C$ csoport.

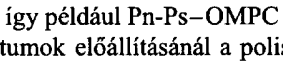
Az A'–S–E'–B' általános képletű spacerben S jelentése kénatom, A' jelentése



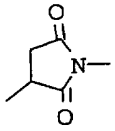
ahol a értéke 1–4 és R'' jelentése CH_2 vagy



ahol Y' jelentése NH_2 vagy NHCOR', és W, p és R' jelentése azonos a fentiekben megadottakkal, továbbá E' jelentése egy tiofilcsoport transzformációs terméke, amelyet egy tiolcsoporttal reagáltatunk, és amelyet



általános képlettel írunk le, ahol R jelentése azonos a fentiekben megadottal, továbbá B' jelentése –CO– vagy E' jelentése





és B' jelentése $–(CH_2)_pC–$, ahol p értéke 1–3. Továbbá az A–E–S–B és A'–S–E'–B' spacer csoportokból az E–S–B és A'–S–E' tagok mennyiségileg és minőségileg is meghatározhatók, kimutatva ezzel, hogy a konjugátumban lévő kötés, ami a kovalens módon módosított poliszacharidból származó tioéter-kén oldalt köti össze, a funkcionalizált (helyettesített) proteinből származó spacer oldallal, kovalens kötés.

A találmány szerinti Pn-Ps–A–E–B–PRO konjugátumok olyan spacereket tartalmazhatnak, amelyek komponensei többek között például a következő származékok: szén-dioxid, 1,4-bután-diamin és S-karboxi-metil-N-acetil-homocisztein; szén-dioxid, 1,5-pentán-diamin és S-karboxi-metil-N-acetil-homocisztein; szén-dioxid, 3-oxa-1,5-pentán-diamin és S-karboxi-metil-N-

acetil-homocisztein; szén-dioxid, 1,4-bután-diamin és S-karboxi-metil-N-acetil-cisztein; szén-dioxid, 1,3-propán-diamin és S-karboxi-metil-N-benzoil-homocisztein; szén-dioxid, 3-aza-1,5-pentán-diamin és S-karboxi-metil-N-acetil-cisztein; szén-dioxid, 1,2-etán-diamin, glicin és S-(szukcin-2-il)-N-acetil-homocisztein.

A találmány szerinti Pn-Ps–A'–S–E'–B'–PRO konjugátumok olyan spacereket tartalmazhatnak, amelyek komponensei a következő származékok, például: szén-dioxid és S-karboxi-metil-ciszteamin; szén-dioxid és S-(α-karboxi-etil)-ciszteamin; szén-dioxid és S-karboxi-metil-homociszteamin; szén-dioxid, S-(szukcin-2-il)-ciszteamin és glicin; szén-dioxid és S-karboxi-metil-cisztein.

B) Eljárás új Pn-Ps intermedierek és Pn-Ps–PRO konjugátumok előállítására

A következő ismertetés során az alábbi lépéseket különböztetjük meg:

I. Poliszacharid előállítása

a) A nyers pneumococcus poliszacharid, Pn-Ps izolálása

b) A nyers Pn-Ps részleges hidrolizálása vagy mechanikai hasítása

c) A részlegesen hidrolizált Pn-Ps méret és tisztaság szerinti frakcionalizálása

II. Konjugálás

a) A frakcionált Pn-Ps funkcionalizálása a Pn-Ps* elektrofil vagy nukleofil reagens kialakítására, előnyösen 100 Pn-Ps oligoszacharid ismétlődő egységre számolva 21 reakcióképes bróm-acetil reakciócsoportot viszünk be

b) Az immunogén protein (PRO), előnyösen a Neisseria meningitides B OMPC vagy ennek alegységének izolálása

c) A PRO funkcionalizálása a PRO* nukleofil vagy elektrofil reagens kialakítására, előnyösen OMPC-t vagy annak alegységét, így például MIEP-t alkalmazunk a reakcióképes szulfhidril-rész kialakítására

d) Az előző a) pont szerint előállított Pn-Ps* poliszacharid konjugálása a c) lépés szerint előállított PRO* proteinnel

e) A Pn-Ps–PRO konjugátum kezelése (burkolása) a maradék funkcionális csoportok eltávolítására

f) A konjugátumtermék izolálása

Ia) A nyers pneumococcus poliszacharid, Pn-Ps izolálása

A pneumococcus kapszuláris poliszacharidok kémiailag és antigén szempontból különböznek egymástól az adott kapszuláris poliszacharid szerotípus oligoszacharid ismétlődő egységeinek összetételétől és kapcsolási módjától függően. Az adott poliszacharid fizikai jellemzőitől függően tehát a poliszacharidok izolálását némiképpen különbözőképpen kell végezni. Általában azonban a baktériumot tenyésztjük, a Pn-Ps-t ismert módszerek szerint kinyerjük [lásd 3. példa és Williams, C. A. és M. W. Methods in Immunology and Immunochemistry, I. kötet, Academic Press (1967)], míg magukat a patogéneket az ATCC-ből szerezzük be. Röviden, nagy mennyiségű baktériumtenyészetet készítünk az alkalmas, a szakterületen a pneumococcus tenyésztésére alkalmas tápközegében, majd egy baktericid anyagot, így például fenolt vagy toluolt adagolunk hozzá az organizmus elpusztítására (3. példa).

Ezután a poliszacharid alkoholos frakcionálását két lépésben végezzük. Az első lépésben alacsony alkoholkoncentrációt alkalmazunk a celluláris törmelék és más nemkívánatos szennyezés kicsapására, míg a nyers Pn-Ps oldatban marad. Ezután meghatározott koncentrációban vízzel elkeverhető alkoholt adagolunk, ami kicsapja a kapszuláris poliszacharidokat, míg a további szennyeződések a felülúszó folyadékban maradnak. Ezután vizes közegben a csapadékot ismételten szuszpendáljuk, majd eltávolítjuk a szennyező proteineket és nukleinsavakat ismert módszerek szerint, így például nukleázos vagy proteolitikus emésztéssel vagy oldószer extrakcióval. A nyers poliszacharidot kinyerjük az alkoholos precipitátumból, majd szárítjuk, amikor is por formában nyerjük a nyers Pn-Ps poliszacharidot (3. példa).

Ib) A nyers Pn-Ps részleges hidrolízise vagy mechanikai hasítása

Lényegében a fentiekben leírtak szerint (lásd még 3. példa is) nyers poliszacharidot állítunk elő, és ezt alkalmazzuk nem konjugált formában a pneumococcus vakcinák kialakításához, amelyeket felnőtteknek és 2 éven felüli korú gyermekeknek adagolunk. Az eljárással új, részlegesen hidrolizált, tisztított Pn-Ps terméket nyerünk, amelynek egyedülálló és meghatározott kémiai és fizikai tulajdonságai vannak (lásd 2. táblázat), és alkalmas a konjugátum vakcina előállítására. A nyers Pn-Ps méretének redukálása megkönnyíti a következő tisztítási lépést, amelynél nagy tisztaságú Pn-Ps terméket nyerünk. Továbbá a találmány szerinti Pn-Ps alkalmazásával a konjugátumok előállításánál a konjugációs lépést sokkal hatásosabban tudjuk végezni. Ennek oka, hogy a nyers poliszacharid vizes oldata általában igen viszkózus, rosszul oldódik, és a kapott konjugátumok nagymértékben oldhatatlanok, és nem szűrhetők. Ebben az esetben a konjugációs műveletet igen nehéz elvégezni, és a konjugátum-kihozatal alacsony. Továbbá a végső termékből a nem konjugált Pn-Ps eltávolítását megkönnyíthetjük, ha a Pn-Ps előkonjugátum mérete, viszkozitása csökkentett, és az oldhatósága jobb. Ez azért fontos, mert a konjugátumkészítményben a Pn-Ps jelenléte megnehezíti az adagolni kívánt konjugátum szükséges dózisának meghatározását, és mivel a konjugált Pn-Ps az, amelynek szignifikáns T-sejt stimuláló hatása van, a nem konjugált Pn-Ps jelenléte rontja az immunológiailag releváns Pn-Ps hatását.

A fentiek szerint előállított száraz, nyers, kapszuláris poliszacharidot például anioncserélő vagy más egyéb kromatográfiás eljárással tisztíthatjuk a részleges hidrolízis előtt vagy után, mint azt például a 6. példában bemutatjuk a Pn14-Ps esetében. A kromatográfiás adszorpció-deszorpció műveletet vagy pozitív, vagy negatív módon alkalmazzuk. A pozitív módozatnál a Pn-Ps-t adszorbeáljuk a gyantához, és a szennyeződéseket az oldatban hagyjuk, amelyeket azután a Pn-Ps deszorpcióját megelőzően mosással eltávolítunk. A negatív módozatnál a szennyeződéseket adszorbeáljuk a Pn-Ps-oldatból, majd eldobjuk, és ily módon a Pn-Ps-t nyerjük

tisztán az oldatban. Egy más módszer szerint a Pn-Ps poliszacharidot közvetlenül részleges, termikus hidrolízisnek is alávethetjük (lásd 4. példa, Pn6B-Ps) vagy ultrahangos hidrolízisnek is alávethetjük (lásd 6. példa, Pn14-Ps). Más hidrolitikai módszerek, így például kémiai, enzimatikus vagy fizikai (például nagynyomású cellában) szintén alkalmazhatók.

A részleges hidrolízist meghatározott hőmérsékleten végzett kezeléssel végezzük vizes közegben, előnyösen 50–110 °C hőmérsékleten 1–48 órán át. Más módszer szerint, amikor meghatározott, nagy energiájú ultrahangos kezelést alkalmazunk, a kezelést 5 mp és 5 perc közötti ideig végezzük, majd annyiszor megismételjük közbeiktatott hűtési periódusokkal, amennyi szükséges ahhoz, hogy a kívánt viszkozitást vagy K_d végpontot elérjük. Az ultrahangos hidrolízises eljárás előnyösebb a termikus hidrolízissel szemben a komplex szerkezetű poliszacharidok (lásd alább) esetén. A poliszacharidok parciális hidrolízisére ismert más egyéb módszerek szintén alkalmazhatók. Így például végezhetünk meghatározott kémiai hidrolízist is savval vagy endolitikus enzimes kezelést vagy fizikai hasítást egy keverőmalomban, a Pn-Ps átlagos lánchosszúságának csökkentésére.

Egy előnyös kiviteli módnál a Pn-Ps poliszacharidot fizikai nyírásnak vetjük alá egy homogenizáló berendezésben való átvezetéssel 0 °C és 30 °C közötti hőmérsékleten, 2140 és $16\,100 \times 10^5$ Pa nyomás közötti nyomáson, amikor is meghatározott Pn-Ps terméket nyerünk, amelynek méretjellemzői, polidiszperzitása és antigenicitása a kívánt értékű (lásd 10. példa).

A hidrolízis végpontját, amelyet az oldat viszkozitásának mérésével vagy nagy teljesítményű méretkizárásos kromatográfiával követünk, minden poliszacharid esetében félüzemi méretben előre meghatározunk, és ez olyan, hogy a poliszacharid antigenicitása nincs befolyásolva. Mint már fent is említettük, egy olyan képesség, amely az antipneumococcus fajtaspecifikus antitestek nem kisebb, mint 70%-os mértékben való kötését jelenti egy azonos koncentrációjú nyers Pn-Ps kiindulási anyaghoz viszonyítva, kielégítő. Nem kell azonban külön mondani, hogy a lényegesen alacsonyabb M_N és M_W értékű vagy molekulánként lényegesen kevesebb ismétlődő egységet tartalmazó Pn-Ps poliszacharidok (II. táblázat) nem hozhatók létre az eljárással, és hogy az olyan Pn-Ps poliszacharidok, amelyek esetleg nem reagálnak a fenti 70%-os, nefelometriás vizsgálattal megállapított határértékek felett, immunogének lehetnek állatok esetében konjugálás esetén. Ez azt jelenti, hogy a fajtaspecifikus anti-Pn-Ps antitestek kötésére vonatkozó, elfogadható mértékű kötésképesség nélkül is az alacsony molekulatömegű Pn-Ps poliszacharidok konjugált formában felismerhetők az emlős immunrendszer által, és jó fajtaspecifikus antipneumococcus választ képesek létrehozni. Ebben az értelemben az „antigén" kifejezést az „immunogén" meghatározással helyettesítjük, mivel ez a megfelelő kritérium egy adott Pn-Ps készítmény elfogadhatóságára vagy nem elfogadhatóságára. A gyakorlatban azonban alkalmasabb használni az in vitro antigenicitás paramétert az in vivo immunogenicitás paraméter helyett az eljárás ellenőrzésére.

Általában ugyanazon méretcsökkentési eljárás alkalmazható a legtöbb poliszacharid esetében. Azonban míg a Pn6B-Ps megtartja antigenicitását hosszantartó termikus méretredukció esetén is, a Pn23F-Ps elvesztheti szerkezeti integritását (eltávolítódik a glicerin-foszfát-oldallánc), ily módon ezen esetben sokkal enyhébb méretredukciót kell végezni ultrahangos kezeléssel vagy fizikai hasítással. Különböző okokból kifolyólag a fizikai hasítás, így például a Gaulin-homogenizátorban végzett művelet az előnyös módszer. Először is ez a módszer nagyüzemi méretekben is alkalmazható. Másodszor, az ultrahangos vagy termikus hidrolízises eljárás általában szükségessé teszi a hidrolizált Pn-Ps utólagos frakcionálását annak érdekében, hogy a polidiszperzitás értéke 1 és 1,5 értékű legyen. A fizikai hasítási módszerrel azonban általában olyan Pn-Ps terméket nyerünk, amelynek polidiszperzitása az említett határon belül van további frakcionálás nélkül, bár egy frakcionálási műveletet alkalmazhatunk annak érdekében, hogy a tisztaságot növeljük, és szükség esetén a CP-szennyezést csökkentsük. Harmadszor, a fizikai hasítási módszer nagyobb reprodukálhatóságot biztosít bármely adott Pn-Ps esetében a termikus vagy ultrahangos hidrolízishez viszonyítva. Negyedszer, a fizikai hasítási módszer esetében kapott Pn-Ps termékek egy adott méretnél nagyobb antigenicitást mutatnak, mint az azonos méretű, de ultrahangos vagy termikus hidrolízissel nyert Pn-Ps termékek.

A viszkozitás, amely kapcsolatban áll az átlagos Pn-Ps molekulatömeggel, előnyös abból a szempontból, hogy az eljárási műveletek alatt jelezzük, és könnyedén kövessük a hidrolízis mértékét, és ily módon szabályozni és korlátozni tudjuk a méretredukció mértékét. Kémiailag és fizikailag nem megkülönböztethető Pn6B-Ps és Pn23F-Ps mintákat állítottunk elő egyszerűen a poliszacharid-méret csökkentésével a csökkentést egy meghatározott viszkozitásvégpontig végezve (lásd fenti I. táblázat). Az ilyen eljárás alatt végzett viszkozitásmeghatározás alkalmazható a nyers poliszacharidok széles választékánál, és ily módon lehetővé tesszük a hidrolitikus méretcsökkentést a kapott Pn-Ps poliszacharidok antigén jellemzőinek megváltozása nélkül. Mint már azt a fentiekben említettük, az antigenicitás megtartása könnyen meghatározható, például az Ouchterlony kettős diffúziós vizsgálattal, sebességnefelometriával vagy más egyéb ismert eljárással. Az alábbi III. táblázatban összefoglalunk különböző Pn-Ps készítményekkel kapcsolatban meghatározott végpont viszkozitásértékeket, amelyeket 1 mg/ml koncentrációjú 0,9%-os nátrium-klorid-oldatban határoztunk meg. Ezek az értékek hasonlóak más egyéb pneumococcus altípusból származó Pn-Ps poliszacharidnál is.

III. táblázat

Viszkozitásértékek nyers és hidrolizált Pn-Ps minták esetén

Pn-Ps altípus	Viszkozitás nyers Pn-Ps esetén	Kívánt viszkozitás-végpont, cSt
Pn4-Ps	1,8	1,5–1,00
Pn6B-Ps	1,4	1,3–1,00

III. táblázat (folytatás)

Pn-Ps altípus	Viszkozitás nyers Pn-Ps esetén	Kívánt viszkozitás-végpont, cSt
Pn9V-Ps	1,4	1,3–1,00
Pn14-Ps	1,2	1,1–0,95
Pn18C-Ps	2,0	1,5–1,00
Pn19F-Ps	1,4	1,3–1,00
Pn23F-Ps	1,6	1,5–1,00

Bizonyos pneumococcus poliszacharidok esetében előnyös egy további tisztítási lépést, például egy ioncserés tisztítást beiktatni a részleges hidrolízist megelőzően vagy az után. A Pn14-Ps esetében ezt a lépést például Whatman DE52 gyantán végzett szakaszos adszorpcióval végezzük, amikor is az anionos szennyeződéseket távolítjuk el a részleges, ultrahangos hidrolízis előtt. A semleges poliszacharidot az enyhén savas pH-jú közegből a felülúszó frakcióként nyerjük ki, és ez közvetlenül alkalmas a hidrolízisre.

A Pn6B-Ps készítmények molekulatömeg-értéke 900 kilodalton (kD) a méretredukciós művelet és frakcionálás előtt és körülbelül 300 kD utána. Pn23F-Ps esetében a megfelelő értékek 1000 kD vagy több a művelet előtt és 4–500 kD utána. Így a Pn-Ps méretének csökkentése 500±300 kD értékkel egy megfelelő érték minden Pn-Ps altípus esetében az eljárás ezen fázisában.

A részlegesen hidrolizált anyag ismételt kicsapása előre meghatározott koncentrációjú alkohollal lehetővé teszi az anyag kinyerését és további tisztítását, mint azt a következő c) pontban ismertetjük.

Ic) A részlegesen hidrolizált Pn-Ps méret és tisztaság szerinti frakcionálása

A Pn-Ps készítmények polidiszperzitása nemcsak a különböző altípusú Pn-Ps poliszacharidok láncchosszúságát jelzi, hanem jelzi, hogy csoportspecifikus C-poliszacharidok vagy más egyéb szennyeződések jelen vannak-e még a Pn-Ps készítményben. Mint már említettük, a maradék C-poliszacharid-szennyeződések nem előnyösek, és összefüggésben lehetnek hátrányos immunválaszokkal.

Az átlagos poliszacharid molekulatömeg szűk intervallumának (csökkentett polidiszperzitás) kiválasztását általában alkoholban, így például etanolban, előnyösen izopropanolban (IPA) mutatott oldhatóságdifferencia alapján végezzük a méretcsökkentés után. Ezen kiválasztás alapja az, hogy egy adott Pn-Ps készítmény esetében az alkoholban való oldhatóság fordítottan arányos a láncchosszúsággal, amely viszont arányos a molekulatömeggel. Ily módon ezt a műveletet sikeresen alkalmazhatjuk a különböző méretű molekulák mennyiségi elválasztására, és az elválasztás során nagy homogenitást kapunk. Az eljárási művelet közben az IPA-frakcionálást úgy végezzük, hogy meghatározunk egy félüzemi kísérlet során egy IPA-intervallumot, amelynél a Pn-Ps kicsapódik. A kvantitatív Pn-Ps kinyerés érdekében a frakcionálás jelzésére antitest-irányított Nephelosa vizsgálatot alkalmazunk. Ezen intézkedésnek köszönhetően a C-poliszachariddal és csoportspecifikus poliszachariddal általában a legtöbb pneumococcus izolátumnál meglévő szennyezettség 3–20-szoros mértékben csökkenthető a nyers Pn-Ps készítményekhez viszonyítva. Továbbá a Pn-Ps készítmények molekulaméretének polidiszperzitása egyidejűleg szintén csökken 1–1,4 értékre.

Egy másik módszer a méretcsökkentett Pn-Ps poliszacharid frakcionálására a kromatográfia, amelynél a méretcsökkentett Pn-Ps vizes oldatát egy, a megfelelő méreteket bezárni képes gyantával, így például CL–2B típusú gyantával vagy más alkalmas gyantával kezeljük, amely gyanták képesek magukba zárni, és így frakcionálni a 200–1000 kD molekulatömegű részeket. A merev, méretbezáró mátrixot alkalmazó HPSEC egy előnyös módszer a késés csökkentésére és a szétválasztás növelésére. Az oszlopról eluálással elválasztott frakciók szétválasztását a viszkozitás, a retenciós idő vagy on line detektálás alapján végezzük, és ily módon nyerjük a Pn-Ps molekulákat, amelyek a fentiek szerint már említett kívánt jellemzőkkel, így például mérettel, viszkozitással és tisztasággal rendelkeznek.

Azok a Pn-Ps készítmények, amelyek esetében egy további IPA-val vagy kromatográfiával kivitelezett frakcionálást végeztünk, előnyösebben viselkednek a kémiai kötési lépésnél, és ily módon reprodukálhatóbb jellemzőkkel rendelkező konjugátumokat nyerünk. Jelentős növekedést tapasztalunk a Pn-Ps poliszacharid tisztaságában is, különösen a CP-szennyezés mennyisége csökkent jelentős mértékben.

A fentiekben ismertetett műveleteknek és intézkedéseknek köszönhetően előnyös tulajdonságú Pn-Ps intermediereket állítunk elő, amelyeket a fenti II. táblázatban foglaltunk össze.

IIa) A Pn-Ps funkcionalizálása és frakcionálása a Pn-Ps elektrofil vagy nukleofil reagens előállítása érdekében, amely előnyösen 10–40 reakcióképes bróm-acetil-csoportot tartalmaz 100 Pn-Ps monomer egységre számolva*

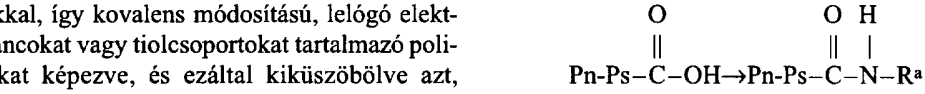
Az előző Ic) lépésnél nyert Pn-Ps elegendően homogén, és fokozott oldhatósággal és csökkent viszkozitással rendelkezik, amely alkalmassá teszi a konjugálásra. A poliszacharidok és más egyéb molekulák konjugálására számos eljárás és módszer ismert a szakterületen. Az itt ismertetésre kerülő módszer csupán egyike az alkalmazható lehetséges eljárásoknak, amellyel az új, részlegesen hidrolizált és frakcionált Pn-Ps intermediereket konjugátumokká alakítjuk, és ily módon ezt semmiképpen nem tekintjük korlátozónak. A bigenerikus spacer eljárást ismertetik Marburg, S. és munkatársai [4 695 624 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; J. Am. Chem. Soc., *108*, 5282 (1986)], amely egy előnyös módszer a frakcionált és méretcsökkentett Pn-Ps immunogén proteinnel való konjugálására. A Pn-Ps-t funkcionalizáljuk, azaz elektrofil vagy nukleofil csoportokat viszünk be. A kapott Pn–Ps* ily módon képes egy szintén funkcionalizált PRO* proteinnel való reagálásra. A találmány szerinti eljárás magában foglalja a nukleofilek vagy bisznukleofilek kiválasztását is, amelyek reagálni fognak az aktivált poli-

szacharidokkal, így kovalens módosítású, lelógó elektrofil oldalláncokat vagy tiolcsoportokat tartalmazó poliszacharidokat képezve, és ezáltal kiküszöbölve azt, hogy szükség legyen a bisznukleofil-módosított poliszacharidok további funkcionalizálására azoknak a kovalensmódosítású proteinekkel való reagáltatása előtt. A proteinek funkcionalizálását végezhetjük egy vagy több lépésben is a reagensek megválasztásától függően.

Ha a megfelelően funkcionalizált Pn-Ps méretét már csökkentettük, a frakcionált Pn-Ps molekulát először oldószerben oldani kell, és oldószerként olyant alkalmazunk, amely nem befolyásolja a funkciós csoportok bevitelét. Mivel a hidroxilcsoport az, amelyet leggyakrabban alkalmazunk a Pn-Ps molekuláknál bevitelre, a Pn-Ps víztartalmának eltávolítása igen kritikus lépés. A savas Pn-Ps hidrogének hidrofób kationnal, így például tetra- vagy tributil-ammónium-kationnal való helyettesítése lehetővé teszi, hogy a Pn-Ps molekula nemvizes oldószerben, így például DMSO-ban vagy DMF-ben is oldódjon. Természetesen nincs szükség ilyen helyettesítésre semleges Pn-Ps molekulák esetében (például Pn14-Ps vagy Pn7F-Ps). Nemvizes oldatban, a Pn-Pst-t reagáltathatjuk valamely biszelektrofil reagenssel, így például karbonil-diimidazollal, amikor is imidazolil-diuretánt nyerünk. A 100 Pn-Ps monomer egységenkénti funkciós csoportok számát ezen pontnál szabályozzuk a karbonil-diimidazol meghatározott mennyiségének adagolásával, ami mólmennyiségben számolva az össz Pn-Ps molekula 1/5-öd része, így átlagosan körülbelül az összes Pn-Ps monomerből csak 10–40 lesz derivatizálva. Az így kapott molekulák érzékenyek a nukleofil szubsztitúcióra, akár i) cisztamin-dihidrokloriddal végezve, amely lehetővé teszi a nukleofil Pn-Ps*-származékok kialakulását, vagy ii) 1,4-bután-diaminnal végezve, amely elektrofil Pn-Ps*-származékok kialakulását teszi lehetővé [4 695 624 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, Marburg és munkatársai, J. Am. Chem. Soc., *108*, 5258 (1986)].

Az utóbbi időben felismertük, hogy néhány savas pneumococcus poliszacharid, így például a Pn9V-Ps, Pn4-Ps, Pn1-Ps, Pn5-Ps és a Neisseria meningitidis B vagy C poliszacharidok szabad karboxilcsoportokat, valamint szabad hidroxilcsoportokat tartalmaznak, ezek konjugációs kémiája némiképpen különbözik a semleges poliszacharidokétól vagy az olyan poliszacharidokétól, amelyek a jelenlévő foszfor-diészter-kötések révén anionos jellegűek, mint például a poli(ribozil-ribitol-foszfát). Általában a karboxilátmentes poliszacharidok konjugációs reakciója úgy megy végbe, hogy a szabad poliszacharid-hidroxil-csoportok uretánkötésekké alakulnak, azaz a Pn-Ps–OH-ból Pn-Ps–O–C–N–R^a lesz,

amely képletben R^a jelentése azt az atomláncot jelenti, amely a poliszacharidot a proteinhez kapcsolja. Ugyanakkor a karbonsavtartalmú poliszacharidok esetében, mint például a Pn9V-Ps, amely glükuronátot tartalmaz vagy a Pn4-Ps esetében, amely piruvátcsoportot tartalmaz, a reakció a következőképpen megy végbe:



ahol R^a jelentése szintén a proteinhez kapcsolódó poliszacharidlánc utolsó tagja.

Azt figyeltük meg, hogy az uretán észtercsoportja vagy nem alakul ki a karbonsavat tartalmazó poliszacharidon, vagy még egy egyszerű amidkötés képződik ezen a helyen. A konjugációs reakció gyorsabban megy végbe a karbonsavcsoport jelenlétének köszönhetően.

Miután úgy gondoljuk, hogy a karbonsavcsoport jelenléte fontos tényező az antenigenitás és immunogenitás szempontjából, az anionos poliszacharidok ezen csoportjánál a konjugációs reakciót gondosan ellenőrizni kell. A végső termékben szükséges nagy poliszacharid/protein arányt szembe kell helyezni az antigén integritás megtartásának szükségével. Ezt úgy biztosítjuk, hogy behatároljuk a kezdeti karbonil-diimidazol közvetített aktiváló anyag mennyiségét. Ha már az amid kialakult, a következő lépés, amelynél a cisztamin-dikloridot vagy az 1,4-bután-diamint alkalmazzuk, már a fentiek szerint mehet végbe.

Más módszernél a karboxilcsoportot reverzibilisen védhetjük, majd az alkalmazott trimetil-szilil-csoportot vagy más hasonló védőcsoportot eltávolítjuk enyhe alkalikus körülmények között, vagy pedig 2,4-dimetoxi-benzil-észtert alkalmazunk, amely savérzékeny. Ebben az esetben a konjugációs reakció ismert módon megy végbe a poliszacharid hidroxilcsoportján keresztül.

1. Nukleofil Pn-Ps előállítása*

A karbonil-diimidazollal aktivált, méretcsökkentett és frakcionált, fentiek szerint előállított Ps-t vizes vagy más oldószeres oldatban reagáltatjuk valamely, például a 4 695 624 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett reagenssel. Előnyösen cisztamin-dihidrokloridot alkalmazunk. Ezután a felesleges cisztamint eltávolítjuk, ditio-treitollal vagy ditio-eritreitollal redukáljuk, amikor is nukleofil szulfhidril-csoporttal funkcionalizált Pn-Ps-t nyerünk. Az így kapott Pn-Ps*-származék reakcióba képes lépni egy elektrofil PRO* proteinnel, például egy olyan proteinnel, amely lelógó bróm-acetil-csoportokat tartalmaz.

2. Elektrofil Pn-Ps előállítása*

A karbonil-diimidazol-aktivált, méretcsökkentett és frakcionált Pn-Ps poliszacharidot vizes vagy más oldószeres közegben, például a 4 695 624 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett reagensekkel, előnyösen például 1,4-bután-diaminnal (BuA_2) reagáltatjuk. Ezt követően a kapott Pn-Ps–BuA_2-t B-nitro-fenil-bróm-acetáttal vagy más hasonló reagenssel acilezzük, így nyerjük a Pn-Ps–BuA_2–BrAc elektrofil származékot, amely képes a nukleofil PRO* proteinnel, azaz egy szulfhidrillel módosított proteinnel reagálni. A derivatizálás mértékét NMR-analízissel mérjük, és összehasonlítjuk az 1,4-bután-diamin integrálást egy alkalmas monoszacharid alkotott jelével, így például a metil-ramnózéval. A derivatizálás előnyös mértéke 10–40%, különösen előnyösen 20%.

IIb) Az immunogén protein (PRO), előnyösen a Neisseria meningitidis B OMPC vagy ennek alegységének izolálása

A proteinrész immunfokozóként kell, hogy viselkedjen. A protein kiválasztásánál el kell kerülni azokat, amelyek a resipiens immunválaszát nem specifikusan aktiválják (reaktorgenitás). A 4 695 624 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban Neisseria meningitidis-ből származó külső membránprotein-komplexet (OMPC) alkalmaztak poliszacharid-protein konjugátumok előállításához. Az OMPC alkalmasnak bizonyult a jelen találmány szerinti megoldásnál is, bár más immunogén proteinek, így például a tetanusz- vagy diftéria-toxoid vagy pertusszinogén szintén alkalmazható.

Különböző módszerek ismertek az OMPC Gram-negatív baktériumoktól való elválasztására [Frasch és munkatársai, J. Exp. Med., *140*, 87 (1974); Frasch és munkatársai, J. Exp. Med., *147*, 629 (1987); Zollinger és munkatársai, 4 707 543 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (1987); Helting és munkatársai, Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C, *89*, 69 (1981); Helting és munkatársai, 4 271 147 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás].

A találmány szerinti megoldásnál felhasználásra kerülő OMPC-t az 1. példában leírtak szerint nyerjük. Ezen túlmenően előnyös még a protein alegység is, amelyet az OMPC disszociációja révén vagy az OMPC-t alkotó proteineket kódoló anyag rekombináns expressziója révén nyerünk, különösen előnyös a fő membránprotein, amelyet mitogén indukciós proteinként (MIP) vagy fő immunonövelő proteinként (MIEP) is említünk. Ezen alegység proteinek előállítására szolgáló egyik eljárást ismertetik például az 555 978, 55 329, 555 204 és 639 457 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentések 2., 16–23. példáiban.

IIc) A PRO funkcionalizálása a nukleofil vagy elektrofil tulajdonságú PRO előállítására, előnyösen az OMPC vagy annak alegység proteinjébe reakcióképes szulfhidrilcsoportok bevitele*

Az előző IIb) pont szerint izolált PRO-t funkcionalizáljuk, azaz elektrofil vagy nukleofil csoportokat viszünk be. Az így kapott PRO* képes az ellentétesen funkcionalizált Pn-Ps* poliszachariddal, amelyet a IIa) pont szerint állítunk elő, reakcióba lépni.

1. Elektrofil PRO-származék előállítása*

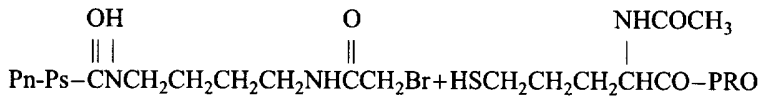
Az izolált PRO-t, így például a Neisseriából származó OMPC-t vagy az OMPC-ből származó MIEP-t előnyösen például N-(bróm-acetil)-6-amino-kapronsav-p-nitro-fenil-észterrel reagáltatunk, amely a PRO protein lizinjének ε-aminocsoportjával képes reakcióba lépni. Az így kapott bróm-acetilezett PRO* reakcióba képes lépni az előző IIa) 1. pont szerint előállított Pn-Ps* nukleofil származékokkal.

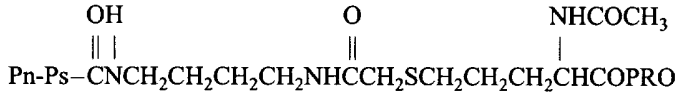
2. Nukleofil PRO-származékok előállítása*

Az izolált PRO-t, így például a Neisseriából származó OMPC-t vagy MIEP-t például N-acetil-homocisztein-tiolaktonnal reagáltatunk a protein szulfhidrilszármazékának előállítására. Az így nyert nukleofil származék reakcióba képes lépni az előző IIa) 2. pont szerint előállított elektrofil Pn-Ps*-al. Az eljárás ezen fázisában nyert szulfhidrilkoncentráció 0,1 és 0,3 μmol/mg protein közötti érték.

IId) Az előző IIa) pont szerint nyert Pn-Ps poliszacharid konjugálása a IIc) pont szerint nyert PRO* proteinnel*

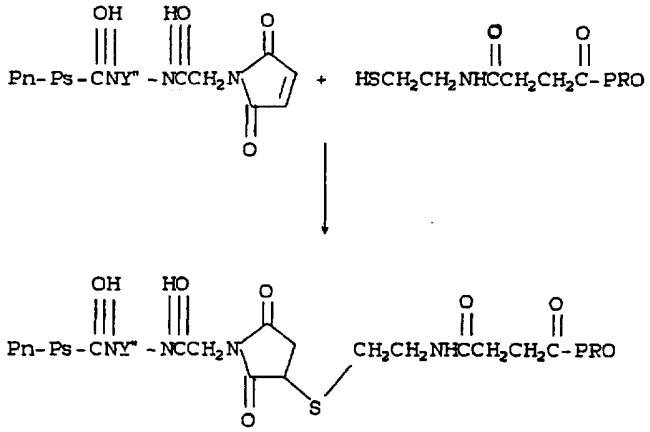
Az előzőek szerint nyert Pn-Ps* és PRO* reakcióképes tagokat reagáltatjuk az ellentétesen aktivált reakciópartnerekkel, a reagenseket megközelítőleg 1:1 tömegarányban alkalmazva. A reakciókeveréket nitrogéngázzal átöblítjük, lezárjuk, majd szobahőmérsékleten hagyjuk a reakciót végbemenni körülbelül 4 órán keresztül 17 °C és 40 °C hőmérsékleten. Például a következő reakciók mennek végbe:





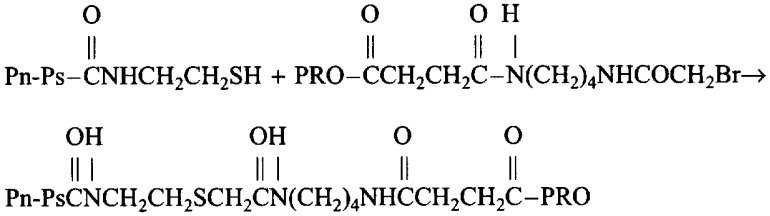
amelynél az aktivált poliszacharidot 4-bróm-acetamido-butil-aminnal reagáltatjuk, majd a kapott aktivált tagot reagáltatjuk a proteinnel, amelyet előzőleg N-acetil-homocisztein-tiolaktonnal reagáltatunk.

Egy másik reakció például a következő:

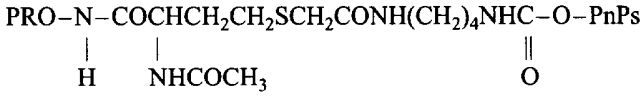


ahol Y'' jelentése 2–8 szénatomos alkilcsoport, és a reakciónál egy amino-derivatizált poliszacharidot, amelyet aktivált maleinimidosavval reagáltatjuk a karboxil-aktivált proteinnel, amelyet amino-tiollal aminál-tunk, és így nyerjük a konjugátumot.

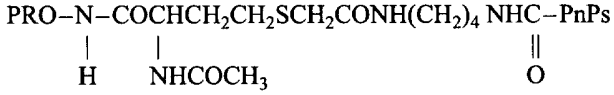
Hasonlóképpen reagáltatunk bármilyen kovalens-módosítású poliszacharidot, amely lelógó tiolcsoportot tartalmaz valamely bakteriális eredetű OMPC vagy MIEP proteinnel, amelyek elektrofil csoportokat tartalmaznak. Ilyen például a következő reakció:



amely reakciónál egy amino-tiollal aktivált poliszacharidot reagáltatunk egy karboxil-aktivált proteinnel, amelyet egy diamin monohalogén-acetil-származékával reagáltattunk, és ily módon nyerjük a konjugátumot. A találmány szerint különösen előnyös kötés a poliszacharid hidroxilcsoportján keresztül a következő:



és a poliszacharid karboxilcsoportján keresztül pedig a következő:



Ha a feleslegben lévő halogén-acetil-csoportok elektrofil aktivitását eliminálni szükséges, a konjugátumot alacsony molekulatömegű tiollal, például N-acetil-ciszteaminnal reagáltatjuk. Ezen reagens alkalmazása lehetővé teszi a halogén-acetil-részek mennyiségének igazolását is, mivel a képződött S-karboxi-metil-ciszteamin egyedülálló módon detektálható a Spackman, Moore és Stein-féle módszerrel.

IIe) A Pn-Ps–PRO konjugátumok kezelése (borítása) a maradék funkcionális csoportok eltávolítására

A maradék elektrofil csoportokat akár a PRO*, akár a Pn-Ps* esetében a reakció végén 2–10-szeres mólfeleslegben – a konjugátummaradék reakcióképes csoportjaira számítva – alkalmazott reagenssel való reagáltatással távolítjuk el. Erre a célra például egy alacsony molekulatömegű nukleofilt, például N-etil-maleimidet (NEM) alkalmazunk a szabad szulfhidrilek vagy elektrofilek eltávolítására, és például N-acetil-ciszteamint a bróm-acetil-csoportok eltávolítására.

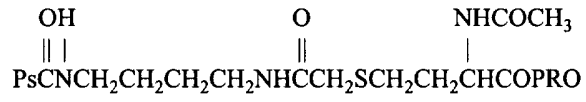
IIf) A konjugált termék izolálása

Az utókezelt konjugátumterméket a nem konjugált PRO, Pn-Ps és más reagensektől ultracentrifugálással vagy szűréssel választjuk el. A konjugátumpelletet vizes pufferoldatban reszuszpendáljuk, amely oldat még detergenst is tartalmaz, így például 0,5% dezoxikolint és valamely sót, így például 0,1 mol triszt, pH 7–9 és körülbelül 10 mmol EDTA-t a maradó pirogének eltávolítására, majd a kapott szuszpenziót 1–25 órán át szobahőmérsékleten állni hagyjuk. A konjugátumot ismételten pelletezzük, majd szuszpendáljuk vizes pufferban a detergens nélkül, majd ismételten újracentrifu-

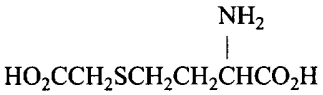
gálással pelletezzük 100 000 G mellett, fixált rotordőlés mellett körülbelül 2 óránt át 1–20 °C közötti hőmérsékleten, majd a kapott anyagot bármilyen ismert egyéb tisztítási eljárásnak vetjük alá, így például gélpermeációs szűrésnek, ioncserés kromatográfiának, gradienscentrifugálásnak vagy más differenciáladszorpciós kromatográfiának, a nem kovalens kötésű poliszacharidok és proteinek eltávolítására, és sebességnefelometriát, valamint kovalenciavizsgálatot alkalmazunk a bigenerikus spacerekhez (lásd alább), mint in vitro módszert, a kívánt biológiai aktivitás követésére.

A reagensek további elválasztását végezhetjük méretkizárásos kromatográfiával oszlopon vagy igen nagy méretű, nem oldható proteinek esetében ultracentrifugálást is alkalmazhatunk. A konjugátum steril vízben való reszuszpendálása és körülbelül 1 napon át 4 °C hőmérsékleten való érlelése lehetővé teszi a tökéletes oldódást, majd ezt követően alacsony fordulatszámú centrifugálással tudjuk eltávolítani az oldhatatlan részecskéket. A felülúszó oldat tartalmazza a végterméket, amelyet sterilen szűrünk, majd vakcinakészítménnyé alakítjuk immunológiailag hatásos mennyiség alkalmazásával, majd sterilen üvegekbe töltjük.

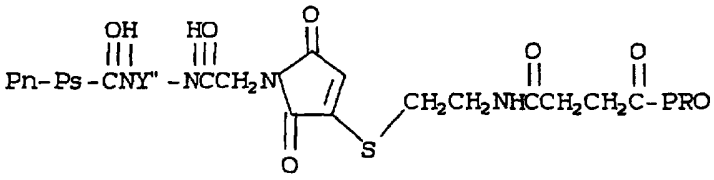
A konjugátum analízisét a kovalencia és így a konjugátum stabilitásának igazolására úgy végezzük, hogy a konjugátumot hidrolizáljuk, előnyösen 6 n sósavval 110 °C hőmérsékleten 20 órán át, majd kvantitatíve analizáljuk az egyes, a hidrolitikus stabil spacer csoportból származó, tioéterkötést tartalmazó aminosavakat és a proteint alkotó aminosavakat. A protein aminosavjainak hozzájárulását szükség esetén kiküszöbölhetjük a szóban forgó proteinekre vonatkozó megfelelő aminosav standardok és a visszamaradó aminosavértékek összehasonlításával, ami a konjugátum kovalenciáját tükrözi, vagy pedig a spacer csoport aminosavját úgy is szervezhetjük, hogy az aminosav standardon kívülesőnek tűnjön az analízis során. A kovalenciavizsgálat arra is alkalmas, hogy kimutassa a tisztítási eljárást, jelezve a biológiailag aktív komponensek koncentrációjának növekedését. A fentiekben említetteknél a következő komponens hidrolízise



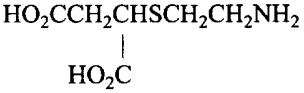
S-karboxi-metil-homociszteint eredményez:



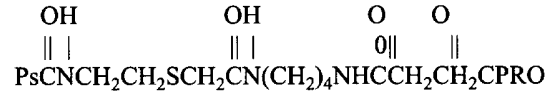
a következő komponens hidrolízise



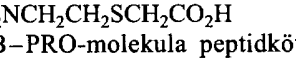
amino-dikarbonsav képződését eredményezi:



továbbá a következő reagens hidrolízise



S-karboxi-metil-ciszteinamint eredményez:



a Ps–A–E–S–B–PRO-molekula peptidkötésnél és más egyéb hidrolitikusan instabil kötéseknél való hasítás révén. Kromatográfiás módszerek, így például Spackman, Morre és Stein módszere előnyösen alkalmazható ezután az aminosavalkotók arányának meghatározására.

Az IgG antitestek optimális termeléséhez szükséges az adott antigénre specifikus B- és T-limfociták működése. A T-limfociták nem képesek felismerni a poliszacharidokat, de képesek elősegíteni az antipoliszacharid IgG antitest választ, ha a poliszacharid kovalens kötéssel kapcsolódik a proteinhez, amelyet a T-sejt képes felismerni.

C) Vakcinakészítmények és alkalmazásuk

Egy előnyös kiviteli módozatnál a konjugátumterméket alumínium-hidroxid gélen adszorbeáljuk. Ezt például úgy végezzük, hogy Pn-Ps-re vonatkozóan 20 μg/ml koncentrációjú konjugátum törzsoldatot készítünk, ezt 1:1, 1:5 és 1:10 arányban steril vízzel hígítjuk, majd ezen minták megfelelő részét, beleértve a 20 mg/ml törzsoldatot is, alumínium-hidroxiddal hígítjuk 1:1 arányban, amely 0,85 mg/ml Al^{+3}-iont, 1,7 t/tf% NaCl-t és

100 μg/ml timerozolt tartalmaz. A kapott oldat pH-ját 1 n nátrium-hidroxiddal 7,5-re beállítjuk, és ily módon 10, 5, 2 és 1 μg/ml Pn-Ps-t tartalmazó oldatokat nyerünk. Ezen készítmények 0,1 ml és 0,75 ml közötti dózisai alkalmasak a különböző korú és súlyú betegeknek való adagolásra. Az ily módon nyert vakcinakészítmények alkalmasak szignifikáns, altípus-specifikus antipneumococcus poliszacharid immunválasz fokozására 2–3 hónapos majomkölykök esetében, Pn6B-Ps–OPMC, Pn14-Ps–OMPC, Pn19F-Ps–OMPC és Pn23F-Ps–OMPC esetében. A Pn-Ps–OMPC konjugátum vakcina esetében még azt is tapasztaltuk, hogy az T-sejtfüggő athymusos egerek esetében.

A leírásból nyilvánvaló, hogy más olyan poliszacharidok, amelyek a leírásban definiált tulajdonságokkal rendelkeznek, valamint más eljárások is, amelyek alkalmasak az ilyen tulajdonságú Ps poliszacharidok előállítására, felhasználhatók a találmány szerinti konjugátumok előállítására, amely poliszacharidok eltérőek az említett részlegesen hidrolizált és frakcionált pneumococcus poliszacharidoktól. Ezen konjugátumokat szintén felhasználhatjuk más patogén organizmusok által kiváltott betegségek megelőzésére. Így például a B streptococcus csoport, amely az újszülöttek agyhártyagyulladását váltja ki, a Neisseria meningitidis B vagy C, amely a csecsemőkori agyhártyagyulladást váltja ki vagy az E. coli, amely előidézője a vizeletvezeték-rendszer és más egyéb helyeken bekövetkező fertőzéseknek, szintén alkalmazható poliszacharid forrásként. Ezek a poliszacharidok, valamint a Pn-Ps és ezek kovalens konjugátumai további fontos komponensei különböző vakcinakészítmény kombinációknak. Az ilyen kombinációk például magukban foglalnak immunológiailag hatásos mennyiségben különböző adjuvánsokat, így például a Freunds- vagy Ribi-féle adjuvánsokat vagy immunomodulátor vegyületeket, így például interleukineket, interferonokat (lásd például Market Letter, 1987. november 30., 26–27; Genetic Engineering News, 1988. január, 8. kötet, 23) vagy más további immunogéneket. Egy előnyös kiviteli formánál a készítmény a találmány szerinti konjugátum immunológiailag hatásos mennyiségén túlmenően egy vagy több valamely következő betegség elleni vakcinát is tartalmaz: hepatitis B, hepatitis A, nem A, nem B hepatitis, AIDS, diftéria, szamárköhögés, tetanusz, kanyaró, mumpsz, rubeola, bárányhimlő, gyermekbénulás és Haemophilus influenzae B. Előnyös további vakcinák például a következők: PevaxHIB, Recombivax HB, M-M-R és a trivalens DTP vakcina.

A következő példákkal a korlátozás szándéka nélkül a találmány szerinti megoldásokat illusztráljuk közelebbről.

1. példa

Neisseria meningitidis B11 szerotípus 2 OMPC előállítása

A) Fermentáció

1. Neisseria meningitidis B11 csoport

A Neisseria meningitidis [beszerzése (Dr. M. Artenstein): Walter Reed Army Institute of Reserach (WRAIR), Washington, D.C.] liofilizált tenyészetét tartalmazó csövét kinyitjuk, és Eugonbroth-ot (BBL) adagolunk hozzá. A tenyészetet Mueller Hinton agarra visszük, és 37 °C hőmérsékleten 5% CO_2 mellett 36 órán át inkubáljuk, majd a tenyészetet begyűjtjük 10% fölözött tejet tartalmazó közegbe (Difco), majd alikvot részeket fagyasztunk –70 °C hőmérsékleten. Az organizmust specifikus antiszérummal (WRAIR) és típusszérummal (Difco) végzett agglutinációval igazoljuk.

A második passzálás tenyészeteket tartalmazó csöveket felolvasztjuk, és 10 Columbia Sheep Blood agarlemezekre (CBAB-BBL) csíkozzuk. A lemezeket 37 °C hőmérsékleten 5% CO_2-tartalomnál 18 órán át inkubáljuk, majd a tenyészeteket 100 ml 10%-os fölözött tejet tartalmazó közegbe gyűjtjük, 0,5 ml-es alikvot részeket veszünk, és –70 °C-on megfagyasztjuk. Az organizmusokat specifikus antiszérummal végzett agglutinációval, cukorfermentációval és gramfestéssel azonosítjuk.

Az ebből a szakaszból származó tenyészeteket tartalmazó csöveket felolvasztjuk, Mueller–Hinton Broth tápközeggel hígítjuk, és 40 Mueller–Hinton agarlemezekre csíkozzuk. A lemezeket 37 °C hőmérsékleten 6% CO_2-tartalomnál 18 órán át inkubáljuk, majd a tenyészeteket 17 ml 10% fölözött tejet tartalmazó közegben gyűjtjük, 0,3 ml-es alikvot részeket veszünk, és –70 °C-on fagyasztjuk. Az organizmusokat gramfestéssel, specifikus antiszérummal végzett agglutinációval és oxidáztesztte azonosítjuk.

2. A sejtpaszta fermentálása és összegyűjtése

a) Inokulum kifejlesztés

Az inokulumok tenyésztését Neisseria meningitidis B csoport, G–11-et tartalmazó fagyasztott cső (4. szakasz) felhasználásával végezzük. 10 Mueller–Hinton agar ferde tenyészeteket inokulálunk, és hatot körülbelül 18 óra elteltével begyűjtünk, és ezeket alkalmazzuk inokumlátumként 3×250 ml Gotschlich-féle élesztődializátumhoz 6,35 pH-jú közegben. Az OD_{660}-értéket 0,18-ra beállítjuk, és addig inkubáljuk, amíg az OD_{660} értéke 1 és 1,8 közötti érték lesz. 1 ml ilyen tenyészetet alkalmazunk ezután 5×2 l-es Erlenmeyer-lombikok (mindegyike 1 l közeget tartalmaz, lásd alább) inokulálására, és a lombikokat 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk 200 fordulat/perc működésű rázóberendezésen. Az OD-értékeket óránként mutatjuk ki az inokulálást követően. Ily módon 4 l tenyészetet nyerünk, és az OD_{660} értéke 1,29.

70 literes oltófermentáló: körülbelül 4 l oltótenyészetet alkalmazunk a steril, 70 l-es fermentáló inokulálására, amely 40 l komplett előállítási közeget tartalmaz (lásd alább). Reakciókörülmények a 70 l-es fermentálóhoz: 37 °C, 185 fordulat/perc, 10 l/perc levegőöblítéssel, konstans pH-szabályozás pH=7-nél 2 órán át. Ezen eljárásnál a végső OD_{660} értéke 0,732 2 óra után.

800 l-es termelőfermentor: körülbelül 40 l oltótenyészetet alkalmazunk a steril 800 l-es fermentor inokulálására, amely 568,2 l komplett előállítási közeget tartalmaz (lásd alább). A reakciókörülmények a következők: 37 °C, 100 fordulat/perc, 60 l/perc levegőöblí-

téssel és pH-szabályozás pH=7 értéken. Ennél a műveletnél az OD-érték 5,58 13 órával az inokulálás után.

3. Komplett közegek az Erlenmeyer-lombikokhoz és 70 és 800 l-es fermentorokhoz:

A frakció

L-glutaminsav	1,5 g/l
Nátrium-klorid, vízmentes	6,0 g/l
Na_2HPO_4, vízmentes	2,5 g/l
NH_4Cl	1,25 g/l
KCl	0,09 g/l
L-cisztein HCl	0,02 g/l

B frakció (Gotschlich-féle élesztődializátum)

1280 g Difco élesztőextraktumot feloldunk 6,4 l desztillált vízben, az oldatot 2 Amicon DC–30 üreges szálas dializisegységben dializáljuk 3 H10Sm töltet alkalmazásával. 384 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-t és 3200 g dextrózt feloldunk a dializátumban, és az össztérfogatot desztillált vízzel 15 l-re egészítjük ki. A pH értékét nátrium-hidroxiddal 7,4-re beállítjuk, az anyagot sterilizáljuk 0,22 µ-os szűrőn való átengedéssel, és az A frakciót tartalmazó fermentorba adagoljuk.

Az Erlenmeyer-lombikhoz 1 l A frakciót és 25 ml B frakciót keverünk össze, és a pH értékét nátrium-hidroxiddal 7–7,2 közötti értékre beállítjuk.

A 70 l-es fermentorhoz 41,8 l A frakciót és 900 ml B frakciót adagolunk, és a pH értékét nátrium-hidroxiddal 7–7,2 közötti értékre beállítjuk.

A 800 l-es fermentorhoz 553 l A frakciót és 15 l B frakciót elkeverünk, és a pH értékét 7,1–7,2 közötti értékre beállítjuk nátrium-hidroxiddal.

b) Begyűjtés és inaktiválás

A fermentációs művelet befejezése után fenolt adagolunk egy külön tartályba, amelyhez ezután a sejt-húslevest adagoljuk, ily módon körülbelül 0,5%-os végső fenolkoncentrációt kapunk. Ezt az anyagot ezután szobahőmérsékleten tartjuk enyhe keverés közben, amíg a tenyészet tovább már nem élő (körülbelül 24 óra).

c) Centrifugálás

Körülbelül 24 óra után 4 °C hőmérsékleten 614,4 l inaktivált folyékony tenyészetet centrifugálunk Sharples folyamatos áramlásos centrifugálással. A kapott sejtpaszta tömege a fenolos kezelés után 3,875 g. A fenollal inaktivált fermentációs levet diaszűréssel gyűjtjük be, mint azt később ismertetjük.

B) OMPC-izolálás

1. lépés

Koncentrálás és diaszűrés

A fenollal inaktivált tenyészetet körülbelül 300 l-re töményítjük, és sterilen desztillált vízzel 0,2 µm-es üreges, szálas szűrő alkalmazásával (ENKA) diaszűrjük.

2. lépés

Extrakció

A betöményített, diaszűrt sejtekkel azonos térfogatú 2X TED-puffert adagolunk (0,1 mol TRIS, 0,01 mol EDTA-puffer, pH 8,5, 0,5% nátrium-dezoxikolát). A szuszpenziót egy szabályozott hőmérsékletű tankba visszük az OMPC extrakciója céljából, és 56 °C hőmérsékleten 30 percen át keverjük. Az extraktumot ezután körülbelül 18 000 fordulat/perccel Sharples folyamatos áramlásos centrifugában centrifugáljuk körülbelül 80 ml/perc áramlási sebesség mellett 4 °C hőmérsékleten. A kapott viszkózus felülúszó folyadékot ezután elválasztjuk, és 4 °C hőmérsékleten tároljuk. Az extrahált sejtpelleteket a fentiek szerinti TED-puferrel ismételten extraháljuk. A felülúszó folyadékot összegyűjtjük, és 4 °C-on tároljuk.

3. lépés

Betöményítés ultraszűréssel

Az összegyűjtött extraktumokat egy szabályozott hőmérsékletű edénybe adagoljuk, amelyet egy AG-Tech 0,1 µm poliszulfon szűrőhöz kapcsolunk. Az extraktum hőmérsékletét a tartályban 25 °C hőmérsékleten tartjuk az egész betöményítési lépés alatt. A mintát 10-szer töményítjük be, körülbelül $75–166 \times 10^3$ Pa membránok közötti nyomásértéken.

4. lépés

Az OMPC kinyerése és mosása

A 3. lépés szűrletét körülbelül 160 000 G (35 000 fordulat/perc) mellett körülbelül 70 °C hőmérsékleten folyamatos áramlásos centrifugában centrifugáljuk 300–500 ml/perc áramlási sebesség mellett, és a felülúszó folyadékot eldobjuk.

Az OMPC-pelleteket TED-pufferben (190 ml puffer; 20 ml/g pellet) szuszpendáljuk, és a második és negyedik lépéseket kétszer megismételjük (a harmadik lépést kihagyjuk).

5. lépés

Az OMPC-termék kinyerése

A 4. lépés szerint nyert pelleteket mossuk, majd 100 ml desztillált vízben szuszpendáljuk üvegbot és Dounce-homogenizátor alkalmazásával a tökéletes szuszpenzió biztosítása érdekében. A vizes OMPC szuszpenziót ezután szűréssel sterilizáljuk 0,27 µm-es szűrőn való átengedéssel, és a TED-puffert vízzel helyettesítve az anyagot diaszűrjük, steril desztillált vízzel szemben 0,1 µm átmérőjű szálasanyag szűrőn.

2. példa

OMPC-alegység tisztítása: tisztított MIEP előállítása OMPC-ből vagy rekombináns sejtekből poliakrilamid gél elektroforézissel

Akrilamid/BIS (37,5:1) gélt alkalmazunk $18 \times 14 \times 3$ mm-es vastagságban. A rétegezett gél 4% poliakrilamid, és az elválasztó gél 12% poliakrilamid gél, körülbelül 50 µg OMPC proteint vagy rekombináns gazdasejt proteint alkalmazunk a gélre. 1 ml OMPC-t adagolunk 0,5 ml pufferoldathoz (4% glicerin, 300 mmol DTT, 10 mmol TRIS, 0,01% brómfenolkék, pH 7). A keveréket 105 °C hőmérsékleten 20 percen át melegítjük, majd hagyjuk szobahőmérsékletre lehűlni, mielőtt a gélhez adagoljuk. A gélt 200–400 mA mellett hűtés közben futtatjuk, amíg a brómfenolkék eléri a gél alját. A géloszlopból egy függőleges csíkot kivágunk (1–2 cm széles), és Coomassie/réz(II)-acetáttal (0,1%) megfestjük. A csíkokat ezután színtelenítjük, amíg a MIEP sáv (körülbelül 38 KD) láthatóvá válik. A csíkot ezután visszahelyezzük az eredeti gélhelyzetbe, és a MIEP területet kivágjuk csontkaparó segítségével.

A kivágott területet kis kockákra daraboljuk (körülbelül 5 mm), és 0,01 molos TRIS pufferoldattal,

pH=8,1, eluáljuk. Két eluációs ciklus után az eluátumot megvizsgáljuk tisztaságra SDS-PAGE alkalmazásával. Az eluátumokat ezután egyesítjük, és 48 órán át 60 mmólos ammónia-hangysav eleggyel pH=10 értéknél dializáljuk. Az eluált proteint 50%-os vizes ecetsavval szemben is dializálhatjuk. A dialízis után az eluált proteint szárazra pároljuk, a kapott anyagot még tovább tisztítjuk PD10 osztályozó oszlopon (Pharmacia, Piscataway, NJ) való átengedéssel, majd szobahőmérsékleten tároljuk.

3. példa

Streptococcus pneumoniae altípusok tenyésztése és a nyers Pn-Ps izolálása

I. Pneumococcus tenyésztése

A pneumococcusok tenyésztése a szakterületen ismert [Chase, M. W., Methods of Immunology and Immunochemistry, *1*, 52 (1967)]. A pneumococcus altípusok izolátumai beszerezhetők az ATCC-nél. A baktériumokat tokozott, nem mozgékony, Gram-pozitív, lándzsa alakú diplococcusokként azonosítottuk, amelyek vér-agaron α-hemoritikusak. Az altípusokat a Quellingreakció alapján specifikus antiszérumok alkalmazásával különböztetjük meg. A mester és törzs ojtott tenyészeteket előnyösen liofilizált állapotban vagy 8 °C hőmérséklet alatt tartjuk. Egy előnyös tenyésztési módszernél a törzstenyészetet Heart Infusion Broth tápközeggel elkeverjük, Heart Infusion Agarra visszük, amely 10% defibrinált nyúlvért tartalmaz, és 37±2 °C hőmérsékleten körülbelül 18 órán át inkubáljuk.

A lemezen kialakuló tenyészetet ismételten Heart Infusion Broth tápközegben szuszpendáljuk, a reszuszpendált tenyészet alikvot részét használjuk 100 ml Heart Infusion Broth tápközeget tartalmazó 10%-os defibrinált nyúlvér inokulálására, amelyet mint stacioner tenyészetet körülbelül 18 órán át 37±2 °C hőmérsékleten inkubálunk. 100 ml folyósított tenyészetet tisztaságra ellenőrzünk a Gram-színezett kenetmikroszkópos vizsgálatával, és Heart Infusion Blood agarlemezeken tenyésztjük. A folyósított tenyészetet (oltó tenyészet) 2–8 °C hőmérsékleten 14 napon át tárolhatjuk vagy azonnal felhasználjuk. 21-es Erlenmeyer-lombikokat vagy más alkalmas edényeket, amelyek Pneumococcus Inoculum Mediumot (YUF) és 25 mg/l mennyiségben dextrózt tartalmaznak, az említett oltóanyaggal inokulálunk, és stacioner körülmények között 8–24 órán át 37±2 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Az inkubációs periódus a tenyésztett Streptococcus pneumoniae típusától függ. A fermentáció pH-értékét úgy állítjuk be, hogy 6–7,2 közötti pH-tartományt tudjunk tartani periodikusan 12%-os nátrium-hidrogén-karbonát-oldatot adagolva addig, amíg az optikai sűrűség értéke 1,5–4 közötti érték lesz. Az optikai sűrűséget 660 nm-nél vizsgáljuk, A tenyészetből egy mintát mikroszkopikusan vizsgálunk, és elvégezzük a szerológiai agglutinációs reakciót a tisztaság ellenőrzésére. A tenyészetet ekkor egy ojtófermenterbe visszük, amely 40 l pneumococcus fermentáló tápközeget tartalmaz, amely desztillált vízből és a következő száraz komponensekből áll: pneumococcus ojtóközeg (YUF), éleszőextraktum ultrafiltrátum, UCON, valamint dextróz körülbelül 25 g/l mennyiségben. A tenyészetet 37±2 °C hőmérsékleten inkubáljuk enyhe keverés közben 2–12 órán át. A pH értékét 6–7,2 közötti értéken tartjuk nátrium-hidroxid-oldat esetenkénti adagolásával. A fermentor 525 l pneumococcus fermentálóközeget tartalmaz, amely a következőkből áll: desztillált víz, a pneumococcus termelőközeg (YUF) száraz komponensei, élesztőextraktum ultrafiltrátum, UCON és körülbelül 25 mg/l dextróz, ezt a közeget körülbelül 50 l 2–12 órás ojtótenyészettel inokuláljuk. A tenyészetet ezután 37±2 °C hőmérsékleten inkubáljuk, enyhe keverés közben 6–30 órán át attól függően, hogy melyik típust növesztjük. A pH értékét 6–7,2 között tartjuk periodikusan nátrium-hidroxid-oldatot adagolva. A fermentáció lefutását az optikai sűrűség meghatározásával követjük, és akkor fejezzük be, ha a dextróz teljes mértékben felhasználódott, azaz jelzi, hogy már a pH-érték nem változik.

A patogén organizmusokat közvetlenül azután elpusztítjuk, miután a fermentációt befejeztük. Ezt körülbelül 1% mennyiségű fenol adagolásával végezzük, és körülbelül 2–12 órán át hagyjuk hatni szobahőmérsékleten.

II. A nyers Pn-Ps izolálása

Az elpusztított tenyészethez denaturált alkoholt adagolunk elegendő mennyiségben ahhoz, hogy a sejttörmeléket és a nukleinsavakat kicsapja, ezeket aztán centrifugálással eltávolítjuk. A nyers poliszacharidot ezután a felülúszó folyadékból további denaturált etanol adagolásával kicsapjuk. A szilárd anyagot centrifugálással összegyűjtjük, és a felülúszó folyadékot eldobjuk.

A nukleinsav-szennyezést csökkenthetjük a poliszacharid semleges vizes oldatban, így például 1–5%-os nátrium-acetátban való oldásával, vagy használhatunk 0,05 mólos foszfátpuffert is, amelyhez nukleázt adagolunk, és körülbelül 0,01 mol magnézium-kloridot. Körülbelül 60–120 perc elteltével 36 °C hőmérsékleten a pH-t 8-ra beállítjuk, és proteázt, így például tripszint adagolunk a proteinszerű szennyeződések emésztésére.

További szennyeződéseket a poliszacharid nátrium-acetátos oldatból denaturált alkohollal vagy izopropanollal való ismételt kicsapásával távolíthatunk el, majd a kicsapott anyagot desztillált vízben oldjuk. Cetrimonium-bromid 8 °C hőmérsékleten való adagolásával további szennyezéseket tudunk kicsapni, amelyeket azután centrifugálással távolítunk el. Nátrium-acetát, majd denaturált alkohol vagy izopropanol alikvot részének adagolásával további szennyeződések is eltávolíthatók. A poliszacharidot további alkohol adagolásával, centrifugálással nyerjük ki. A csapadékot abszolút etanollal addig mossuk, amíg fehér poranyagot nyerünk. A poliszacharidot szűréssel elválasztjuk, abszolút etanollal, majd acetonnal mossuk, vákuumban szárítjuk, így nyerjük a nyers Pn-Ps poliszacharidot por formájában.

4. példa

Részlegesen hidrolizált, tisztított Pn6B-ps előállítása

1. Termikus hidrolízis: 3 g nyers Pn-Ps port 1200 ml sóoldatban (0,9%-os NaCl-t oldunk keverés

közben szobahőmérsékleten 4 órán át, majd 4 °C hőmérsékleten 1 éjszakán át tároljuk. Az oldatot ezután visszafolyatás közben 100 °C hőmérsékleten 24 órán át hidrolizáljuk, majd szobahőmérsékletre lehűtjük. Ezután 59,7 g nátrium-acetátot adagolunk hozzá úgy, hogy a végső koncentráció 3 t/tf% legyen.

2. Szerológiai próba: izopropanolos (IPA) frakcionálási félüzemi vizsgálat, valamint antitest-irányított végpont Nephelose-vizsgálat segítségével, amelyet 10 ml mennyiségű mintán végeztünk, kimutattuk, hogy a Pn6B-Ps 40–50% IPA-nál csapódna ki.

3. Első IPA-adagolás: a hidrolizált mintát (előző 1. lépés szerinti, 1200 ml térfogat) 43,5% IPA-tartalmúvá alakítjuk 932 ml IPA adagolásával, amelyet szobahőmérsékleten keverés közben cseppenként adagolunk. A mintát ezután 15–30 percen át keverjük, majd 11 000 G mellett 30 percen át centrifugáljuk (Beckman JA–10 rotor, 8000 fordulat/perc, 20 °C). A hulladékpelletet abszolút etanollal elkeverjük 250 ml-es Omnimix edényben, majd 60 ml-es üvegszűrős tölcséren átmossuk. A csapadékot közvetlenül a tölcséren abszolút etanollal, majd acetonnal mossuk, vákuumban $CaCl_2$ felett szobahőmérsékleten szárítjuk az analízis előkészítéséhez.

4. Második IPA-adagolás és a termék kinyerése: a 43,5%-os IPA felülúszó folyadékot (az előző 3. lépésből, 2020 ml térfogat) 93,5 ml-es IPA keverés közben cseppenként történő adagolásával 46,0%-osra beállítunk, majd a mintát tároljuk, majd centrifugáljuk a 3. lépésben leírtak szerint. A pelletet pépesítjük, elválasztjuk, mossuk, és a 3. lépésben leírtak szerint szárítjuk. A kapott Pn6B-Ps mennyisége 1650 mg, K_d-értéke 0,62 és foszfortartalma 3,3%.

5. példa

S. pneumoniae 6-OMPC konjugátum, Pn6B-Ps–OMPC

A) Dowex 50X2 tetrabutil-ammónium gyanta előállítása [Dowex 50 (Bu_4N^+)]

Dowex 50X2 típusú gyantát (72 g, 200–400 mesh, H^+ forma) vízben szuszpendálunk, egy oszlopra adagoljuk, majd egymást követően vízzel, 6 n sósavval, majd ismételten vízzel mossuk, amíg az elfolyó folyadék pH-papírral semleges értéket mutat. Ezután 10%-os vizes tetrabutil-ammónium-hidroxid-oldatot engedünk át az oszlopon addig, amíg az elfolyó folyadék erősen alkalikus lesz. Végül vizet folyatunk keresztül az oszlopon, amíg az elfolyó folyadék ismételten semleges lesz.

B) Pn6B(Bu_4N^+)

600 mg méretcsökkentett és frakcionált Pn6B-Ps-t (lásd I. táblázat Pn6B-Ps/1 minta) feloldunk 60 ml steril desztillált vízben, majd az oldatot mágneses keverővel addig keverjük, amíg a szilárd anyag teljesen feloldódik (körülbelül 1,5 óra). A poliszacharid-oldatot ezután az átöblített gyantára adagoljuk, és hagyjuk a gyantaágyon a gravitációs erő alapján átfolyni (4,5 óra). Az oszlopot ezután 10–12 ml vízzel átmossuk, az eluátumokat egyesítjük, liofilizáljuk, és ily módon 640 mg száraz, Pn6B-Ps tetrabutil-N-butil-ammónium-sót nyerünk [Pn6B(n-Bu_4N^+)].

C) Pn6B–BuA_2

640 mg előzőek szerint előállított Pn6B(N-Bu_4N^+)-t feloldunk 24 ml dimetil-szulfoxidban (DMSO), és mágneses keverővel 30 percen át keverjük, amikor is a szilárd anyag teljesen oldatba megy. Az így kapott keverékhez 44,2 mg 1,1'-karbonil-diimidazolt adagolunk, és a keveréket szobahőmérsékleten 60 percen át keverjük. Egy külön lombikban feloldunk 1,022 g bután-diamin-dihidrokloridot (BuA_2.2HCl) 16 ml vízben, 10 n NaOH adagolásával meglúgosítjuk (pH=10,2), a kapott oldatot 0,2 μm-es steril szűrőn átszűrjük, és jégfürdőn lehűtjük. A tárolt DMSO keveréket, amely az aktivált poliszacharidot tartalmazza, ezután a hideg $BuAH_2$.2HCl oldathoz adagoljuk lassú áramban, majd a kapott oldatot 0 °C-on 15 percen át keverjük. A keveréket ezután hagyjuk szobahőmérsékletre felmelegedni, és egy további órán át keverjük, majd dialíziscsőbe adagoljuk, és 4 °C hőmérsékleten a következőkkel szemben dializáljuk: 1. 15 l 0,1 mol, pH=7 nátrium-foszfát-puffer 6 órán át; 2. 15 l 0,01 mol, pH=7 nátrium-foszfát-puffer 12 órán át; 3. 15 l 0,01 mol, pH=7 nátrium-foszfát-puffer 9 órán át; 4. 15 l desztillált víz 17,5 órán át. A dialíziscső tartalmát ezután liofilizáljuk, ily módon 222 mg Pn6B-1,4-bután-diamint (Pn6B–BuA_2) nyerünk. Az így kapott anyag 5 mg-ját NMR-spektroszkópiával vizsgáljuk (300 MHz, D_2O), és 22 diamincsoportot mutatunk ki 100 Pn6B-Ps ismétlődő monomer egységre számolva, a Pn6B-Ps bután-diamin-metilén- és ramnóz-metil-protonok rezonanciáinak integráljait összehasonlítva.

Pn6B–BuA_2–BrAc

210 mg Pn6B–BuA_2-t feloldunk pH=9,04-nél 2 l 0,1 mólos Kolthoff borát-foszfát-pufferben, majd a keveréket mágnesesen keverjük 30 percen át az oldatba vitel érdekében. Az így kapott vizes oldathoz ezután 210 mg p-nitro-fenil-bróm-acetátot adagolunk 2,6 ml acetonitrilben oldva, és a keveréket 1 éjszakán át (20 óra, 4 °C) keverjük. Az oldatot ezután dialíziscsőbe visszük, és 4 °C hőmérsékleten a következőkkel szemben dializáljuk: 1. 15 l steril desztillált víz 12,3 órán át; 2. 15 l steril desztillált víz 8,25 órán át; 3. 15 l steril desztillált víz 5,5 órán át. A kapott anyagból 1,7 ml-t kiveszünk vizsgálat céljára (NMR és HPSEC-univerzális kalibrálás vagy molekulatméret-analízis), majd 0,449 g szárított, pH=8 foszfát-puffer sót (előállítása 0,1 mólos, pH=8 nátrium-foszfát-oldat liofilizálásával) adagolunk hozzá. A teljes oldódás után (körülbelül 30 perc) az oldatot steril 0,2 μm-es szűrőn szűrjük, amikor is a Pn6B–BuA_2BrAc pH=8 oldatát nyerjük.

Pn6B–OMPC

40 ml (4,5 mg/ml) steril OMPC-t ultracentrifugálással pelletezünk (4 °C, 43 K fordulat/perc, 2 óra) négy 10 ml-es centrifugálócsőben. Mindegyik pelletet ezután 3 ml sterilen szűrt (0,22 μm) tiolező keverékben szuszpendáljuk, amely a következőket tartalmazza: 164 mg N-acetil-homocisztein-tiolakton-hidroklorid, 255 mg etilén-diamin-tetraecetsav-dinátrium-só, 53 mg ditiotreitol, 30 ml $Na_2B_4O_7$ pufferben, pH=11,09. A reszuszpendált pelleteket ezután homogenizáljuk (Dounce), egyesítjük, az edényt gáztalanítjuk, nitrogén-

gázzal 1 éjszakán át szobahőmérsékleten (19 óra) öblítjük, majd a kapott oldatot három ultracentrifugálócsőbe szétosztjuk, rárétegezünk 1 mol KH_2PO_4-et, és a pelletezett proteint (4 °C, 43 K fordulat/perc, 2 óra). A pelleteket ezután ismételten 0,1 mólos nátrium-foszfátban reszuszpendáljuk pH=8 puffer (30 ml), homogenizáljuk (Dounce), majd ismételten pelletezzük (4 °C, 43 K fordulat/perc, 2 óra). Az így kapott steril proteinpelletet ezután reszuszpendáljuk a szűrt Pn6B–BuA_2–BrAc-oldatban. Ezután azonnal Ellman-féle tesztet végzünk, és kimutatjuk, hogy az SH mennyisége, koncentrációja 34 μmol. A reakciókeveréket ezután gáztalanítjuk, nitrogéngázzal átöblítjük, és szobahőmérsékleten 91 órán át állni hagyjuk.

A proteint ezután 1 ml 0,22 μm-es steril szűrőn átszűrt, következőket tartalmazó oldattal kezeljük: 75 mg N-etil-maleimid, 5 ml pH=8, 0,1 mol nátrium-foszfát-pufferben. A keveréket 4 órán át szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd ezt követően hozzáadunk 300 μl N-acetil-ciszteamint (0,22 μm steril szűrőn szűrve), és a kapott oldatot további 19,5 órán át állni hagyjuk.

Az így kezelt, steril konjugátumot ezután négy centrifugacsőben szétosztjuk, hozzáadunk 0,1 mol (pH=7) nátrium-foszfát-puffert, és ultracentrifugáljuk (4 °C, 43 K fordulat/perc, 2 óra), majd ismételten szuszpendáljuk, és homogenizáljuk (Dounce) steril, pH=7, 0,1 mólos $NaPO_4$-pufferben (42 ml). Ezt követően ismételten centrifugálást végzünk, majd a pelleteket reszuszpendáljuk Dounce-homogenizálóban, összesen 50 ml steril desztillált vízben. 4 °C hőmérsékleten, 17 órán át való állás után a konjugátumkészítményt 1000 fordulat/perc mellett 3,5 percen át TH 4 rotorral TJ–6 típusú centrifugában centrifugáljuk, és a kis mennyiségű szedimentumot eltávolítjuk. A végső szuszpenzió formájú konjugátumterméket a következőkre vizsgáljuk: protein (Lowry), Pn6B poliszacharid (fenol/kénsav), nem konjugált poliszacharid (méretkizárásos kromatográfia, sebességnefelometria), aminosavak (aminosav-analízis). A kapott eredmények a következők:

Pn6B poliszacharid	0,33 mg/ml
Protein	2,2 mg/ml
Pn6B-Ps/OMPC	0,15
Szabad Pn6B-Ps	<5 szakasz%
S-karboxi-metil-homocisztein/lizin	7,7%
S-kartoxi-metil-ciszteamin/lizin	1,6%

6. példa

Részlegesen hidrolizált, tisztított Pn14-Ps előállítása

1. Anioncserélő gyantával végzett kezelés: 2,81 g Pn14-Ps poranyagot feloldunk 1124 ml desztillált vízben keverés közben szobahőmérsékleten 4 órán át, majd 4 °C hőmérsékleten 1 éjszakán át állni hagyjuk. Az oldatot ezután 60 g DE52-re visszük (Whatman, dietil-amino-etil-cellulóz), amelyet előzőleg körülbelül 15 órán át pH=5–6 közötti értéken desztillált vízben előduzzasztottunk. Az iszapot gyengén rázzuk egy rázóberendezés segítségével szobahőmérsékleten körülbelül 15 órán át, majd Beckman JA–10 berendezéssel 5000 fordulat/perc mellett 15 percen át 20 °C hőmérsékleten centrifugáljuk. A felülúszó folyadékot szinterelt üvegszűrőn (150 ml, közepes porozitás) átszűrjük, majd egy 2 l-es, oldalnyakkal ellátott lombikba adagoljuk.

2. Ultrahangos hidrolízis: az előző 1. lépés szerint nyert, DE52-kezelt Pn14-Ps-t (1100 ml) plasztik edényben jégfürdőn ultrahanggal kezelünk, Branson Sonifier készülékkel (0,5 inch próba, 8-as állás) 2 percen át. A mintát ezután hagyjuk körülbelül 15 percen át hűlni, majd a viszkozitást meghatározzuk, majd ismételten 1 perces intervallumokban ultrahangkezelést végzünk. A viszkozitás végpontját, 1,096 cSt értéket az utolsó ultrahangos kezelés után érjük el. A hidrolizált mintát ezután szobahőmérsékletre beállítjuk, és 18 g nátrium-acetát reagenst adunk hozzá, és így a végső koncentrációt 1 t/tf% értékre beállítjuk.

3. Szerológiai vizsgálat: izopropanolos (IPA) frakcionálási félüzemi vizsgálatot és antitest-irányított végpont nefelóz vizsgálatot végzünk 10 ml mennyiségű mintán, ez mutatja, hogy a Pn14-Ps 35–45% IPA-nál csapódna ki.

4. Első IPA-adagolás: az előző 2. lépés szerint nyert hidrolizált mintához (1090 ml) 706 ml IPA-t adagolunk cseppenként, keverés közben szobahőmérsékleten, így 39,3% IPA-koncentrációt nyerünk. A mintát ezután 15–30 percen át keverjük, majd 11 000 G mellett 30 percen át centrifugáljuk (Beckman JA–10 rotor, 8000 fordulat/perc, 20 °C), majd a felülúszó folyadékot dekantáljuk. A hulladékpelletet abszolút etanollal 200 ml-es Omnimix edényben elkeverjük, majd 60 ml-es szinterelt üvegtölcséren összegyűjtjük. A csapadékot közvetlenül a tölcséren mossuk vízmentes etanollal, majd acetonnal, vákuumban $CaCl_2$-n szobahőmérsékleten szárítjuk.

5. Második IPA-adagolás és a termék kinyerése: az előző 4. lépés szerint nyert 39,3%-os IPA felülúszó folyadékhoz (1712 ml) 73,5 ml IPA-t adagolunk cseppenként, keverés közben szobahőmérsékleten, és így 41,8%-os IPA-oldatot nyerünk. A mintát ezután állni hagyjuk, majd a 4. lépésben leírtak szerint centrifugáljuk, majd szintén a 4. lépésben leírtak szerint pépesítjük, összegyűjtjük, mossuk, és szárítjuk. A kapott Pn14-Ps termék tömege 1399 mg.

6. Dialízis és liofilizálás: 1385,6 mg fenti, 5. lépés szerint nyert terméket feloldunk 554 ml desztillált vízben szobahőmérsékleten, 2–3 órán át. Az így kapott 2,5 mg/ml koncentrációjú oldatot dializiscsőbe visszük (1200 M_W cutoff érték, 45 mm), és desztillált vízzel szemben 27 órán át kétszeri desztillált víz cserével dializáljuk. A dializált mintát ezután liofilizáló edénybe visszük, gyors fagyasztással szárazjég:metanol fürdőn megfagyasztjuk, és Virtis (Freezemobile) típusú liofilizálóval két és fél napon át liofilizáljuk, amíg teljesen száraz lesz. Ily módon 1326,8 g Pn14-Ps terméket nyerünk, amelynek K_d-értéke 0,56.

A fent leírtak alapján szakember számára nyilvánvaló, hogy más semleges Pn-Ps altípusokat, így például Pn7F-Ps-t szintén előállíthatunk, és a Pn14-Ps-nél leírtakhoz hasonlóan konjugálhatjuk.

7. példa

Külső membránprotein-komplex konjugálása pneumococcus 14 poliszachariddal, Pn14-Ps–OMPC

a) A Pn14-Ps 1,4-bután-diamin-származékának előállítása (14-BuA_2)

400 mg Pn14-Ps-t vákuumban P_2O_5 felett 3 órán át szárítunk, majd elkeverjük 26 ml dimetil-szulfoxiddal (DMSO), és 0,75 órán át keverjük, hogy feloldódjon. Az oldathoz azután 62 mg karbonil-diimidazolt adunk, és a kapott oldatot szobahőmérsékleten 80 percen át keverjük.

1,060 g 1,4-bután-diamin-dihidrokloridot (BuA_2·2HCl) feloldunk 38,5 ml vízben, és a pH értékét 2,5 n NaOH-val 10,20-ra beállítjuk. Az oldatot ezután Millex 0,2 μm GV szűrőn átszűrjük, és jégfürdőn lehűtjük.

Az előzőek szerint nyert DMSO-oldatot ezután elkeverjük a hideg BuA_2-oldattal, és további 10 percen át jégfürdőn keverjük. Az oldatot ezután szobahőmérsékleten 50 percen át állni hagyjuk, majd két 12" hosszúságú Spectrapor 2 dialíziscsőbe adagoljuk, a folyadék tetejétől számítva 1 cm-re lezárjuk, és a következőkkel szemben dializáljuk: 1. 15 l pH=7, 0,1 mólos nátrium-foszfát-puffer 16,5 órán át, 2. 15 l pH=7, 0,1 mólos nátrium-foszfát-puffer 8 órán át, 3. 15 l pH=7, 0,1 mólos nátrium-foszfát-puffer 8 órán át, 4. 15 l víz 17,5 órán át. Az anyagot ezután liofilizáljuk, amikor is 210 mg Pn14-Ps 1,4-bután-diamin-származékot nyerünk (Pn14-BuA_2).

A kapott anyag 5 mg-os mintáját NMR-spektroszkópiával vizsgálva megállapítottuk, hogy 100 ismétlődő poliszacharid egységre számolva körülbelül 31 bután-diamin-csoportot tartalmaz, ezt a Pn14-Ps bután-diamin-metilén- és N-acetil-metil-rezonanciák integráljainak összehasonlításával határoztuk meg.

b) A Pn14-Ps bróm-acetilezett bután-diamin-származékának előállítása (Pn14–BuA_2–BrAc)

210 mg Pn14–BuA_2-t elkeverünk 36 ml 0,1 mólos pH=9 borát-foszfát-pufferrel, és 2,5 órán át keverjük, hogy oldatot nyerjünk. Ezután 195 mg p-nitro-fenil-bróm-acetátot feloldunk 4 ml acetonitrilben, és az előző oldathoz adagoljuk, a kapott keveréket 21 órán át 4 °C hőmérsékleten keverjük. Az anyagot ezután Spectrapor 2 csőben a következőkkel szemben dializáljuk: 1. 15 l desztillált víz 6 órán át, 2. 15 l desztillált víz 14,5 órán át, 3. 15 l víz 6 órán át. A dializált mintából 2 ml-t eltávolítunk vizsgálat céljára, majd hozzáadunk 492 mg szárított, pH=8 foszfátpuffer sót (előállítása 0,1 mólos nátrium-foszfát-puffer, pH=8 liofilizálásával). Az oldatot 0,2 μm Corning-szűrőn átszűrjük, amikor is pH=8 vizes oldatban 43 ml Pn14–BuA_2–BrAc-t nyerünk.

c) Az OMPC és Mn14–BuA_2–BrAc–Ps konjugálása

50 ml OMPC-oldatot (3,2 mg/ml koncentráció) szétosztunk öt db 10 ml-es centrifugálócsőben, és Beckman 80 Ti rotorral 43 000 fordulat/perc mellett 4 °C hőmérsékleten 2 órán át centrifugáljuk. Ezután tiolező keveréket készítünk 300 mg EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav-nátriumsó) és 64 mg ditiotreitol (DTT) 30 ml $Na_2B_4O_7$-pufferben (pH=11) való oldásával. 346 mg N-acetil-homocisztein-tiolaktont adagolunk ezután, és az oldatot 0,2 μm Corning-szűrőn (csésze típus) átszűrjük.

A fentiek szerinti centrifugálásnál kapott pellet mindegyikét 3 ml szűrt tiolező keverékben (összesen 15 ml) szétoszlatjuk, majd Dounce-homogenizálóba visszük, és reszuszpendáljuk. A csöveket átöblítjük 5 ml-es tiolező oldat alkalmazásával. Az öblítési műveletet megismételjük további 5 ml tiolező oldattal. Az öblítőfolyadékokat egyesítjük, Dounce-homogenizálóban homogenizáljuk, és az összes reszuszpendált anyagot (25 ml) 100 ml-es gömblombikba adagoljuk.

A lombikot ezután egy diafragmával lezárjuk, és a levegőt nitrogénnel helyettesítjük Firestone-szelep alkalmazásával, és a reakciókeveréket szétosztjuk 3 centrifugacsőben, mindegyikre 1 mol vizes KH_2PO_4-et adagolunk, és 2 órán át 43 000 fordulat/perc mellett 4 °C hőmérsékleten centrifugáljuk. A felülúszó folyadékokat eltávolítjuk, a pelleteket 0,1 mólos nátrium-foszfátban (pH=8) reszuszpendáljuk, amikor is 30 ml végső reszuszpendált térfogatot nyerünk. Egy második ultracentrifugálást végzünk (2 óra, 4 °C, 43 K fordulat/perc), majd a felülúszó folyadékot eltávolítjuk, a pelleteket Dounce-módszerrel reszuszpendáljuk az előzőek szerint előállított, szűrt Pn14–BuA_2–BrAc-oldatban. Az elvégzett Ellman-vizsgálat kimutatja, hogy az anyag 23 μmol tiolt tartalmaz.

Meg kell jegyezni, hogy a Pn14–BuA_2–BrAc-oldat szűrését közvetlenül a tiolezett protein reszuszpendálása előtt végezzük. A kapott reakciókeveréket (azaz Pn14–BuA_2–BrAc tiolezett OMPC-vel) nitrogénatmoszférában állni hagyjuk, szobahőmérsékleten 114 órán át.

A reakciókeveréket ezután a következőképpen dezaktiváljuk, azaz dezaktiváljuk a Pn14-Ps és OMPC molekularészeken lévő reakcióképes csoportokat: az oldathoz adagolunk 5 ml pH=8, 0,1 mólos nátrium-foszfát-pufferben oldott 75 mg N-etil-maleimidet (NEM), és a keveréket további 22,5 órán át állni hagyjuk.

Az így kezelt 35 ml reakciókeveréket ezután 4 centrifugacsőben elosztjuk, és 43 K fordulat/perccel 2 órán át 4 °C hőmérsékleten centrifugáljuk, a pelleteket 40 ml TED-pufferben reszuszpendáljuk (0,1 mol TRIS, 0,01 mol EDTA, 0,5% DOC, pH=8,5), és szobahőmérsékleten 19 órán át állni hagyjuk. Az oldatot ezután centrifugáljuk (43 K, 2 óra, 4 °C), a pelleteket 40 ml 0,1 mólos, pH=8 nátrium-foszfát-pufferben reszuszpendáljuk, majd ismételten centrifugáljuk (43 K, 2 óra, 4 °C). Az így kapott pelleteket 40 ml vízben reszuszpendáljuk, és 4 °C hőmérsékleten 17 órán át tároljuk. Ezután az anyagot alacsony fordulatszám mellett (1000 fordulat/perc, 3,5 perc) centrifugáljuk, amikor is apró pelleteket nyerünk, amelyeket eldobunk. A felülúszó folyadékot eltávolítjuk, ily módon 43 ml konjugátumot nyerünk, amelynek analitikai jellemzői a következők:

Vizsgálat	*Eredmény*
a) Ps-tartalom	387 mcg/ml
b) Protein	1300 mcg/ml
Ps/protein arány (számított)	0,30
c) Szabad Ps	<5 terület%
d) Aminosav-analízis	
SCMHC/lizin	9,8%
SCMC/lizin	3,5%

8. példa

Pn23F-Ps intermedier előállítása

1. Ultrahangos hidrolízis: 3 g Pn23F-Ps port feloldunk 1200 ml sóoldatban (0,9% NaCl) keverés közben szobahőmérsékleten 4 órán át. A kapott oldatot ezután műanyag edényben jégfürdőn ultrahanggal kezeljük Branson Sonifier berendezéssel (0,5 inch minta, 8-as állás) 3 perces intervallumokon át, összesen 15 percig. A viszkozitást minden intervallum után ellenőrizzük. 15 perc elteltével további 5 perc ultrahangos kezelést végzünk, amikor is 1,206 cSt értékű viszkozitásvégpontot nyerünk. A hidrolizált mintát ezután szobahőmérsékletre beállítjuk, és 58,4 g nátrium-acetátot adagolunk hozzá, így a végső koncentráció 3 t/tf%.

2. Szerológiai próba: izopropanolos (IPA) frakcionálási félüzemi vizsgálatot és antitest-irányított végpont nefelóz vizsgálatot végzünk 10 ml térfogatú mintán, ami azt mutatja, hogy a Pn23F-Ps 35–45% IPA-koncentrációnál csapódna ki.

3. Első IPA-adagolás: az előző 1. lépés szerint előállított hidrolizált mintához (1165 ml) 810 ml IPA-t adagolunk cseppenként keverés közben szobahőmérsékleten, így 41,0% IPA-koncentrációt nyerünk. A mintát 15–30 percen át keverjük, majd 11 000 G mellett 30 percen át centrifugáljuk (Beckman JA–10 rotor, 8000 fordulat/perc, 20 °C), a kapott pelletet abszolút etanollal 250 ml-es Omnimix edényben elkeverjük, majd 60 ml-es szinterelt üvegtölcséren szűrjük, a csapadékot közvetlenül a tölcséren abszolút etanollal, majd acetonnal átmossuk, vákuumban $CaCl_2$ felett szárítjuk szobahőmérsékleten.

4. Második IPA-adagolás és a termék kinyerése: az előző 3. lépés szerinti 41,3%-os IPA felülúszó folyadékhoz (1925 ml) cseppenként keverés közben szobahőmérsékleten 45 ml IPA-t adagolunk, így a koncentráció 43,5% IPA lesz. A mintát ezután állni hagyjuk, majd a 3. lépésben leírtak szerint centrifugáljuk, és szintén a 3. lépésben leírtak szerint a pelletet pépesítjük, szűrjük, mossuk, és szárítjuk. Ily módon 1795 mg Pn23F-Ps terméket nyerünk.

5. Dialízis és liofilizálás: 1779 mg előző 4. lépés szerint nyert Pn-Ps anyagot feloldunk 712 ml desztillált vízben szobahőmérsékleten 3–4 órán át. Az oldatot ezután (2,5 mg/ml) dializiscsőbe visszük (12 000 M_W cutoff érték, 45 mm), és desztillált vízzel szemben 4 °C hőmérsékleten 27 órán át dializáljuk, a dialízis alatt kétszer cseréljük a desztillált vizet. A mintát ezután liofilizáló edénybe visszük, szárazjég/metanol eleggyel gyorsan megfagyasztjuk, majd Virtis (Freezemobile) liofilizáló berendezésben 2–3 napon át liofilizáljuk. Ily módon 1703 mg Ps terméket nyerünk, K_d-értéke 0,60.

9. példa

Külső membránprotein-komplex konjugálása Pn23F-Ps intermedierrel

a) Dowex 50X2 (200–400 mesh) gyanta tetrabutil-ammónium formájának előállítása [Dowex 50 (Bu_4N^+)]

72 g Dowex 50X2 gyantát (200–400 mesh, H^+ forma) vízben szuszpendálunk (vízként a folyamaton végig nem lázkeltő, steril desztillált vizet alkalmazunk), majd a kapott szuszpenziót egy oszlopra visszük, és egymást követően a következőkkel átmossuk: 1. 800 ml víz, 2. 400 ml 6 n sósav, 3. 300 ml víz egész addig, amíg az elfolyó folyadék pH-papírra semleges, 4. 250 g 10%-os vizes tetrabutil-ammónium-hidroxid-oldat egész addig, amíg az elfolyó folyadék erősen alkalikus pH-papírral, 5. 750 ml víz.

b) Pn23F-Ps tetrabutil-ammónium formájának előállítása (Pn23F–Bu_4N^+)

34 ml-es Dowex 50X2 (Bu_4N^+) gyantával töltött oszlopot 70 ml vízzel átmosunk. 450 mg osztályozott Pn23F-Ps-t elkeverünk 50 ml vízzel, és 0,5 órán át keverjük. Ezt az oldatot az oszlopra adagoljuk, és gravitációval hagyjuk átfolyni rajta (körülbelül 2 óra). Ezután az oszlop aljára vákuumot csatlakoztatunk, és az eluálást vákuumban további 1 órán át folytatjuk. Az oszlopot ezután 25 ml vízzel átmossuk, az elfolyó eluátumokat egyesítjük, liofilizáljuk, amikor is 0,5 g Pn23F (Bu_4N^+) sót nyerünk. Ezt vákuumszárítóban P_2O_5 felett körülbelül 17 órán át tároljuk.

c) Pn23F-Ps 1,4-bután-diamin-származékának előállítása (Pn23F–BuA_2)

Az előző b) lépés szerint nyert 0,5 g Pn23F (Bu_4N^+) származékot elkeverjük 25 ml dimetil-szulfoxiddal (DMSO), és 15 percen át teljes oldódásig keverjük. Az oldathoz ezután 22 mg karbonil-diimidazolt (CDI) adagolunk, és szobahőmérsékleten 0,5 órán át keverjük.

Ezután 507 mg 1,4-bután-diamin-dihidrokloridot (BuA_2.2HCl) feloldunk 30 ml vízben, a pH értékét 2,5 n NaOH-val 10,23-ra beállítjuk, majd Millex 0,2 μm GV-szűrőn átszűrjük, és jégfürdőn lehűtjük.

Az előzőek szerint előállított DMSO-oldatot ezután elkeverjük a hideg BuA_2-oldattal, és további 1 órán át keverjük jégfürdőn. Az oldatot ezután szobahőmérsékleten 1 órán át tároljuk, majd az oldatot 2 × 12 col méretű Spectrapor dializációs csőbe adagoljuk, a folyadékfelszín felett 1 cm-rel lezárjuk, és a következőkkel szemben dializáljuk: 1. 15 l pH=7, 0,1 mólos nátrium-foszfát-puffer 16 órán át, 2. 15 l pH=7, 0,01 mólos nátrium-foszfát-puffer 10,5 órán át, 3. 15 l pH=7, 0,01 mólos nátrium-foszfát-puffer 12,5 órán át, 4. 15 l víz 10,5 órán át. A dializátumot ezután liofilizáljuk, amikor is 220 mg 1,4-bután-diamin-származékot nyerünk, pN23F–BuA_2.

A kapott termékből 6,9 mg-ot NMR-spektroszkópiával vizsgálunk, és megállapítjuk, hogy 100 ismétlődő poliszacharid egységre körülbelül 23,5 bután-diamin-csoport jut, ezt a Pn23F poliszacharid bután-diamin-metilén és ramnóz-metil-protonok rezonanciájának integráljait összehasonlítva határoztuk meg.

d) Pn23F-Ps bróm-acetilezett bután-diamin-származékának előállítása (Pn23F–BuA_2–BrAc)

214 mg Pn23F–BuA_2-t elkeverünk 23 ml 0,1 mólos, pH=9 borát-foszfát-pufferrel, és 30 percen át keverjük az oldódásig. Ezután 230 mg p-nitro-fenil-bróm-acetátot adagolunk 60 ml acetonitrilben oldva, a kapott keveréket 23 órán át 4 °C hőmérsékleten keverjük, Spectrapor 2 edényben a következőkkel szemben dializáljuk: 1. 15 l víz 8 órán keresztül, 2. 15 l víz 12 órán át, 3. 15 l víz

6 órán át. A dializátumból 1,5 ml-t vizsgálatra eltávolítunk, majd hozzáadunk 490 mg szárított pH=8 foszfát-puffer sót (előállítása 0,1 mólos, pH=8 nátrium-foszfát-oldatból liofilizálással). Az oldódásig 15 perc szükséges, majd ezt követően az oldatot 0,2 μm Corning-szűrőn szűrjük, amikor is a Pn23F–BuA_2–BrAc vizes oldatot nyerjük, pH=8.

e) OMPC és Pn23F–BuA_2–BrAc–Ps konjugálása

60 ml OMPC-t (3,1 mg/ml) szétosztunk 6 db 10 ml-es centrifugálócsőbe, és centrifugáljuk (Beckman Ti 80 rotor, 43 000 fordulat/perc, 4 °C, 2 óra). Tiolező keveréket készítünk úgy, hogy 260 mg EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav-dinátrium-só) és 52 mg ditiotreitolt (DTT) feloldunk 30 ml $Na_2B_4O_7$-ben, tiolaktont adagolunk hozzá, és az oldatot 0,2 μm Corning-szűrőn szűrjük.

A centrifugálásnál nyert pelletek mindegyikét elkeverjük 3 ml szűrt tiolező keverékkel (összesen 20 ml), és Dounce-homogenizálóba visszük, és reszuszpendáljuk. A csöveket további 6 ml tiolező oldattal átöblítjük, az öblítési műveletet még egyszer 4 ml tiolező oldattal megismételjük, az öblítőfolyadékokat egyesítjük, a Dounce-homogenizálóban homogenizáljuk, és az így kapott, összesen 28 ml mennyiségű reszuszpendált anyagot 100 ml-es gömblombikba visszük.

A gömblombikokat diafragmával lezárjuk, és a levegőt nitrogéngázzal helyettesítjük Firestone-szelep segítségével, majd a reakciókeveréket 19 órán át állni hagyjuk. A 28 ml mennyiségű reakciókeveréket ezután 3 centrifugálócsőben szétosztjuk, mindegyikre 1 mol mennyiségű kálium-foszfátot adagolunk, és centrifugáljuk (2 óra, 43 000 fordulat/perc, 4 °C, Beckman 80 Ti rotor). A felülúszó folyadékokat eltávolítjuk, a pelleteket 0,1 mol nátrium-foszfát-oldatban, pH=8, reszuszpendáljuk, amikor is 30 ml-es végső szuszpenzió térfogatot nyerünk.

Egy második ultracentrifugálást végzünk (2 óra, 4 °C, 43 000 fordulat/perc), a felülúszó folyadékot eltávolítjuk, a pelleteket Dounce-módszerrel a 7.I.C.3d szakaszban előállított és szűrt Pn23F–BuA_2–BrAc-oldatban reszuszpendáljuk. Az Ellman-féle vizsgálattal kimutatjuk, hogy a kapott oldat 28 μmol tiolt tartalmaz.

Meg kell jegyezni, hogy a Pn23F–BuA_2–BrAc-oldat szűrését közvetlenül a tiolezett protein reszuszpendálása előtt végezzük. A kapott reakciókeveréket (azaz Pn23F–BuA_2–BrAc + tiolezett OMPC) nitrogénatmoszférában 117 órán át szobahőmérsékleten tároljuk.

A reakciókeveréket ezután a következőképpen kezeljük, azaz dezaktiváljuk a Pn23F-Ps és OMPC reakcióképes csoportjait: 75 mg N-etil-maleinimidet (NEM) feloldunk 5 ml 0,1 mólos nátrium-foszfát-pufferben, pH=8, az oldatot 0,22 μm szűrőn átszűrjük, a fenti reakciókeverékkel elkeverjük, és 18 órán át állni hagyjuk.

A fentiek szerint dezaktivált konjugált keverék térfogata 38,5 ml, ezt 40 ml-re egészítjük ki 1,5 ml pH=8, 0,1 mólos nátrium-foszfát adagolásával. Ebből az oldatból 35 ml-t ezután egyenletesen szétosztunk 4 10 ml-es centrifugálócsőbe, és mindegyikhez 0,1 mólos, pH=8 nátrium-foszfát-puffert adagolunk. A csöveket centrifugáljuk (43 000 K fordulat/perc, 2 óra, 4 °C), a felülúszó folyadékokat eltávolítjuk, a pelleteket 8 ml TED-pufferben (1 mol TRIS, pH=8,5, 0,01 mol EDTA, 0,5% Na-dezoxikolát) szétoszlatjuk, és Dounce-homogenizátorba visszük. A centrifugálócsöveket egymást követően 8 ml TED-pufferrel átöblítjük, a pelleteket reszuszpendáljuk (összesen 40 ml), és szobahőmérsékleten 20 órán át állni hagyjuk. Az anyagot ezután centrifugáljuk a fentiek szerint 4 10 ml-es centrifugálócsőben 43 000 fordulat/perc mellett 2 órán át 4 °C-on. Mindegyik pelletet ezután 8 ml TED-pufferben szétoszlatjuk, a csöveket 8 ml TED-pufferrel átöblítjük, reszuszpendáljuk, és ismételen centrifugáljuk a fentiek szerint. A pelleteket ezután ismételten reszuszpendáljuk 0,1 mol, pH=7 nátrium-foszfát-pufferrel, így az össztérfogat 40 ml lesz, ezt ismételten centrifugáljuk, majd a pelleteket ismételten szuszpendáljuk vízben, amikor a térfogat 44 ml lesz, ezt 4 °C hőmérsékleten 17 órán át állni hagyjuk. A kis mennyiségű oldhatatlan anyagot kis fordulatszámú centrifugálással (1000 fordulat/perc, 3,5 perc) centrifugáljuk, amikor is a terméket a felülúszó folyadékban nyerjük.

A kapott felülúszó folyadék hatóanyagot tartalmazó konjugátum vakcina. A konjugátum analitikai jellemzői a következők:

Vizsgálat	*Eredmények*
a) Ps-tartalom	284 mcg/ml
b) Protein	2025 mcg/ml
Ps/protein arány (számított)	0,14
c) Szabad Ps	<5 terület%
d) Aminosav-analízis	
SCMHC/lizin	6,7%
SCMC/lizin	1,6%

10. példa

Pn-Ps előállítása Gaulin-homogenizálással

A nyers pneumococcus poranyagot 1,5 mg/ml koncentrációnak megfelelő mennyiségben vízben feloldjuk, és 1 éjszakán át 4 °C hőmérsékleten keverjük. 10 mg/ml koncentrációjú Pn-Ps-oldatot szintén készítünk. A 10 mg/ml koncentrációjú oldat viszkozitásának csökkentését 1,5 mg/ml oldat viszkozitásának megfelelő értékre sikerrel végeztük 50 mmol $CaCl_2$ adagolásával. Az oldott Pn-Ps-t ezután Gaulin-homogenizátoron engedjük át, valamely következő 4 nyomásérték közül az egyikre beállítva: $13{,}8 \times 10^6$, 35×10^5 Pa, 69×10^6 Pa vagy 103×10^6 Pa. A hasított Pn-Ps molekulákat ezután összegyűjtjük 60% izopropanol adagolásával, amelyet 50 mmol $CaCl_2$-vel együtt adagolunk, amely utóbbit 2 mólos törzsoldatból nyertünk. A pelleteket ezután abszolút etanollal omnimixerben átmossuk, szűrjük, a kicsapódott Pn-Ps elválasztására. A Pn-Ps-t ezután a szűrőn acetonnal átmossuk, majd kalcium-szulfáton szárítjuk, és –70 °C hőmérsékleten tároljuk az analízisig. A hasított Pn-Ps-ből alikvot részt ezután reszuszpendálunk körülbelül 1 mg/ml koncentráció elérésére, és vizsgáljuk a molekulaméretet és a polidiszperzitást HPSEC-univerzális kalibrációval és az antigenicitási indexet pedig nefelometriával. A kapott eredményeket a következő táblázatban foglaljuk össze.

Pn-Ps altípus	*M_W érték, amelynél az antigenitás csökkenni kezd*	*Poli-diszperzitás*
6B	500 000	1,19
14	300 000	1,15
19F	250 000	1,09
23F	250 000	1,15

11. példa

Egér T-sejt stimulálás

A vizsgálatot abból a célból végeztük, hogy meghatározzuk a Pn-Ps konjugátum vakcinák T-sejtfüggőségét/immunogenicitását egerek esetében. Ezt a modellt adoptáltuk, mivel a 2 évnél fiatalabb korú gyermekek általában megfelelő választ adnak a T-függő antigénekre. Az athymusos egerek abnormális tymus apitélimmal rendelkeznek, és ily módon a T-függő antigénekkel szembeni válaszuk szignifikánsan kevesebb, mint a hasonló normál ivadékoké.

A vakcinakészítményt hígítjuk 0,5 μg poliszacharidnak megfelelő mennyiségben, és ezt intraperitoneálisan kifejlett athymusos egereknek (nu/nu), valamint ezek kontroll normál ivadékaiknak (nu/+) adagoljuk 0., 7. és 28. napon. Az egereket 1 héttel később elvéreztetjük, és az egyes szérumokat vizsgáljuk az antitestválaszra radioimmun vizsgálattal (RIA).

A RIA-vizsgálatnál mindegyik szérumot C^{14} jelzett Pn-Ps-sel kombináljuk. Minden képződött antigén-antitest komplexet ezután telített ammónium-szulfáttal kicsapunk, és a mintákat béta-számlálóval 1 percen át számoljuk. A vizsgálat során a következő konjugátumokat vizsgáltuk: Pn6B-Ps–OMPC, Pn14-Ps–OMPC, Pn19F-Ps–OMPC, Pn23F-Ps–OMPC, Pn18C-Ps és Pn4-Ps és azt állapítottuk meg, hogy mindegyik jó T-sejt stimulálást vált ki az nu/+ egereknél.

12. példa

A Pn-Ps konjugátumok immunogenicitása gyermek rhesus majmoknál

A vizsgálatot annak érdekében végeztük, hogy megállapítsuk a Pn-Ps–OMPC vagy Pn-Ps–MIEP konjugátum vakcinák immunogenicitását gyermek majmoknál mind ömlesztett konjugátum, mind tartályokba töltött konjugátum vakcinák esetében. A gyermek majom modellről már kimutatták korábban, hogy kiváló klinikai kísérleti állat a PedvaxHIB konjugátum vakcina esetében is [Vella és munkatársai, Pediatrics, április 5., Suppl. 668–675 (1990)], és ily módon ezt választottuk modellként a jelen Pn-Ps konjugátum vakcinák kiértékeléséhez is.

A kívánt dózisú vakcinát intramuszkulárisan (0,25 ml mindkét oldalon) injekció formájában adagoljuk a 2–3 hónapos gyermek majmoknak a 0. és a 28. napon. A majmokat ezután a 0., 28. és 42. napon elvéreztetjük, és a szérumot vizsgáljuk radioimmun vizsgálattal az antitestválaszra.

A RIA-vizsgálatnál a majomszérumokat C^{14} jelzett Pn-Ps-sel kombináljuk. A képződött antigén-antitest komplexeket telített ammónium-szulfáttal kicsapjuk, és a mintákat béta-számlálóval 1 percen át számoljuk. Az immunogén válasz a vakcinával szemben kielégítő, ha a kísérleti állatok legalább 50%-ánál legalább 1 μg antitestválaszt nyerünk a két dózis vakcina beadagolása után.

A következő vizsgált konjugátumok esetében megállapítottuk, hogy mindegyik erős antifajta-specifikus antitestválaszt vált ki: Pn6B-Ps–OMPC, Pn23F-Ps–OMPC, Pn19F-Ps–OMPC, Pn18C-Ps–OMPC, Pn4-Ps–OMPC és Pn14-Ps–OMPC. Továbbá a következő konjugátumokat tartalmazó tetravalens kompozíciók igen jó anti-Pn-Ps antitestválaszt váltanak ki mind a négy szerotípussal szemben: Pn6B-Ps–OMPC, Pn23F-Ps–OMPC, Pn19F-Ps–OMPC, Pn14-Ps–OMPC.

13. példa

A pneumococcus konjugátumok protektív hatása csincsilláknál

A csincsilláknak szubkután vagy intramuszkulárisan 0, 0,25, 1,0, illetve 4,0 μg Pn6B-Ps–OMPC konjugátumot adagolunk $Al(OH)_3$ hordozón adszorbeálva. A csincsillákat a 0., 2., 4., 6. és 8. héten elvéreztetjük. Az állatokat Streptococcus pneumoniae 6B-vel megfertőzzük 8 héttel az injekciók beadagolása után, és a vizsgálatokat minden 1–3. napon végezzük otoszkópiával és timpanometriával. A középfülváladékot tenyésztésre leszívjuk, és az állatokat 2 héttel a fertőzést követően leöljük. A leölt állatokat középfül-hisztopatológiára vizsgáljuk. A halálozás 60%-os volt azon állatoknál, akik nem kaptak konjugátumot, míg a legalacsonyabb dózis esetében is a halálozás 0%-ra csökkent. Nem alakult ki védelem a gennyes középfülgyulladással szemben azon állatoknál, amelyek konjugátumot nem kaptak, míg 60–100%-os védelem alakult ki azoknál az állatoknál, amelyeknek bármilyen dózisú konjugátumot adagoltunk.

14. példa

Anti-pneumococcus immunválasz 2–5 éves gyermekeknél

2–5 éves gyermekeknek 0,5 vagy 5 μg dózisú Pn6B-Ps-t adagoltunk, és vizsgáltuk az anti-Pn6B-Ps antitesteket RIA- és ELISA-módszerekkel. Szignifikáns növekedést állapítottunk meg az anti-Pn6B-Ps antitestekre vonatkozóan.

15. példa

Pneumococcus poliszacharidok sebességnefelometriás vizsgálata

A vizsgálat célja a konjugátumkészítményeknél, valamint a szabad Pn-Ps esetében a poliszacharid-tartalom, valamint az antigenicitási index meghatározása sebességnefelometriával.

A sebességnefelometriához szükséges standard görbe tartománya a különböző Pn-Ps poliszacharidok esetében különbözik a válasz/Pn-Ps tömegegységet illetően, és a válasz vs Pn-Ps antigénkoncentráció görbe lineáris szakasza más minden Pn-Ps esetében. Az itt megadott példa szerinti eljárás specifikus a Pn6B konjugátumokra, és szükségeszerűen nem alkalmazható más típusú Pn-Ps konjugátumok esetében. Továbbá az

alumínium-oxidon adszorbeált mintákat és a megfelelő standardjait 3%-os nátrium-citráttal hígítottuk a 0,9%-os nátrium-klorid helyett. A vizes konjugátummintákat és standardokat (azaz nem az adszorbeált mintákat) 0,9%-os nátrium-kloriddal hígítottuk, majd további hígításokat végeztünk azon koncentrációértékekre, amelyek várhatóan a standard görbe tartományán belül estek.

A) Reagensek:

Sóoldat: 0,9% vizes NaCl

Anti-Pn-Ps szérum: antiszérum (Health Research Inc., Albany, NY) 30-szorosra hígítva sóoldattal

Standardok:

3878 μg/ml törzsoldatból, amelynek a koncentrációját a poliszacharidokra ismert fenol-kénsav vizsgálattal határoztuk meg, 1,0, 2,0, 2,5, 3,0 és 4,0 mcg/ml Pn-Ps konjugátumoldatokat hígítottunk.

Vizsgálati minta:

3%-os nátrium-citrát törzsoldattal végzett hígítással 1,0, 2,0 és 3,0 mcg Pn-Ps/ml koncentrációjú hígításokat készítünk.

b) Eljárás

A mintákat és a standardokat Beckman ICS sebességnefelométerrel vizsgáltuk két párhuzamos méréssel. Meghatároztuk a minták koncentrációit a standard görbék alapján, a koncentrációértékeket a hígítási faktorral megszoroztuk, és átlagoltuk a kapott értékeket minden minta esetében.

Mint már a fentiekben említettük, ezen meghatározásoknál azon mintákat, amelyek antigenicitási indexe 70% alatti érték volt, nem alkalmaztuk konjugáláshoz annak érdekében, hogy a felhasználásra kerülő Pn-Ps a kívánt immunológiai jellemzőket biztosítsa.

16. példa

MIEP-t kódoló genom DNS klónozása

Körülbelül 0,1 g fenollal inaktivált N. meningitidis sejtet (lásd 1. példa) friss csőbe helyezünk. A fenollal inaktivált sejteket 567 μl TE-pufferben (10 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA, pH=8) reszuszpendálunk, a reszuszpendált sejtekhez 30 μl 10%-os SDS-t és 3 μl 20 mg/ml koncentrációjú proteináz K-t (Sigma) adagolunk. A sejteket elkeverjük, és 37 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk, majd hozzáadunk 100 μl 5 mólos NaCl-oldatot, majd alaposan elkeverjük. Ezután 80 μl 1%-os cetil-trimetil-ammónium-bromid-oldatot (CTAB) adagolunk 0,7 mólos NaCl-ben, jól elkeverjük, és 65 °C hőmérsékleten 10 percig melegítjük. Ezután azonos térfogatú (körülbelül 0,7–0,8 ml) kloroform/izoamil-alkohol elegyet (24:1 arány) adagolunk, jól elkeverjük, és a kapott elegyet 10 000 G mellett 5 percen át centrifugáljuk. A felső vizes fázist új centrifugálócsőbe tesszük, és a szerves fázist eldobjuk. Azonos térfogatú fenol/kloroform/izoamil-alkoholt (25:24:1) adagolnak a vizes fázishoz, elkeverjük, és 10 000 G mellett 5 percen át centrifugáljuk. A felső vizes fázist új csőbe visszük, hozzáadunk 0,6 térfogatnyi (körülbelül 420 μl) izopropil-alkoholt, jól elkeverjük, és a kicsapódott DNS-t 10 000 G mellett 10 percen át centrifugáljuk. A felülúszó folyadékot eldobjuk, a pelleteket 70%-os etanollal mossuk, szárítjuk, 100 μl TE-pufferben reszuszpendáljuk, az így kapott termék N. meningitidis genom DNS.

Két DNS oligonukleotidot szintetizálunk, amely megfelel a MIEP gén 5' és 3' végének [Murakai, E. C. és munkatársai (1989), Infection and Immunity, *57*, 2318–23]. A MIEP gén 5' végére specifikus DNS oligonukleotid-szekvenciája a következő: 5'–ACT-AGTTGCAATGAAAAAATVVVTG–3', a MIEP gén 3' végére pedig a következő: 5'–GAATTCAGAT-TAGGAATTTGTT–3'. Ezeket a DNS oligonukleotidokat alkalmazzuk primerként a MIEP gén polimeráz láncreakció (PCR) kibővítéshez 10 ng N. meningitis genom DNS felhasználásával. A PCR-bővítési lépést a gyártó cég által javasolt módon végezzük (Perkin Elmer).

A kibővített MIEP DNS-t ezután SpeI és EcoRI restrikciós endonukleázokkal emésztjük. Az 1,3 kb DNS-fragmenst, amely a MIEP komplett kódoló szakaszát tartalmazza, elektroforézissel 1,5% agarózgélen elválasztjuk, és a gélről elektroelúcióval kinyerjük [Current Protocols in Molecular Biology (1987), Ausubel, R. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G. és Struhk, K., kiadó: Greene Publishing Assoc.].

A pUC–19-plazmidvektort SpeI és EcoRI enzimekkel emésztjük. A géllel tisztított SpeI–EcoRI MIEP DNS-t az SpeI–EcoRI-emésztett pUC–19-vektorba ligáljuk, és ezt alkalmazzuk az E. coli DH5 törzs transzformálásra. A transzformánsokat tartalmazó pUC–19-vektort, amely az 1,3 kb MIEP DNS-t tartalmazza, restrikciós endonukleáz térképezéssel azonosítjuk, és a MIEP DNS-t szekvenáljuk az azonosítás érdekében. A megfelelő inszertet tartalmazó plazmidot pUC–19–MIEP-plazmidnak nevezzük.

17. példa

A pC1/1.Ga110p(B)ADH1$_t$ vektor megalkotása

A Ga110 promotert az YEp52-plazmidból [Broach és munkatársai (1983), Experimental Manipulation of Gene Expression, Inouye, M, Academic Press, 83–117] izoláljuk géltisztítással, amelyhez a 0,5 kbp fragmenst alkalmazzuk, amelyet Sau 3A és HindIII enzimekkel való hasítás után nyertünk. Az ADH1 terminátort a pGAP.tADH2 [Kniskern és munkatársai (1986), Gene, *46*, 135–141] vektorról izoláljuk géltisztítással a 0,35 kbp fragmens felhasználásával, amelyet HindIII és SpeI enzimekkel való hasítással nyertünk. A két fragmenst T4 DNS ligázzal ligáljuk a géllel tisztított pUC18ΔHindIII-vektorhoz (a HindIII helyet pUC18 HindIII enzimmel való emésztésével eliminálják, az E. coli DNS polimeráz I Klenov-fragmensével tompa véget alakítunk ki, és T4 DNS ligázzal ligáljuk), amelyet előzőleg BamHI és SphI enzimekkel emésztettünk a pGa110–tADH1 parentális vektor kialakítására. Ennek van egy egyedülálló HindIII klónozó helye a Ga110p.ADH1$_t$ kapcsolásánál.

Az egyedülálló HindIII klónozó helyet átcseréljük egyedülálló BamHI klónozó helyre a pGa110.tADH1

HindIII enzimmel való emésztésével, a hasított DNS-t géllel tisztítjuk, ligáljuk a T4 DNS ligáz alkalmazásával a következő HindIII–BamHI linkerhez:

5'–AGCTCGGATCCG–3'
3' – GCCTAGGCTCGA–5'

A kapott pGal10(B)tADH1-plazmidból hiányzik a HindIII hely, és egy egyedülálló BamHI klónozó helyet tartalmaz.

A Gal10p.tADH1-fragmenst a Gal10.(B)tADH1-plazmidból SmaI és SphI enzimekkel való emésztéssel izoláljuk, T4 DNS polimerázzal tompa véget alakítunk ki, és gélen tisztítjuk. A pC1/I élesztő shuttle vektort [Brake és munkatársai (1984), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *81*, 4642–4646] SphI enzimmel emésztjük, T4 DNS polimerázzal tompa véget alakítunk ki, és a kapott fragmenst a vektorhoz ligáljuk T4 DNS ligázzal. A ligálási reakciókeveréket alkalmazzuk ezután az E. coli HB101 sejtek transzformálásra az ampicillin rezisztencia kialakítására, és a transzformánsokat a ^{32}P-jelzett HindIII–BamHI linker egy szálának hibridizálásával választjuk ki. Az új vektorkonstrukciót [pC1/1.Gal10p(B)ADHT1$_t$] HindIII és BamHI enzimekkel való emésztéssel igazoljuk.

18. példa

Az élesztő MIEP expressziós vektor megalkotása MIEP+Leader DNA-szekvenciák felhasználásával

A MIEP komplett kódoló szakaszát tartalmazó DNS-fragmenst a pUC19.MIEP 7 SPeI és EcoRI enzimekkel való emésztésével nyerjük, a MIEP DNS-t gélen tisztítjuk, és T4 DNS polimerázzal tompa végűvé alakítjuk.

A pC1/1.Gal10p(B)ADH1$_t$ élesztő belső expressziós vektort BamHI enzimmel emésztjük, borjúbél alkalikus foszfatázzal defoszforilezzük, T4 DNS polimerázzal tompa végűvé alakítjuk, és a DNS-t gélen tisztítjuk a nem hasított vektor eltávolítására.

A MIEP 1,1 kbp tompa végű fragmensét a tompa végű pC1/1.Gal10p(B)ADH1$_t$-vektorhoz ligáljuk, a ligálási reakciókeveréket alkalmazzuk a kompetens E. coli DH5 sejtek ampicillin rezisztenciává való transzformálásra. A transzformálásokat a ^{32}P-jelzett oligonukleotidokhoz való hibridizációval választjuk ki:

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

amelyet emésztünk, hogy homológ legyen a MIEP-vektor kapcsolást áthidaló szekvenciákkal. A DNS-készítményeket a hibridizációra pozitív transzformánsokból készítjük, és KpnI és SalI enzimekkel emésztjük annak igazolására, hogy a MIEP-fragmens a megfelelő orientációban volt a Gal10 promoterről való expresszióhoz. A DNS-konstrukció további igazolását nyerjük a didezoxi-szekvenálással a Gal10 promotertől a MIEP kódoló szakaszba.

A MIEP transzformánsokkal való expresszióját a Western blot-analízissel mutatjuk ki. A transzformánsokban képződött rekombináns MIEP együtt vándorol a poliakrilamid gélen az OMPC-ből nyert MIEP-vel és immunológiailag reakcióképes a MIEP-re specifikus antitestekkel.

19. példa

Az élesztő MIEP expressziós vektor megalkotása az 5'-módosított MIEP DNS-szekvenciával

A polimeráz láncreakció (PCR) eljárással HindII helyet tartalmazó DNS oligonukleotidot állítunk elő, amely a következőből áll: konzervált élesztő 5' nem transzlált leader (NTL), metionin indító kodon (ATG) (az érett MIEP első 89 kodonja az Asp-vel kezdődően a +20 helyzetben) és egy KpnI hely (a +89 helyzetben). A PCR eljárást a gyártó cég (Perkin Elmer Cetus) előírásai szerint végeztük, templátként pUC19MIEP42#7 és primerként a következő DNS oligomereket alkalmazva:

5'CTAAGCTTAACAAAATGGACGTTACCTTGTACGGTACAATT3' és
5'ACGGTACCGAAGCCGCCTTTCAAG3'

A MIEP klón 5' szakaszának eltávolítására pUC19MIEP42#7-plazmidot KpnI és HindIII enzimekkel emésztettük, és a 3,4 kbp vektorfragmenst agarózgélen tisztítjuk. A 280 bp PCR-fragmenst KpnI és HindIII enzimeket emésztjük, agarózgélen tisztítjuk, és a 3,4 kbp vektorfragmenssel ligáljuk. Az E. coli HB101 (BRL) transzformánsokat DNS oligonukleotid hibridizációval választjuk ki, és a pozitív transzformánsokból származó DNS-eket restrikciós enzim emésztéssel analizáljuk. Azért, hogy megbizonyosodjunk, hogy a PCR lépés alatt mutánsok nem kerültek bevezetésre, a pozitív transzformánsok 280 bp PCR-ből származó DNS-ét szekvenáltunk. A kapott plazmid tartalmazza a HindIII–EcoI inszertumot, amely az NTL élesztőt, ATG kodont és a MIEP teljes leolvasási keretét (ORF) tartalmazza az Asp kodonnal kezdődően (aminosav+20).

Az élesztő MIEP expressziós vektorokat a következőképpen állítjuk elő: a pGAL10/pC1/1- és pGAP/pC1/1-vektorokat [Vlasuk, G. P. és munkatársai (1989), J. B. C., *264*, 12, 106–12, 112] BamHI enzimmel emésztjük, a polimeráz I DNS Klenov-fragmensével süllyesztett végűvé alakítjuk, és borjúbél alkalikus foszfatázzal defoszforilezzük. A kapott lineáris vektorokat Klenovval kezelt és géltisztított, fentiek szerint nyert HindIII–EcoRI-fragmenssel ligáljuk, amely tartalmazza az élesztő NTL, ATG tagokat, valamint a MIEP ORF tagját, ily módon nyerjük a pGal10/pC1/1–MIEP- és pGAP/pC1/1–MIEP-vektorokat.

A Saccharomyces cerevisiae U9 (gal10pga14-) törzset a pGal10/pC1/1–MIEP-plazmiddal transzformáljuk. A rekombináns klónokat izoláljuk, és a MIEP expressziójára vizsgáljuk. A klónokat 37 °C hőmérsékleten szintetikus közegben (leu-) rázással tenyésztjük, amely közeg 2 t/tf% glükózt tartalmaz, a tenyésztést körülbelül 6 OD_{660} értékig végezzük. Ezután 2 t/tf% mennyiségben galaktózt adagolunk a MIEP expressziójának megindítására a Gal10 promoterről. A sejteket a

galaktózos indukció után további 45 órán át tenyésztjük, körülbelül $OD_{600=9}$ értékig. A sejteket ezután centrifugálással elválasztjuk, a sejtpelletet desztillált vízzel mossuk, és fagyasztjuk.

Western blot-analízis rekombináns MIEP-hez

Annak megállapítására, hogy az élesztő a MIEP-t expresszálja, Western blot-analízist végzünk, ehhez 20%, 1 mm, 10–15 lyukú Novex Laemmli géleket alkalmazunk. Az élesztősejteket üveggyöngyök felhasználásával vízben összetörjük [a műveletnél 2% mennyiségben nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) használhatunk]. A sejttörmeléket 10 000 G mellett 1 perces centrifugálással eltávolítjuk.

A felülúszó folyadékot pufferrel elkeverjük, mint azt a MIEP poliakrilamidos gél tisztításánál leírtuk. A mintákat 35 mA mellett futtatjuk, referencia kontrollként OMPC-t alkalmazva, a futtatást addig végezzük, amíg a brómfenolkék marker a gélből kifut.

A proteineket 0,45 μm pórusméretű nitrocellulóz papírra visszük Novex transzfer berendezés alkalmazásával. Átvitel után a nitrocellulóz papírt 5%-os szarvasmarha szérum albuminnal foszfátsó pufferben 1 órán át blokkoljuk, majd 15 ml 1:1000 hígítású nyúl anti-MIEP antiszérumot (ismert eljárások szerint géltisztított MIEP immunizálásával előállítva) adagolunk. A keveréket 1 éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd hozzáadunk 15 ml 1:1000 hígítású alkalikus foszfatázzal konjugált kecske anti-nyúl IgG-t. A keveréket 2 órán át inkubáljuk, majd a foltot kifejlesztjük [Fast Red TR só (Sigma) és naftol-AS-MX foszfatáz (Sigma)].

20. példa

Rekombináns MIEP bakteriális expressziója

Az 1,3 kbp MIEP gént tartalmazó pUC19–MIEP-plazmidot SpeI és EcoRI restrikciós endonukleázokkal emésztjük. Az 1,1 kbp fragmenst izoláljuk, és ismert módon agaróz gélen tisztítjuk. A két cistron TAC promotert és az egyedül álló EcoRI helyet tartalmazó pTACSD-plazmidot EcoRI enzimmel emésztjük. Mind az 1,3 kbp MIEP DNS-en, mind a pTACSD-vektoron tompa végeket alakítunk ki T4 DNS polimeráz (Boehringer Mannheim) alkalmazásával a gyártó cég előírásai szerint. A tompa végű 1,3 kbp MIEP DNS-t ezután a tompa végű vektorhoz ligáljuk T4 DNS ligáz (Boehringer Mannheim) alkalmazásával a gyártó cég utasításai szerint. Az így ligált DNS-t alkalmazzuk az E. coli DH5aIQMAX (BRL) törzs transzformálására a gyártó cég előírásai szerint. A transzformált sejteket agarlemezre visszük, amely 25 μg kanamicint és 50 μg penicillint tartalmaz ml-enként, és 15 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A DNS oligonukleotidot, amelynek szekvenciája homológ a MIEP-vel ^{32}P-vel jelöljük, és alkalmazzuk standard DNS hibridizációs technikát alkalmazva a nitrocellulóz szűrő kiválasztására, amelyek a transzformánsok lemezeiről lizált, denaturált szelepeket tartalmazzák. A hibridizációnál pozitív telepeket restrikciós endonukleázok alkalmazásával térképezzük a MIEP gén orientációjának meghatározására.

A MIEP expresszióját a transzformánsokkal Western blot-analízissel mutatjuk ki. A transzformánsokban nyert rekombináns MIEP együtt vándorol a poliakrilamid gélben az OMPC-ből nyert MIEP-vel, és immunológiailag reakcióképes, a MIEP-re specifikus antitestekkel.

21. példa

Pn-Ps konjugálása N. meningitidis MIEP-hez

A kémiai konjugálást a 4 882 317 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett eljárás szerint végezzük.

10 mg MIEP-t 3 ml 0,1 mólos borátpufferben, pH 11,5, elkeverünk 10 mg etilén-diamin-tetraecetsav-dinátriumsóval (EDTA Sigma Chemicals) és 4 g ditiotreitollal (Sigma Chemicals). A kapott proteinoldatot nitrogéngázzal átöblítjük, majd hozzáadunk 125 mg N-acetil-homocisztein-tiolaktont (Aldrich Chemicals), és a kapott keveréket szobahőmérsékleten 16 órán át inkubáljuk. A keveréket ezután nitrogéngázban kétszer dializáljuk 1 l 0,12 mólos borátpufferrel szemben, pH=9,5, amely 4 mmol EDTA-t is tartalmaz, a dialízist 24 órán át szobahőmérsékleten végezzük. A tiolezett proteint ezután tioltartalomra vizsgáljuk Ellman-féle reagens alkalmazásával (Sigma Chemicals), majd a proteinkoncentrációt Bradford-reagenssel (Pierce Chemicals) határozzuk meg. A MIEP és Pn-Ps konjugáláshoz bróm-acetilezett Ps-t adagolunk 1,5-szeres feleslegben (t/t) a MIEP-oldathoz, és a pH értékét 1 n nátrium-hidroxiddal 9–9,5 közötti értékre beállítjuk. A keveréket ezután nitrogénatmoszférában 6–8 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd ezután 25 μmol N-acetil-ciszteamint (Chemical Dynamics) adagolunk, és a keveréket további 18 órán át hagyjuk állni nitrogénatmoszférában szobahőmérsékleten. A kapott konjugátumoldatot ezután 1 n sósavval megsavanyítjuk pH=3–4 közötti értékig, majd 10 000 G értékig centrifugáljuk. A felülúszó folyadékból 1 ml-t adagolunk FPLC Superose 6B töltetű oszlopra (1,6×50 cm, Pharmacia), és a konjugátumot (Pn-Ps–MIEP) tartalmazó PBS-sel eluáljuk. A poliszacharid-protein konjugátumokat tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, a konjugátumoldatot 0,22 μm-es szűrőn szűrjük sterilizálás céljából.

22. példa

A Pn-Ps–MIEP konjugátumok immunogenicitásának kimutatása

Immunizálás: Hím Balc/c egereket (Charles River, Wilmington) immunizálunk kovalens kötéssel konjugált Pn-Ps–MIEP-el, 2,5 μg Pn-Ps alkalmazásával 0,5 ml előformázott alumínium-hidroxidon. A kontroll egereket hasonló mennyiségű Pn-Ps adagolásával immunizáltuk, amelyet Pn-Ps–CRM [Anderson, M. E. és munkatársai (1985), J. Pediatrics, *107*, 346–351] formában (2,5 μg Pn-Ps/6,25 μg CRM, a humán dózis ¼-e), Pn-Ps–DT formájában (DT 2,5 μg Pn-Ps/1,8 μg DT, a humán dózis $\frac{1}{10}$-e, így a Pn-Ps konstans mennyiségekben kerül felhasználásra) és Pn-Ps–OMPC formájában (2,5 μg Pn-Ps/30 μg OMPC, a humán dózis ¼-e).

6–13,5 hetes gyermek rhesus majmokat immunizáltunk alumínium-hidroxid hordozón adszorbeált Pn-Ps–MIEP konjugátummal. Minden majomnak 0,25 ml konjugátumot adagoltunk két különböző helyen injekció útján, összesen 0,5 ml dózisban. A majmokat a 0., 28. és 56. napon immunizáltuk, és a vérmintákat 2–4 hetenként vettük.

Az antitestválaszokat ELISA-módszerrel mérjük, amellyel megkülönböztetjük az immunoglobinválaszok osztályát és alosztályát. RIA-analízist is alkalmazunk, ezzel mennyiségileg meghatározzuk az össz anti-Pn-Ps antitest mennyiséget, és értékeljük a majmok válaszát.

A Pn-Ps–MIEP konjugátumok alkalmasak az immunválasz kiváltására egereknél IgG anti-Pn-Ps antitesttel, és memóriaválasz kiváltására is alkalmasak. Ez ellentétben van a Pn-Ps–CRM és Pn-Ps–Dt konjugátumokkal, amelyeknél értékelhető anti-Pn-Ps antitestkiváltás nincs. Így a MIEP immunológ hordozó proteinként szolgál a Pn-Ps számára, és képes anti-Pn-Ps antitestválasz kiváltására, ha Pn-Ps antigénhez kovalens kötéssel kapcsolódik. A tisztított MIEP ily módon hatásos immunológ hordozó proteinként alkalmazható a heterogén OMPC helyett bakteriális poliszacharid konjugátum vakcinák előállításánál.

23. példa

A Pn-Ps készítmények C-poliszacharid tartalmának kvantitatív meghatározása

Különböző módszereket dolgoztunk ki a C-poliszacharid kvantitatív meghatározására, ez a módszer lehet NMR-, enzimatikus vagy kromatográfiás módszer. Ebben a példában a kolin (C–Ps komponens) kromatográfiás elválasztását végezzük a hidrolizált Pn-Ps-től, és a módszert más módszerekkel összehasonlítjuk. A kolint kationcserélő oszlopon választjuk el, és a detektálást elnyomott konduktivitásméréssel végezzük.

A Pn-Ps mintákat teljesen elhidrolizáljuk 36%-os hidrogén-fluorid-savval 2 órán át 45–65 °C hőmérsékleten végzett, majd 2 mólos trifluor-ecetsavval 16 órán át 100 °C hőmérsékleten végzett kezeléssel. A hidrolízist követően 200–300 μg mintát injektálunk a Dionex BioLC kromatográfrendszerbe, amelynél Ominpac PCX–500 analitikai és védőoszlopot, Ion Pac CTC–1 kationmegkötő oszlopot, CMMS–2 Micromembrane Suppressort alkalmazunk, amelyet 5 mmólos tetrabutil-ammónium-hidroxiddal regenerálunk (10 ml/perc) a konduktivitás mérésére szolgáló detektor 1 μsiemens érzékenységű. A mintát izokratikusan eluáljuk 5% 200 mmol HCl, 5% 20%-os acetonitril, 85% μQ víz, 5% 20 mmol diamino-propionsav alkalmazásával. A kolint éles csúcs formájában eluáljuk körülbelül 10 perc után.

Ezzel a módszerrel analizáltuk a tisztított C–Ps (beszerzés: Statens Serum Institute) kolintartalmát, és 5,4 tömeg% mennyiséget határoztunk meg. Ez az érték egyezik a CPS kolintartalmával kapcsolatban publikált értékkel.

Ezt az értéket alkalmaztuk a különböző Pn-Ps készítmények C–Ps-koncentrációjának meghatározására a HPLC-értéknél kapott nmol kolinmennyiségeket tömegértékekre átszámolva. Az 5,4 tömeg% kolintartalom átalakításával számoltuk a C–Ps tömegmennyiségeit. A 3% feletti C–Ps koncentrációértékeket konjugációra nem alkalmasnak minősítettük. A következő táblázatban összefoglaljuk ezen módszer, valamint az NMR- és enzimatikus módszerek összefüggéseit, és megállapítjuk a különböző tisztaságú Pn-Ps mennyiségek jellemző C–Ps-tartalmát.

Minta	*NMR*	*Enzimatikus*	*HPLC*
Pn6B-Ps	20%	N.D.	18,4%
Pn6B-Ps	1,6%	0,3–1,0%	1,2%
Pn23F-Ps	N.D.	2,8%	3,7%
Pn14-Ps	2,9%	2,4%	3,2%
Pn19F-Ps	2,7%	2,6%	2,6%

24. példa

Részlegesen hidrolizált tisztított Pn18C-Ps készítmény előállítása

1. Ultrahangos hidrolízis: 3 g Pn18C-Ps poranyagot 1200 ml sóoldatban (0,9% nátrium-klorid) feloldunk keverés közben szobahőmérsékleten 3–4 órán át, majd lefedjük, és 1 éjszakán át 4 °C hőmérsékleten tároljuk. A kapott oldatot ezután műanyag edényben ultrahanggal kezeljük jégfürdőn Branson Sonifier készülék alkalmazásával (0,5-es inch minta, 8-as állás), 20 perces intervallumokkal (5 perces löketekkel) összesen 40 percen át. A viszkozitást minden intervallum után ellenőrizzük. 40 perc után további 10 perces ultrahangos kezelést végzünk az 1,218 cSt viszkozitásérték elérése érdekében. A hidrolizált mintát ezután (1188 ml) szobahőmérsékletre beállítjuk, és hozzáadunk 59,2 g nátrium-acetát reagenst, így a végső koncentráció 3 t/tf% lett.

2. Szerológiai próba: az izopropanolos (IPA) frakcionálási próba, valamint az antitest-irányított végpont Nephelose-vizsgálat, amelyet 10 ml-es mintákon végeztünk, kimutatta, hogy a Pn18C-Ps 40–50% IPA-tartalomnál csapódna ki.

3. Első IPA-adagolás: a hidrolizált mintához (előző 1. lépésből nyerve, 1200 ml) 894 ml IPA-t adagolunk cseppenként keverés közben szobahőmérsékleten, így az IPA-tartalom 42,7%. A mintát 15–30 percen át keverjük, majd centrifugáljuk 1100 G mellett 30 percen át (Beckman JA–10 rotor, 8000 fordulat/perc, 20 °C). A kapott pelletet vízmentes etanollal elkeverjük 250 ml-es Omnimix edényben, majd 60 ml-es szinterelt gáztölcséren átszűrjük, a csapadékot közvetlenül a tölcséren vízmentes etanollal, majd acetonnal mossuk, vákuumban szárítjuk, $CaSO_4$-en (Drierite), szobahőmérsékleten szárítjuk az analízis céljára.

4. Második IPA-adagolás és intermedier termék kinyerése: a 42,7%-os IPA felülúszó folyadékhoz (3. lépés, 2015 ml) 92,0 ml IPA-t adagolunk cseppenként, szobahőmérsékleten keverés közben, és így az IPA-tartalmat 45,2%-ra beállítjuk. A mintát ezután állni hagyjuk, majd a 3. lépésben leírtak szerint centrifugáljuk. A kapott pelletet pépesítjük, szűrjük, mossuk a 3. lépésben leírtak szerint. Ily módon 1609 mg Pn18C-Ps intermediert nyerünk.

5. Dialízis és liofilizálás: az előző 4. lépés szerint nyert termékből 1612,5 mg-ot feloldunk 645 ml desztil-

lált vízben szobahőmérsékleten 2 órán át, majd az oldatot (2,5 mg/ml) dializiscsőbe visszük (12 000 M_W cut-off érték, 45 mm), és dializáljuk desztillált vízzel szemben 4 °C hőmérsékleten 30 órán át két további vízcserével. Ezután a mintát liofilizáló edénybe visszük, szárazjég/metanol fürdőn megfagyasztjuk, és Virtis (Freezemobile) típusú liofilizálóban 2–3 napon át liofilizáljuk. Ily módon 14 878 mg Ps végterméket nyerünk.

25. példa

S. pneumoniae 18C–OMPC konjugátum, Pn18-Ps–OMPC

A) Dowex 50X2 (200–400 mesh) tetrabutil-ammónium gyanta előállítása [Dowex 50 (Bu_4N^+)]

500 g Dowex 50X2 (200–400 mesh, H^+ forma) gyantát feliszapolunk vízben, majd oszlopra adagoljuk, és egymást követően a következőkkel mossuk: 1. 600 ml H_2O, 2. 1000 ml 6 n HCl, 3. 400 ml H_2O, amíg az elfolyó folyadék pH-papírra semleges, 4. 72 g 10%-os vizes tetrabutil-ammónium-hidroxid, addig, amíg az elfolyó folyadék pH-papírra erősen alkalikus, 5. 1000 ml H_2O semlegességig.

B) Pneumoniae 18C poliszacharid tetrabutil-ammónium formájának előállítása [Pn18C (Bu_4N^+)]

60 ml-es Dowex 50X2 Bu_4N^+ gyantával töltött oszlopot átmosunk 250 ml vízzel. 650 mg csökkentett molekulatömegű Pn18C poliszacharidot elkeverünk 65 ml vízzel, és 1 órán át keverjük, mialatt úgy tűnik, hogy oldatba megy. Ezt az oldatot felvisszük az oszlopra, és gravitációval hagyjuk átfolyni a folyadékot (körülbelül 2 óra, majd vákuumban 1 óra). Az oszlopot ezután 150 ml vízzel átmossuk, az elfolyó folyadékokat egyesítjük, és liofilizáljuk, amikor is 640 mg 18C(Bu_4N^+) sót nyerünk. Ebből 20 mg-ot NMR-analízis céljára félreteszünk.

C) 18C (18C–BuA_2) 1,4-bután-diamin-származékának előállítása

630 mg 18C (Bu_4N^+) készítményt elkeverünk 143 ml DMSO-val (dimetil-szulfoxid), és 3,25 órán át keverjük. Ezen idő alatt a szilárd anyag feloldódik, ebből 1 ml-t eltávolítunk Karl Fischer-féle víztartalom-meghatározásra. Ennél 28,2 μmol H_2O/ml értéket találtunk (4 mmol összesen). Ehhez az oldathoz 165,1 mg karbonil-diimidazolt (CDI) adagolunk, és a kapott oldatot szobahőmérsékleten 2 órán át keverjük. Az oldat 1,260 g 1,4-bután-diamin-dihidrokloridot (BuA_2.2HCl) tartalmaz 40 ml vízben, és az oldat pH-ját 2,5 n nátrium-hidroxiddal 10,2-re beállítjuk. Az így kapott oldatot jégfürdőn lehűtjük, az előzőekben nyert DMSO-oldatot lassan hozzáadagoljuk, és további 10 percen át jégfürdőn keverjük. A keverést ezután még szobahőmérsékleten 50 percen át folytatjuk, majd az oldatot Spectrapor 2 dializiscsőbe visszük, ½" magasságban a tetőtől lezárjuk, és a folyadékot a következőkkel szemben dializáljuk: 1. 15 l pH 7, 0,1 mólos $NaPO_4$-puffer 13 órán át, 2. 15 l pH 7, 0,01 mólos $NaPO_4$-puffer 11 órán át, 3. 15 l pH 7, 0,01 mólos $NaPO_4$-puffer 10,8 órán át, 4. 15 l H_2O 9,5 órán át. A térfogat ekkor 190 ml. Ebből 7,5 ml alikvot részt eltávolítunk, és NMR-vizsgálat céljára külön liofilizáljuk. A visszamaradó 182,5 ml anyagot liofilizáljuk, ily módon 416 mg 18C 1,4-bután-diamin-származékot nyerünk (Pn18C–BuA_2). NMR-spektrummal kimutatjuk, hogy az anyag 100 ismétlődő poliszacharid egységre vonatkoztatva 10 bután-diamin-csoportot tartalmaz, amelyet a bután-diamin belső metiléncsoportjainak, valamint a ramnóz metilcsoportjainak rezonanciaintegráljainak összehasonlításával határoztunk meg.

D) 18C bróm-acetilezett bután-diamin-származékainak előállítása (Pn18C–BuA_2–BrAc)

416 mg 18C–BuA_2-t elkeverünk 36 ml, 0,1 mol, pH 9,04 pufferrel (Kothoff borát-foszfát), és a teljes oldatba menetelig keverjük. Ezután 256 mg p-nitro-fenil-bróm-acetátot adagolunk 4,48 ml acetonitrilben oldva, a keveréket 20 órán át 4 °C-on keverjük, majd Spectrapor 2 csőben a következőkkel szemben dializáljuk: 1. 15 l H_2O 6 órán át, 2. 15 l H_2O 6 órán át, 3. 15 l H_2O 6 órán át. Ennél a pontnál a térfogat 60 ml, amelyből 1,7 ml-t vizsgálatok céljára eltávolítunk (NMR, Ouchterlony és Viscotek), majd a maradékhoz 2,42 g száraz, pH=8 foszfátpuffer sót (előállítása 0,1 mólos pH=8 $NaPO_4$-oldat liofilizálásával) adagolunk. Oldódás után az anyagot 0,2 μ Corning-szűrőn átszűrjük, amikor is a 18C–BuA_2–BrAc pH=8 oldatát nyerjük. A szűrést lassan végezzük, és 4 szűrőt alkalmazunk.

E) OMPC (N. meningitidis) konjugálása Pn18C–BuA_2–BrAc-hez

80 ml mennyiségű 3,2 mg/ml koncentrációjú OMPC-t, Outer Membrane Protein Complex (N. meningitidis) szétosztunk négy darab 25 ml-es centrifugacsőben, és 60 Ti típusú rotorral 43 000 fordulat/perc mellett (43 K) 4 °C hőmérsékleten 2 órán át centrifugáljuk. Tiolező keveréket készítünk oly módon, hogy 680 mg EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav-dinátriumsó) és 120 mg ditiotreitolt (DTT) feloldunk 40 ml pH=11,09 $Na_2B_4O_7$-pufferben, majd hozzáadunk 320 mg N-acetil-homocisztein-tiolaktont, és az oldatot 0,5 μm Corning-szűrőn (csésze típus) átszűrjük. A fenti centrifugálásnál kapott pelleteket 5 ml szűrt tiolező keverékkel elkeverjük (összesen 20 ml), majd Dounce-homogenizátorba visszük, és reszuszpendáljuk. A csöveket további 2/10 ml tiolező oldattal átmossuk egymást követően többször, majd az oldatokat egyesítjük, és homogenizáljuk a Dounce-keverőben, és a teljes kapott reszuszpendált anyagot (40 ml) 100 ml-es gömblombikba visszük. Az üvegedényt további 20 ml tiolező oldattal átöblítjük, és ezt is a reakcióedénybe adagoljuk. Ezután a lombikot szeptummal lezárjuk, nitrogéngázzal átöblítjük Firestone-szelep alkalmazásával, és a reakciókeveréket 18,5 órán át állni hagyjuk. A 60 ml-es mennyiséget ezután 4 centrifugacsőben szétosztjuk, mindegyik tetejére 1 mol KH_2PO_4-et (vizes) rétegezünk, és 2 órán át 43 K mellett 4 °C hőmérsékleten centrifugáljuk. A felülúszó folyadékokat eltávolítjuk, a pelleteket 0,1 mol $NaPO_4$ pH=8 pufferben reszuszpendáljuk, ily módon 40 ml-es végső térfogatot nyerünk. Az oldatot egyenletesen 22–25 ml-es centrifugacsőben szétoszlatjuk (polikarbonát), a reakció üvegedényt 10 ml pH=8 foszfátpufferrel még átöblítjük, és ezt az öblítőfolyadékot a centrifugacső tetejére rétegezzük. Egy má-

sodik ultracentrifugálást végzünk (2 óra, 4 °C, 43 K), a pelleteket 30 ml pH=8, 0,1 mólos PO_4-pufferben reszuszpendáljuk. Ellman-vizsgálatot végzünk, amellyel összesen 24 μmol SH-t mutatunk ki 100 nmol/mg OMPC-n. A tiolezett proteint ezután 100 ml-es gömblombikba visszük, és hozzászűrünk 18C–BuA_2–BrAc-oldatot. A kapott reakciókeveréket (azaz 18C–BuA_2–BrAc + tiolezett OMPC) 89 órán át nitrogéngáz atmoszférában szobahőmérsékleten tároljuk.

A kapott keveréket ezután a következőképpen kezeljük: 75 mg N-etil-maleimidet (NEM) feloldunk 5 ml, pH=8, 0,1 mólos $NaPO_4$-pufferben, 0,22 μm-es szűrőn átszűrjük, és 2 ml-t ebből az oldatból a fenti reakciókeverékhez adagolunk, és 4 órán át állni hagyjuk.

Ezután 0,5 ml N-acetil-ciszteamint feloldunk 2,5 ml 0,1 mólos, pH=8 PO_4-pufferben, ezt 0,22 μm-es szűrőn átszűrjük, és 1 ml-t ebből az oldatból a fenti reakciókeverékhez adagolunk, és 22,5 órán át állni hagyjuk.

A fentiek szerint kezelt terméket ezután egyenletesen 4 25 ml-es centrifugálócsőben eloszlatunk, rárétegezünk 8 ml pH=8, 0,1 mol PO_4-puffert, 43 K mellett 2 órán át 4 °C hőmérsékleten centrifugáljuk. Ezután a felülúszót eltávolítjuk, a pelleteket Dounce-homogenizátorban TED-pufferrel homogenizáljuk (összesen 40 ml), az üvegedényt további 10 ml TED-pufferrel átmossuk, és az oldatot két 25 ml-es csőbe visszük. A csöveket szobahőmérsékleten 15,25 órán át tároljuk, majd 2 órán át 43 K-val 24 °C hőmérsékleten centrifugáljuk. A kapott pelleteket Dounce-homogenizátorban reszuszpendáljuk, összesen 30 ml TED-pufferrel, majd két 25 ml centrifugálócsőbe visszük, az üvegedényeket további 25 ml TED-pufferrel átöblítjük, és 43 K mellett 4 °C hőmérsékleten 2 órán át centrifugáljuk. A pelleteket 50 ml pH=7 foszfátpufferben reszuszpendáljuk, és egy harmadik centrifugálást végzünk 43 K mellett 2 órán át 4 °C hőmérsékleten. A pelleteket 82 ml vízben reszuszpendáljuk, és 25,5 ml-es mennyiségben két 50 ml-es műanyag, steril (Falcon) centrifugálócsőbe adagoljuk. A csöveket 4 °C hőmérsékleten 18 órán át állni hagyjuk, majd a konjugátumpreparátumot 1000 fordulat/perc mellett 3,5 percen át TH rotorban TJ–6 típusú centrifugában centrifugáljuk. A végső konjugátumszuszpenziót proteinre (Lowry), 18C poliszacharidra (fenol/kénsav), nem konjugált poliszacharidra (méretkizárásos kromatográfia–sebességnefelometria) és aminosavra (Spinco) vizsgáljuk, amikor is a következő értékeket kapjuk:

Poliszacharid=339 μ/ml
Protein=2,57 mg/ml
Szabad poliszacharid: <5% (a kísérleti hibahatár)
S-karboxi-metil-homocisztein/lizin=0,025
S-karboxi-metil-ciszteamin/lizin=0,005

26. példa

Pn4-Ps intermedier előállítása

1. Ultrahangos kezelés: 1 g Pn4-Ps poranyagot feloldunk 400 ml sóoldatban (0,9% NaCl) keverés közben szobahőmérsékleten 4 órán át, a kapott oldatot műanyag edényben, jégfürdőn, Branson Sonifier készüléken ultrahanggal kezeljük (0,5 inch minta, 8-as állás), 10 perces intervallumokban összesen 20 percig. A viszkozitást minden intervallum után ellenőrizzük, 20 perc után 1,267 cSt végpontviszkozitás-értéket nyerünk. A hidrolizált mintát szobahőmérsékletre visszük, hozzáadunk 18,7 g nátrium-acetát reagenst, így 3 t/tf% végső koncentrációt nyerünk.

2. Szerológiai próba: izopropanolos (IPA) frakcionálási félüzemi vizsgálatot és antitest-irányított végpont Nephelose-vizsgálatot végzünk 110 ml térfogatú mintán, és megállapítjuk, hogy a Pn4-Ps 45–55% IPA-tartalomnál válna ki.

3. Első IPA-adagolás: a hidrolizált mintához (előző 1. lépés szerint előállítva, 385 ml) 379 ml IPA-t adagolunk cseppenként, keverés közben szobahőmérsékleten, így 49,7% IPA-tartalmat nyerünk. A mintát ezután 15–30 percen át keverjük, 11 000 G mellett 30 percen át (Beckman JA–10 rotor, 8000 fordulat/perc, 20 °C) centrifugáljuk, a kapott pelletet vízmentes etanollal elkeverjük 250 ml-es Omnimix edényben, majd 60 ml-es szinterelt üvegtölcséren átszűrjük. A csapadékot közvetlenül a tölcséren vízmentes etanollal, majd acetonnal mossuk, vákuumban szárítjuk $CaCl_2$ felett szobahőmérsékleten analízis céljára.

4. Második IPA-adagolás és a termék kinyerése: a 49,7%-os IPA felülúszó folyadékhoz (3. lépés szerint előállítva, 727 ml) 38 ml IPA-t adagolunk cseppenként keverés közben szobahőmérsékleten, és így 52,2% IPA-tartalmat nyerünk. A mintát ezután állni hagyjuk, majd a 3. lépésben leírtak szerint centrifugáljuk, és ugyancsak a 3. lépésben leírtak szerint a pelletet pépesítjük, szűrjük, mossuk, és szárítjuk. Ily módon 516 mg Pn4-Ps terméket nyerünk.

5. Dialízis és liofilizálás: 500 mg fentiek szerint nyert Pn-Ps mintát feloldunk 200 ml desztillált vízben szobahőmérsékleten 2–3 órán át. A kapott 2,5 mg/ml koncentrációjú oldatot dialíziscsőbe visszük (12 000 M_w cutoff érték, 45 mm), és desztillált vízzel szemben 4 °C hőmérsékleten 27 órán át dializáljuk két további desztillált vízcserét végezve. A mintát ezután liofilizáló edénybe visszük, szárazjég/metanol fürdőn fagyasztjuk, majd liofilizáljuk Virtis (Freezemobile) liofilizálóban 2–3 napon át. Ily módon 491 mg végső Ps terméket nyerünk, K_d=0,69.

A fentiek alapján szakember számára nyilvánvaló, hogy más karboxiltartalmú Pn-Ps altípust, így például a Pn1-Ps-t vagy Pn5-Ps-t szintén előállíthatunk a fentiek szerint, és a Pn4-Ps vagy Pn9V-Ps poliszacharidokhoz hasonlóan, amelyek szintén savas poliszacharidok, konjugálhatjuk.

27. példa

S. Pneumoniae Type 4-OMPC konjugátum (Pn4-Ps–OMPC) előállítása

A) Dowex 50X2 (200–400 mesh) gyanta tetrabutil-ammónium formájának előálltása [Dowex 50 (Bu_4N^+)]

500 g Dowex 50X2 gyantát (200–400 mesh, H^+ forma) elkeverünk vízzel (CM–66), oszlopra adagoljuk, és egymást követően a következőkkel mossuk: 1. 600 ml H_2O, 2. 1000 ml 6 n HCl, 3. 400 ml H_2O, addig,

amíg az elfolyó folyadék pH-papírra semleges, 4. 72 g 10%-os vizes tetrabutil-ammónium-hidroxid-oldat addig, amíg az elfolyó folyadék pH-papírra erősen lúgos, 5. 1000 ml H_2O semlegességig.

B) S. Pneumoniae Type 4 poliszacharid tetrabutil-ammónium formájának előállítása [Pn4(Bu_4N^+)]

65 ml Dowex 50X2 (Bu_4N^+) gyantát 120 ml vízzel oszlopon átmosunk. 400 mg molekulatömeg-csökkentett Pn4 poliszacharidot elkeverünk 35 ml vízzel, és 20 percen át keverjük, mialatt úgy tűnik, hogy oldat képződik (a keverést 1 éjszakán át folytatjuk). Ezt az oldatot az oszlopra adagoljuk, és gravitációval hagyjuk rajta átfolyni, majd 150 ml vízzel átmossuk, és az elfolyó folyadékokat egyesítjük és liofilizáljuk, amikor is 504 mg Pn4 (Bu_4N^+) sót nyerünk.

C) Pn4 1,4-bután-diamin-származékának előállítása (Pn4–BuA_2)

97 mg Pn4 (Bu_4N^+) poliszacharidot elkeverünk 16 ml DMSO-val (dimetil-szulfoxiddal), és a kapott oldatot 52 °C-on 15 percen át keverjük. Ezen idő alatt a szilárd anyag feloldódik, majd a kapott oldatot szobahőmérsékletre lehűtjük.

Az így kapott oldathoz 160 µl DMSO-ban oldott 2 mg karbonil-diimidazolt (CDI) adagolunk, és a kapott oldatot szobahőmérsékleten 1 órán át keverjük. 0,5 g 1,4-bután-diamin-dihidrokloridot (BuA_2.2HCl) feloldunk 5 ml vízben, és a pH-ját 5 n nátrium-hidroxiddal 10,2-re beállítjuk, majd a kapott oldatot jégfürdőn lehűtjük. A fentiek szerint nyert DMSO-oldatot ezután lassan a hideg BuA_2-oldathoz adagoljuk, és 5 percen át jégfürdőn, majd szobahőmérsékleten 1 órán át keverjük, majd az oldatot Spectrapor 2 dializiscsőbe adagoljuk, amelyet a tetejétől számított ½" magasságban lezárunk, és az anyagot a következőkkel szemben dializáljuk: 1. 4 l pH=7, 0,1 mólos $NaPO_4$-puffer 15 órán át, 2. 4 l pH=7, 0,01 mol $NaPO_4$-puffer 9 órán át, 3. 4 l pH=7, 0,01 mólos $NaPO_4$-puffer 21 órán át, 4. 4 l H_2O 20 órán át. Az oldatot ezután liofilizáljuk, amikor is 70 mg Pn4 1,4-bután-diamin-származékot nyerünk (Pn4–BuA_2). A mintából 5 mg-ot NMR-spektroszkópiával vizsgálva megállapítjuk, hogy a poliszacharid 100 ismétlődő monomer egységre számítva 22 bután-diamin-csoportot tartalmaz, amelyet a bután-diamin-metil-csoportjainak és az N-acetil-metil-csoportjainak rezonanciaintegráljainak összehasonlításával állapítunk meg.

D) A bróm-acetilezett bután-diamin-származék előállítása (Pn4–BuA_2–BrAc)

54 mg Pn4–BuA_2-t elkeverünk 5,5 ml, 0,1 mólos pH=9,04 pufferrel (Kolthoff borát-foszfát), és az oldódásig keverjük. Ezután 55 mg p-nitro-fenil-bróm-acetátot feloldunk 1 ml acetonitrilben, az előző oldathoz adagoljuk, és a kapott keveréket 17 órán át 4 °C hőmérsékleten keverjük. A kapott anyagot Spectrapor 2 dializálócsőben dializáljuk a következőkkel szemben: 1. 16 l H_2O 24 órán át, 2. 16 l H_2O 8 órán át, 3. 16 l H_2O 23 órán át. Ekkor 12,5 ml folyadékot nyerünk, amelyből 1 ml-t vizsgálatra félreteszünk (NMR, Ouchterlony és Viscotek), majd a maradékhoz 275 mg szárított pH=8 foszfátpuffert (előállítása 0,1 mol, pH=8 $NaPO_4$-oldat liofilizálásával) adagolunk. A teljes oldódás után az anyagot 0,2 µ Corning-szűrőn átszűrjük, amikor is a Pn4–BuA_2–BrAc pH=8 oldatát nyerjük.

E) OMPC (N. meningitidis) konjugálása Pn4–BuA_2–BrAc-hez

5 ml 4,324 mg/ml koncentrációjú Outer Membrane Protein Complex-et (N. meningitidis, OMPC) 80 Ti rotorral 43 000 fordulat/perc, 4 °C hőmérsékleten 2 órán át centrifugálunk. Tiolező keveréket készítünk úgy, hogy 85 mg EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav-nátrium-sót) és 15 mg ditiotreitrolt (DTT) feloldunk 10 ml pH=11,09 $Na_2B_4O_7$-pufferben, és hozzáadunk 50 mg N-acetil-homocisztein-tiolaktont, majd a kapott oldatot 0,2 µm-es szűrőn átszűrjük. A centrifugálásnál kapott pelleteket eloszlatjuk 5 ml így nyert szűrt tiolező keverékben, majd Dounce-homogenizátorba visszük, és reszuszpendáljuk. A reszuszpendált anyagot ezután centrifugálócsőbe tesszük, szeptummal lezárjuk, és nitrogéngáz atmoszféra alá helyezzük Firestone-szelep segítségével. A reakciókeveréket 19 órán át tároljuk, majd centrifugálócsőbe tesszük, és 1 mmol vizes KH_2PO_4-et rétegezünk rá, és 2 órán át 43 K mellett 4 °C hőmérsékleten centrifugáljuk. A felülúszó folyadékokat eltávolítjuk, és a pelleteket 10 ml 0,1 mólos $NaPO_4$ pH=8 pufferben reszuszpendáljuk. A kapott oldatot centrifugálócsőbe visszük, és másodszor ultracentrifugáljuk (2 óra, 4 °C, 43 K), majd a pelleteket 11,4 ml Pn4–BuA_2–BrAc-oldatban reszuszpendáljuk. Az elvégzett Ellman-vizsgálattal kimutatjuk, hogy az anyag 3,44 µmol SH-t tartalmaz, azaz 158 nmol SH/mg OMPC. A kapott reakciókeveréket, azaz Pn4–BuA_2–BrAc + tiolezett OMPC, nitrogéngáz áramban tartjuk szobahőmérsékleten 66 órán át.

A fenti reakciókeveréket a következőképpen kezeljük: 5 mg N-etil-maleimidet (NEM) feloldunk 1 ml pH=8, 0,1 mólos $NaPO_4$-pufferben, átszűrjük 0,22 µm-es szűrőn, és a fentiek szerinti reakciókeverékhez adjuk, majd a kapott anyagot 5 órán át állni hagyjuk. Ezután 0,1 ml N-acetil-ciszteinamint feloldunk 0,4 ml 0,1 mólos pH=8 PO_4-pufferben, átszűrjük 0,22 µm-es szűrőn, és az előző reakciókeverékhez adjuk, majd 14,5 órán át állni hagyjuk.

Az így kapott reakciókeveréket ezután 43 K mellett 4 °C hőmérsékleten 2 órán át centrifugáljuk, a pelleteket 8 ml 1X TED-pufferben reszuszpendáljuk, az oldatot szobahőmérsékleten 1 éjszakán át állni hagyjuk, majd 43 K mellett 4 °C hőmérsékleten 2 órán át centrifugáljuk. A pelleteket 8 ml TED-pufferben reszuszpendáljuk, azonnal ismételten centrifugáljuk 2 órán át 43 K mellett 4 °C hőmérsékleten. A pelleteket 10 ml pH=7 0,1 mólos PO_4-pufferben reszuszpendáljuk, és ismét centrifugáljuk 43 K mellett 4 °C hőmérsékleten 2 órán át. A végső pelletet 7,5 ml H_2O-ban szuszpendáljuk, 1 éjszakán át 4 °C hőmérsékleten állni hagyjuk, majd a szuszpenziót 1000 fordulat/perc mellett 3 percen át centrifugáljuk, a felülúszó a kívánt konjugátum.

Vizsgálatok: Lowry-protein: 0,920 mg/ml
Fenol/kénsav vizsgálat: 0,212 mg/ml
Ps/PRO=0,23
SCMHS/lys=0,031
SCMC/lys=0,022

A fentiek szerint előállított konjugátumot egereknek vagy afrikai zöld majmoknak adagolva nagy koncentrációban mutathatók ki az anti-Pn4-Ps antitestek, amely meghatározást a Pn4-Ps-specifikus ELISA-vizsgálattal végeztük.

28. példa

Pn9V-Ps intermedier előállítása

1. Ultrahangos hidrolízis: 1 g Pn9V-Ps port feloldunk 400 ml sóoldatban (0,9% NaCl), és szobahőmérsékleten 4 órán át keverjük, majd a kapott oldatot műanyag edényben jégfürdőn Branson Sonifier berendezéssel ultrahanggal kezeljük (0,5 inch minta, 8-as állás) 3 perces intervallumokban. A viszkozitást minden intervallum után ellenőrizzük. 13 perc elteltével még 1 perces ultrahangos kezelést végzünk az 1,117 cSt viszkozitás-végpont biztosítására. A hidrolizált mintát szobahőmérsékletre hozzuk, majd hozzáadunk 19,5 g nátrium-acetátot, amikor is a végső 3 t/tf% koncentrációt nyertük.

2. Szerológiai próba: izopropanolos (IPA) frakcionálási félüzemi kísérletet és antitest-irányított végpont Nephelose-vizsgálatot végzünk 10 ml-es mintán, eszerint a Pn9V-Ps 40–45% IPA-tartalom közötti értéknél csapódna ki.

3. Első IPA-adagolás: a hidrolizált mintához (1. lépés szerint előállítva, 391 ml) 281 ml IPA-t adagolunk cseppenként keverés közben szobahőmérsékleten, így 41,8% IPA-tartalmat nyerünk. A mintát 15–30 percen át keverjük, majd 11 000 G mellett 30 percen át centrifugáljuk (Beckman JA–10 rotor, 8000 fordulat/perc, 20 °C). A pelletet vízmentes etanollal elkeverjük 250 ml-es Omnimix berendezésben, majd 60 ml-es szinterelt üvegtölcsérben szűrjük, a csapadékot közvetlen a szűrőn vízmentes etanollal, majd acetonnal mossuk, és vákuumban szárítjuk $CaCl_2$-n szobahőmérsékleten.

4. Második IPA-adagolás és a termék kinyerése: a 41%-os IPA felülúszó folyadékhoz (előző 3. lépés szerint előállítva, 637 ml) 28,6 ml IPA-t csepegtetünk keverés közben szobahőmérsékleten, így 44,3% IPA-tartalmat nyerünk. A mintát állni hagyjuk, majd a 3. lépésben leírtak szerint centrifugáljuk, majd szintén a 3. lépés szerint pépesítjük, szűrjük, mossuk és szárítjuk. Ily módon 342,2 mg Pn9V-Ps terméket nyerünk.

5. Dialízis és liofilizálás: 347 mg előző 4. lépés szerint nyert Pn-Ps mintát feloldunk 139 ml desztillált vízben szobahőmérsékleten 4–5 órán át. A kapott 2,5 mg/ml koncentrációjú oldatot dializiscsőbe visszük (12 000 M_W cutoff érték, 25 mm), és desztillált vízzel szemben 4 °C hőmérsékleten 25 órán át dializáljuk két további desztillált vízcserét végezve. Ezután a mintát liofilizáló lombikba visszük, szárazjég/metanol fürdőn fagyasztjuk, és Virtis (Freezemobile) liofilizáló berendezésen 2–3 napon át liofilizáljuk. Ily módon 303,5 mg végső Ps terméket nyerünk, K_d=0,60.

6. Harmadik IPA-adagolás és a termék kinyerése: az előző 4. lépés szerint előállított 44,3%-os IPA felülúszó folyadékhoz (655 ml) 30,8 ml IPA-t csepegtetünk keverés közben szobahőmérsékleten, így 46,8% IPA-koncentrációt nyerünk. A kapott mintát állni hagyjuk, majd a 3. lépésben leírtak szerint centrifugáljuk, a pelletet pépesítjük, szűrjük, mossuk, és szárítjuk. Ily módon 410,8 mg Pn9V-Ps terméket nyerünk.

7. Dialízis és liofilizálás: előző 6. lépés szerint nyert 420,4 mg Pn-Ps mintát feloldunk 168 ml desztillált vízben szobahőmérsékleten 4–5 órán át. A kapott 2,5 mg/ml koncentrációjú oldatot dializálócsőbe visszük (12 000 M_W cutoff érték, 45 mm), és desztillált vízzel szemben 4 °C hőmérsékleten 25 órán át dializáljuk két további desztillált víz cserét végezve. A mintát ezután liofilizáló lombikba visszük, szárazjég/metanol fürdőn fagyasztjuk, és Virtis (Freezemobile) liofilizáló berendezésben 2–3 napon át liofilizáljuk. Ily módon 342,5 mg Ps végterméket nyerünk, K_d=0,65.

8. Szakember számára nyilvánvaló, hogy a 4. és 5. lépésekben nyert termékeket nagy mennyiségű IPA-adagolással választottuk el, majd dializáltuk és liofilizáltuk, amikor is egyetlen terméket nyertünk, amelynek analitikai jellemzői az egyes alfrakciók súlyozott átlagának felelnek meg. Szakember számára az is nyilvánvaló, hogy az ott ismertetett Pn9V-Ps vagy Pn4-Ps anyagokhoz hasonlóan kezelhetjük a Pn1-Ps vagy Pn5-Ps anyagokat is.

29. példa

Pn9V-Ps konjugálása OMPC-vel

A 28. példában leírtak szerint járunk el, és nyerjük a Pn9V-Ps-t, amelyet a Pn4-Ps anyaggal kapcsolatban a 27. példában leírt módon konjugálunk.

30. példa

Az acetát kvantitatív meghatározása Pn9V/18C-Ps-ben, valamint a piruvát kvantitatív meghatározása Pn4-Ps-ben

Módszert fejlesztettünk ki az O-piruvát-csoportok meghatározására Pn4-Ps-ben, valamint az O-acetát-csoportok meghatározására a Pn9V-Ps és Pn18C-Ps anyagokban a pneumococcus (Pn) kapszuláris poliszacharidok (Ps) előállítása során. Az O-acetil- vagy O-piruvát-csoportok először a hidrolízis során szabadulnak fel, majd az acetát- és piruvátcsoportokat a Pn-Ps hidrolizátumban azonosítjuk, és határozzuk meg mennyiségileg nagy teljesítményű anioncserélő kromatográfiával elnyomott konduktivitás alapján.

A feldolgozott, valamint nem feldolgozott Pn4, Pn9V és Pn18C mintákat analizáljuk ezzel a módszerrel. Az előzetes eredmények szerint a nem feldolgozott, illetve méretellenőrzött Pn4 esetében a piruvátcsoportok mólaránya a Ps ismétlődő egységhez körülbelül 1:1, illetve 0,8:1. Az acetátok és a Ps ismétlődő egységek aránya a Pn18C-Ps-ben 1:1, illetve 0,8:1 a nem feldolgozott és méretellenőrzött mintáknál és 1,7:1, illetve 1,5 a nem feldolgozott és méretellenőrzött Pn9V esetében. A vizes Pn18C-Ps–OMPC konjugátummintákat szintén analizáltuk az O-acetát és Ps ismétlődő egységek közötti mólarány meghatározására, ennek az értéke körülbelül 0,5:1.

Az irodalomban ismertetik, hogy a piruvátcsoport egy igen erőteljes immunodeterminánsa a 4 típusú kapszuláris poliszacharidok esetében, és ennek eltávolítása

jelentős változást idéz elő az immunológiai specificitásban [Heidelberger, M., Dudman, W. F. és Nimmich, W., Immunochemical relationships of certain capsular polysaccharides of Klebsiella, pneumococci and Rhizobia, J. Immuno., *104*, 1321–1328 (1970)]. Hasonlóképpen az O-acetát eltávolítása a Pn18C-Ps poliszacharidok esetében csökkenti az immunológiai specificitást [Estrada-Parra, S. és Heidelberger, M., The specific polysaccharide of type XVIII pneumococcus, Biochemistry, *2*, 1288–1294 (1963)]. Ezért igen fontos kvantitatív módszert kidolgozni az acetát- és piruvátcsoportok meghatározására a Pn18C-Ps, illetve Pn4 anyagokban. Az O-acetil-csoportok a Pn9V esetében igen fontos szerepet játszhatnak a Pn9V immunológiai szerkezetében, mivel a dez-O-acetilezett Pn9V antigén reaktivitással nem rendelkezik, mint az a sebesség-nefelometriai vizsgálattal kimutatható.

Azt tapasztaltuk, hogy az O-acetát könnyen felszabadul a Pn9V-ből, és a Pn18C-Ps-ből alkalikus körülmények között (pH=11) 4 °C hőmérsékleten, és az O-piruvát könnyen felszabadul melegítés hatására 65 °C hőmérsékleten a Pn4-ből. Azt találtuk továbbá, hogy az acetát- és piruvátcsoportok elválaszthatók a hidrolizált Pn-Ps mintákból OminPac PAX500 oszlop alkalmazásával 1 ml/perc áramlási sebesség mellett 0,98 mmol nátrium-hidroxid és 2% metil-alkohol mint mobil fázis alkalmazásával. A detektálást elnyomott konduktivitás-detektálással végezzük, amelyhez 25 ml kénsavat alkalmazunk regenerálóként 10 ml/perc áramlási sebességgel. A példában megadjuk az O-acetát- és O-piruvátcsoportoknak a Pn18C-Ps, 9V és Pn4 anyagokról való hidrolízisének optimális körülményeit is.

Műszerezés

Dionex BioLC berendezést OmniPac PAX–500 oszlopon, valamint analitikai oszloppal (4,6×250 mm) szerelünk fel. Elnyomott kondukciós detektálást alkalmazunk 25 mn kénsav mint regeneráló felhasználásával. Az áramlási sebességet a Dionex autoregen egységen 10 ml/perc értékre állítjuk be. A mobil fázis, valamint a gradiens fázis az acetát- és piruvátcsoportoknak a hidrolizált Pn-Ps-ről való eltávolítására a következő:

Puffer 1 – 1 mmol nátrium-hidroxid
Puffer 2 – 100% metanol
Puffer 3 – 200 mmol nátrium-hidroxid
Puffer 4 – víz

Idő	*%puffer 1*	*%puffer 2*	*%puffer 3*	*%puffer 4*	*Áramlás, l/perc*
0	98	2	0	0	1
12,5	98	2	0	0	1
12,6	58	2	0	40	1,5
20,0	58	2	0	40	1,5
20,1	98	2	0	0	1,5
30,0	98	2	0	0	1,5
30,1	98	2	0	0	1
50,0	98	2	0	0	1

A fenti körülmények, valamint detektorérzékenységként 3 μsiemens alkalmazásával 4 nmol mennyiségű acetát és piruvát minden eluátumban kimutatható, körülbelül 5,2 és 9,5 perces retenciós idők mellett.

Mintakészítés

A Merck Manufactoring Division-ból származó tisztított Pn-Ps mintákat Karl-Fischer-titrálásnak vetettük alá Aquastar V3000 térfogati nedvesség titráló berendezés felhasználásával a maradék H_2O-tartalom meghatározására, majd a mintát milli-Q H_2O-ban oldottuk 1 mg/ml koncentrációban. A mintákat (100 μg/ml) 2 mmólos NaOH-val kezeltük 16 órán át szobahőmérsékleten az O-acetát-csoportoknak a Pn9V-Ps-ről és Pn18C-Ps-ről való eltávolítására. A Pn4-Ps mintákat 1 mmol sósavval hidrolizáltuk 60 °C hőmérsékleten 16 órán át az O-piruvátnak a Pn4-ről való eltávolítására. Az osztályozott Pn9V és Pn18C-Ps, valamint Pn18C-Ps–OMPC konjugátumok mintáit szintén vizsgáltuk a monoszacharid-összetételre nagy teljesítményű pH-anioncserélő kromatográfiával és pulzáló amperometrikus detektálással. A monoszacharid-összetételt annak érdekében határoztuk meg, hogy megkapjuk a Pn-Ps koncentrációját az osztályozott és vizes konjugátummintákban.

Az acetát, piruvát és N-acetil-mannóz-amin mintákat milli-Q H_2O-ban oldottuk 200 nmol/ml koncentrációnak megfelelő mennyiségben.

A minták és standardok hidrolízise

A Pn18C-Ps minták dez-O-acetilezését a Pn18C-Ps minták 4 különböző koncentrációjú nátrium-hidroxiddal (1, 2, 5 és 50 mmol) különböző hőmérsékleteken (4 °C, 25 °C, 45 °C és 65 °C) és különböző ideig (3, 6 és 16 óra) végzett hidrolízisével végeztük. A kísérletnél az acetát, piruvát és N-acetil-mannóz-amin standard oldatainak vizsgálatát is elvégeztük annak megállapítására, hogy az alkalmazott körülmények elegendőek-e a dezacetilezéshez, és eredményezik-e az acetát/piruvátcsoport degradációját vagy az N-acetát-csoportok lehasadását.

A piruvátcsoportoknak a Pn4 mintákról való eltávolítását vagy nátrium-hidroxiddal (50 mmol/100 °C/16 óra) vagy különböző koncentrációjú sósavval (1, 10, 100 mmol), különböző ideig (3, 5 és 16 óra) és különböző hőmérsékleteken (65 °C, 85 °C és 100 °C) végzett hidrolízisével tanulmányoztuk.

Sebességnefelometria

Sebességnefelometriával mértük a Pn9V-Ps, Pn18C-Ps és Pn4-Ps anyagok aktivitását az acetil-, illetve piruvilcsoportok eltávolítása után. A mintákat 1, 1,5, 2 és 2,5 μg/ml koncentrációra hígítottuk.

Nagy teljesítményű méretkizárásos kromatográfia (HPSEC)

A Pn9V-Ps, Pn18C-Ps és Pn4 minták HPSEC-analízisét az acetilcsoportok, illetve piruvilcsoportok eltávolí-

tása előtt, illetve után mértük. Egy áramlási szűkítővel ellátott 7,5×600 mm TSK G6000PW oszlopot 50 °C-ra melegítettük, és 858–1072×10^5 Pa mellett 0,2 mol nátrium-acetáttal kiegyensúlyoztuk 0,3 ml/perc áramlás mellett. Az oszlopra 60 μg mintát (1 mg/ml) injektáltunk, és a mobil fázissal 0,3 ml/perc sebesség mellett eluáltuk. Az oszlopról lejövő eluátumot az oszlopon 0,5 ml/perc sebességgel átengedett 0,5 mol nátrium-hidroxiddal elkevertük, és a Dionex pulzáló amperometrikus detektorral mértük, és meghatároztuk a K_d-értéket.

Szenzitivitás és linearitás vizsgálata

A detektor linearitást és szenzitivitást mind a piruvát, mind az acetát esetében 2 μsiemens értékben határoztuk meg. A piruvát és acetát kimutathatóságának alsó határa 0,125 nmol. Mindkét komponens esetében a detektorválasz lineáris volt 2 nmol értéken keresztül, a korrelációs koefficiens értéke 0,9999, illetve 0,9992 volt piruvát, illetve acetát esetében.

A Pn18C-Ps mintáról az O-acetát eltávolításának optimalizálása

A Pn18C-Ps hidrolízisének időbeli lefutását tanulmányozva megállapítható, hogy az O-acetil-csoport alkalikus hidrolízisre alacsony hőmérsékleten labilis. 2 mmol nátrium-hidroxid elegendő volt 4 °C hőmérsékleten 16 órás inkubálás után a Pn18C-Ps teljes dez-O-acetilezésére. Magasabb hőmérsékleten (>25 °C) azt találtuk, hogy az N-acetát-csoport is eltávolodik az N-acetil-mannóz-aminról, ami befolyásolhatja a Pn9V-O-acetát meghatározását. Az O-acetát-csoportok eltávolításának optimális körülményeinek a 16 órán át 4 °C hőmérsékleten való kezelést találtuk. Kevesebb, mint 1% acetátcsoport távozott az N-acetil-mannózamid standardról 2 mmol nátrium-hidroxiddal 16 órán át szobahőmérsékleten végzett kezelésnél.

Az O-piruvát-csoportok Pn4-ről való eltávolításának optimalizálása

Hidrolízisre vonatkozó vizsgálatokat végeztünk Pn4 nátrium-hidroxiddal végzett kezelésével. Gyorsan felismertük, hogy igen kevés piruvát mutatható ki, ha nátrium-hidroxidot alkalmazunk. A kezdeti kontroll vizsgálatok azt mutatták, hogy a piruvát a Pn4-ről vízben 100 °C hőmérsékleten hasad le. Ennek alapján úgy döntöttünk, hogy az O-piruvát-csoportoknak a Pn4-ről való eltávolítására sósavas hidrolízist és emelt hőmérsékletet alkalmazunk. A piruvátcsoportok bizonyos degradálódása figyelhető meg magasabb hőmérsékleteken. Ezt azzal demonstrálhatjuk, hogy a standard piruvátmintát ugyanazon körülmények között hidrolizáljuk, mint a Pn4-et. A piruvát maximális kinyerését akkor nyerjük, ha 1 mmol sósavval 16 órán át 65 °C hőmérsékleten végezzük a hidrolízist.

Az O-acetát és O-piruvát analízise Pn-Ps mintákban

Különböző mintákat, így a kiindulási Pn-Ps-ben, osztályozott Pn-Ps és egy Pn18-Ps–OMPC konjugátumot vizsgáltunk O-acetát/piruvát-tartalomra a fentiek szerint leírt HPLC módszerrel két mmólos nátrium-hidroxiddal szobahőmérsékleten az O-acetát lehasadására Pn9V-Ps/18 mintákról vagy 1 mmólos sósavval 65 °C hőmérsékleten az O-piruvát-csoportok lehasadására Pn4-Ps-ről. A vizsgálat eredményei a következők:

Minták	*Piruvát/acetátcsoportok aránya a Ps ismétlődő egységhez*
Pn4, 1. minta	1,0
Pn4, 2. minta	0,8
Pn9V, 1. minta	1,7
Pn9V, 2. minta	1,5
Pn18C-Ps, 1. minta	1,0
Pn18C-Ps, 2. minta	0,8
Pn18C-Ps–OMPC vizes készítmény	0,5

A fenti eredmények azt mutatják, hogy az oldalcsoportok retenciója az osztályozott Pn-Ps mintákban körülbelül 90% Pn9V-Ps esetében és 80% Pn4 és 18C esetében. Az O-acetát-csoportok retenciója a Pn18C-Ps–OMPC vizes konjugátumkészítményben körülbelül 50%. A Pn18C-Ps és Pn4 minták esetében az elméleti értékek 1 mol acetát vagy piruvát 1 mol Ps ismétlődő egységre és a Pn9V esetében pedig az arány 2:1 [Jansson, P-E., Lindberg, B. és Lindquist, U., Structural Studies of the capsular polysaccharides from Streptococcus pneumoniae Type 4, Carbohyd. Res., *95*, 73–80 (1981); Lugrowski, C. és Jennings, H. J., Structural determination of the capsular polysaccharide of Streptococcus pneumoniae Type 18C, Carbohyd. Res., *131*, 119–129 (1984); Perry, M. B., Daoust, V. és Carlos, D. J., The specific capsular polysaccharide of Streptococcus pneumoniae Type 9V, Can. J. Biochem., *59*, 524–533 (1981)]. Az O-acetát esetében a Pn18C-Ps–OMPC konjugátummal kapcsolatban kimutatott alacsonyabb retenciós érték annak tudható be, hogy az O-acetil-csoportok alkalikus körülményekkel szemben alacsony hőmérsékleten érzékenyebbek.

Sebességnefelometriával a Pn4, Pn9V és Pn18C-Ps, valamint a dez-O-piruvilezett és dez-O-acetilezett minták aktivitását vizsgáltuk. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a minták a nefelozaktivitást teljesen elvesztik ezen csoportok eltávolítása után a kezeletlen minták K_d-értékeinek ellenére. A K_d-értékeket HPSEC-módszerrel mértük. Bár a Pn4 minta K_d-értéke az enyhe savas hidrolízissel végzett dez-O-piruvilezés hatására 0,6-ról 0,68 értékre növekszik. A Pn4 és Pn18C-Ps minták antigenicitására vonatkozó adatok alátámasztják más kutatók vizsgálati eredményeit, amely szerint ezen oldalcsoportok a pneumococcus poliszacharid immunológ reaktivitásában fontos szerepet játszanak. A Pn9V-vel kapcsolatos eredmények alapján úgy tűnik, hogy a glükuronsav, ezen molekula O-acetil-csoportja szintén fontos szerepet játszik az immunológ reaktivitásban.

A fentiek alapján egy gyors, érzékeny módszert dolgoztunk ki a Pn4 mintákban az O-piruvil-ketál, valamint a Pn9V és Pn18C-Ps mintákban az O-acetát kvantitatív meghatározására. Ez a módszer igen előnyös a Pn4, Pn9V és Pn18C-Ps megfelelő osztályozásában és konjugálásában annak érdekében, hogy ezen poliszacharidok antigénszerkezete megmaradjon.

31. példa

Pn6B-Ps–MIEP konjugátumok elválasztása

1. Két konjugációs reakciókeveréket (az egyik a másik H_2O-val dializált mintája) 3–8 °C hőmérsékleten tároltunk a felhasználásig.

2. A mintákhoz 0,2 MOPS-puffert, pH=7,2, adagolunk 7 mmol végső koncentrációnak megfelelő mennyiségben. A mintákhoz szilárd GuHCl-t adagoltunk 4,2 mol végső koncentrációnak megfelelő mennyiségben. (Megjegyzés: 1,42 g GuHCl/ml koncentrációnak megfelelő mennyiséget kell adagolni a szilárd GuHCl adagolása révén bekövetkező térfogat-növekedés kompenzálására. Hasonlóképpen a pufferadagolást is úgy kell beállítani, hogy a térfogat-növekedést figyelembe vegye, és hogy a minta összetétele közelebb legyen az oszlopról lejövő eluátum összetételéhez. Eljárhatunk úgy is, hogy a mintát dializáljuk az oszlopról lejövő eluátummal szemben a kromatográfiát megelőzően.)

3. 2,8 ml mintát (körülbelül 1 mg proteintartalmú, a Lowry-proteinvizsgálattal meghatározva) adagolunk a 12,6×96 cm-es szefakril S–1000 töltetű oszlopra, amelyet 10 mmol MOPS, pH=7,2 és mmol GuHCl 0,6 ml/perc áramlási sebességgel végzett adagolásával kiegyensúlyozunk. Az oszlopról elfolyó folyadékot folyamatosan vizsgáljuk 280 nmol-nál (Perkin Elmer LC 235 dióda elrendezésű detektor), és 3 ml-es frakciókat gyűjtünk.

4. A proteineloszlást A280 (valamint a spektrum) és a Pn6B-Ps-eloszlást a Pn6B-Ps-specifikus RIA-vizsgálat alapján mértük. A Pn6B-Ps–BrAc, valamint ennek nem aktivált MIEP fizikai keverékének elúciós helyzete alapján összegyűjtöttük a Ps- és proteintartalmú frakciókat, és külön-külön eluáltuk azokról a helyekről, amelyeket a Pn6B-Ps–BrAc számára megfigyeltünk, és amelyet feltételezetten kijelöltünk a Pn6B-Ps–MIEP konjugátum számára.

5. A keverékeket ultraszűréssel, YM–30 membrán alkalmazásával, valamint milli-Q H_2O alkalmazásával diaszűréssel betöményítettünk. A protein- és Pn6B-Ps-tartalmat a kvantitatív összetétel-vizsgálatok alapján becsültük. Az SCMHC jelenlétét aminosav-analízissel detektáltuk.

32. példa

Pn18C-Ps pneumococcus poliszacharid közvetlen RIA-vizsgálata

Ezt a vizsgálatot alkalmaztuk a 18C típusú pneumococcus poliszacharid kvantitatív meghatározására, ez egy többrétegű szendvics RIA-vizsgálat. Nyúl anti-Pn18C-Ps-t polisztirol gyöngyök felületére rétegeztünk. A gyöngyöket Pn18C-Ps-tartalmú oldatban inkubáltuk. Az inkubálás után a gyöngyöket mostuk, majd ismételten egy második, Pn18C–OMPC elleni egér antitestet tartalmazó oldatban inkubáltuk. Ezen inkubálás után a gyöngyöket átmostuk, és harmadszor is inkubáltuk 125 I-kecske anti-egér IgG tartalmú oldatban. A lemezeket ismételten mostuk, majd a gyöngyöket egy műanyag csőbe vittük számlálás céljából. Az ismeretlen, Pn18C-Ps-tartalmú mintákat standard görbéhez hasonlítottuk a mennyiségi meghatározás céljából.

Berendezés

1. RIA kit: Abbot Labs, Diagnostic Div., Catalog No. 6171-10
2. Qwik Wash System, Abbot Labs, Diagnostic Div.
3. Beosztható pipetták, valamint eldobható pipettavégek (Eppendorf digital)
4. Gamma Counter (Abbott Autologic)
5. ¼ col polisztirol gyöngyök tükröző felületi kikészítéssel: Precision Plastic Ball Co., 3000 N, Cicero Ave., Chicago, Illinois 60641

Reagensek

1. New York State Health Services anti-Pn18C-Ps antitest R18–44 típus vagy ezzel ekvivalens
2. Egér anti-Pn18C-Ps OMPC antiszérum (11260-235 keverék vagy ezzel ekvivalens)
3. Kecske anti-egér IgG ^{125}I-jelzett antiszérum: NEX 159, New England Nuclear, 549 Albay Street, Boston, MA 02118
4. Inkubációs puffer: RCM8, amely a következőket tartalmazza:
   1% BSA SIGMA A2153
   0,1% azid Sigma S2002
5. Hígító

8 rész magzati borjúszérum	Sigma F3885
1 rész kecskeszérum	Sigma G6767
1 rész nyúlszérum	Sigma R4505
0,5% Tween 20	Sigma P1379
0,1% azid	Sigma S2002

3. Anti-Pn18C-Ps bevonatú gyöngyöt adagolunk egy tálca minden lyukába, amely a mintát vagy a standardot tartalmazza, és a lemezt enyhén rázzuk, hogy minden gyöngy a pufferrel teljesen be legyen vonva.
4. A lemezeket egy ragasztófedéllel látjuk el, amely a RIA-kithez tartozik, és a lemezeket szobahőmérsékleten 6 órán át inkubáljuk.
5. A lemezeket Qwik Wash berendezésben ionmentesített vízzel mossuk.
6. Az egér anti-18C antitesteket a hígítóval 1:1000 arányban hígítjuk.
7. 200 µl ilyen oldatot adunk minden gyöngyöt tartalmazó lyukba.
8. A lemezt letakarjuk, és 1 éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáljuk.
9. A lemezt Qwik Wash berendezés segítségével ionmentesített vízzel átmossuk.
10. ^{125}I-jelzett kecske, anti-egér antitesttel 15 000 cpm/10 µl értékig hígítást végzünk (körülbelül 1:160 arányú hígítás).
11. Az így kapott oldatból 20 µl-t adagolunk minden gyöngyöt tartalmazó lyukba.
12. A lemezeket lefedjük, és 37 °C hőmérsékleten 2 órán át inkubáljuk.
13. A lemezeket Qwik Wash berendezés segítségével ionmentesített vízzel mossuk.
14. A gyöngyöket a RIA-kit műanyag csöveibe tesszük, és megfelelő gamma-számlálóval számlálunk.

Számítások

1. A párhuzamos mérések eredményét átlagoljuk a vizsgálandó minta, a standard, valamint az inkubációs pufferkontroll esetében. Az inkubációs pufferkontrollra kapott eredményeket levonjuk mind a standard, mind a vizsgálandó minta eredményeiből.
2. A statisztikai számítások mérésére alkalmas számítógéppel betápláljuk a standard görbe adatait,

és kiszámítjuk a korrelációs koefficienst, valamint a görbe meredekségét.

3. A megfelelő standard görbe alapján kiszámítjuk a minták válaszait, és a hígításokkal korrigáljuk.

A fentiek szerint járunk el minden Pn-Ps minta esetében a megfelelő fajtaspecifikus reagensek alkalmazásával.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a *Streptococcus pneumoniae* egy vagy több altípusából származtatott poliszacharidhoz (Pn-Ps-hez) kovalens kötéssel kapcsolódó immunogén proteint tartalmazó konjugátum előállítására, *azzal jellemezve,* hogy immunogén proteinhez kovalens kötéssel molekulánként átlagosan kevesebb, mint 1200 ismétlődő egységet tartalmazó, 1×10^5 és 1×10^6 közötti molekulatömeg-értékű, 1,0 és 1,4 közötti polidiszperzitási fokú és a *pneumococcus* csoportspecifikus C-poliszachariddal a fajtaspecifikus poliszacharidhoz viszonyítva 3%-nál kisebb mértékben szennyezett poliszacharidot kapcsolunk. (Elsőbbsége: 1991. január 28.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy poliszacharidként 0,7 és 1,1 közötti antigenicitási indexű és 0,6 és 3 dL/g közötti belső viszkozitású poliszacharidot alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1991. január 28.)

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy poliszacharidként az 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F *Streptococcus pneumoniae* altípusok bármelyikéből származó poliszacharidot alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1991. január 28.)

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy poliszacharidként 1,0 és 1,4 közötti méret szerinti polidiszperzitási fokú, C-poliszacharid szennyezettségi szintjét tekintve a fajtaspecifikus poliszacharidhoz viszonyítva 3% alatti értékű és a következő poliszacharidok bármelyikéből vagy azok keverékéből származó, a *Neisseria meningitidis B* külső membránproteinkomplexével (OMPC) vagy ennek MIEP alegységével konjugált poliszacharidot vagy poliszacharidok keverékét alkalmazunk:

1. *Streptococcus pneumoniae* 6B, amelyből származó poliszacharidra a következők jellemzők:
a) M_N-érték 3×10^5 és 6×10^5 között,
b) K_d-csúcs körülbelül $0{,}60 \pm 0{,}05$,
c) M_W-érték 3×10^5 és 7×10^5 között,
d) belső viszkozitás 0,1 mólos nátrium-foszfátban, pH=7,2, 1,0 és 2,0 között, és
e) kevesebb, mint 1000 ismétlődő egységet tartalmaz átlagosan molekulánként;

2. *Streptococcus pneumoniae* 14, amelyből származó poliszacharidra a következők jellemzők:
a) M_N-érték 3×10^5 és 8×10^5 között,
b) K_d-csúcs körülbelül $0{,}60 \pm 0{,}05$,
c) M_W-érték 4×10^5 és 1×10^6 között,
d) belső viszkozitás 0,1 mólos nátrium-foszfátban, pH=7,2, 0,6 és 1,6 között, és
e) kevesebb, mint 1200 ismétlődő egységet tartalmaz átlagosan molekulánként;

3. *Streptococcus pneumoniae* 19F, amelyből származó poliszacharidra a következők jellemzők:
a) M_N-érték 2×10^5 és 6×10^5 között,
b) K_d-csúcs körülbelül $0{,}65 \pm 0{,}05$,
c) M_W-érték 2×10^5 és 6×10^6 között,
d) belső viszkozitás 0,1 mólos nátrium-foszfátban, pH=7,2, 1,0 és 2,0 között, és
e) kevesebb, mint 1000 ismétlődő egységet tartalmaz átlagosan molekulánként;

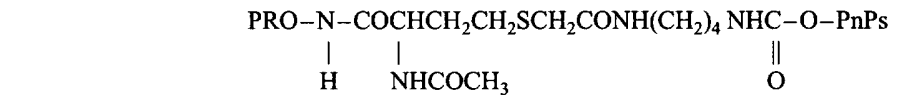
4. *Streptococcus pneumoniae* 23F, amelyből származó poliszacharidra a következők jellemzők:
a) M_N-érték 2×10^5 és 6×10^5 között,
b) K_d-csúcs körülbelül $0{,}54 \pm 0{,}05$,
c) M_W-érték 4×10^5 és 8×10^5 között,
d) belső viszkozitás 0,1 mólos nátrium-foszfátban, pH=7,2, 1,5 és 3,0 között, és
e) kevesebb, mint 1000 ismétlődő egységet tartalmaz átlagosan molekulánként;

5. *Streptococcus pneumoniae* 4, amelyből származó poliszacharidra a következők jellemzők:
a) M_N-érték 2×10^5 és 4×10^5 között,
b) K_d-csúcs körülbelül $0{,}65 \pm 0{,}05$,
c) M_W-érték 2×10^5 és 5×10^5 között,
d) belső viszkozitás 0,1 mólos nátrium-foszfátban, pH=7,2, 1,2 és 3,0 között, és
e) kevesebb, mint 600 ismétlődő egységet tartalmaz átlagosan molekulánként;

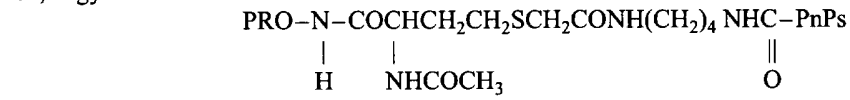
6. *Streptococcus pneumoniae* 9V, amelyből származó poliszacharidra a következők jellemzők:
a) M_N-érték 3×10^5 és 6×10^5 között,
b) K_d-csúcs körülbelül $0{,}65 \pm 0{,}05$,
c) M_W-érték 3×10^5 és 7×10^5 között,
d) belső viszkozitás 0,1 mólos nátrium-foszfátban, pH=7,2, 1,0 és 2,0 között, és
e) kevesebb, mint 800 ismétlődő egységet tartalmaz átlagosan molekulánként;

7. *Streptococcus pneumoniae* 18C, amelyből származó poliszacharidra a következők jellemzők:
a) M_N-érték 2×10^5 és 6×10^5 között,
b) K_d-csúcs körülbelül $0{,}65 \pm 0{,}05$,
c) M_W-érték 2×10^5 és 6×10^5 között,
d) belső viszkozitás 0,1 mólos nátrium-foszfátban, pH=7,2, 1,5 és 3,0 között, és
e) kevesebb, mint 700 ismétlődő egységet tartalmaz átlagosan molekulánként. (Elsőbbsége: 1991. január 28.)

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az OMPC vagy MIEP Pn-Ps-hez történő kovalens kötésére a következő képletű „spacer" tagot alkalmazuk:



a poliszacharid hidroxilcsoportján történő kötések esetén, vagy



a poliszacharidok karboxilcsoportján keresztül történő kötések esetén, amely képletekben a PRO jelentése OMPC vagy MIEP, és a Pn-Ps jelentése a *pneumococcus* poliszacharid, továbbá a Pn-Ps:OMPC vagy Pn-Ps:MIEP konjugátumok tömegaránya 0,05 és 0,5 közötti érték, és a hidrolízis és aminosav-analízis alapján az SCMHC/lys arány 0,01 és 0,15 közötti érték. (Elsőbbsége: 1991. január 28.)

6. Eljárás *pneumococcus* poliszacharid-immunogén protein konjugátum előállítására, *azzal jellemezve,* hogy

a) *pneumococcus* organizmust tenyésztünk, és a nyers *pneumococcus* poliszacharidot izoláljuk vagy a *pneumococcus* poliszacharid poranyagot oldjuk,

b) az a) pont szerint nyert poliszacharidot tisztítjuk, és részlegesen hidrolizáljuk egy olyan előre meghatározott végpontig, amellyel a kapott poliszacharid olyan konjugálást tesz lehetővé, hogy a poliszacharid fajtaspecifikus antigenicitása a nyers, a) pont szerinti poliszacharidhoz viszonyítva mintegy 30%-kal csökkentett, és

c) az előző b) lépés szerint nyert terméket egy immunogén proteinnel konjugáljuk, és valamely következő *pneumococcus* altípus tenyészetét alkalmazzuk: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F és 23F, és a Pn-Ps poliszacharid antigén integritását megtartja az Ouchterlony kettős immunodiffúziós vagy sebességnefelometriás vizsgálattal meghatározva anti-Pn-Ps fajtaspecifikus antitestek felhasználásával, a Pn-Ps poliszacharidot a konjugálás előtt fizikai úton hasítjuk Gaulin-sajtolóban 2000 és 15 000 psi érték között vagy 100 °C hőmérsékleten 24 órán át melegítéssel hidrolizáljuk vagy ultrahanggal kezeljük, ezen kezeléseket 1 mg/ml koncentrációjú, 0,9 mólos nátrium-klorid-oldatban a viszkozitás értékének vagy a K_d (csúcs) végpontjának a különböző felsorolt Pn-Ps poliszacharidok esetében a

Pn-Ps altípus	Kitűzött viszkozitás-végpont (Cst)	Kitűzött K_d-(csúcs) végpont
Pn4-Ps	1,5–1,00	0,65±0,05
Pn6B-Ps	1,3–1,00	0,60±0,05
Pn9V-Ps	1,3–1,00	0,65±0,05
Pn14-Ps	1,1–0,95	0,60±0,05
Pn18C-Ps	1,5–1,00	0,65±0,05
Pn19F-Ps	1,3–1,00	0,65±0,05
Pn23F-Ps	1,5–1,00	0,54±0,05

értékei eléréséig végezzük,

és adott esetben kromatográfiás vagy alkoholos frakcionálással az 1,4 alatti polidiszperzitású anyagot kiválasztjuk. (Elsőbbsége: 1991. január 28.)

7. Eljárás *pneumococcus* poliszacharid-protein konjugátum előállítására, *azzal jellemezve,* hogy

a) a Pn-Ps nyers *pneumococcus* poliszacharidot izoláljuk,

b) i) adott esetben a nyers Pn-Ps poliszacharidot a szennyeződések ioncserés adszorpciójával tisztítjuk, vagy

ii) a nyers Pn-Ps poliszacharidot részlegesen hidrolizáljuk vagy mechanikusan hasítjuk,

c) adott esetben a részlegesen hidrolizált Pn-Ps poliszacharidot méret és tisztaság szerint frakcionáljuk,

d) az előző a)–c) pontok szerint kapott egy vagy több *pneumococcus* altípusból származtatott frakcionált Pn-Ps poliszacharidot nukleofil vagy elektrofil funkciós csoportokkal látunk el,

e) a *Neisseria meningitidis B* OMPC-t vagy annak valamely alegységét izoláljuk,

f) az OMPC-t vagy annak alegységét funkciós csoportokkal látjuk el reakcióképes elektrofil vagy nukleofil csoportok bevitelével,

g) a d) lépés szerint nyert poliszacharidot az f) lépés szerinti proteinnel konjugáljuk,

h) a kapott konjugátum el nem reagált funkciós csoportjait hatástalanítjuk,

i) a konjugátumterméket izoláljuk. (Elsőbbsége: 1991. január 28.)

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a b) és c) lépéseket a következőképpen végezzük:

b) 1 – adott esetben az anionos szennyeződéseket pH≈5 oldatból anioncserélőn adszorbeáljuk,

2 – adott esetben a Pn-Ps-t oldatban a következőképpen hidrolizáljuk:

1. az oldatot 50–150 °C közötti hőmérsékleten 1–48 órán át melegítjük, vagy

2. 5 s–5 min intervallumokban ultrahangos kezelést végzünk, a kezelési időt a beállított ultrahangos kezelés erősségétől függően megválasztjuk, majd hűtési periódusokat iktatunk be, és további ultrahangos kezelést végzünk, vagy

3. Gaulin-sajtolóban 2140×10^5 és $16\,100 \times 10^5$ Pa nyomás közötti értéken hasítjuk a molekulát, és

c) a hidrolizált Pn-Ps poliszacharidot frakcionáljuk, és kiválasztjuk az 1×10^5 és 1×10^6 molekulatömeg közötti frakciókat a következő kezelésekkel:

i) előre meghatározott koncentrációjú izopropanollal differenciál-alkohol oldással a kívánt méretintervallumú Pn-Ps-t kicsapjuk, vagy

ii) méretkizárásos folyadékkromatográfiával frakcionáljuk az 5×10^4 és 1×10^6 molekulatömeg közötti értékű molekulákat, és a hidrolízis vagy hasítás végpontjait viszkozitásméréssel, 0,1 mólos nátrium-foszfát-pufferrel készült 1 mg/ml koncentrációjú oldattal, pH=7,2-n vagy kromatográfiával a különböző poliszacharidok esetében a

Pn-Ps altípus	Kitűzött viszkozitás-végpont (Cst)	Kitűzött K_d-(csúcs) végpont
Pn4-Ps	1,5–1,00	0,65±0,05
Pn6B-Ps	1,3–1,00	0,60±0,05

Táblázat (folytatás)

Pn-Ps altípus	Kitűzött viszkozitás végpont (Cst)	Kitűzött K_d (csúcs) végpont
Pn9V-Ps	1,3–1,00	0,65±0,05
Pn14-Ps	1,1–0,95	0,60±0,05
Pn18C-Ps	1,5–1,00	0,65±0,05
Pn19F-Ps	1,3–1,00	0,65±0,05
Pn23F-Ps	1,5–1,00	0,54±0,05;

végpontértékeken határozzuk meg. (Elsőbbsége: 1991. január 28.)

9. Eljárás vakcinakészítmény előállítására, *azzal jellemezve,* hogy 1–5. igénypontok bármelyike szerint előállított konjugátumot, inert hordozót, és adott esetben valamely adjuváns vagy immunomodulátor vegyület vagy más immunogén anyag immunológiailag hatásos mennyiségét elegyítjük. (Elsőbbsége: 1991. január 28.)

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy hordozóként alumínium-hidroxidot, alumíniumfoszfátot vagy timsót, további immunogén anyagként a hepatitis B, hepatitis A, nem A, nem B hepatitis, AIDS, diftéria, szamárköhögés, kanyaró, mumpsz, rubeola, bárányhimlő, gyermekbénulás és Haemophilus influenzae B közül egy vagy több elleni vakcinát; és konjugátumként Pn4-Ps–OMPC, Pn6B-Ps–OMPC, Pn9V-Ps–OMPC, Pn14-Ps–OMPC, Pn18C-Ps–OMPC, Pn19F-Ps–OMPC, Pn23F-Ps–OMPC, Pn1-Ps–OMPC, Pn-Ps–OMPC és Pn7F-Ps–OMPC közül egy vagy több konjugátumot alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1991. december 19.)