

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3278-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD

PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **06. 06. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **07.06.95,**
07.06.95, 12.07.95, 12.07.95

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/477497, 95/482626,**
95/2153730, 95/2153733

(33) Země priority: **US, US, CA, CA**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 02. 98**
(Věstník č. 2/98)

(86) PCT číslo: **PCT/CA96/00387**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/40225**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 39/00
A 61 K 39/385
A 61 K 39/39

(71) Přihlášovatel:

ALBERTA RESEARCH COUNCIL,
Edmonton, CA;

(72) Původce:

Malcolm Andrew J., Edmonton, CA;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Imunogenní a imunostimulační oligosa-
charidové kompozice, způsoby jejich pří-
pravy a použití

(57) Anotace:

Vynález poskytuje imunogenní oligosachari-
dové kompozice, způsoby jejich přípravy a
použití. Kompozice obsahují zejména oligosa-
charidy kovalentně kondenzované k proteino-
vému nosiči, přičemž se ukazuje, že výsledný
konjugát obsahuje specifické imunogenní epi-
topy a vyvolává protektivně imunogenní odpo-
věď. Tento vynález také poskytuje kompozice
obsahující oligosacharid *S. pneumoniae* séro-
typu 8, vhodné pro stimulování imunitní od-
povědi na antigen, způsoby zjišťování pro-
tektivní imunizace proti bakteriálnímu pato-
genu, využívajících tyto kompozice, způsoby
zvyšování imunogenní odpovědi na antigen
podáním těchto kompozic oligosacharidu
S. pneumoniae sérotypu 8 společně s antige-
nem a způsoby přípravy imunostimulačních
kompozic, které jsou popsány výše.

CZ 3278-97 A3

15.10.97

- 1 -

Imunogenní a imunostimulační oligosacharidové kompozice,
způsoby jejich přípravy a použití

Oblast techniky

Tento vynález se týká imunogenních a imunostimulačních oligosacharidových kompozic, způsobů jejich přípravy a jejich použití. Vynález se zejména týká imunogenní kompozice obsahující oligosacharidy kovalentně vázané k nosiči, kde výsledný konjugát vyvolává imunoprotektivní odpověď. Imunostimulační kompozice zahrnují oligosacharidy *S. pneumococcus* sérotypu 8, kovalentně vázané k nosiči nebo jako přísadu v kompozici.

Literární odkazy

V příslušné části popisu jsou citovány dále uvedené literární odkazy.

- P. Anderson, *Infect. Immun.*, 39, 233 (1983),
P. W. Anderson, *Immunogenic Conjugates*, US patent
č. 4 673 574 (1987);
P. Anderson, M. E. Pichichero a R. A. Insel, *J. Clin. Invest.*, 76, 52 (1985a),
P. Anderson, M. E. Pichichero a R. A. Insel, *J. Pediatr.*, 107, 346 (1985b),
P. W. Anderson, M. E. Pichichero, R. A. Insel, R. Betts, R. Eby a D. J. Smith, *J. Immunol.*, 137, 1181 (1986),
P. W. Anderson, M. E. Pichichero, E. C. Stein, S. Porcelli, R. Betts, D. M. Connuch, D. Korones, R. A. Insel, J. M. Zabradnick a R. Eby, *J. Immunol.*, 142, 2464 (1989),
O. T. Avery, W. F. Goebel, *J. Exp. Med.* 50, 533 (1929),

A. Barro, R. Dogan, J. L. Prued'homme, A. Bajart, B. Danue a B. Fritzell, Vaccine, II, 1003 (1993),

G. S. Bixler a S. Pillai, The cellular basis of the immune response to conjugate vaccines v "Conjugate Vaccines. Contributions to microbiology and immunology", J. M. Creese a R. E. Lewis, vyd., Kargen, Basilej (1989),

G. Bolan, C. V. Broome, R. R. Fracklam, B. D. Pitkaytis, D. W. Fraser a W. F. Schlech, III, Ann. Internal Med., 104, 1 (1986),

J. M. Bolgano, A. A. McLean, P. P. Vela, I. Canepa, W. L. Davidson a M. R. Hilleman, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 157, 148 (1978),

C. V. Broome, R. R. Fracklam a D. W. Fraser, N. Engl. J. Med., 303, 549 (1980),

G. A. W. Bruyn a R. van Furth, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 10, 897 (1991),

D. S. Chudwin, S. C. Artrip, A. Korenbilt, G. Schiffman a S. Rao, Infect. Immun., 50, 213 (1985),

K. K. Connelly, J. R. Starke, Sem. Resp. Inf., 6, 209 (1991),

S. J. Cryz a E. Fürer, Conjugate vaccine against infections by gramnegative bacteria, method for its preparation and use, US patent č. 4 771 127 (1988),

R. Eby, M. Koster, D. Hogerman a F. Malinoski, Pneumococcal Conjugate Vaccines, v "Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS",

E. Norrby, F. Brown, R. Chanock, H. Ginsberg, vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1994),

A. Fattom, C. Lue, S. C. Szu, J. Mestecky, G. Schiffman, D. Brylar, W. F. Vann, D. Watson, L. M. Kimzey, J. B. Robbins a R. Schneerson, Infect and Immun., 58, 2309 (1990),

A. Fatom, W. F. Vann, S. C. Szu, R. Schneerson, J. B.

Robbins, C. Chu, A. Sutton, J. C. Vickers, W. T. London, B. Curfman, M. C. Hardagree a J. Shiloach, J. Infect. Immun., 56, 2292 (1988),

H. L. Forester, D. W. Jahnigen, F. M. LaForce, Am. J. Med., 83, 425 (1987),

A. Gaur, K. Arunan, O. Singh a G. P. Talwar, Int. Immunol., 2, 151 (1990),

G. S. Giebink, M. Koskela, P. P. Vella, M. Haris a T. L. Chap, J. Inf. Dis., 167, 347 (1993),

W. F. Goebel, O. T. Avery, J. Exp. Med., 50, 521 (1929),

L. K. Gordon, Polysaccharide-exotoxoid conjugate vaccines, US patent č. 4 619 828 (1986),

L. K. Gordon, Haemophilus influenzae b polysaccharide -diphtheria toxoid conjugate vaccine, US patent č. 4 644 059 (1987),

M. Hazelwood, R. Nusrat, D. S. Kumararatne, M. Goodal, C. Raykundalia, D. G. Wang, H. J. Joyce, A. Milford-Wards, M. Forte a A. Pahor, Clin. Exp. Immunol., 93, 157 (1993),

S. Hakamori, R. Kannagi, Carbohydrate antigens in higher animals, v "Handbook of experimental immunology, sv. 1", D. M. Weir, L. A. Herzenberg, C. Blackwell a L. A. Herzenberg, vyd., Blackwell, Oxford (1986),

M. Heidelberger a O. T. Avery, J. Exp. Med., 38, 73 (1923),

M. R. Hilleman, A. J. Carlson, jr., A. A. McLean, P. P. Vela, R. E. Weibel a A. F. Woodhour., Rev. Infect. Dis., 3 (dodatek), S 31 (1981),

H. J. Jennings, C. Lugowski, Immunogenic polysaccharide-protein conjugates, kanadský patent č. 1 181 344 (1985),

H. J. Jennings, R. Roy a A. J. Gamian, Modified meningococcal group b polysaccharide for conjugate vaccine,

kanadský patent č. 1 261 320 (1989),

J. K. N. Jones a M. B. Perry, J. Am. Chem. Soc., 79,
2787 (1957),

L. Kenne a B. Lindberg, Bacterial polysaccharides
v "The Polysaccharides, sv. 2", G. O. Aspinall, vyd.,
Academic Press, New York (1983),

C-J. Lee, S. D. Banks a J. P. Li, Crit. Rev. Microbio.,
18, 89 (1991),

A. Lees, F. Finkelman, J. K. Inman, K. Witherspoon, P.
Johnson, J. Kennedy a J. J. Mond, Vaccine, 12, 1160 (1994),

R. A. Lock, D. Hansman a J. C. Paton, Microbial
Pathogen., 12, 137 (1992),

D. V. Madore, C. L. Jackson a D. C. Phipps, Penridge
Pediatric Association, L. A. Popejoy, R. Eby a D. H. Smith,
Pediatric, 85, 331 (1990),

A. J. Malcolm, P. Messner, U. B. Sleytr, R. H. Smith
a F. M. Unger, Crystalline bacterial cell surface layers
(S-layers) as combined carrier/adjuvants for conjugate
vaccines, v "Immobilized Macromolecules: Application
Potentials", U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum a M. Sara,
vyd., Springer-Verlag, Londýn (1993a),

A. J. Malcolm, M. W. Best, R. J. Szarka, Z. Mosleh, F.
M. Unger, P. Messner a U. B. Sleytr, Surface layers of
Bacillus alvei as a carrier for a Streptococcus pneumoniae
conjugate vaccine v "Advances in Bacterial Paracrystalline
Surface Layers", T. J. Beveridge a S. F. Koval, vyd., Plenum
Press, New York (1993b),

G. L. Mandell, "Principles and Practice of Infectious
Diseases", Churchill Livingstone, New York (1990),

S. Marburg, D. Jorn, R. L. Tolman, B. Arison, J.
McCauley, P. J. Kniskern, A. Hagopian a P. O. Vella, J. Am.
Chem. Soc., 108, 5282 (1986),

S. Marburg, R. L. Tolman a P. J. Kniskern, Covalently

-modified polyanionic bacterial polysaccharides, stable covalent conjugates of such polysaccharides and immunogenic proteins with bigeneric spacers, and methods of preparing such polysaccharides and conjugates and of confirming covalency, US patent č. 4 695 624 (1987),

S. Marburg, P. J. Kniskern a R. L. Toolman, Covalently ~~-modified bacterial polysaccharides, stable covalent~~ conjugates of such polysaccharides and immunogenic proteins with bigeneric spacers, and methods of preparing such polysaccharides and conjugates and of confirming covalency, US patent č. 4 882 317 (1989),

M. A. Mufson, D. Hughey a E. Lydick, J. Infect. Dis., 151, 749 (1985),

M. A. Mufson, H. E. Krause, G. Schiffman a D. E. Hughey, Am. J. Med. Sci., 293, 279 (1987),

S. V. Nielsen a J. Henrichsen, Scand. J. Infect. Dis., 25, 165 (1993),

J. C. Paton, R. A. Lock, C-J. Lees, J. P. Li, A. M. Berry, T. J. Mitchell, P. W. Andrew, D. Hansman a G. J. Boulnois, Infect. Immun, 59, 2297 (1991),

C. C. A. M. Peeters, A-M. Tenbergen-Meekes, J. T. Poolman, M. Berutett, B. J. M. Zegers a G. T. Rijkers, Infect. Immun., 59, 3504 (1991),

C. L. Penney, F. Michon a H. J. Jennings, Improved Vaccine Compositions, WO 92/04951 (1992),

R. M. Perlmutter, D. Hansburg, D. E. Briles, R. A. Nicolotti a J. M. Davie, J. Immunol., 121, 566 (1978),

M. Porro, Oligosaccharide Conjugate Vaccines, kanadský patent č. 2 052 323 (1992),

M. Porro a P. Constantino, Glycoproteineic conjugates having trivalent immunogenic activity, US patent č. 4 711 779 (1987),

M. Porro, Oligosaccharide conjugate vaccines, US

patentová přihláška č. 07/590 649 (1990),

L. A. M. Saunders, G. T. Rijkers, W. Kuis, A. J. Tenbergen-Meekes, B. R. de Graff-Meeker, I. Hiemstra a B. J. M. Zegers, J. Allergy Clin. Immunol., 91, 110 (1993),

R. A. Schidt, J. F. Boyd, J. D. McCracken, G. Schiffman a J. P. Giolma, Med. Pediatr. Oncol., 11, 305 (1983),

R. Schneerson, O. Barrera, A. Sutton a J. B. Robins, J. Exp. Med. 152, 361 (1980),

R. Schneerson, J. B. Robbins, C. Chu, A. Sutton, W. Vann, J. C. Vickers, W. T. London, B. Curfman a M. C. Hardegree, Infect. Immun., 45, 582 (1984),

R. Schneerson, J. B. Robbins, J. C. Parke, C. Bell, J. Schlesselman, A. Sutton, Z. Wang, G. Schiffman, A. Karpas a J. Shiloach, Infect. Immun., 52, 519 (1986),

R. Schneerson, L. Levi, J. B. Robbins, D. M. Bryla, G. Schiffman a T. Lagergard, Infect. and Immunity, 60, 3528 (1992),

R. C. Seid, jr., R. A. Boykins, D. F. Liu, K. W. Kibrough, C. L. Hsieh a R. Eby, Glycoconj. J., 6, 489 (1989),

S. H. Sell, P. F. Wright, W. K. Vaughn, J. Thompson a G. Schiffman, Rev. Infect. Dis. 3 (doplňek), S 97 (1981),

E. D. Shapiro a J. D. Clemens, Ann. Intern. Med., 101, 325 (1984),

E. D. Shapiro, N. Engl. J. Med., 316, 1272 (1987),

E. D. Shapiro, Pneumococcal vaccine, ve "Vaccines and Immunotherapy," S. J. Fryz, jr., vyd., Pergamon Press, New York, (1991),

G. R. Siber, S. A. Weitzman, A. C. Aisenberg, H. J. Weinstein a G. Schiffman, N. Engl. J. Med., 299, 442 (1978),

M. S. Simberkoff, A. P. Cross, M. Al-Ibrahim, A. L. Baltch, P. J. Geiseler, J. Nadler, A. S. Richmond, R. P. Smith, G. Schiffman a D. S. Shepard, N. Engl. J. Med., 315,

1318 (1986),

M. S. Simberkoff, Pneumococcal vaccine in adults,
v "Immunization", M. A. Sande a R. K. Root, vyd., Churchill
Livingstone, New York (1989),

R. V. Sims, W. C. Steinman, J. H. McConville, L. K.
King, W. C. Zwick a J. C. Schwartz, Ann. Intern. Med., 108,
653 (1988),

J. Slack, G. P. Der-Balian, M. Nahm a J. M. Davie, J.
Exp. Med., 151, 853 (1980),

U. B. S. Sorensen, J. Clin. Micro., 31, 2097 (1993),

J. L. Sloyer, jr., J. H. Ploussard a V. M. Howie, Rev.
Infect. Dis. 3 (doplnek), S 1 (1981),

K. E. Stein, J. Inf. Dis., 165, 549 (1992),

K. E. Stein, Int. J. Tech. Assess, Health Care, 10,
167 (1994),

K. E. Stein, D. A. Zopf, B. M. Johnson, C. B. Miller
a W. E. Paul, J. Immunol., 128, 1350 (1982),

K. E. Stein, D. A. Zopf a C. B. Miller, J. Exp. Med.,
157, 657 (1983),

M. C. Steinhoff, K. Edwards, H. Keyserling, M. L.
Thoms, C. Johnson, D. Madore a D. Hogerman, Pediatr. Infect.
Dis. J., 13, 368 (1994) a

G. C. Tsay a M. S. Collins, Vaccines for gram-negative
bacteria, US patent č. 4 663 160 (1987).

Popis výše uvedených publikací, patentů a patentových
přihlášek je zde začleněn literárním odkazem ve svém celku
ve stejném rozsahu, jako kdyby formulace každé jednotlivé
publikace, patentu a patentové přihlášky byly zde zahrnuty
výslovně a jednotlivě.

Dosavadní stav techniky

3 3000 3 30 30 3000
30 300 30 30 30 30
3 30 3 30 30 30
3 30 3 30 30 30
300 300 300 30 30 30

Imunologické odpovědi na polysacharidy

Heidelberger a Avery (1923) dokázali, že typově specifické antigeny pneumokoků jsou polysacharidy. Bakteriální kapsulární polysacharidy jsou antigeny buněčného povrchu, složené z identických opakujících se jednotek, které tvoří prodloužené sacharidové řetězce. Polysacharidové struktury jsou přítomny na patogenních bakteriích a byly identifikovány na druzích *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* skupiny A a skupiny B, *Streptococcus pneumoniae* a dalších druzích (Kenne a Lindberg, 1983).

Specifické determinanty krevních skupin a "nádorové doprovodné" ("tumor associated") antigeny jsou příklady karbohydrátů (tímto výrazem se zde budou označovat příslušné cukry) povrchu savčích buněk. Onkogenicky transformované buňky často mají povrchové karbohydráty zřetelně odlišné od povrchových karbohydrátů netransformovaných buněk. Tyto glykany sestávají pouze z několika monosacharidů (Hakomori a Kannagi, 1986). Glykanové struktury samy o sobě jsou obvykle neantigenní, ale vytvářejí hapteny v konjunkci s proteinovými nebo glykoproteinovými matricemi.

Všeobecným rysem sacharidových antigenů je jejich neschopnost vyvolat signifikantní hladiny protilátek tříd IgG (IgG isotopů) nebo paměťové odpovědi. Předpokládá se, že jde o antigeny nezávislé na brzlíku (thymus independentní - TI). Konjunkce polysacharidových antigenů nebo imunologicky inertních karbohydrátových haptenu k antigenům závislým na brzlíku (thymus dependentním - TD), jako například k proteinům, zvyšuje jejich imunogenicitu. Protein stimuluje přenašeč - specifické T_H - pomocné buňky, které hrají úlohu

v indukci syntézy antikarbohydrátových protilátek (Bixler a Pillai, 1989).

Mnoho z naší současné znalosti o TI a TD odpovědích pochází ze studií, které se vztahují k myším modelům (Stein a kol. 1983, Stein 1992, Stein 1994). TI antigeny všeobecně vyvolávají nízkou afinitu protilátek omezené třídy a neprodukují imunologickou paměť. Adjuvans mají malý vliv na odpověď na TI antigeny. Na rozdíl od nich, TD antigeny vyvolávají heterogenní a vysokou afinitu protilátek s imunizací a produkují imunologickou paměť. Adjuvans zvyšují odpověď na TD antigeny. Sekundární reakce na TD antigeny ukazují zvýšení poměru IgG ku IgM, zatímco pro TI antigeny sekundární reakce poměru IgG ku IgM je 1:1, podobně jako je tomu u primární reakce (Stein a kol. 1982, Stein 1992, Stein 1994). U myší a lidí TD antigeny vyvolávají predominantně IgG₁ isotopy a dále také určité množství isotopů IgG₂ a IgG₃. TI odpovědi na polysacharidy jsou omezeny na IgG₃ z IgG isotopů (Perlmutter a kol., 1978, Slack a kol., 1980).

Současné pneumokokové vakcíny

Pneumokoky jsou v současné době rozděleni do 84 sérotypů, založených na jejich kapsulárních polysacharidech. Ačkoliv s geografickou polohou existuje určitá variabilita běžně se vyskytujících sérotypů, všeobecně sérotypy 1, 3, 4, 7, 8, a 12 více převládají u dospělé populace. Sérotypy 1, 3, 4, 6, 9, 14, 18, 19 a 23 často způsobují zápal plic u dětí (Mandell, 1990, Connelly a Starke, 1991, Lee a kol., 1991, Sorensen, 1993, Nielsen a Henriksen, 1993).

V současné době je nejvíce používaná antipneumokoková

vakcína, složená z purifikovaných kapsulárních polysacharidů z 23 kmenů pneumokoků (Pneumovax^R 23, Merck Sharp & Dohme). Pneumokokové kapsulární typy, které Pneumovax^R 23 obsahuje, jsou 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F (dánská nomenklatura). O těchto sérotypech se uvádí, že jsou zodpovědné za 90 % vážných pneumokokových nemocí na světě.

O účinnosti vakcíny Pneumovax^R 23 se v literatuře vede určitá polemika (Borgano a kol., 1978, Broome a kol., 1980, Sloyer a kol., 1981, Shapiro a Clemens, 1984, Bolan a kol., 1986, Simberkoff a kol., 1986, Forester a kol., 1987, Shapiro, 1987, Sims a kol., 1988, Simberkoff, 1989, Shapiro, 1991). Pneumokoková vakcína je účinná pro indukci protilátkové odpovědi u zdravých mladých dospělých jedinců (Hilleman a kol., 1981, Mufson a kol., 1985, Bruyan a van Furth, 1991). Bylo prokázáno, že tyto protilátky mají in vitro opsoninovou aktivitu (Chudwin a kol., 1985). Avšak existuje výrazná variabilita v intenzitě odpovědi a v přetrvávání titrů protilátek k různým sérotypům (Hilleman a kol., 1981, Mufson a kol., 1987).

Děti mladší dvou let jsou nejrizikovější skupinou, pokud se týče systémových chorob, zánětu středního ucha a akutního respiračního infekčního onemocnění dolních cest dýchacích způsobených pneumokoky, protože tyto pneumokoky na takovou vakcínu nereagují (Sell a kol., 1981, Hazelwood a kol., 1993, Saunders a kol., 1993). Kromě toho starší a imunosupresovaní jedinci mají oslabené nebo různorodé odpovědi na Pneumovax^R 23 (Siber a kol., 1978, Schildt a kol., 1983, Forester a kol., 1987, Simberkoff, 1989, Shapiro, 1991). Tyto populační skupiny nereagují dobře na polysacharidové antigeny této thymus independentní vakcíny.

Charakteristické pro thymus independentní antigeny je, že třída protilátek změněná z isotopu IgM na isotyp IgG není obvykle pozorována ani není anamnestická odpověď na booster imunizaci (Borgano a kol., 1978).

Nedávné výskyty kmenů bakterií rezistentních na antibiotika kladou důraz na potřebu vyvinout účinné vakcíny pro prevenci dětských infekcí. Nepochybně jsou třeba nové vakcíny proti pneumokokům, obzvláště pro vysoce rizikové skupiny a pro děti.

Konjugované vakcíny

Avery a Goebel byli prvními, kteří připravili vakcíny proti bakteriálním infekcím (Avery a Goebel, 1929, Goebel a Avery, 1929). Později bylo vyvinuto několik proteinových nosičů konjugátů, které vyvolávají thymus dependentní odpovědi na velký počet bakteriálních polysacharidů. Doposavad největší pozornosti dosáhl vývoj konjugovaných vakcín na *Haemophilus influenzae*, typ b (Hib). Schneerson a kol. kovalentně kondenzovali Hib polysacharidy (polyribitol- fosfát) k toxoidu záškrtu. Tato skupina také vyvinula Hib vakcínu derivováním polysacharidu dihydrazidem kyseliny adipové jako vymešovacím činidlem (spacer) a kondenzováním této látky k toxoidu tetanu s karbodiimidem (Schneerson a kol., 1986). Podobný postup byl použit k přípravě konjugátů, obsahujících toxoid záškrtu jako nosič (Gordon, 1986 a 1987). Bifunkční spacer byl využit ke spojení proteinu vnější membrány druhu *Neisseria meningitidis* skupiny B s Hib polysacharidy (Marburg a kol., 1986, 1987 a 1989). Konečně Anderson (1983 a 1987) vytvořil konjugovanou vakcínu tím, že použil Hib oligosacharidy kondenzované reduktivní aminací k netoxickému zkrříženě

reaktivnímu mutantnímu toxinu záškrtu CRM₁₉₇.

Zprávy o účinnosti těchto vakcín se v literatuře liší a mnohé studie stále ještě probíhají. Avšak o oligosacharidových konjugátech (Anderson a kol., 1985a, 1985b, 1986, 1989, Seid a kol., 1989, Madore a kol., 1990, Eby a kol., 1994) a polysacharidových konjugátech (Barra a kol., 1993) se referuje, že jsou imunogenní u malých dětí a vyvolávají thymus dependentní odpověď. Haptenový obsah je klíčovým faktorem konjugované imunogenity (Anderson a kol., 1989, Eby a kol., 1994).

Další konjugované vakcíny byly vyvinuty Jenningsem a kol. (1985 a 1989), který využil aktivaci jodistanu ke kondenzaci polysacharidů druhu *Neisseria meningitidis* k nosičům toxoidu tetanu nebo záškrtu. Porro (1987) popsal metody kondenzace oligosacharidů esterifikované N. meningitidis k proteinovým přenašečům. Byly vyvinuty konjugované vakcíny, obsahující polysacharidy druhu *Pseudomonas aeruginosa*, kondenzované jodistanovým postupem k detoxifikovanému proteinu ze stejného organismu (Tsai a Collins, 1987). Cryz a Furer (1988) použili dihydrazid kyseliny adipové jako rameno vymezovacího činidla (spacer arm) k vytvoření konjugovaných vakcín proti *P. aeruginosa*.

Polysacharidy specifických sérotypů *S. pneumoniae* byly také kondenzovány k osvědčeným proteinovým nosičům, jako například k toxoidům tetanu a záškrtu (Schneerson a kol., 1984, Fattom a kol., 1988 a 1990, Schneerson a kol., 1992), k membránovým proteinům N. meningitidis (Marburg a kol., 1987, Giebink a kol., 1993) a k pneumolysinovému mutantnímu nosiči (Paton a kol., 1991, Lock a kol., 1992, Lee a kol., 1994). Byla vyvinuta technologie pro kondenzaci

oligosacharidů *S. pneumoniae* k proteinu CRM₁₉₇ (Porro, 1990). Tyto konjugované vakcíny mají variabilní či dosud neurčitě imunopotentní vlastnosti. Největším problémem v současné době při vývoji účinných glykokonjugovaných vakcín u *S. pneumoniae* je reprodukovatelnost těchto vazebných technologií s udržením imunogenních epitopů. Optimální imunogenní velikost oligosacharidu se jeví být různá, závislá na sérotypu, určující konformační aspekt určitých imunogenních epitopů (Eby a kol., 1994, Steinhoff a kol., 1994).

Jsou potřeba nové vakcíny proti DTP, tuberkulóze, dětské obrně, spalničkám, hepatitidě, *Haemophilus influenzae* typu b a zápalu plic, které vyvolají dlouhotrvající ochranu. Aby byla vyvolána ochrana proti *S. pneumoniae* u dětí, je vyžadován multi-haptenový proteinový konjugát, který obsahuje vysokou hladinu oligosacharidů v optimální imunogenní velikosti pro každý sérotyp.

Mnozí výzkumníci navrhli zvýšení imunogennosti konjugované vakcíny podáváním adjuvans. Například sůl hliníku je pro použití u lidí schválena. Také karbohydrátové podíly, jako např. β -glukanové částice a nízkomolekulární dextran, mají vlastnosti projevující aktivitu adjuvans, jak bylo referováno. Adjuvax (Alpha-Beta Technology) je kompozice adjuvans, které obsahuje β -glukanové částice. Lees a kol. (1994) referovali o užití konstrukčních prvků na bázi nízkomolekulárního dextranu jako o adjuvans. Penney a kol. (1992) ohlásili sloučeninu s dlouhým alkylovým řetězcem s imunologickou aktivitou.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 ilustruje opakující se jednotkové struktury polysacharidů, používané v příkladech tohoto vynálezu.

Obr. 2 ukazuje separační profil kapsulárních polysacharidů sérotypu 8 druhu *Streptococcus pneumoniae* na koloně BioGel P-10 po kyselé hydrolyze (0,5-M kyselina trifluoroctová, dále též TFA, teplota 100 °C, doba 20 minut). Výsledkem jsou rozeznatelné oligosacharidy s opakujícími se jednotkami od jedné do osmi.

Obr. 3A až 3D ukazují relativní velikost opakujících se jednotek kapsulárních polysacharidů hydrolyzovaného sérotypu 8 druhu *Streptococcus pneumoniae* u píku 1 (obr. 3A), 2 (obr. 3B), 3 (obr. 3C) a 4 (obr. 3D), měřenou pomocí analýzy HPLC.

Obr. 4 ukazuje HPLC retenční doby glukózových, M-3 maltotriózových, M-7 maltoheptózových a M-10 maltooligosacharidových standardů, použité k určení relativní velikosti různých opakujících se jednotek oligosacharidů.

Obr. 5 je příkladem retenčních dob ribitolu, rhamnózy, galaktózy, fukózy a mannózy jako monosacharidových standardů, použitých k určování obsahu uhlohydrátu hydrolyzovaných opakujících se jednotek.

Obr. 6 ukazuje separační profil polysacharidových hydrolyzátů *S. pneumoniae* sérotypu 6B v kyselině fluorovodíkové při průchodu kolonou P-10 BioGel.

Obr. 7 ukazuje separační profil polysacharidových hydrolyzátů *S. pneumoniae* sérotypu 6B v kyselině trifluoroctové při průchodu kolonou P-60 BioGel.

Obr. 8 ukazuje separační profil polysacharidových hydrolyzátů *S. pneumoniae* sérotypu 14 v kyselině trifluor-octové při průchodu kolonou P-30 BioGel.

Obr. 9 ukazuje separační profil polysacharidových hydrolyzátů *S. pneumoniae* sérotypu 19F v kyselině octové při průchodu kolonou P-10 BioGel.

Obr. 10 ukazuje separační profil polysacharidových hydrolyzátů *S. pneumoniae* sérotypu 23F v kyselině trifluor-octové při průchodu kolonou P-10 BioGel.

Obr. 11 ukazuje separační profil polysacharidu *S. pneumoniae* sérotypu 8 štěpeného celulázou při průchodu kolonou P-10 BioGel.

Obr. 12 ukazuje separační profil polysacharidových hydrolyzátů pneumokokové C-substance v kyselině fluorovodíkové při průchodu kolonou P-10 BioGel.

Obr. 13 ukazuje výsledky inhibice ELISA při použití myšího antiséra ke konjugátu proteinový nosič - oligosacharid sérotypu 8 *Streptococcus pneumoniae*.

Obr. 14 vyobrazuje okyselení oligosacharidů pro karbodiimidovou kondenzaci.

Obr. 15 ukazuje separaci redukované a jodistanové frakce polysacharidu (23-valentní polysacharidová vakcína Pneumovax^R 23, Merck Sharp & Dohme).

Obr. 16 ukazuje separaci redukované a jodistanové frakce oligosacharidů druhu *Streptococcus pneumoniae*,

sérotypu 6B.

Obr. 17 ukazuje separaci redukované a jodistanové frakce oligosacharidů druhu *Streptococcus pneumoniae*, sérotypu 19F.

Obr. 18 zobrazuje chemické reakce při kondenzaci jodistanu a EDC.

Obr. 19 ukazuje mono-hapten 8-oligosacharidový konjugát toxoidu tetanu, inhibovaný anti-8 sérem, vázaným na 8 polysacharidem pokrytou ELISA desku.

Obr. 20 zobrazuje isotopy protilátek IgG, vyvolané polysacharidem *S. pneumoniae* sérotypu 8 po imunizaci 8:14 dihapten-oligosacharid-TT-konjugátem.

Obr. 21 ukazuje zvýšenou hladinu isotopu protilátky IgG₁, vyvolanou polysacharidem po imunizaci 8:14 dihapten-oligosacharidovým konjugátem, typickou pro thymus dependentní odpověď.

Obr. 22A a 22B ukazují vyvolané IgG isotopy ze skupiny myši imunizovaných 14-polysacharidovými a oligosacharidovými konjugáty s adjuvans a bez adjuvans.

Nyní bude uveden krátký souhrn vynálezu.

Jeden aspekt vynálezu je, že vynález skýtá kompozice, které obsahují

- a) karbohydrátový hapten, obsahující alespoň jeden imunogenní epitop a separovaný podle velikosti, a

- b) nosič, ve kterém výše zmíněný hapten je kovalentně kondenzován k výše zmíněnému nosiči a kde konjugát haptenu s nosičem je protektivně imunogenní.

Jiný aspekt vynálezu poskytuje způsoby přípravy konjugovaných sloučenin, které spočívají v tom, že se

- a) štěpí bakteriální polysacharid na oligosacharidy, aby byly chráněny imunogenní epitopy na výsledných oligosacharidech, b) separují výsledné oligosacharidy na základě velikosti,
- c) provede selekce těch oligosacharidů, které obsahují imunogenní epitopy, založená na inhibici ELISA, d) aktivují oligosacharidy selektované v bodě c), a e) kondenzují aktivované oligosacharidy k purifikovanému nosiči, kde výsledná sloučenina obsahuje imunogenní epitopy a je protektivně imunogenní.

Další aspekt vynálezu spočívá v tom, že vynález poskytuje způsoby zajišťující ochrannou imunizaci proti bakteriálnímu patogenu tím, že se podává savci, potřebujícímu takové ošetření, účinné množství vakcínové kompozice popsané výše.

Ještě dalším aspektem vynálezu je, že vynález skýtá kompozice vhodné pro stimulování imunitní odpovědi na antigen, přičemž výše zmíněné imunostimulační kompozice zahrnují oligosacharid *S. pneumoniae* sérotypu 8, který obsahuje imunogenní epitop, jak byl stanoven inhibicí ELISA, a vhodné farmaceutické vehiculum, kde výše zmíněný oligosacharid poskytuje imunostimulační efekt.

Ještě dalším znakem vynálezu je, že vynález poskytuje způsoby zajišťování protektivní imunizace proti bakteriálnímu patogenu. Tyto způsoby zahrnují podávání savci, v případě potřeby takového léčení, účinného množství kompozice sérotypu 8, popsané výše.

Ještě dalším znakem vynálezu je, že vynález poskytuje způsoby zvýšení imunogenní odpovědi na antigen, které zahrnují podávání oligosacharidu *S. pneumoniae* sérotypu 8, který obsahuje imunogenní epitop, jak byl stanoven inhibicí ELISA, společně s výše zmíněným antigenem.

Jiný dalším aspektem vynálezu je, že vynález poskytuje způsoby přípravy imunostimulačních kompozic popsaných výše, které zahrnují

- a) štěpení polysacharidu *S. pneumoniae* sérotypu 8 na oligosacharidy, aby byly chráněny imunogenní epitopy na výsledných oligosacharidech,
- b) separování výsledných oligosacharidů podle velikosti,
- c) selekci těch oligosacharidů, které obsahují imunogenní epitopy, která je založená na inhibici ELISA, a
- d) smísení selektovaných oligosacharidů s vhodným farmaceutickým nosičem.

Nyní se uvádí podrobný popis vynálezu.

Tento vynález se vztahuje ke zlepšeným způsobům přípravy konjugátů oligosacharido-proteinových nosičů.

Konjugovaný produkt může být složen z různých haptenu nebo nosičů. Mohou být připraveny mono-, di- a multihaptenové konjugáty. Jsou popsány způsoby určení přítomnosti imunogenních epitopů na haptenu nebo nosiči výsledného konjugátu. Takové konjugáty mají využití jako vakcíny, terapeutické a profylaktické prostředky, imunomodulační diagnostické prostředky a prostředky pro vývoj a výzkum.

Tento vynález je obzvláště vhodný pro vyvíjení konjugátů jako vakcín proti takovým bakteriálním patogenům, které zahrnují *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae B*, *Streptococcus* skupiny B, *Streptococcus* skupiny A, *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Cryptococcus neoformans*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae*, na které však výčet není omezen. Konjugáty podle tohoto vynálezu přeměňují slabě imunogenní nebo neimunogenní molekuly na molekuly, které vyvolávají specifické imunoprotektivní protilátkové nebo buněčné odpovědi.

U vysoce rizikových skupin, jako například starších osob a dětí do 2 let, byly pozorovány slabé imunitní odpovědi na polysacharidové vakcíny (thymus independentní antigeny, TI). Několik výzkumníků se pokusilo vyvolat thymus dependentní odpovědi (TD) na velký počet bakteriálních polysacharidů, když použili proteinové nosiče. Integrita kritických imunogenních epitopů a nepevná kovalentní vazba mezi karbohydrátem a proteinem jsou velká omezení u těchto konjugovaných vakcín. Tento vynález směřuje k objevení kondenzační technologie, která poskytuje dobrou reprodukovatelnost s ohledem na poměr uhlohydrátu a nosiče v konjugátu. Tento vynález také poskytuje způsoby ověřování přítomnosti

imunogenních epitopů na oligosacharidových haptenech a na konjugátech haptenu - nosiče. Tyto konjugáty vyvolávají odpověď na tyto polysacharidové konjugáty, která je charakteristická pro typy IgM, IgG a IgA.

Polysacharidové konjugáty vyvolávají nezvýšovatelné odpovědi protilátek IgM, obvyklé pro TI antigeny. Antisérum, vytvořené jako odpověď na tyto polysacharidové konjugáty, nemá opsoninovou aktivitu. V tomto vynálezu oligosacharidy připravené štěpením polysacharidů z různých bakteriálních kmenů jsou separovány podle velikosti a použity k produkci mono-haptenových konjugátů. Tyto konjugáty vyvolávají isotypy IgG protilátek s imunoprotektivní opsonizační schopností. Tato protilátková odpověď je vyvolána bez použití

jakéhokoliv adjuvans. A tak způsoby podle tohoto vynálezu jsou ideálně vhodné pro vytváření imunogenních konjugátů oligosacharidový haptenu - nosiče, které využijí slabě imunogenní nebo neimunogenní polysacharidy různých kmenů. Zjistilo se, že kritickou pro vyvolání imunoprotektivní odpovědi je přítomnost imunogenních epitopů na těchto oligosacharidech.

Počet bakteriálních antigenů potřebných k vývoji účinných antipatogenních vakcín vzrůstá. Avšak opakované podávání toxoidů tetanu nebo záškrtu (které jsou často užívány jako proteinové nosiče ve vakcínových kompozicích a jako profylaktická míra následujícího traumatu) může způsobit fenomén, který se nazývá nosičem indukovaná epitopová suprese. Epitopová suprese byla popsána v literatuře u konjugátů syntetického peptidu a sacharidového toxoidu (Gaur a kol., 1990, Peeters a kol., 1991). Imunologické odpovědi na haptenu kondenzovaný s proteinovým nosičem mohou být redukovány nebo mohou chybět, když příjemce byl předtím imunizován nosičem.

Cílem mnoha výzkumníků je vyvinout vakcíny, které vyvolají ochranu k hlavním bakteriálním sérotypům, které způsobují akutní respirační infekční onemocnění, zánět středního ucha, bakteriemi u dětí, bez vyvolání suprese nosičem. Způsoby podle tohoto vynálezu mohou být využity k vytváření multi-haptenových konjugátů s optimálními imunogenními epitopy ke každému bakteriálnímu sérotypu. Tyto konjugáty, které obsahují nižší množství proteinového nosiče než tradiční konjugáty, snižují výskyt fenomenu (jevu) suprese nosičem. Snižená dávka antigenu při možném použití těchto konjugátů minimalizuje antigenní kompetici, pozorovanou u tradičních konjugátů.

Již dříve původci tohoto vynálezu uvedli, že povrchové vrstvy (S-vrstvy) krystalické bakteriální buňky jsou vhodné jako nosiče pro vývoj prototypových konjugovaných vakcín (Malcolm a kol., 1993a) a jako prostředek při vyhnutí se jevu suprese nosičem (Malcolm a kol., 1993b). V laboratoři majitele patentu se rozpoznalo několik glykoproteinů S-vrstvy, které vyvolávají nezkříženě reagující protilátkové a buněčné odpovědi. Při použití S-vrstev, izolovaných z různých bakteriálních kmenů, mohou být vyvinuty vakcíny proti mnoha chorobám, a tím se vyhne supresi nosičem, pozorované u toxoidů tetanu a záškrtu. Avšak S-vrstvy je obtížné izolovat a purifikovat, dále je drahé je vyrobit, takže nelze dosáhnout jejich širokého využití jako nosiče vakcín. Tento vynález popisuje způsoby pro přípravu mono-, do a multi-haptenových oligosacharidových konjugátů, které snižují množství nosiče nezbytného k vyvolání zvláštní odpovědi, a tím klesá riziko nosičem indukované epitopové suprese dokonce i tehdy, když je jako nosič použit toxoid tetanu nebo záškrtu.

Využitelnost

Jedno zvláštní použití technologie podle tohoto vynálezu spočívá ve vývoji účinných vakcín pro prevenci infekcí zápalu plic u dětí. Jinou aplikací vynálezu je vyvinout vakcínu pro ochranu proti kmenům *Streptococcus* skupiny B, *Streptococcus* skupiny A, *Haemophilus influenzae* B, *Streptococcus pneumoniae* a *N. meningitidis*, které převládají u dětí a u osob starších a imunosupresovaných. Další použití zahrnují vývoj konjugátu pro vyvolání ochrany proti různým bakteriálním nebo virovým patogenům.

Původci tohoto vynálezu zjistili, že použití podmínek, které štěpí specifické vazby (například 1 až 4 vazby), ale nechají monosacharidy a další imunologicky důležité sloučeniny jako například fosfáty neporušené, má za následek zlepšenou imunogennost výsledných konjugátů.

Původci tohoto vynálezu zjistili, že velikost a struktura oligosacharidu jsou důležité pro maximalizování imunogennosti konjugovaného preparátu. Různé velikosti oligosacharidů jsou separovány z hydrolyzovaných směsí polysacharidů a izolovány podle velikosti frakce. Obsah monosacharidů a relativní velikost separovaných oligosacharidů se měří například HPLC analýzou. Opakující se jednotky různé velikosti jsou testovány za použití inhibice ELISA. Původci vynálezu zjistili, že inhibice ELISA je přímo úměrná imunogennosti oligosacharidového preparátu a výsledného konjugátu.

V laboratoři původců byly používány zejména oligosacharidy, připravené ze štěpení polysacharidů druhů *S. pneumococcus*, kmenů 3, 6B, 8, 14, 19F a 23, pneumokokové

C-substance, a C-polysacharidy *N. meningitidis*. Pro některé sérotypy *S. pneumococcus* a pneumokokovou C-substanci jsou preferovány následující opakující se jednotky (R.U.):

Sérotyp 3: 4-8 R.U.
6B: 4-10 R.U.
8: 2-8 R.U.
14: 4-6 R.U.
19F: 4-10 R.U.
C-substance: 6-10 R.U.

Preferované opakující se jednotky pro C-polysacharid *N. meningitidis* jsou 6-10 R.U.

Bylo nalezeno, že vytvářející se nabitě skupiny na sacharidových haptenech usnadňují vazby haptenu k nosiči. K umožnění vazby oligosacharidu k nosiči při vyšším poměru cukru k nosiči je účinné použití kationových nebo anionových výměnných kolon. Toto zajišťuje více haptenu na nosič a snižuje jev (fenomén) suprese nosičem. Redukované frakce karbohydrátu jsou použity pro vazbu k nosiči.

Jiný důležitý aspekt při přípravě účinných konjugovaných vakcín je použití purifikovaného nosiče. Nečistoty v preparátu nosiče mohou vadit v procesu kondenzace. Shluky nosičových proteinů, nalezených v preparátu nosiče, mohou mít nepříznivý vliv na optimální poměr haptenu a nosiče, nezbytný k vyvolání požadované odpovědi. Nosiče jsou zpravidla purifikovány na velikosti vylučující kolonové chromatografií, ačkoliv může být použita jakákoliv standardní metoda, která odstraňuje nečistoty a shluky.

Pro získání ideálního poměru uhlohydrátu a konjugované-

ho nosiče jsou kritické doba kondenzační reakce, množství oligosacharidu, kondenzačního činidla a nosiče. Původci tohoto vynálezu vyvinuli způsoby, které měří poměry, uhlohydrátu k nosiči pomocí opakovatelných testů. K přípravě účinného konjugátu je také důležité během kondenzační reakce udržovat optimální hodnotu pH a teplotní podmínky. K vytvoření účinných konjugovaných kompozic je z podobného hlediska důležité užití účinných blokovacích činidel, která zastaví kondenzační reakci, ale nezakrývají imunogenní skupiny.

Je nezbytné využití kondenzačních chemických vlastností, které udržují imunogenní epitopy na oligosacharidech/polysacharidech. Původci tohoto vynálezu zjistili, že kondenzace EDC s jodistanem, jak je popsána níže, může být použita pro kondenzaci oligosacharidů a nosičů. Kromě přímé kondenzace cukru k nosiči se mohou použít různé spojovníky (linkery), které oddělí sacharid od povrchu proteinu. Příslušné linkery mohou také zajistit nabitě nebo nenabitě části, jak je požadováno. Imunogennost kondenzované kompozice cukr - nosič se určuje inhibicí ELISAových jednotek.

Při používání způsobu podle vynálezu původci objevili možnosti produkovat di-haptenové a multi-haptenové konjugáty, které si ještě zachovávají své imunogenní epitopy. Mohou být vyráběny konjugáty s různými oligosacharidovými sekvencemi a/nebo velikostmi. Podobně mohou být syntetizovány konjugáty, obsahující oligosacharidové a polysacharidové kompozice. Takové konjugáty jsou schopny snižovat nebo eliminovat antigenní kompetici a vyvo...

A tak vhodná forma konjugátu zajišťuje schopnost redukovat supresi epitopu indukovanou nosičem. Klíčem v tomto ohledu jsou identifikace a použití imunogenních

oligosacharidových epitopů a účinnější kondenzace cukru k proteinu. Vázání většího počtu imunogenních epitopů na molekulu proteinu znamená, že je k zajištění ochranné imunizace potřeba menší množství nosiče.

Původci tohoto vynálezu vyvinuli způsoby, které měří rozsah imunoprotektivní protilátkové odpovědi na konjugované kompozice pomocí isotopování ELISA, baktericidních a opsonizačních testů. Toto dovoluje určit, které konjugáty budou vyvolávat odpověď vhodného imunoglobulinového isotypu, například IgG isotypů, pokud se použijí u protektivně imunizovaných savců.

Definice

Dále vysvětlené termíny mají následující významy, pokud jsou zmiňovány v tomto dokumentu:

Oligosacharid znamená karbohydrátovou sloučeninu, sestavenou z malého počtu monosacharidových jednotek. Oligosacharidy mohou vzniknout zejména štěpením polysacharidů.

Polysacharid znamená karbohydrátovou sloučeninu, obsahující velký počet sacharidových skupin. Polysacharidy, nalézající se na vnějším povrchu bakterií nebo virů, jsou obzvláště výhodné při tomto vynálezu.

Nosič znamená látku, která vyvolává thymus dependentní imunologickou odpověď, a která může být vázána k haptenu nebo antigenu za vzniku konjugátu. Zejména může být použito různých proteinových, glykoproteinových, karbohydrátových nebo podjednotkových nosičů včetně toxoidu/toxinu tetanu,

toxoidu/toxinu záškrtu, proteinů vnější membrány bakterie, povrchových vrstev krystalické bakteriální buňky, sérového albuminu, γ -globulinu nebo hemocyaninové přílepků.

Imunogenní znamená být příčinou imunitní odpovědi. Imunogenní epitop znamená, že část molekuly, která je rozpoznána imunitním systémem, zapříčiňuje imunogenní odpověď.

Hapten znamená antigen, obsahující nekompletní nebo částečný antigen, který nemusí být sám schopný způsobit produkci protilátek. Di - a multi-hapten, pro účely tohoto patentu, se uvádí ve vztahu ke kompozicím, obsahujícím dva (di) nebo více (multi) oligosacharidové hapteny, konjugované k nosiči.

Protektivně imunogenní neboli imunoprotektivní znamená stimulující imunitní odpověď, která zabraňuje infekci patogenem.

Imunostimulační znamená stimulující nebo zvyšující imunitní odpověď k slabším imunogenním haptenům nebo antigenům.

Novorozeně znamená nově narozený živočich, včetně dětí.

Metodologie

Příprava a separace štěpených polysacharidů

Polysacharidy, které jsou dostupné ze sbírky American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, nebo se mohou dostat postupy izolace, známými v tomto oboru, se

štěpí na oligosacharidové jednotky za použití vhodných koncentrací chemikálií. Mezi tyto chemikálie se zahrnuje kyselina trifluoroctová, kyselina octová, kyselina fluorovodíková, kyselina chlorovodíková, hydroxid sodný a octan sodný, třebaže na ně výčet není omezen. V závislosti na jednotlivých chemických vlastnostech a koncentracích a na požadovaných výsledných oligosacharidech se mohou použít různé dlouhá časová období a teploty. Dále se mohou k přípravě oligosacharidů z polysacharidů použít komerčně dostupné enzymy (například celulóza a β -galaktosidáza) nebo izolované endoglykany související s bakteriofágem, známé v oboru nebo připravené podle dosavadního stavu techniky.

Obr. 1 ukazuje opakující se jednotkové struktury polysacharidů, použité v příkladech podle tohoto vynálezu. Odborníkovi v tomto oboru jsou známy další bakteriální a virové polysacharidy, které mohou být použity při způsobech a v kompozicích podle tohoto vynálezu. Mohou se štěpit různé polysacharidy, mezi které se zahrnuje pneumokokový skupinový antigen (C-substance) a kapsulární polysacharidy sérotypů *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* skupiny A a *Streptococcus* skupiny B, na které však výčet není omezen.

Po rozštěpení se výsledné oligosacharidové směsi separují podle velikosti za použití P-10 (frakcionační rozsah molekulové hmotnosti 1500 až 20 000), P-30 (frakcionační rozsah molekulové hmotnosti 2500 až 40 000) a P60 (frakcionační rozsah molekulové hmotnosti 3000 až 60 000) BioGel kolony. Přítomnost karbohydrátů v různých frakcích kolony se určuje rozborů za pomoci kyseliny fenolsírové nebo kyseliny sialové a chromatografie na tenké

vrstvě (TLC). Frakce kolony, které obsahují karbohydráty, se potom analyzují pomocí HPLC.

Přítomnost imunogenních epitopů ve frakcích štěpených polysacharidů separovaných podle velikosti je určována inhibicí ELISA, jak je popsáno dále. Jestliže příprava nemá za následek oligosacharidové frakce, které inhibují při testu ELISA, postupy štěpení mohou být modifikovány změnou enzymů nebo chemikálií, molarity, doby reakce nebo teploty, aby se vytvořily imunogenní epitopy.

Stanovení imunogenních epitopů v oligosacharidavých přípravcích

Přítomnost imunogenních epitopů ve frakcích kolony se potvrzuje inhibicí ELISA a testováním fosforu, jak je uvedeno dále v experimentální části. Oligosacharidové frakce, které obsahují imunogenní epitopy [definovány jako ty, které způsobují alespoň přibližně 25% redukci a spíše přibližně 50% redukci v O.D.₄₀₅ (optická hustota) při koncentraci 12,5 µg], jsou selektovány pro kondenzaci s nosičem.

Kondenzace k nosiči

Oligosacharid nebo polysacharid, který má být použit pro kondenzaci s nosičem, je okyselen nebo redukován v preparátu pro EDT nebo jodistanovou oxidační kondenzaci. Například oligosacharidový preparát může být redukován pomocí RexynTM 101 (H) kationoměničové kolony na bázi organické kyseliny, k okyselení cukru pro EDC kondenzaci. Podobně mohou být redukovány cukry při použití normalizovaných způsobů pro jodistanovou oxidační kondenzaci. Když se

připravují di-haptenové nebo multi-haptenové konjugáty, každý oligosacharid je aktivován jednotlivě pro EDC nebo jodistanovou konjugaci.

Mezi výhodné dihaptenové oligosacharidové konjugáty se zahrnuje 3:8-TT, 6:8-TT, 6:14-TT, 8:14-TT, 8:19-TT, 8:23-TT a 14:19-TT.

Nosič

Může se použít různých proteinových, glykoproteinových karbohydrátových nebo podjednotkových nosičů včetně toxoidu/toxinu tetanu, toxoidu/toxinu záškrtu, proteinů vnější membrány bakterie, povrchové vrstvy krystalické bakteriální buňky, sérového albuminu, γ -globulinu nebo hemocyaminové přílepky. Ve zvláštních případech tohoto vynálezu se jako nosič používá toxoid tetanu. Preparáty na bázi toxoidu tetanu běžně obsahují shluky a nízkomolekulární nečistoty. Čistota nosiče je nezbytná pro získání pevnosti v kondenzačních reakcích. K získání purifikovaného preparátu nosiče se používá vylučovací chromatografie podle velikosti.

Oligosacharidy obsahující imunogenní epitop, separované podle velikosti, se kondenzují k purifikovaným nosičům karbodiimidovou (EDC) nebo jodistanovou aktivací, při použití způsobů popsanych v experimentální části. Libovolné oligosacharidy zbavené heptenu se separují od konjugátů hapten - nosič pomocí kolonové chromatografie. Poměr uhlohydrátu k proteinu v konjugátech se stanoví Lowryho proteinovými testy a testy na bázi kyseliny fenolsírové nebo kyseliny sialovou. Obvykle mají konjugáty připravované EDC kondenzací poměr uhlohydrátu a nosiče 1:2, zatímco konjugáty připravené použitím jodistanové oxidační kondenzace mají

poměry uhlohydrátu k nosiči v rozsahu od 1:5 do 1:10.

Určování imunogenních epitopů na konjugátech

Jak již bylo dříve uvedeno, integrita kritických imunogenních epitopů je problémem dříve známých konjugačních technologií. V tomto vynálezu je používán test inhibice ELISA k určení potenciální imunogenosti různých konjugátů, produkovaných konjugačními postupy podle tohoto vynálezu. Původci tohoto vynálezu zjistili, že konjugáty, které prokazují inhibici při tomto testu (alespoň asi 25% redukci a výhodněji asi 50% redukci v O.D.₄₀₅ při koncentraci 6,25 µg), při použití způsobů uvedených dále v příkladech, zajišťují ochrannou imunogenost, když se používají jako vakcíny u savců. A tak tento test je používán k vyšetření vhodných konjugovaných kompozic.

Imunizace k vyvolání imunoprotektivních odpovědí protilátky

Obvykle se myši imunizují ve dni 0 (první neboli primární imunizace), ve dni 7 (druhá neboli sekundární imunizace) a ve dni 28 (třetí neboli terciární imunizace) podkožní injekcí (100 µl do 2 bočních stran) s antigeny (polysacharidové konjugáty, oligosacharidové konjugáty, nekondenzovaný polysacharid nebo oligosacharid nebo nekondenzovaný toxoid tetanu) v dávkách 0,1, 0,5, 1, 2,5 a 5 µg, vztaženo na obsahu uhlohydrátu pro EDC konjugáty a obsahu proteinu pro jodistanové konjugáty.

Antigeny se zředí na různé dávky v 0,9% roztoku chloridu sodného. Jako negativní kontrolní vzorky se použijí myši, kterým se aplikuje 0,9% roztok chloridu sodného. Myším se odebere krev 7 až 10 dní po 2. a 3. imunizaci, aby bylo

získáno sérum ke zkoumání imunoprotektivních odpovědí protilátky. V tabulce 1 je běžné imunizační schéma pro *S. pneumoniae* sérotypu 3. Jde o konjugáty polysacharidu a oligosacharidu s toxoidem tetanu, připravené za použití EDC kondenzace.

Účinná jsou i různá jiná schémata včetně: den 0 (1. imunizace), den 14 (2. imunizace) a den 44 (3. imunizace), a den 0 (1. imunizace), den 30 (2. imunizace) a den 60 (3. imunizace).

Konjugáty podle tohoto vynálezu mohou být použity jako klasické vakcíny, jako imunogeny, které vyvolávají specifickou produkci protilátek nebo stimulují specifické buňkou zprostředkované imunitní odpovědi. Mohou být také využity pro terapeutické metody, například ke stimulaci imunního systému, aby rozpoznal tumor - doprovodné antigeny, jako imunomodulátory, například ke stimulaci produkce lymfokinů/cytokinů aktivováním specifických buněčných receptorů, jako profylaktická agens, například k blokování na buněčné membráně a prevenci buněčné adheze, jako diagnostická agens, například k identifikování určitých buněk, jako nástroje vývoje a/nebo výzkumu, například ke stimulaci buněk pro produkci monoklonální protilátky.

Určování odpovědi

Jak již bylo dříve diskutováno, protilátkové odpovědi na TI a TD antigeny se liší. U myši je odpověď na polysacharidový (TI) antigen obvykle složena z IgM a IgG v poměru 1:1. Všeobecně jsou IgG isotopy omezeny s IgG₃, který je příliš vytlačen do anti-polysacharidového séra. Isotypy IgA mohou být také přítomny. TI antigeny vyvolávají

protilátky s nízkou afinitou a imunologická paměť není vytvářena.

U TD antigenů jsou zjištěny zvýšené sekundární odpovědi IgG protilátek (anamnestická odpověď) s vyšším poměrem IgG ku IgM. Zřetelné hladiny IgA obvykle nejsou přítomné. TD antigen vyvolává heterogenní odpověď IgG isotypů. Predominantní isotyp, kterým jsou isotypy IgG₁, IgG_{2a} a IgG_{2b}, může způsobit expresi, zatímco hladina IgG₃ isotypu je obvykle relativně nízká. TD antigeny vyvolávají imunologickou paměť a protilátková afinita se zvyšuje s imunizací. A tak analýza imunoglobulinových isotypů, produkovaných jako odpověď na podávání konjugátů, umožní určit, zda konjugát bude protektivně imunogenní nebo takový nebude.

Původci tohoto vynálezu zjistili, že konjugáty podle vynálezu indukují odpověď typickou pro TD, spíše než TI antigeny, jak bylo stanoveno přímým a isotypovým ELISA baktericidním a opsonizačním testem.

Konjugáty připravované pomocí způsobů EDC kondenzace podle tohoto vynálezu vyvolávaly lepší protilátkové odpovědi, než konjugáty připravované jodistanovou aktivací. Dávky 1 µg byly nejvíce imunogenní. Oligosacharidové konjugáty, připravené z nosičů toxoidu záškrtu, vyvolávaly podobné protilátkové odpovědi jako oligosacharidové konjugáty, připravované z nosičů toxoidu tetanu.

Jak bylo zmíněno výše, několik výzkumníků se pokusilo zvýšit imunogenitu a vyvolat thymus dependentní protilátkovou ochranu pomocí kondenzace polysacharidové látky k toxoidům tetanu a záškrtu. Výsledky ukazují, že tyto konjugáty jsou jen o málo více imunogenní, než nekondenzova-

né kapsulární polysacharidy (CPS). Jedno možné vysvětlení pro tento úkaz může být ve skutečnosti, že toxoidy černého kašle, záškrtu a tetanu (v hlinité soli jako adjuvans) jsou často profylakticky podávány dětem v imunizačním režimu ve čtyřech dávkách. Tento režim mohou děti tolerovat, avšak u dětí způsobuje neschopnost vyvolat protektivní odpověď protilátky k haptenu/antigenu, kondenzovaným k těmto toxoidovým nosičům (suprese nosičem). Jiný možný důvod pro selhání indukce ochrany může být strukturální. Proteinové nosiče vyvolávají a zvyšují imunitní odpověď na hapteny, ale v případě konjugátů CPS-protein, je podíl CPS relativně velký k TI antigenu. Imunitní systém nemusí rozpoznat CPS-protein jako konjugát, ale jednoduše jako dva odlišné subjekty, což má za následek thymus independentní odpověď na CPS a thymus dependentní odpověď na nosič.

Zdá se, že tomu tak je případě zde popisované studie, jak je ukázáno v tabulce 2. Imunitní systém rozpoznává polysacharid z konjugátu polysacharid - toxitoid tetanu (TT) podle tohoto vynálezu jako TI antigen. Možná TD indukující schopnost nosiče s ohledem na protilátky k polysacharidu není pozorována. Nutně se předpokládá, že imunogenní epitopy karbohydrátových haptenu (oligosacharidů) musí být v těsné blízkosti u TD indukujících epitopů nosiče, aby konvertovaly odpověď TI na odpověď TD.

K přípravě konjugátů je zde použita také technologie "linker arm". Jako linker se podle tohoto vynálezu použila například kyselina 6-amino-n-hexanová. Bylo shledáno, že výsledné konjugáty jsou méně účinné ve vyvolávání protilátkových odpovědí, než konjugáty připravené přímo kondenzací EDC aktivovaných oligosacharidových haptenu k nosičům. Toto zjištění podporuje hypotézu původců tohoto

vynálezu, že k vyvolání TD odpovědi je třeba, aby haptén a nosič byly v těsné blízkosti.

Původci tohoto vynálezu také vyvinuli způsoby stanovení hladiny imunoprotektivní protilátky vyvolané konjugáty podle tohoto vynálezu, při použití baktericidních nebo opsonizačních testů. Tyto testy ukázaly, že konjugáty podle tohoto vynálezu jsou účinné ve vyvolávání protektivních protilátek, jak bylo změřeno pomocí těchto testů.

Jak bylo uvedeno dříve, u studií s nosičem S-vrstva, provedených v laboratoři majitele tohoto vynálezu i u jiných výzkumníků, byl pozorován fenomén epitop - nosič suprese (Malcolm a kol., 1993b). Multi-hapténové konjugáty podle tohoto vynálezu snižují nebo zmaří tuto supresi, protože tyto konjugáty budou obsahovat větší množství imunogenního epitopu na molekulu nosiče, než obvyklé konjugované vakcíny. S konjugáty podle tohoto vynálezu nebude imunní systém "přestimulován" nosičem. Například tri-hapténový konjugát, připravovaný způsoby podle tohoto vynálezu, bude vyžadovat jen tři injekce k vyvolání specifických imunitních odpovědí na tři různé cílové patogeny. Na rozdíl od něj, při použití běžných monohapténových konjugátů, je třeba aplikovat devět injekcí k vyvolání podobných odpovědí. To znamená, že by se požadovalo trojnásobné množství proteinu.

Dále, využitím konjugátů podle tohoto vynálezu mohou být navrženy imunizační režimy, které konvertují anti-polysacharidovou TI odpověď na TD odpověď. Ekonomická počáteční expozice na polysacharid (například použitím látky Pneumovax^R 23), následovaná jednou aplikací konjugátu podle tohoto vynálezu, by indukovala hladiny IgG protilátek (anamnestická odpověď). Takový imunizační režim by

neindukoval supresi nosiče. V takových případech, imunitní systém zpočátku vyškolený na různé karbohydrátové epitopy a antigeny (TI odpověď), by byl indukován multihaptenovými konjugáty k vyvolání silnějších imunogenních odpovědí na patogeny často způsobující nemoci u zvláštních populačních skupin (například sérotypy 1, 3, 4, 6, 9, 14, 18, 19 a 23 u dětí).

Farmaceutické kompozice

K vyvolání protilátek na specifické patogeny a/nebo na různé podíly uhlohydrátů se konjugáty podle tohoto vynálezu mohou podávat různými způsoby k doručení na místo určení, tedy intraperitoneálně, intramuskulárně, intradermálně, subkutánně, orálně nebo nasálně.

Složení kompozic podle tohoto vynálezu může zahrnovat vhodné farmaceutické nosiče. Konjugáty podle tohoto vynálezu jsou imunogenní bez adjuvans, ačkoliv adjuvans mohou zvýšit titry imunoprotektivních protilátek nebo buňkou zprostředkovanou imunitní odpověď. Taková adjuvans mohou zahrnovat dále uvedené přípravky, na které však nejsou omezeny: Freundovo kompletní adjuvans, Freundovo nekompletní adjuvans, hydroxid hlinitý, dimethyldioktadecylamoniumbromid, Adjuvax (Alpha-Beta Technology), Inject Alum (Pierce), Monophosphoryl Lipid A (Ribi Immunochem Research), MPL + TDM (Ribi Immunochem Research), Titermax (CytRx), toxiny, toxoidy, glykoproteiny, lipidy, glykolipidy, stěny bakteriální buňky, podjednotky (bakteriální nebo virové), karbohydrátové podíly (mono-, di-, tri-, tetra-, oligo- a polysacharidy), různá složení liposomů nebo saponiny. K přípravě imunogenní látky mohou být s konjugátem použity kombinace různých adjuvans.

Přesná složení kompozice budou záviset na jednotlivém konjugátu, na druhu, který má být imunizován a na cestě podání.

Takové kompozice jsou vhodné pro imunizování kteréhokoliv živočicha, náchylného k bakteriální nebo virové infekci, jako jsou například hovězí, ovčí, kozí, koňské, zaječí, prasečí, psí, kočičí a ptačí druhy. Mohou být imunizována domácí i divoká zvířata. Lidé mohou být těmito konjugovanými kompozicemi také imunizováni.

Způsobem podávání může být kterýkoliv vhodný způsob a může se měnit v závislosti na bakterii nebo viru, na živočichu, který má být imunizován a na jiných okolnostech. Přednost se dává parenterálnímu podání, jako například subkutánnímu, intramuskulárnímu nebo intravenóznímu podání. Nejvíce se preferuje subkutánní podání. Může být použito také orální podávání, mezi které se zahrnují orální dávkové formy, které jsou enterálně povlečené.

Rozvrh podávání se může měnit v závislosti na bakteriálním nebo virovém patogenu a na živočichu, který má být imunizován. Živočichové mohou dostat jednu dávku nebo mohou dostat další booster dávku nebo dávky. Pro trvalou ochranu mohou být použity každoroční boostery. K počátečnímu vyvolání protilátkové odpovědi jsou zejména preferovány tři dávky ve dnech 0, 7 a 28.

Příklady provedení vynálezu

Dále zařazené příklady nemají v úmyslu jakýmkoli způsobem omezit rozsah vynálezu.

Příklady

Příklad 1

Způsob přípravy a separace polysacharidových hydrolyzátů

Obr. 2 ukazuje separační profil kapsulárních polysacharidů sérotypu 8 druhu *Streptococcus pneumoniae* na koloně BioGel P-10 po kyselé hydrolyze (0,5-M kyselina trifluoroctová, teplota 100 °C, doba 20 minut). Výsledkem jsou rozeznatelné oligosacharidy opakujících se jednotek od jedné do osmi. Číslo od jedné do osmi se shoduje s čísly opakujících se jednotek, nalezených v každém píku, přičemž pík devět obsahuje oligosacharidy větší než osm opakujících se jednotek. Oligosacharidy odvozené od hyaluronové kyseliny byly použity k normalizaci chromatografického systému.

Relativní velikost opakujících se jednotek u píků 1, 2, 3 a 4 byla stanovena pomocí analýzy HPLC (obr. 3). Obr. 4 ukazuje HPLC retenční doby glukózy, M-3 maltotriózy, M-7 maltokeptózy a M-10 maltooligosacharidu (Sigma Chemical Co.), používané jako standardy k určení relativní velikosti různých oligosacharidových opakujících se jednotek. Obsah monosacharidu opakující se struktury se stanoví další hydrolyzou oligosacharidových opakujících se jednotek s 2,0-M kyselinou trifluoroctovou (TFA) při teplotě 100 °C po dobu 2 hodin. Příklad retenčních dob ribitolu, rhamnózy, galaktózy, fukózy a mannózy jako monosacharidových standardů, použitých k určování obsahu karbohydrátu hydrolyzovaných opakujících se jednotek je znázorněn na obr. 5. Chemická struktura jednoho sérotypu 8 opakující se jednotky byla určena jako β -glukóza (1 $\rightarrow$ 4) β -glukóza (1

—> 4) α -galaktóza (1 —> 4) α -glukuronová kyselina (1 —> 4) pomocí analýzy GC-MS a NMR. Toto souhlasí s opakující se jednotkou struktury citované v literatuře (Jones a Perry, 1957).

Obr. 6 až 10 jsou příklady separačních profilů polysacharidových hydrolyzátů (kyselina trifloroctová, kyselina octová nebo kyselina fluorovodíková) *S. pneumoniae*, sérotypů 6B, 14, 19F a 23F na kolonách P-10, P-30 nebo P-60 BioGel.

Obr. 11 ukazuje separaci enzymem štěpeného polysacharidu (sérotyp 8 štěpený celulázou). Separace oligosacharidů C-substance je ukázána na obr. 12.

Příklad 2

Způsob inhibice ELISA k určení imunogenních epitopů oligosacharidových preparátů

Základní postup využitý pro inhibici ELISA k testování na přítomnost imunogenních epitopů na oligosacharidových preparátech a oligosacharidových nebo polysacharidových konjugátech se uvádí dále.

1. Pokryje se 96 jamek EIA plotny (NUNC) s 1 μ g Ag na jamku za použití 0,05 M Na_2CO_3 pokrývacího pufru (100 μ l na jamku) a inkubuje při teplotě 4 °C přes noc.

2. Ten samý den se připraví inhibiční Ag zkumavky (například s různými oligosacharidovými hydrolyzáty) při použití 1 x PBS - 0,01 % Tween 20 jako ředidla.

- Provede se sedminásobné seriové ředění ve zkumavkách (počínaje 25 μg na jamku, až do 0,391 μg /jamku ve trojím provedení), celkový objem v každé zkumavce by měl být 175 μl po seriovém ředění.

- Připraví se ředění antiséra specifického typu (například Diagnostic anti-serum 14, které bylo získáno u králíků, Statum Seruminstitut) v poměru 1 : 1000, v 1 x PBS + Tween.

- Přidá se 175 μl tohoto roztoku do každé zkumavky. Celkový objem v každé zkumavce je nyní 350 μl . Zkumavky se udržují při konstantní teplotě 4 °C přes noc.

3. Dalšího den se blokují EIA plotny, pomocí blokovacího pufru (100 μl /jamku, 1 x PBS + 1 % BSA) a udržují při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny.

4. Odeberou se plotny, obsah každé zkumavky se přenesse do jamek (100 μl /jamku) a inkubuje za teploty místnosti po dobu 2 hodin.

5. Třikrát se promyjí plotny promývacím roztokem (0,01 % Tween + 1 x PBS).

6. Připraví se ředění konjugátu koží antikráličím (nebo anti-druhových sérotypů specifického séra použitého v bodě 2) IgG alkalické fosfatázy (TAGO) v 1 x PBS + 1 % Tween pufru (100 μl /jamku) v poměru 1 : 1500 a inkubuje při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Opět tak udělat.

7. Čtyřikrát se promyjí plotny promývacím roztokem a oklepe se přebytečná kapalina.

8. Rozpustí se substrátové tablety alkalické fosfatázy (#104 - Sigma) v diethylenaminovém (DEA) pufru, hodnota pH = 9,98, 5 ml/tabletu, 100 µl/jamku.

9. Inkubují se plotny v temnu a odečte se absorbance při vlnové délce 405 nm každých 15 minut.

V tomto testu mohou být použita různá komerčně a laboratorně připravená antiséra, zahrnující séra, která vytvářejí myši, krysy, králíci, kozy, prasata, opice, paviáni a lidé, na které však výčet není omezen.

Obr. 13 ukazuje výsledky inhibice ELISA při použití myšího antiséra ke konjugátu proteionový nosič - oligosacharidy sérotypu 8, *Streptococcus pneumoniae* (2 až 4 opakované jednotky kondenzované při použití EDC k toxoidu tetanu). Inhibice byla testována s opakujícími se jednotkami 1, 2, 3, 4, 6 a 8+ oligosacharidů typu 8 (0,5 M kyseliny trifluor-octové, teplota 100 °C, 20 minut příprava) a polysacharidy typu 8. Z těchto výsledků může být vidět, že opakující se jednotka 1 (řetězec se 4 monosacharidy) neobsahuje imunogenní epitop. Opakující se jednotka 2 (řetězec s 8 monosacharidy) byla schopna inhibovat protilátky, vázané na ELISA plotnu, co udává, že obsahuje imunogenní epitop. Molekulová hmotnost opakující se jednotky 2 byla určena pomocí FAB-MS analýzy v hodnotě 1365. Toto dobře koreluje s teoretickou molekulární hmotností 8 sacharidů. Opakující se jednotky 3, 4, 6, 8+ a celý polysacharid také inhibovaly protilátky vázané na ELISA plotnu. Opět tak udávaly, že na těchto oligo/polysacharidech byly přítomny imunogenní epitopy.

15.10.97

- 41 -

Tabulka 3 ukazuje podobné výsledky, zjištěné za použití králičího anti-S. pneumoniae sérotypu 8 specifického séra (Statens Seruminstitut). Opakující se jednotka 1 neinhibuje zřetelně vazbu, opakující se jednotky 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8+ a celý polysacharid inhibují vazbu.

Inhibice ELISA byla také používána k určení přítomnosti imunogenních epitopů na oligosacharidech, připravených při použití různých postupů hydrolýzy na různých polysacharidech. Tabulka 4 ukazuje výsledky s metodami používanými podle dosavadního stavu techniky, například kanadský patent č. 2 052 323, původce Porro, k hydrolyzování polysacharidu S. pneumoniae sérotypu 6 (0,01 M kyseliny octové, teplota 100 °C, doba 30 hodin). Celý polysacharid blokoval vazbu při nízké koncentraci antigenu (účinný při koncentraci 0,39 µg), zatímco hydrolyzát kyseliny octové neblokoval. Je třeba povšimnout si, že původci tohoto vynálezu nemohli separovat hydrolyzovaný preparát podle velikosti, protože byl "karamelizován".

Původci tohoto vynálezu zjistili, že různá hydrolyzační činidla (například kyselina trifluoroctová), doba redukce a teplota vytvářejí oligosacharidy s imunogennějšími epitopy, jak je ukázáno v tabulce 5. 0,5 M kyseliny trifluoroctové, teplota 70 °C a doba 1 nebo 2 hodin hydrolyzování účinně inhibují vázání protilátky při 3,13 µg koncentraci, avšak při čtyřhodinové přípravě tomu tak není. Také tabulky 6 a 7 ilustrují vliv doby přípravy 6B oligosacharidů s imunogenními epitopy nebo bez imunogenních epitopů. Dvouhodinová příprava s kyselinou octovou blokuje vázání protilátek (při koncentraci 3,13 µg), přípravy po dobu 24 a 48 hodin toto neblokuje. Podobně příprava s kyselinou trifluoroctovou po dobu 1,5 hodiny účinněji blokuje vázání

než příprava po dobu 3 hodin.

Jak je ukázáno v tabulce 8, hydrolýza sérotypu 14 S. pneumoniae v 0,5 M kyselině trifluoroctové při teplotě 70 °C po dobu 7 hodin, jak bylo zjištěno při dosavadním stavu techniky (Porro, kanadský patent č 2 052 323), není výhodná. Lepší pro přípravu imunogenních 14 oligosacharidů je snížená molární koncentrace kyseliny trifluoroctové (například 0,1 M).

Tabulka 9 ilustruje důležitost výběru oligosacharidů, které obsahují imunogenní epitopy, pro kondenzaci k nosiči. Struktura opakující se jednotky 3 oligosacharidu sérotypu 14 nemůže inhibovat vázání protilátky. Avšak opakující se jednotky 4 a 8 obsahují imunogenní epitopy a účinně blokují vázání protilátky.

Tabulka 10 ukazuje vliv koncentrace hydrolyzátu a reakčního doby na přípravu 14 oligosacharidů, obsahujících imunogenní epitopy. Imunogenní epitopy se při sedmihodinové hydrolýze pomocí kyseliny trifluoroctové zachovávají, ale při hydrolýze po dobu 24 hodin jsou zničeny.

Tabulka 11 ilustruje důležitost použití optimálních tepelných podmínek pro vytváření oligosacharidů 19F, obsahujících imunogenní epitopy. Imunogenní epitopy se zničí hydrolýzou prováděnou kyselinou chlorovodíkovou při teplotě místnosti, ale jsou zachovány, když hydrolýza se provádí při teplotě 70 °C.

Když se hodnota pH váže na barvu.

Jak je ukázáno v tabulce 12, slabá inhibice vázání protilátky se pozoruje u hydrolyzátu 23F polysacharidů s 0,25-M kyselinou fluoroctovou při teplotě 70 °C po dobu

3 hodin (Porro, kanadský patent č 2 052 323). Tabulka 13 ukazuje vliv času na vytváření imunogenních 23-oligosacharidů. Oligosacharidy, vytvářené (hydrolyzou pomocí 0,1 M kyseliny trifluoroctové, při teplotě 70 °C po dobu 3 hodin, inhibují vázání protilátky, avšak oligosacharidy připravené hydrolyzou po dobu 5 hodin nepůsobí inhibičně. Tabulka 14 ukazuje přítomnost imunogenních oligosacharidů po hydrolyze 0,5 M kyselinou trifluoroctovou při teplotě 70 °C po dobu 15 minut nebo při hydrolyze 5 molární kyselinou octovou při teplotě 70 °C po dobu 5 hodin. Tyto hydrolyzáty účinně inhibují do koncentrace 0,78 µg.

Tabulka 15 ukazuje užitečnost inhibice ELISA k rozpoznání imunogenních oligosacharidů *Neisseria meningitidis* sérotypu C. Hydrolyzáty připravené pomocí octanu sodného blokují vázání protilátky stejně účinně, jako celý polysacharid.

Příklad 3

Způsob acidifikace karbohydrátových částí pro karbodiimidovou kondenzaci

Připraví se kationměničová kolona (Fisher Scientific) s náplní Rexyn 101 (H, organická kyselina) a promyje deuterovanou vodou (dH₂O). Polysacharidové a oligosacharidové vzorky rozpuštěné v deuterované vodě (hodnota pHné vody neutrální) se vedou touto kolonou a zachycují rychlostí jedné kapky za 6 sekund. Acidifikace se potvrdí pomocí indikátorových tyčinek, u kterých se hodnota pH váže na barvu. Prebytečná deuterovaná voda se použije k promytí kolony. Acidifikované frakce se spojí a lyofilizují pro použití při kondenzačních reakcích.

Obr. 14 popisuje štěpení prováděné pomocí kyseliny trifluoroctové mezi β -D-Glcp (1 $\longrightarrow$ 4) β -D-Gal oligosacharidové struktury. Jako výsledek vznikne aldehyd a hydroxylová skupina. Další oxidací aldehydu vzniká karboxylová skupina. Když tato látka projde kationoměničovou kolonou, vytvoří se skupina COO^- .

Příklad 4

Způsoby kondenzace a kvantitativní testy

Způsob kondenzace karbodiimidu (EDC)

Ve 2 ml 0,1-molárního dihydrogenfosforečnanu draselného se rozpustí vzorek ionem nabitého karbohydrátu (polysacharidu nebo oligosacharidu) (například 3 mg) a EDC (3 mg) v poměru 1:1. Pomocí 1-normálního roztoku hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové se udržuje hodnota pH 4,5. Tato směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny. Potom se přidá nosič (3 mg) k EDC aktivovaným karbohydrátům a dále míchá při teplotě místnosti po dobu 4 hodin. Tato reakce se zastaví přidáním 200 μ l 10 % hydrogenuhličitanu amonného. Vzniklá směs se dále míchá při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny.

Výsledný konjugát se dialyzuje proti deuterované vodě přes noc za použití dialyzační trubice s hranou molekulární hmotnosti (MWCO) 50 000.

Konjugáty se lyofilizují a potom testují pomocí Lowryho proteinu, kyseliny fenolsírové, kyseliny sialové a testují na fosfor, aby se stanovilo složení (způsoby jsou popsány

níže). Konjugáty připravené těmito kondenzačními metodami mají obvykle poměr karbohydrátu a nosiče 1:2.

Testování pomocí kyseliny fenolsírové pro kvantitativní stanovení karbohydrátů

Reakční činidlo : 5% roztok fenolu [5,5 ml kapalného fenolu (90%) přidaného do 94,5 ml destilované vody].

Standard : Zásobní roztok glukózy, 1 mg/ml. Pro standardní křivku se připraví 2 až 60 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ vzorku pufru.

Postup: Převzato z publikace Handbook of Micromethods for the Biological Sciences, G. Keleti a W. H. Lederer (vyd.), 1974, Van Nostrand Reinbold Co., New York.

1. Umístí se 200 μl vzorků do velmi čistých zkumavek.
2. Přidá se 200 μl fenolového činidla.
3. Rychle se přidá 1 ml koncentrované kyseliny sírové.
4. Reakční směs se nechá dobře vířit.
5. Reakční směs se nechá stát při teplotě místnosti po dobu 30 minut.
6. Při teplotě místnosti je barva stabilní 2 až 30 hodin.
7. Odečte se absorbance při vlnové délce 490 nm. Slepý vzorek se zkumavkou obsahující pouze vodu se označí jako

vzorek # 1.

Kvantitativní stanovení pomocí kyseliny sialové

Reakční činidla :

a) 6 g oktahydrátu síranu hlinitého $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}]$ se rozpustí a doplní destilovanou vodou na objem 20 ml.

b) 1 g p-dimethylaminobenzaldehydu se rozpustí a doplní 6-normální kyselinou chlorovodíkovou na objem 20 ml. (Uloží se ve tmavé lahvičce v chladničce).

Standard : N-acetylneuraminová kyselina v koncentraci 0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, celkový objem je 350 μl . Použije se destilovaná voda k doplnění na 350 μl .

Postup:

1. Použije se 200 μl vzorku duplicitně. Doplní se destilovanou vodou na objem 350 μl .

2. Přidá se 700 μl reakčního činidla A do každé zkumavky a vše se protřepe.

3. Přidá se 350 μl Ehrlichova reakčního činidla B.

4. Zakryjí se všechny zkumavky mramorovou destičkou.

5. Zkumavky se zahřívají po dobu 30 minut na teplotu 100 °C při použití modulu Pierce Heatings.

6. Zkumavky se rychle ochladí na teplotu místnosti na ledové lázni.

7. Odečte se optická hustota při vlnové délce 530 nm.

Testy na fosfor

Reakční činidla:

a) 2,5% molybdenan amonný

b) 10% kyselina askorbová

c) kyselina chloristá a

d) 1-mmolární fosforečnan sodný jako standard.

Postup: Převzato z G. Rouser, A. N. Siakotos a S. Fleischer, Lipids 1, 85-86 (1996).

1. Vzorky a standardy (0, 25, 50, 100 a 200 μ l, 25 až 200 nmol) se umístí do čistých zkumavek.

2. Vzorky se suší v ohřívacím bloku v digestoři po dobu 5 minut při teplotě 180 °C.

3. Do každé zkumavky se přidá 450 μ l kyseliny chloristé, každá zkumavka se zakryje mramorovou destičkou a zahřívá po dobu 30 až 60 minut na teplotu 180 °C.

4. Po ochlazení zkumavek se přidá 2,5 ml deuterizované vody.

5. K reakční směsi se přidá 0,5 ml molybdenanu amonného a ihned míchá vytvářením víru.

6. K reakční směsi se přidá 0,5 ml kyseliny askorbové a ihned míchá vytvářením víru.

7. Zkumavky se umístí po dobu 15 minut na vodnou lázeň o teplotě 95 °C.

8. Po ochlazení zkumavek se odečtete absorbance při vlnové délce 820 nm.

9. Před odečtením mohou být vzorky nechány několik hodin.

Testování Lowryho proteinu

Reakční činidla:

a) 2 % (hmotnost/objem) uhličitanu sodného v 0,1-molárním roztoku hydroxidu sodného (1 litr)

b) 0,5% síran mědnatý v 1% roztoku citrátu sodného (100 ml)

c) Folin-Ciocalteuovo fenolové činidlo (2 x)

d) hovězí sérový albumin (BSA) (1 mg/ml)

Postup:

1. Připraví se standardní křivka, která sestává z 0, 12,5, 25, 50, 100 a 200 µg BSA v konečném objemu 200 µl.

2. Vnese se vzorek neznámého proteinu do 200 μ l deuterované vody.

3. Smíchají se reakční činidla A a B v objemovém poměru 50:1 a přidají se 2 ml do každého vzorku.

4. Míchá se vířením a vše nechá stát při teplotě místnosti po dobu 10 minut.

5. Folin-Ciocalteuovo fenolové činidlo se zředí v poměru 1:1 deuterovanou vodou a přidá v objemu 200 μ l do každého vzorku.

6. Vše se míchá vířením a ponechá stát při teplotě místnosti po dobu 30 minut.

7. Odečte se absorpce při vlnové délce 660 nm.

Kondenzační způsob jodistanové oxidace

Vzorky polysacharidu nebo oligosacharidu (například 3 mg) se rozpustí ve 3 ml čerstvě připraveného 60-milimolárního jodistanu sodného v 50-milimolárním octanu sodném. Tento přípravek se potom míchá přes noc při teplotě 4 °C. K zastavení reakce se přidá ethylenglykol (300 μ l). Tato směs se potom míchá při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny a poté lyofilizuje. Vzorky rozpuštěné v 1,5 ml 0,03-molárního hydrogenuhličitanu amonného (hodnota pH = 8,0) se vedou přes kolonu s náplní P-2 Bio-Gel. Testy kyselinou fenolsírovou nebo kyselinou sialovou se použijí k určení frakcí, obsahujících jodistanem redukovanou formu vzorků, a tyto vzorky se potom lyofilizují.

Obr. 15 ukazuje separaci redukované polysacharidové frakce (23-valentní polysacharidová vakcína - Pneumovax^R 23, Merck Sharp & Dohme) frakce. Obr. 16 a 17 ukazují separaci redukovaných oligosacharidů sérotypů 6B a 19F druhu *Streptococcus pneumoniae*.

3 mg redukovaného sacharidu a 3 mg nosiče se rozpustí ve 3 ml 0,1-molárního dekahydrátu tetraboritanu sodném, hodnota pH = 8,9. Do této směsi se potom přidá natriumkyanborhydrid (H + zdroj) a vše se míchá po dobu 48 hodin při teplotě 50 °C. Tato reakce se zastaví úpravou hodnoty pH na 3 až 4 pomocí 80% kyseliny octové. Vzniklý konjugát se potom dialyzuje po dobu 48 hodin proti deuterované vodě (2 až 3 výměny deuterované vody) při použití dialyzační trubice s 50 000 MWCO.

Konjugát se lyofilizuje a složení konjugátu se určí testováním Lowryho proteinu a testy pomocí kyseliny fenolsírové, kyseliny sialové a testem na fosfor. Konjugáty připravené použitím těchto kondenzačních způsobů mají poměr karbohydrátu a nosiče od 1:5 do 1:10.

Obr. 18 popisuje jodistanovou a EDC kondenzační chemickou reakci.

Příklad 5

Konjugované nosiče

Příklad 4 popisuje způsoby používané k přípravě imunogenních oligosacharidových/polysacharidových konjugátů ze slabě imunogenních nebo neimunogenních polysacharidů.

Toxoid tetanu se čistí pro použití jako nosič sloupcovou chromatografií. Tento purifikovaný toxoid vyvolává vysoké hladiny isotopů IgM (například 50 $\mu\text{g/ml}$ myšího séra) a IgG (například IgG, 100 $\mu\text{g/ml}$ séra, IgG_{2a}, 38 $\mu\text{g/ml}$ séra, IgG_{2b}, 68 $\mu\text{g/ml}$ séra, a IgG₃, 105 $\mu\text{g/ml}$ séra).

Příklad 6

Způsob stanovení imunogenních epitopů na oligosacharidovém/polysacharidovém konjugátu

Použije se inhibice ELISA, jak je popsána v příkladu 2. Pomocí inhibice ELISA se potvrzuje přítomnost imunogenních epitopů na mono-hapten 8-oligosacharidovém konjugátu toxoidu tetanu. Tento konjugát inhibuje anti-8 sérum, které se váže k 8 polysacharidu, pokrývajícimu ELISA plotnu (obr. 19). Volný toxoid tetanu vázání neinhibuje. Je také prokázána přítomnost imunogenního 8 oligosacharidu na di-haptenových konjugátech 6:8, 14:8 a 19:8. Tento obrázek ilustruje reprodukovatelnost kondenzačních postupů podle tohoto vynálezu, protože konjugáty 8-mono-haptenové a di-haptenové blokovaly vázání protilátek stejně, což vyjadřuje, že každý konjugát obsahuje ekvivalentní množství 8 oligosacharidu.

Tabulka 16 ukazuje výsledky inhibice ELISA, když se jako inhibující antigeny použijí 6B polysacharid, 6B oligosacharidy, konjugát 6B:8-di-hapten-oligosacharidu a toxoidu tetanu a samotný toxoid tetanu. Toxoid tetanu neinhibuje vázání anti-6B-séra k 6B-polysacharidu, pokrývajícimu ELISA plotnu. Volný 6B-oligosacharid nebo

polysacharid inhibuje vázání. Konjugát 6B:8-di-hapten-oligosacharid-TT také inhibuje vázání. To potvrzuje přítomnost imunogenních 6B epitopů na konjugátu 6B:8-di-hapten-TT.

Podobně konjugát 14:8-di-hapten-TT inhibuje anti-14 sérové vázání, co dokazuje přítomnost imunogenních epitopů sérotypu 14 (tabulka 17). Za povšimnutí stojí, že při vysokých koncentracích existuje nespecifická inhibice samotným tetanovým toxoidem. Původci tohoto vynálezu zjistili, že toto je artefakt anti-14 v tomto testu.

K toxoidu tetanu byly kondenzovány různé oligosacharidové frakce 23F hydrolyzátu. Všechny imunogenní epitopy, které obsahoval sérotyp 23F, jsou uvedeny v tabulce 18.

Imunogenní epitopy oligosacharidů *N. meningitidis* (příprava s NaOAc) byly zachovávány podobně, když kondenzovaly k toxoidu tetanu (viz tabulka 19).

Příklad 7

Způsob stanovení hladin isotopů protilátek, vyvolaných thymus independentními (TI) a thymus dependentními (TD) antigeny

Základní postup k měření hladin protilátkových isotopů je založen na kvantitativním stanovení isotopů IgM, IgG a IgA, vyvolaných různými konjugáty.

1. Pokryjí se EIA plotny (NUNC, IMMUNOSORB) 1 μg /jamku Ag v 0,05-molárním pufru uhličitanu sodného a hydrogenuhličitanu sodného, hodnota pH = 9,5, v objemu 100 μl /jamku.

2. Inkubuje se přes noc při teplotě 4 °C.
3. Další den se blokují plotny se 100 µl/jamku blokovacího pufru (1 x PBS + 1 % BSA) a inkubuje se za teploty místnosti přibližně během 1 hodiny.
4. Rozředí se myší sérum v pracovním pufru (1 x PBS + 0,1 % Tween) v poměru 1:25, přidá se 100 µl/jamku do příslušné jamky a udržuje po dobu 2 hodin při teplotě místnosti.
5. Plotny se třikrát promyjí promývacím pufrem (1 x PBS + 0,05 % Tween) a přebytečná kapalina se odklepe poklepem ploten o pracovní desku stolu.
6. Rozředí se EIA Grade Mouse Type (králičí anti-myší IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ a IgA, Bio-Rad) v pracovním pufru v poměru 1:2 při 100 µl/jamku a inkubuje 2 hodiny při teplotě místnosti.
7. Plotny se třikrát promyjí promývacím pufrem.
8. Rozředí se konjugát kozí anti-králičí IgA alkalické fosfatázy (TAGO) v pracovním pufru v poměru 1:1500 při 100 µl/jamku a inkubuje během 2 hodin při teplotě místnosti.
9. Plotny se čtyřikrát promyjí promývacím pufrem.
10. Připraví se enzymový substrát za použití tablet Sigma # 104 Alkaline Phosphatase Substrate (jedna tableta/5 ml 10% dietanolaminového substrátového pufru) při 100 µl/jamku a inkubuje v temnu při teplotě místnosti a odečet

se provádí každých 30 minut při vlnové délce 405 nm.

11. Přepočítá se odečtená absorbance na μg protilátek/ml séra za použití křivek dávka-odpověď, vytvořených z ELISA odpovědí, králíčích anti-myších isotopů protilátek na různé koncentrace imunoglobulinů zvláštních myších tříd a podtříd (Zymed Labs. Inc.).

Tabulka 2 ukazuje protilátky vyvolané u myší po imunizaci oligosacharidovými a polysacharidovými konjugáty *S. pneumoniae* sérotypu 8. Pouze 8 oligosacharidový konjugát vyvolává IgG protilátky všech isotopů, nekonjugovaný oligosacharid není imunogenní, polysacharid a polysacharidový konjugát vyvolává protilátky isotopů typické pro TI odpovědi (převážně isotopy IgM, IgA a IgG₃). Adjuvans není nezbytné k vyvolání IgG isotopů s konjugátem oligosacharid-toxoid tetanu podle tohoto vynálezu. Konjugáty obsahující relativně malé oligosacharidy, hapteny o 2 až 4 opakujících se jednotkách (8 až 16 sacharidů), vyvolávají nejlepší protilátkové odpovědi, jak je změřeno přímou metodou ELISA.

Pracovní postup přímé ELISA

1. Použije se NUNC Maxisorp Immunoplate.
2. Rozředí se pokrývací antigen v uhličitan-hydrogen-uhličitanovém pufru na 1,0 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Použijí se skleněné zkumavky, protože antigen by se k plastické hmotě přilepil.
3. Přidá se 100 μl do každé jamky plotny a uloží přes noc při teplotě 4 °C.
4. Promyje se třikrát v PBS s 0,05 % Tween a přebytečné

PBS se odklepe poklepem na Kimwipes papírové ručníky.

5. Přidá se 100 μ l/jamku blokovacího činidla (1 x PBS - 1 % BSA) a inkubuje při teplotě místnosti po dobu 60 minut.

6. Provede se trojnásobné promytí jako v bodě 4.

7. Přidá se testovaná protilátka příslušně zředěná PBS - 0,01 % Tween v množství 100 μ l/jamku a inkubuje při teplotě místnosti po dobu 90 minut.

8. Provede se trojnásobné promytí jako v bodě 4.

9. Rozředí se alkalickou fosfatázou konjugovaný anti-myší Ig (TAGO Cat # 4653) PBS Tween v poměru 1:1500, přidá se 100 μ l/jamku a inkubuje v temnu po dobu 90 minut.

10. Provede se trojnásobné promytí jako v bodě 4.

11. Přidá se Sigma 104 fosfatázový substrát (tablety s obsahem dinatrium-p-nitrofenylfosfátu) v množství 100 μ l/jamku. Přidají se 2 tablety (5 mg/tabletu) substrátu do 10 ml dietanolaminového pufru. Vše se udržuje v temnu, protože substrát je světlem inaktivován. Inkubace se provádí za teploty místnosti v temnu. Vývoj reakce je různý v závislosti na protilátce. Absorbance může být odečítána přístrojem Microelia Auto Reader (405 nm) v přibližně 30 minutových intervalech.

Výsledky v tabulce 20 ukazují srovnání hladin IgG₁ a IgG₃ u myší imunizovaných 8-konjugátem ve věku 3 týdnů a ve věku 8 týdnů. Signifikantní hladiny IgG₁ byly vyvolány

8-oligosacharid-TT-konjugátem u myši imunizovaných ve stáří 3 týdnů ($0,273 \mu\text{g/ml}$) a ve stáří 8 týdnů ($0,700 \mu\text{g/ml}$). Příznačné pro TD odpověď je, že adjuvans (například FCA), zvyšuje specificky hladinu IgG_1 ($1,22 \mu\text{g/ml}$). 8-Polysacharid indukuje nadměrnou expresi IgG_3 a nízkou hladinu IgG_1 , typickou pro polysacharidovou TI odpověď. 8-Polysacharid-TT konjugát, pokládáný za "TD antigen", indukuje pouze nízké hladiny IgG_1 s nadměrnou expresí IgG_3 , charakteristické pro TI polysacharidové antigeny. Tedy adjuvans v kombinaci s 8-polysacharid-TT-konjugátem nezvyšuje hladiny IgG_1 , ale zvyšuje protilátky IgG_3 (jako TI odpověď). O některých polysacharidových konjugátech je známo, že vyvolávají kombinace diagramů TI a TD protilátkových odpovědí (Stein, 1992, Stein, 1994).

Obr. 20 zobrazuje IgG protilátkové isotopy vyvolané 8:14 di-hapten-oligosacharid-TT-konjugátem na 8 polysacharid. Podobně jako 8-mono-hapten konjugát, tento di-hapten konjugát může indukovat mnohem vyšší hladiny specifických IgG_1 protilátek (TD odpověď), než 8-polysacharidový konjugát nebo 8-polysacharid samotný. Je prokázána nadměrná exprese IgG_3 isotopu na polysacharidový imunogen. Kontrolním myším se injektuje samotný toxoid tetanu.

Výsledky, získané s oligosacharidovými konjugáty sérotypu 14, jsou ukázány v tabulce 21. 14-Oligosacharid-TT-konjugát, připravený hydrolýzou 0,1-molární kyselinou trifluorooctovou, vyvolává IgG_1 , G_{2a} , G_{2b} a G_3 isotopy. Dávka $1 \mu\text{g}$ je nejvíce imunogenní. Oligosacharid-TT-konjugáty, připravené za použití karbohydrátových frakcí separovaných píků 7 a 8 z hydrolyzátu s 0,5-molární kyselinou trifluorooctovou, vyvolávají nižší hladiny IgG isotopů. Menší oligosacharidy (píky 4 a 5 preparátu získaného s 0,5-molární

kyselinou trifluoroctovou) v konjugované formě vyvolávají nízké hladiny IgG isotopů. 14-Polysacharid-TT-konjugát vyvolává relativně vysoké hladiny IgG₁ isotopů. Nicméně sérum z myší, očkovaných tímto polysacharidovým konjugátem, nebylo imunoprotektivní (jak bude ukázáno v příkladu 8, tabulka 24). Zde se objevuje požadovaná prahová hladina IgG protilátkových isotopů, která zajišťuje imunoprotekci k patogenu sérotypu 14. Nekondenzovaný 14-polysacharid, samotný toxoid tetanu nebo 0,9% roztok chloridu sodného jako negativní kontrolní sérum, všechny vykazují nízké hladiny všech isotopů, ekvivalentní k hladinám normálního myšího séra (NMS).

Obr. 21 ukazuje zvýšenou hladinu protilátky IgG₁ isotopu na 14-polysacharid, vyvolanou 8:14 di-hapten-oligosacharidovým konjugátem, typickou pro TD odpověď. 14-Polysacharid indukuje nadměrnou expresi IgG₃ (TI odpověď), samotný 14-oligosacharid není imunogenní. Nekondenzovaný toxoid tetanu slouží jako negativní kontrolní stanovení.

Jako u jednotlivých lidí, různé skupiny myší prokázaly variabilní vnímavost na oligosacharidové a polysacharidové konjugáty. U určitých skupin myší byly pozorovány změny hladin u různých IgG protilátkových isotopů. Obr. 22A ukazuje výsledky ze skupiny "dobrých respondentů" myší, které vytvářejí IgG₁ na 14-polysacharidový konjugát (jako TD odpověď). Přesto však 14-oligosacharidový konjugát vyvolává vyšší hladiny IgG₁. Tento konjugát také vyvolává výrazné hladiny IgG_{2b} (0,955 µg/ml = oligosacharidový konjugát, 0,139 µg/ml = polysacharidový konjugát). Tato odpověď je řízena TD, protože FCA zvyšuje tyto IgG_{2b} protilátky, viz obr. 22B (1,509 µg/ml = oligosacharidový konjugát, 0,474 µg/ml = polysacharidový konjugát).

Schopnost oligosacharidových konjugátů podle tohoto vynálezu vyvolat větší TD protilátkové odpovědi než polysacharidové konjugáty není omezena na imunogeny *S. pneumoniae*. Oligosacharidové konjugáty druhu *Neisseria meningitidis* skupiny C vyvolávají větší hladiny protilátek IgG₁ isotopu (7,01 µg/ml) než polysacharidový konjugát (3,60 µg/ml) nebo polysacharid samotný (0,162 µg/ml). Zajímavé je, že množství isotopu IgG₃, indukovaného oligosacharidovými konjugáty, je také větší (13,11 µg/ml = oligosacharidový konjugát, 9,84 µg/ml = polysacharidový konjugát, 3,81 µg/ml = polysacharid samotný).

Příklad 8

Baktericidní a opsonizační testy k měření imunoprotektivních protilátek vyvolaných konjugáty

Základní použité baktericidní a opsonizační testy jsou takové, jak je uvedeno dále.

Baktericidní test

1. Naočkuje se plotna krevního agaru požadovanými gramnegativními bakteriemi, opatřenými z American Type Cultur Collection a inkubuje přes noc při teplotě 37 °C.

2. Příští den se vezme izolovaná kolonie a naočkuje se v 1,0 ml prostředí Todd-Hewitt Broth (THB) kvasinkovým extraktem (YE) do sterilní testovací zkumavky. Vše se udržuje přes noc při teplotě 37 °C.

3. Další den se změří optická hustota naočkovaných

bakterií při vlnové délce 420 nm. Jako slepý vzorek se použije prostředí s THB + YE.

4. Na sterilní 96-jamkové plotně s plochým dnem se přidá do každé jamky sterilní 2,5mm skleněná kulička.

5. Do každé jamky se přidá:

a) 5 μ l bakterií,

b) 10 μ l myšího séra, které má být testováno.

Vše se inkubuje během 1 hodiny při teplotě 37 °C.

Poznámka : Body 5 a 6 se provádějí trojnásobně.

6. Po 1 hodině inkubace se provede ředění exogenního komplementu (například Low Tox Rabbit Complement, Cedarlane) sterilně v THB + YE v poměru 1 : 20 a přidá se 50 μ l/jamku. Poté se inkubuje během 1 hodiny při teplotě 37 °C.

7. Po úplné inkubaci se 50 μ l alikvot rozprostře na plotny krevního agaru pomocí skleněného nanášedla.

8. Zabalí se všechny plotny krevního agaru do plastických sáčků a inkubují po dobu 12 hodin při teplotě 37 °C.

9. Další den se spočítají kolonie tvořící plaky.

Opsonizační test

1. Naočkuje se plotna krevního agaru požadovanými

15.10.97

- 60 -

gramnegativními nebo grampozitivními bakteriemi (opatřenými z American Type Culture Collection) a inkubuje se přes noc při teplotě 37 °C.

2. Příští den se vezme izolovaná kolonie, smíchá se s 1,0 ml prostředí THB + YE ve sterilní testovací zkumavce a inkubuje přes noc při teplotě 37 °C.

3. Další den se připraví 100 jedn./ml sterilního heparinu.

4. Aplikuje se intravenózní injekcí 100 µl sterilního heparinu do ocasu každé myši (5 až 10 myši). Po 10 minutách se retroorbitálně odebere myším krev do sterilní zkumavky.

5. Změří se optická hustota bakterií při vlnové délce 420 nm, přičemž se použije prostředí THB + YE jako slepý vzorek. (Ke změření optické hustoty se použije spektrofotometru 4040).

6. Na sterilní 96-jamkovou plotnu s plochým dnem se sterilní skleněnou 2,5-mm kuličkou v každé jamce se přidá:

- a) 50 µl heparinizované krve
- b) 10 µl séra
- c) 5 µl bakterií.

Tento stupeň se provádí triplicitně.

7. Plotna se zabalí do tenké folie a inkubuje při teplotě 37 °C v inkubátoru po dobu 1 hodiny na třepačce

(s pomalým pohybem).

8. Po jedné hodině se 50 μ l alikvot rozprostře na krevní agarové plotny pomocí skleněného nanášedla.

9. Zabalí se všechny plotny do plastického obalu a inkubují při teplotě 37 °C po dobu 12 hodin.

10. Další den se spočítají kolonie tvořící plaky.

Jak bylo změřeno opsonizačním testem, o séru z myší, imunizovaných oligosacharidovým konjugátem *S. pneumoniae* typu 8, bylo zjištěno, že je imunoprotektivní. Opsonizace bakterie *S. pneumoniae*, zprostředkovaná specifickými anti-kapsulárními protilátkami, je nezbytná pro hostitelovu obranu (Saunders a kol., 1993). Tento test je všeobecně považován za spolehlivou indikaci imunoprotektivní schopnosti in vivo. Výsledky testů prokazují, že protilátky na 8-oligo-konjugát velmi redukuje růst kolonie tvořící jednotky *S. pneumoniae* sérotypu 8 na plotnách krevního agaru (tabulka 22). Tato redukce je specifická, protože růst kolonií sérotypů 3 a 6B (použity jako kontroly specifity) nebyl inhibován. Imunizace s nekonjugovanými oligosacharidy nebo polysacharidy (které jsou používány v komerčně dostupných vakcínách proti zápalu plic) nevyvolává žádnou ochranu. Ochrana vyvolaná polysacharidovým konjugátem je mnohem menší (39 % redukce), než ochrana vyvolaná oligosacharidovým konjugátem (98 % redukce). Tyto výsledky prokazují, že 8-oligo-tetanus toxoidový konjugát vyvolává vysoké hladiny imunoprotektivních protilátek proti patogenu *S. pneumoniae*, sérotypu 8. Hladina imunoprotektivních protilátek vyvolaná polykonjugáty je nízká.

8-Oligo-konjugát může také vyvolat imunoprotektivní odpověď protilátky u myši, kterým byl předtím podán úplně samotný polysacharid. Myši, očkované 2 dávkami 8-poly-sacharidu a potom třetí oligo-konjugovanou injekcí, mají ve svém séru imunoprotektivní protilátky (70% redukce kolonií při opsonizačním testu). Jako v předchozích experimentech, myši dostávající 3 injekce polysacharidu nevyvolávají žádné signifikantní množství protektivních protilátek. Oligo-sacharid specifických sérotypů, kondenzovaný k nosiči proteinu, může být prospěšný jako booster ke zvýšení imunoprotekce vysoce rizikových skupin, skupin bez odpovědi nebo jen s malou odpovědí na 23-valentní polysacharidovou vakcínu.

Původci tohoto vynálezu provedli studii imunogennosti s di-hapten 3 oligo/8-oligo-tetanus toxoidovými konjugáty. Oligosacharidy obou sérotypů se připravují hydrolýzou prováděnou kyselinou trifluoroctovou. Myši, jimž byl aplikován tento multi-haptenový konjugát, vyvolávají imunoprotektivní protilátky na sérotypy 3 a 8 (96 až 99 % redukce kolonií - tabulka 23). 3/8-Polysacharidový konjugát vyvolává malé množstvím imunoprotektivní protilátky (10 až 12 %). Mono-hapten 3-oligo-tetanus toxoidový konjugát, použitý v této studii, se připravuje s oligosacharidy, u kterých bylo určeno inhibicí ELISA, že mají imunogenní epitopy a nejsou schopny vyvolat imunoprotektivní odpověď. Mechanismus, který dovoluje imunitnímu systému odpovědět na epitopy na 3-oligosacharidu v di-haptenové formě je ovšem spekulativní. Nicméně původci tohoto vynálezu předpokládají, že 8-oligosacharidy stimulují klony buněk (například přídatných nebo pomocných buněk), které mohou zvýšit odpověď na epitopy oligosacharidu sérotypu 3.

Původci tohoto vynálezu objevili, že struktura 8-oligosacharidu má aktivitu jako adjuvans nebo aktivitu podobnou jako adjuvans. Relativně jednoduchá struktura opakujících se jednotek 8-oligosacharidu [β -glukóza (1 $\longrightarrow$ 4) β -glukóza (1 $\longrightarrow$ 4) α -galaktóza (1 $\longrightarrow$ 4) α -glukonová kyselina] může specificky nebo nespecificky stimulovat/aktivovat imunitní buňky nebo indukovat receptory nebo faktory ke zvýšení humorální/buněčné odpovědi na neimunogenní nebo slabě imunogenní polysacharidy/oligosacharidy. Oligosacharidy sérotypu 8 mají adjuvansovou aktivitu v konjugované formě nebo jako přísada do prostředku ve formě vakcíny.

Výsledky opsonizace 14-oligosacharid-TT-konjugátu (0,1-molární TFA preparát - tabulka 24) ukazují dobrou redukci bakteriální kolonie sérotypu 14 (76 %). 14-Oligo-TT 0,5-M TFA preparát vyvolává méně imunoprotektivní protilátky (54 % redukce). Séra z polysacharid-TT-konjugátu, polysacharidu samotného a z toxoidu tetanu injektovaná myším, prokazují velmi sníženou inhibiční schopnost (18, 2 a 15 %). Sérum z kontrolních myší (0,9 % roztok chloridu sodného a NMS) neprokazují žádnou redukující schopnost.

Di-hapten-oligosacharidové konjugáty také vyvolávají protilátky s opsoninovou aktivitou. Sérum k 8:14-oligo-TT-konjugátu redukuje kolonie tvořící jednotky sérotypu 14 o 65 % (tabulka 25). Tento di-haptenový konjugát je stejně imunogenní jako mono-haptenový 14-konjugát (redukce CFU = 68 %). Sérum z myší, imunizovaných polysacharidovým konjugátem, redukuje CFU málo, o 37 %.

Příklad 9

15.10.97

- 64 -

Zmaření nosičové suprese a redukce antigenní kompetice

V literatuře byly publikovány redukované odpovědi, za určitých podmínek, způsobené antigenní kompeticí, když byly injektovány mnohočetné antigeny. Výsledky, získané z imunizačních schémat A a D (tabulka 26), se použijí k určení, zda odpověď na každou složku multi-haptenového konjugátu podle tohoto vynálezu je stejná jako odpověď vyvolaná jednotlivými mono-haptenovými konjugáty.

Jednotková hmotnost karbohydrátového antigenu mono- a multi-haptenových konjugátů podle tohoto vynálezu je ekvivalentní (například poměr CHO k proteinu je roven 1:2 u konjugátů EDC). Forma multi-haptenových konjugátů podle tohoto vynálezu, používající redukovanou celkovou zátěž antigenů, minimalizuje potenciál pro vývoj antigenní kompetice.

Schémata B a E určí, zda první injekce s konjugátem je dostatečná k vyškolení imunitního systému a k vyvolání T dependentní odpovědi, když je posílena nekondenzovaným polysacharidem nebo polysacharidy.

Schémata C a F stanoví schopnost konjugátů podle tohoto vynálezu ke zvýšení imunoprotektivních odpovědí protilátky u myší, které byly předtím senzibilizovány samotným polysacharidem nebo polysacharidy. Jestliže tomu tak je, multi-haptenová vakcína proti zápalu plic, obsahující oligosacharidy sérotypů 3 a 4 může být velmi vhodná ke zvýšení odpovědi na Pneumovax^R 23 u vysoce rizikových pacientů.

Skupina myší bude očkována 3 dávkami (1., 2., 3.)

toxoidu tetanu (titry k toxoidu tetanu mají být potvrzeny metodou ELISA) a dále 3 injekcemi různých oligo nebo poly-TT-konjugátů *S. pneumoniae* jako v bodě G (tabulka 26).

Ve všech studiích budou konjugáty podávány perorálně a subkutánní injekcí.

Konjugáty podle tohoto vynálezu budou stimulovat imunitní odpovědi u malých dětí, u dětí s nezralým imunitním systémem a u imunosupresovaných osob. Jako modely pro tyto situace, původci tohoto vynálezu určují imunopotenciační účinnost konjugátů zde popsaných u mladých myší, u SCID a u holých myší. Jak bylo popsáno výše, tyto myši budou také pre-senzibilizovány toxoidem tetanu před multikonjugovaným očkováním, aby bylo možné studovat jev (fenomen) suprese nosičem.

Modifikace výše popsaných způsobů provedení různých ztělesnění tohoto vynálezu budou zřejmé odborníkovi v oboru, sledujícímu údaje z tohoto vynálezu, jak jsou zde uvedeny. Příklady, popsané výše nejsou omezením, a představují pouze příklady vynálezu, jehož rozsah je definován dále zařazenými patentovými nároky.

Tabulka 1

Běžné imunizační schéma pro konjugované vakcíny

Den aplikace	Den odebrání krve	Konjugát*
0	17	PSC-TT (A-123)
7	38	
28		
0	17	PSC (A-123)
7	38	
28		
0	17	OSC-TT (A-124)
7	38	
28		
0	17	OSC (A-124)
7	38	
28		
0	17	TT
7	38	
28		
0	17	0,9 % NaCl
7	38	
28		
N/A	Normální myš	Žádná injekce

* Skupina pěti myší dostala subkutánní injekce 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, nebo 5,0 μg konjugátu v 200 μl 0,9% roztoku NaCl (100 μl injekce do každého boku). PSC-TT (A-123) je konjugát polysacharid-toxoid tetanu (šarže # A-123). OSC-TT (A-124) je konjugát oligosacharidu (4 až 8 opakujících se jednotek) s toxoidem tetanu (šarže # A-124). PSC (A-123) je polysacharid (šarže # A-123). OSC (A-124) je oligosacharid (4 až 8 opakujících se jednotek) (šarže # A-124). TT je toxoid tetanu.

Tabulka 2

Průměrné hladiny protilátek myšího séra na jednotlivé konjugáty sérotypu 8 *S.pneumoniae* (postterciární imunizace)

Antisérum proti:	Třída imunoglobulinu isotopu ($\mu\text{g/ml}$)					
	IgA	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgM
konjugáty 8-oligo-sacharid-toxoidu tetanu	3,3	2,7	0,08	0,07	1,7	8,4
nekonjugovaný 8-oligosacharid	0,3	0,05	0,02	0,02	0,8	0,8
konjugáty 8-poly-sacharid-toxoidu tetanu	10,8	0,13	0,07	0,07	1,75	14,6
nekonjugovaný 8-polysacharid	5,75	0,08	0,05	0,06	2,75	10,4

Tabulka 3 - první část

Inhibice ELISA při použití oligosacharidů typu 8

Inhibující koncentrace antigenu (μg)	O.D. 405 nm opakující se jednotky, připravené pomocí 0,5-M TFA, 100 °C, 20 min				
	8-PS	1R.U.	2R.U.	3R.U.	4R.U.
25,0	0,013	2,575	1,015	0,680	0,733
12,5	0,011	2,583	1,610	1,109	1,190
6,25	0,031	2,542	2,042	1,751	1,878
3,13	0,105	2,591	2,359	2,127	2,456
1,57	0,228	2,585	2,566	2,264	2,748
0,781	0,468	2,602	2,643	2,313	2,761
0,391	0,821	2,919	2,829	2,549	3,000

Tabulka 3 - druhá část

Inhibice ELISA při použití oligosacharidů typu 8

Inhibující	O.D. 405 nm			
koncentrace	Opakující se jednotky, připravené pomocí 0,5-M			
antigenu	TFA, 100°C, 20 min			
(μg)	5R.U.	6R.U.	7R.U.	.8+R.U.
25,0	0,698	0,564	0,489	0,177
12,5	0,974	1,008	0,827	0,427
6,25	1,395	1,303	1,243	0,783
3,13	1,845	1,827	1,628	1,204
1,57	2,282	2,234	1,944	1,744
0,781	2,597	2,531	2,219	2,014
0,391	2,814	2,837	2,318	2,865

15.10.97

- 70 -

Tabulka 4

Inhibice ELISA, při použití oligosacharidů typu 6B

O.D. 405 nm

Inhibující koncentrace antigenu (μg)	6B (0,01-M kyselina octová, 100°C, 30 h)	
	6B-PS	
25,0	0,018	0,300
12,5	0,023	0,502
6,25	0,025	0,776
3,13	0,054	0,952
1,57	0,109	1,090
0,781	0,207	1,192
0,391	0,331	1,266

Tabulka 5

Inhibice ELISA, oligosacharidy typu 6B, užity různé
přípravy pomocí TFA

O.D. 405 nm

Inhibující

koncentrace antigenu (μg)	6B-PS	6B (0,05M TFA, 70°C, 1h)	6B (0,1M TFA, 70°C, 2h)	6B (0,1M TFA, 70°C, 4h)
--	-------	-----------------------------	----------------------------	----------------------------

25,0	0,016	0,223	0,211	1,897
12,5	0,017	0,281	0,372	2,417
6,25	0,069	0,717	0,702	2,276
3,13	0,370	1,096	1,216	2,674
1,57	0,958	2,411	1,793	2,673
0,781	0,959	2,595	2,243	2,817
0,391	1,216	2,540	2,502	2,563

Tabulka 6

Inhibice ELISA, oligosacharidy typu 6B, užity různé přípravy pomocí kyseliny octové O.D. 405 nm Inhibující koncentrace 6B (2-M kys. 6B (2-M kys. 6B (2-M kys.

antigenu (μg)	6B-PS	octová, 70°C, 2h)	octová, 70°C, 24h)	octová, 70°C, 48h)
25,0	0,016	0,341	1,530	2,452
12,5	0,017	0,631	1,849	2,534
6,25	0,069	0,982	2,319	2,613
3,13	0,370	1,504	2,579	2,716
1,57	0,958	2,034	2,748	2,807
0,781	0,959	2,473	2,751	2,732
0,391	1,216	2,533	2,597	2,626

15.10.97

- 73 -

Tabulka 7

Inhibice ELISA při použití oligosacharidů typu 6B

O.D. 405 nm			
Inhibující koncentrace antigenu (μg)	6B-PS	6B (0,05-M TFA,	6B (0,05-M TFA,
		70°C, 1,5h)	70°C, 3h)
25,0	0,100	0,297	0,594
12,5	0,140	0,485	0,916
6,25	0,215	0,816	1,371
3,13	0,396	1,180	1,852
1,57	0,563	1,702	2,195
0,781	1,060	2,286	2,644
0,391	1,616	2,515	2,551

15.10.97

- 74 -

Tabulka 8

Inhibice ELISA při použití oligosacharidů typu 14

O.D. 405 nm

Inhibující koncentrace antigenu (μg)	14-PS	14 (0,1-M TFA,	14 (0,5-M TFA,
		70°C, 3h)	70°C, 7h)
25,0	0,020	0,072	0,201
12,5	0,022	0,229	0,339
6,25	0,022	0,362	0,745
3,13	0,065	0,631	1,032
1,57	0,161	1,028	1,341
0,781	0,299	1,277	1,614
0,391	0,644	1,691	1,714

Tabulka 9

Inhibice ELISA při použití oligosacharidů typu 14

O.D. 405 nm

Inhibující

koncentrace
antigenu
(μg)

Opakující se jednotky, připravené pomocí

0,5-M TFA, 100°C, 15 min

3 R.U.

4 R.U.

8 R.U.

25,0	2,011	0,596	0,337
12,5	1,966	1,078	0,517
6,25	1,936	1,425	0,712
3,13	1,891	1,620	0,924
1,57	2,021	1,889	1,242
0,781	2,055	1,923	1,595
0,391	2,089	1,877	1,727

Tabulka 10

Inhibice ELISA při použití oligosacharidů typu 14

O.D. 405 nm

Inhibující koncentrace antigenu (μ g)	O.D. 405 nm			
	14-PS	14 (0,01-M TFA, 70°C, 7h)	14 (0,05-M TFA, 70°C, 7h)	14 (0,05-M TFA, 70°C, 24h)
25,0	0,038	0,075	0,163	0,610
12,5	0,055	0,110	0,283	0,986
6,25	0,093	0,191	0,503	1,406
3,13	0,197	0,318	0,857	2,225
1,57	0,330	0,528	1,367	2,562
0,781	0,623	0,945	2,095	2,622
0,391	1,053	1,462	2,429	2,569

Tabulka 11

Inhibice ELISA za použití oligosacharidů typu 19F

O.D. 405 nm

Inhibující koncentrace antigenu (μg)	19F-PS	19F(0,2-M HCl, nezahříváno, 3h)	19F(0,2-M HCl 70°C, 3h)
25,0	0,347	2,335	0,253
12,5	0,380	2,926	0,328
6,25	0,460	3,286	0,495
3,13	0,669	3,415	0,691
1,57	0,805	3,405	1,064
0,781	1,000	3,491	1,414
0,391	1,508	3,549	1,827

15.10.97

- 78 -

Tabulka 12

Inhibice ELISA za použití oligosacharidů typu 23F

O.D. 405 nm

Inhibující koncentrace antigenu (μg)	23F-PS	23F(0,5-M TFA,	23F(0,25-M TFA,
		70°C, 1h)	70°C, 3h)
25,0	0,033	0,385	0,435
12,5	0,033	0,586	0,592
6,25	0,027	0,686	0,743
3,13	0,037	0,832	0,870
1,57	0,062	0,952	0,933
0,781	0,128	1,085	1,029
0,391	0,240	1,155	1,099

15.10.97

- 79 -

Tabulka 13

Inhibice ELISA za použití oligosacharidů typu 23F

O.D. 405 nm

Inhibující koncentrace antigenu (μg)	23F-PS	23F(0,1-M TFA,	23F(0,1-M TFA,
		70°C, 3h)	70°C, 5h)
25,0	0,487	0,187	2,107
12,5	0,364	0,261	2,517
6,25	0,355	0,339	2,623
3,13	0,341	0,545	3,009
1,57	0,358	0,770	2,689
0,781	0,401	0,998	2,624
0,391	0,432	1,366	2,887

15.10.97

- 80 -

Tabulka 14 - první část

Inhibice ELISA za použití oligosacharidů typu 23F

O.D. 405 nm

Inhibující

koncentrace

antigenu

(μg)

23F-PS

23F(0,5-M TFA,
70 °C, 1h)23F (0,5-M TFA,
70 °C, 15 min)

25,0

0,127

0,309

0,159

12,5

0,111

0,529

0,149

6,25

0,118

0,923

0,179

3,13

0,148

1,480

0,242

1,57

0,288

2,118

0,430

0,781

0,480

2,534

0,712

0,391

0,940

2,557

1,218

15.10.97

- 81 -

Tabulka 14 - druhá část

Inhibice ELISA za použití oligosacharidů typu 23F

O.D. 405 nm

Inhibující koncentrace antigenu (μg)	23F (5-M kys. octová, 70 °C, 5h)	23F (2-M kys. octová, 70 °C, 24h)
25,0	0,160	0,241
12,5	0,144	0,405
6,25	0,243	0,750
3,13	0,410	1,172
1,57	0,852	1,662
0,781	1,345	2,361
0,391	1,909	2,430

Tabulka 15

Inhibice ELISA za použití *N.meningitidis*-C polysacharidu

O.D. 405 nm

Inhibující
koncentrace

antigenu (μg)	N.meng-CPS	N.meng-C(0,1M NaOAc, 50 °C, 6 h)	N.meng-C(1M NaOAc, 50 °C, 6h)
25,0	0,304	0,07269	0,046
12,5	0,240	0,07245	0,031
6,25	0,369	0,406	0,4123
3,13	0,836	1,088	1,151
1,57	2,402	2,593	2,512
0,781	2,679	2,839	2,749
0,391	2,434	2,448	2,504

15.10.97

- 83 -

Tabulka 16

Inhibice ELISA za použití konjugátů typu 6B

Inhibující koncentrace antigenu (μg)	O.D. 405 nm			
	6B-PS	6B:8-TT	6B-OS	TT
25,0	0,019	0,070	0,037	2,314
12,5	0,022	0,117	0,046	2,289
6,25	0,033	0,205	0,081	2,209
3,13	0,058	0,339	0,145	2,173
1,57	0,127	0,533	0,287	2,208
0,781	0,248	0,816	0,534	2,237
0,391	0,435	1,234	0,856	2,249

Tabulka 17

Inhibice ELISA za použití konjugátů typu 14

Inhibující koncentrace antigenu (μg)	O.D. 405 nm			
	14-PS	14:8-TT	14-OS	TT
25,0	0,004	0,029	0,026	0,216
12,5	0,006	0,043	0,037	0,510
6,25	0,017	0,075	0,068	0,769
3,13	0,043	0,141	0,131	1,018
1,57	0,078	0,258	0,247	1,242
0,781	0,160	0,447	0,400	1,362
0,391	0,299	0,669	0,655	1,475

15.10.97

- 85 -

Tabulka 18 - první část

Inhibice ELISA za použití konjugátů typu 23F

Inhibující koncentrace antigenu (μg)	O.D. 405 nm		
	23F-PS-TT	23F-TT (F:27-47)	23F-TT (F:32-51)
25,0	0,027	0,348	0,235
12,5	0,038	0,433	0,390
6,25	0,055	0,556	0,547
3,13	0,104	0,659	0,665
1,57	0,189	0,806	0,823
0,781	0,215	0,944	0,861
0,391	0,412	1,029	1,017

15.10.97

- 86 -

Tabulka 18 - druhá část

Inhibice ELISA za použití konjugátů typu 23F

Inhibující koncentrace antigenu (μg)	O.D. 405 nm		
	23F-TT (F:32-65)	23F-TT (F:31-51)	TT
25,0	0,397	0,053	1,073
12,5	0,463	0,093	1,017
6,25	0,604	0,161	1,094
3,13	0,698	0,255	1,097
1,57	0,769	0,371	1,098
0,781	0,954	0,548	1,085
0,391	0,978	0,696	1,089

15.10.97

- 87 -

Tabulka 19

Inhibice ELISA za použití N. meningitidis-C polysacharidu

O.D. 405 nm

Inhibující
koncentrace
antigenu

(µg)	N.meng- CPS	N.meng- CPS-TT	N.mengC-TT (F:37-49)	TT
25,0	0,038	0,068	0,250	2,222
12,5	0,025	0,042	0,221	1,880
6,25	0,028	0,120	0,297	1,917
3,13	0,058	0,209	0,529	1,894
1,57	0,108	0,212	0,610	1,807
0,781	0,371	0,511	0,762	1,813
0,391	0,393	0,623	1,101	1,849

Tabulka 20

Průměrné hladiny protilátek IgG₁ a IgG₃ na konjugáty S.
pneumoniae sérotypu 8 (postterciární imunizace)

Imunoglobulin isotopu (μg/ml)		
	IgG ₁	IgG ₃
1. Imunizace ve:		
3 týdnech věku		
8-O-TT	0,273	0,468
8-P-TT	0,036	0,213
8-P	0,052	3,18
TT	0,034	-
8 týdnech věku		
8-O-TT	0,700	1,96
8-P-TT	0,159	2,89
8-P	0,007	2,17
TT	0,003	0,74
8 týdnech věku + FCA		
8-O-TT	1,273	1,74
8-P-TT	-	3,73
8-P	0,055	5,06
TT	-	0,295

15.10.97

- 89 -

Tabulka 21

Průměrné hladiny protilátek myšního séra na různé konjugáty
S.pneumoniae sérotypu 14 (postterciární imunizace)

Imunoglobulin isotopu (μg/ml)						
Antisérum na :	IgM	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgA
14-oligo-TT (0,1M TFA)	6,50	50,99	0,178	0,158	37,65	0,078
1 μg 14-oligo-TT (0,5M TFA pík 4 a 5)	2,8	-	0,009	0,018	1,51	-
1 μg 14-oligo-TT (0,5M TFA pík 7 a 8)	3,39	12,35	0,155	0,143	9,32	0,020
1 μg 14-poly-TT	5,11	15,25	0,038	0,053	8,95	0,001
1 μg 14-poly	4,70	-	0,008	0,031	9,20	0,077
1 μ TT	3,37	-	0,024	0,060	8,36	0,031

15.10.97

- 90 -

Tabulka 22

Opsonizační výsledky testujícího antiséra na konjugát
S. pneumoniae sérotypu 8

% redukce jednotek tvořících
kolonie (CFU)

Antisérum na :	Typ 8
konjugát 8-oligosacharid -toxoidu tetanu	98
nekonjugovaný 8-oligosacharid	10
konjugát 8-polysacharid toxoidu tetanu	39
nekonjugovaný 8-polysacharid	11

15.10.97

- 91 -

Tabulka 23

Opsonizační výsledky testujícího antisérum na konjugáty
S. pneumoniae sérotypů 3 a 8

% redukce CFU			
Antisérum na :	Typ 3	Typ 6B	Typ 8
konjugát 3/8-oligosacharid -toxoidu tetanu	96	0	99
konjugát 3/8- polysacharid -toxoidu tetanu	10	0	12
PBS kontrola	0	0	0

Tabulka 24

Opsonizační výsledky testujícího antisérum na konjugáty
S. pneumoniae sérotypů 14

% redukce CFU	
Antisérum na :	Typ 14
14-O-TT (0,1-M TFA)	76
14-O-TT-(0,5-M TFA, píky 7 a 8)	54
14-poly-TT	18
14-polysacharid	2
toxoid tetanu	15
0,9% NaCl	0
NMS	0

15.10.97

- 93 -

Tabulka 25

Opsonizační výsledky testujícího antiséra na konjugát
di-hapten *S. pneumoniae*

% redukce CFU

Antisérum na :	Typ 14
14-O-TT	68
8:14-O-TT	65
14-P-TT	37
toxoid tetanu	0
0,9% NaCl	0
NMS	0

Tabulka 26

Imunizační režimy

- A: 1. Mono-hapten-oligosacharidový konjugát
2. Mono-hapten-oligosacharidový konjugát
3. Mono-hapten-oligosacharidový konjugát
-
- B: 1. Mono-hapten-oligosacharidový konjugát
2. Nekondenzovaný polysacharid
3. Nekondenzovaný polysacharid
- C: 1. Nekondenzované polysacharidy
2. Mono-hapten-oligosacharidový konjugát
3. Mono-hapten-oligosacharidový konjugát
- D: 1. Multi-hapten-oligosacharidový konjugát
2. Multi-hapten-oligosacharidový konjugát
3. Multi-hapten-oligosacharidový konjugát
-
- E: 1. Multi-hapten-oligosacharidový konjugát
2. Nekondenzované polysacharidy
3. Nekondenzované polysacharidy
-
- F: 1. Nekondenzované polysacharidy
2. Multi-hapten-oligosacharidový konjugát
3. Multi-hapten-oligosacharidový konjugát
- G: 1. Toxoid tetanu
2. Toxoid tetanu
3. Toxoid tetanu
4. Mono- nebo multi-hapten-oligosacharidové konjugáty
5. Mono- nebo multi-hapten-oligosacharidové konjugáty
6. Mono- nebo multi-hapten-oligosacharidové konjugáty

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m,
ž e obsahuje :

a) alespoň jeden podle velikosti separovaný karbo-
hydrátový oligosacharidový haptén, obsahující alespoň jeden
imunogenní epitop, kde oligosacharidový haptén je separován
podle velikosti na zvláštní opakující se jednotky,

b) nosič, který vyvolává thymus dependentní imunitní
odpověď v subjektu, přičemž haptén je kovalentně kondenzován
přímo k nosiči a kde konjugát haptén - nosič je protektivně
imunogenní.

2. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í
s e t í m, ž e hapténem je oligosacharid bakteriálního
nebo virového polysacharidu.

3. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í
s e t í m, ž e přítomnost výše zmíněného imunogenního
epitopu je stanovena použitím inhibice ELISA.

4. Kompozice podle nároku 2, v y z n a č u j í c í
s e t í m, ž e výše uvedený oligosacharid je produkován
kyselou hydrolyzou zmíněného polysacharidu.

5. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í
s e t í m, ž e protektivní imunogennost je stanovena
isotopovou ELISA.

6. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í

s e t í m, ž e protektivní imunogennost je stanovena baktericidním nebo opsonizačním testem.

7. Kompozice podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e polysacharid je vybrán ze skupiny, sestávající z kapsulárních polysacharidů *S. pneumococcus* sérotypů 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22, 23F a 33F.

8. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje alespoň dva hapteny.

9. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e neindukuje nosičovou supresi.

10. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e neindukuje antigenní kompetici.

11. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje adjuvans.

12. Způsob přípravy kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se

a) štěpí bakteriální nebo virový polysacharid na oligosacharidy při zachování imunogenních epitopů na výsledných oligosacharidech,

b) separují se výsledné oligosacharidy na zvláštní opakující se jednotky na základě velikosti,

c) provede se selektování oligosacharidů separovaných podle velikosti, které obsahují imunogenní epitopy,

d) aktivuje se alespoň jeden oligosacharid, selektovaný ve stupni c), a

e) přímo se kondenzují aktivované oligosacharidy k nosiči, který vyvolává thymus dependentní imunitní odpověď v subjektu,

přičemž výsledná kompozice je protektivně imunogenní.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e štěpení se provádí použitím kyselé hydrolýzy.

14. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jako aktivace se použije acidifikace na kationové koloně.

15. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e kondenzace se provádí použitím 1-ethyl-3,3'-dimethyl(aminopropyl)karbodiimidu nebo jodistanu.

16. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e kondenzace poskytuje předem stanovený poměr haptenu k nosiči.

17. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e stupně a) až d) se opakují za použití alespoň jednoho dalšího bakteriálního nebo virového polysacharidu, k dosažení di- nebo multivalentního konjugátu.

18. Způsob podle nároku 17, v y z n a č u j í c í

s e t í m, ž e bakteriální polysacharidy se vyberou ze souboru sestávajícího z kapsulárních polysacharidů S. pneumococcus sérotypů 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22, 23F a 33F.

19. Způsob zajištění protektivní imunizace proti bakteriálnímu patogenu, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje podání účinného množství kompozice podle nároku 1 savci, který potřebuje takového ošetřování.

20. Způsob podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e podávání se volí ze skupiny sestávající z perorálního a parenterálního podání.

21. Způsob podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e výše zmíněným savcem je novorozenec.

22. Způsob podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e savec je vybrán ze skupiny, sestávající z imunosupresovaných savců a savců pokročilejšího věku.

23. Kompozice vhodná pro stimulování imunitní odpovědi na antigen, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e imunostimulační kompozice obsahuje oligosacharid S. pneumoniae sérotypu 8, který obsahuje imunogenní epitop a vhodné farmaceutické vehikulum, přičemž oligosacharid zajišťuje imunostimulativní účinek.

24. Kompozice podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e oligosacharid je konjugován k proteínovému nosiči.

25. Kompozice podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e neindukuje supresi nosiče.

26. Kompozice podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e neindukuje antigenní kompetici.

27. Způsob zajištění protektivní imunizace proti bakteriálnímu patogenu, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje podání účinného množství kompozice podle nároku 23 savci, který potřebuje takového ošetřování.

28. Způsob zvýšení imunogenní odpovědi na antigen, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje podání oligosacharidu S. pneumoniae sérotypu 8, který obsahuje určený imunogenní epitop, společně s tímto antigenem.

29. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e podávání se vybere ze skupiny, sestávající z perorálního a parenterálního podání.

30. Způsob přípravy prostředku podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se

a) štěpí S. pneumoniae sérotypu 8 polysacharidu na oligosacharidech k zachování imunogenních epitopů na výsledných oligosacharidech,

b) separují výsledné oligosacharidy, založené na velikosti,

c) vyberou takových oligosacharidy, které obsahují imunogenní epitopy, a

d) smísí selektované oligosacharidy s vhodným farmaceutickým nosičem.

31. Způsob podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e štěpení se provádí za použití kyselé hydrolýzy.

32. Způsob podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále zahrnuje stupně, zařazené před stupněm d), spočívající v

1) aktivování oligosacharidů, selektovaných ve stupni c), a

2) kondenzování aktivovaných oligosacharidů k purifikovanému nosiči.

33. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e aktivace se provádí acidifikací na kationové koloně.

34. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e kondenzace se provádí za použití 1-ethyl-3,3'-dimethyl(aminopropyl)karbodiimidu nebo jodistanu.

35. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e kondenzace zajišťuje předem stanovený poměr haptenu k nosiči.

36. Způsob zvýšení imunogennosti antigenu u savce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se podává oligosacharid *S. pneumoniae* sérotypu 8, který obsahuje

stanovený imunogenní epitop, společně se zmíněným antigenem, přičemž oligosacharid zvyšuje imunogenní účinek.

37. Způsob podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e oligosacharidem je *S. pneumoniae* sérotypu 8, který je konjugován k nosiči.

38. Způsob podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e oligosacharidem je *S. pneumoniae* sérotypu 8, podávaný jako příměs do farmaceutické nebo vakcínové kompozice.

39. Způsob podle nároků 36, 37 a 38, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e podávání se vybere ze skupiny, sestávající z perorálního a parenterálního podání.

40. Způsob specifické nebo nespecifické stimulace savčích buněk, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se těmto buňkám podává oligosacharid *S. pneumoniae* sérotypu 8, který obsahuje strukturu β -glukóza (1 $\longrightarrow$ 4) β -glukóza (1 $\longrightarrow$ 4) α -galaktóza (1 $\longrightarrow$ 4) α -glukonová kyselina.

41. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e oligosacharid se konjuguje k nosiči.

42. Způsob podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e oligosacharid se podává jako příměs do farmaceutické nebo vakcínové kompozice.

43. Způsob podle nároků 40, 41 nebo 42, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e podávání se vybere ze skupiny, sestávající z perorálního a parenterálního podání.

44. Způsob podání adjuvans savci, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se podává savci oligosacharid *S. pneumoniae* sérotypu 8, který obsahuje strukturu β -glukóza (1 $\longrightarrow$ 4) β -glukóza (1 $\longrightarrow$ 4) α -galaktóza (1 $\longrightarrow$ 4) α -glukonová kyselina.

45. Způsob podle nároku 44, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se oligosacharid konjuguje k nosiči.

46. Způsob podle nároku 44, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se oligosacharid podává jako příměs do farmaceutické nebo vakcínové kompozice.

47. Způsob podle nároků 44, 45 nebo 46, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e podání se vybere ze skupiny, sestávající z perorálního a parenterálního podání.

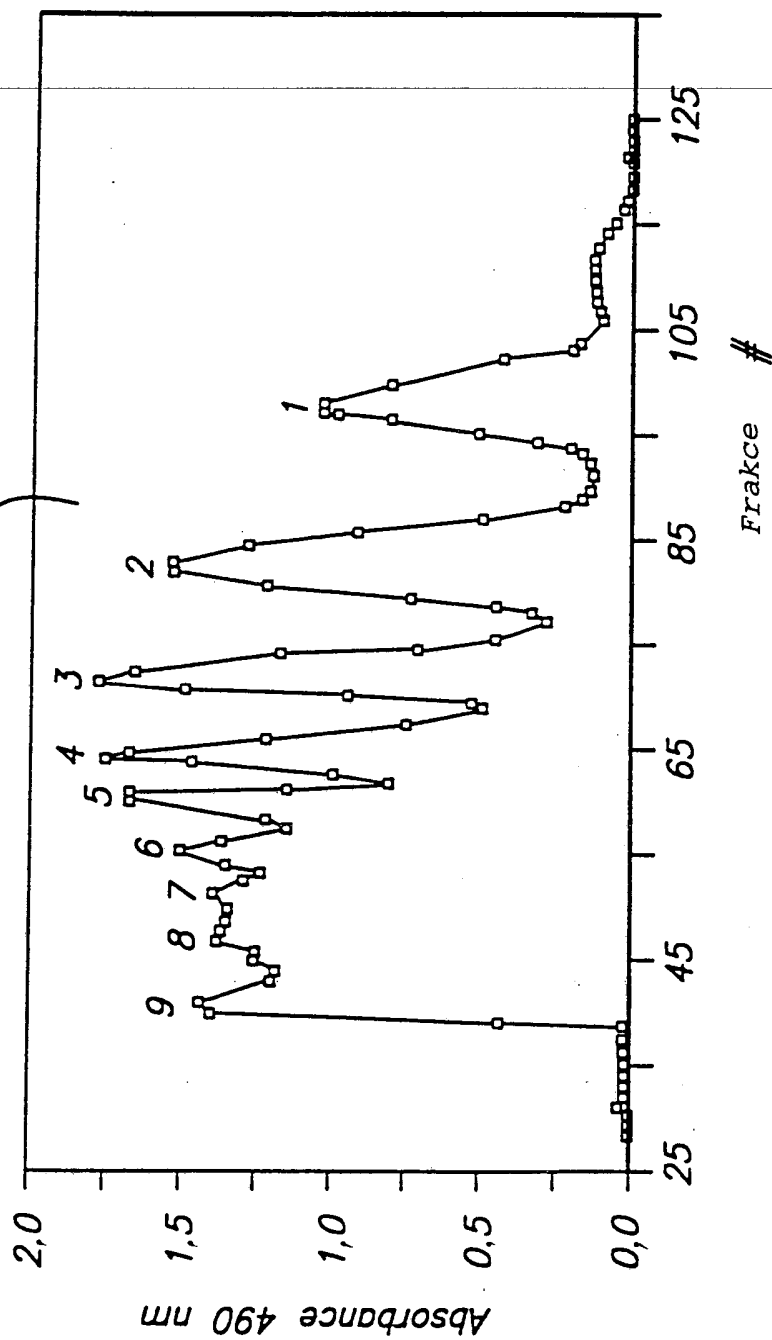
Obv. 1

Separace typu 8 pneumokokového polysacharidového hydrolyzátu

Kolona : Polyakrylamid P-10 Bio-Gel

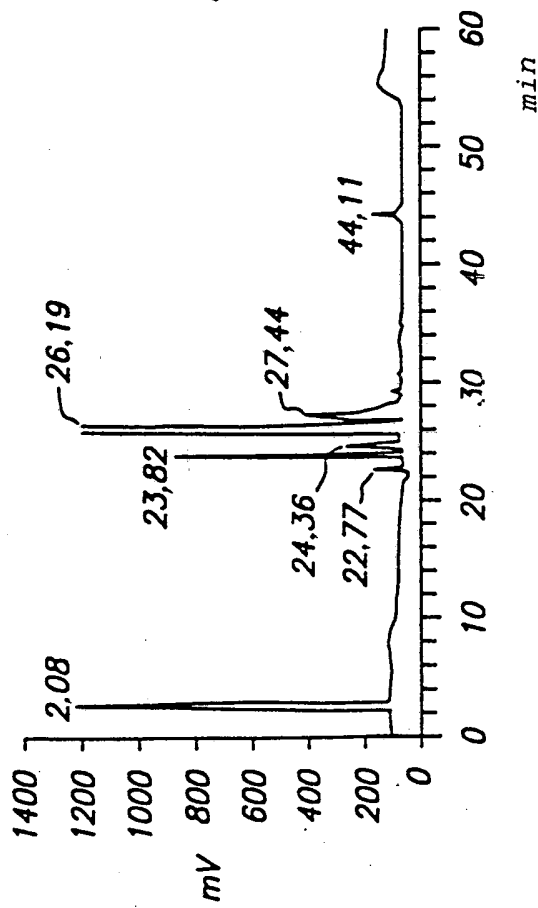
Pufr : 0,03-M hydrogenuhličitan amonný, pH = 8,0

Kyselá hydrolyza : 0,5-M TFA, 100 °C, 20 min

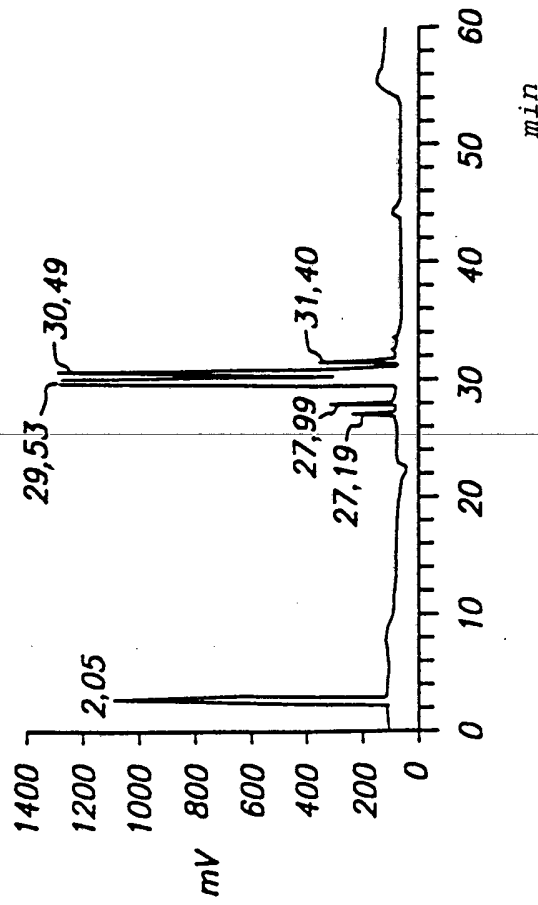


Obr. 2.

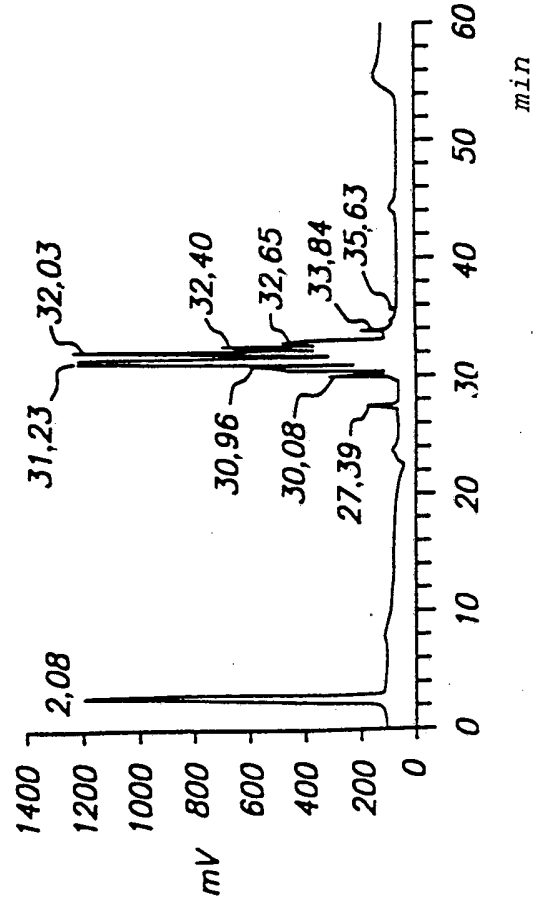
Obr. 3A



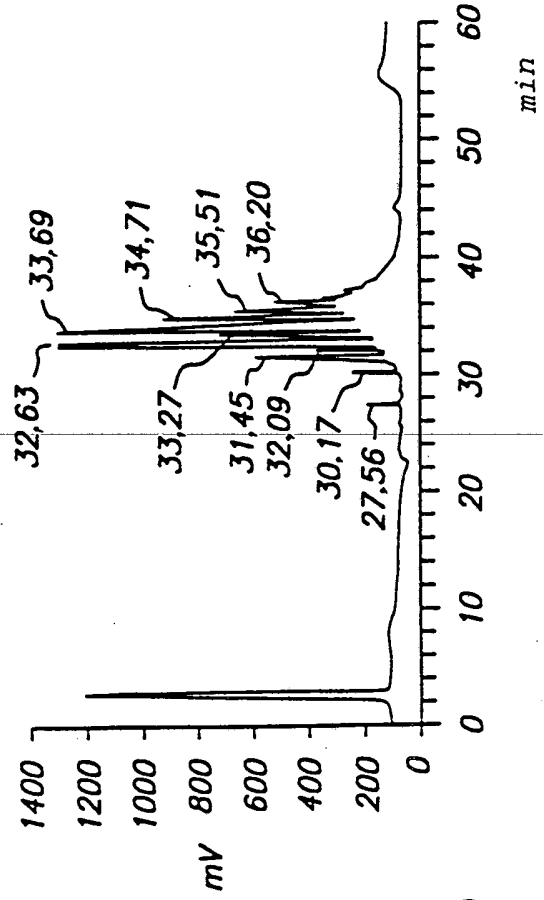
Obr. 3B



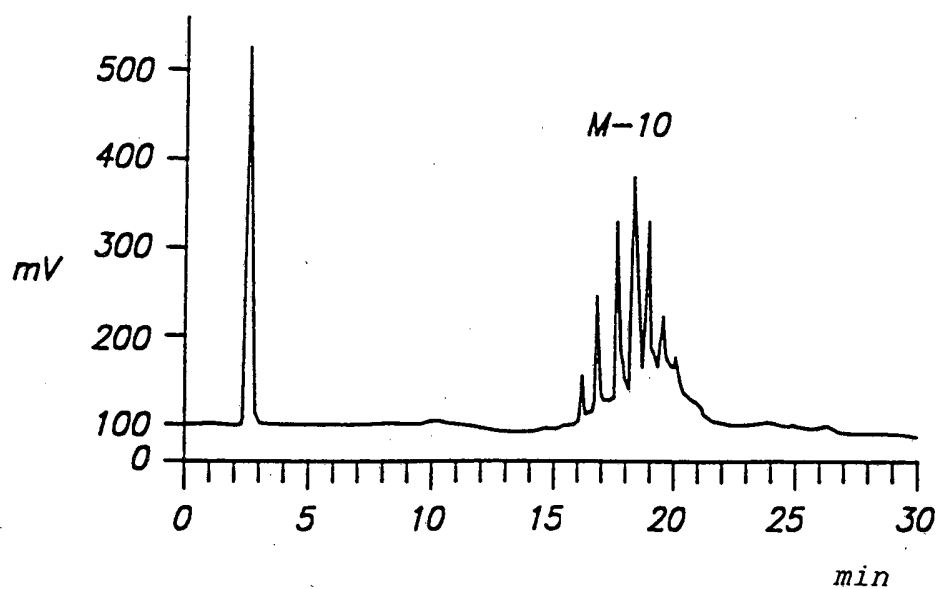
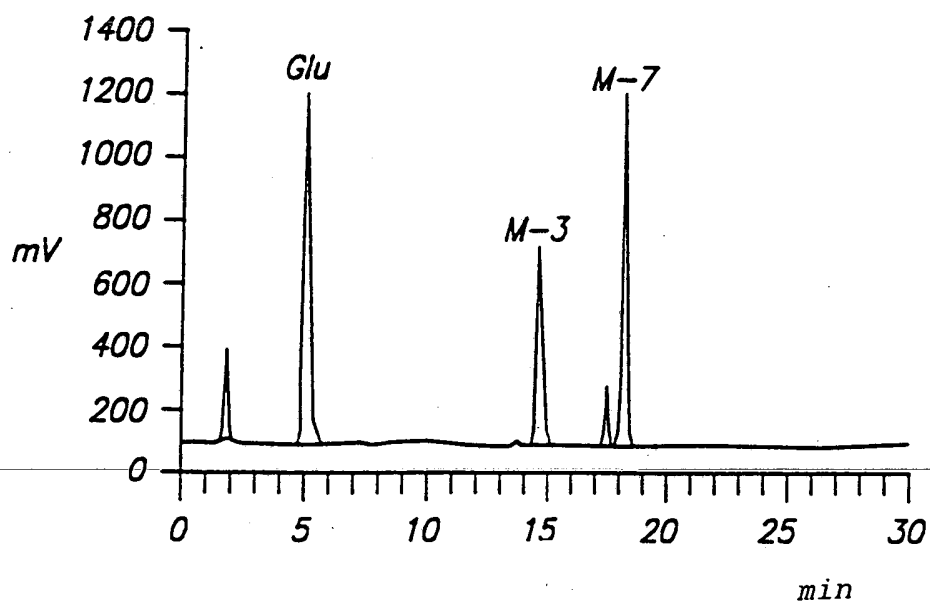
Obr. 3C



Obr. 3D



15.10.97 278-47

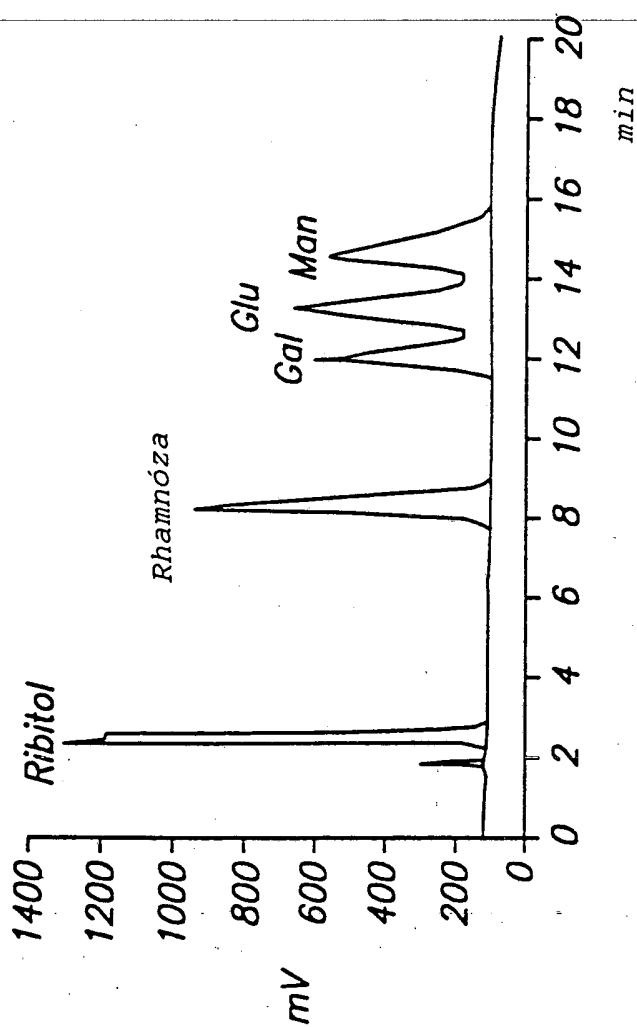


Dionexová metoda a HPLC profily, ukazující retenční doby glukózy, maltotriózy (M-3), maltoneotázy (M-7) a malto-oligosacharidových (M-10) standardů (Sigma Chemical Co.), použitých k určení velikosti oligosacharidových opakujících se jednotek

Obr. 4

15.10.97

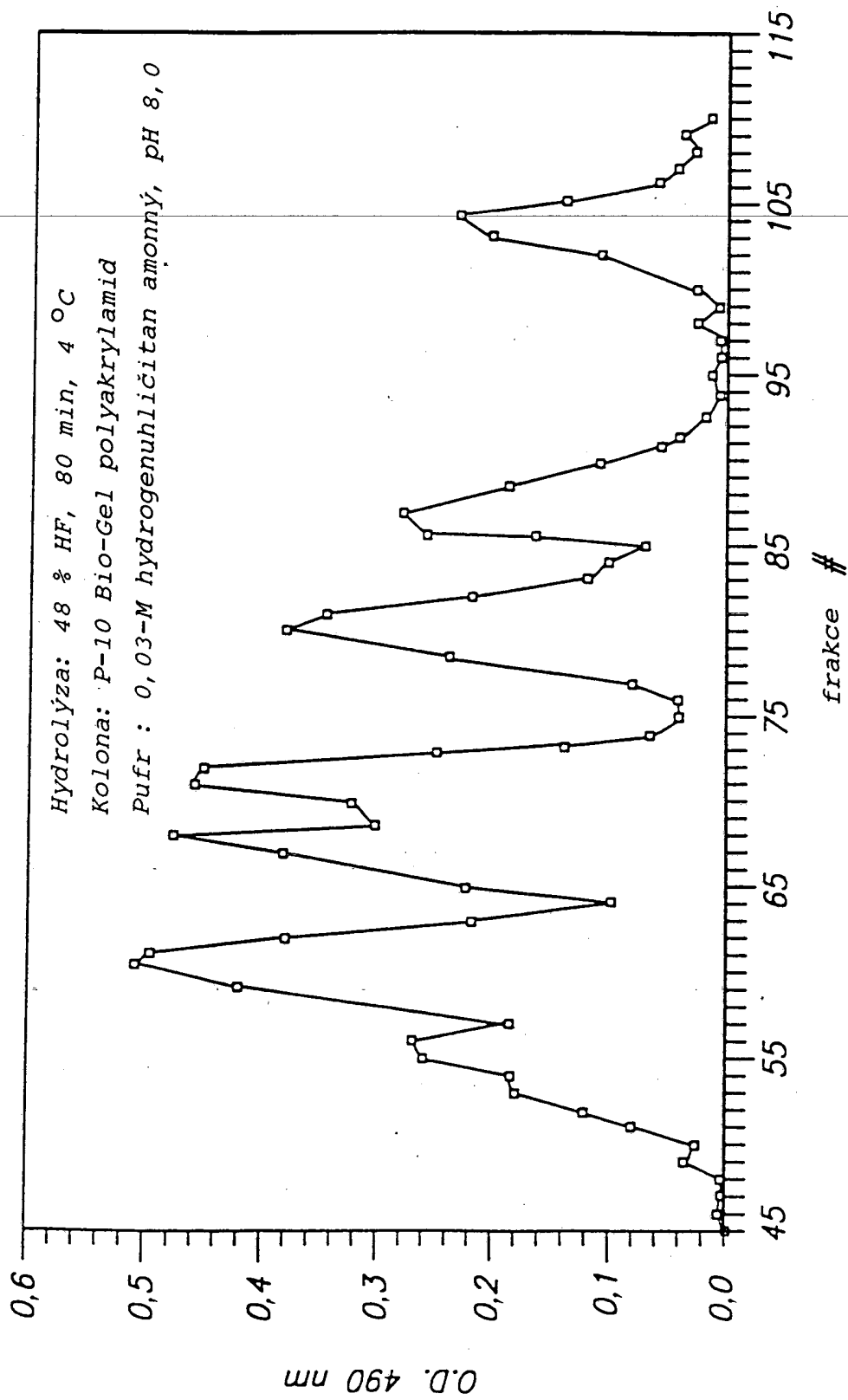
3248-4



Dionexová metoda a HPLC profily, ukazující retenční doby ribitolu, rhamnózy, galaktózy, glukózy a mannózy jako monosacharidových standardů, použitých k určování obsahu karbohydrátu hydrolyzovaných opakujících se jednotek

Obr. 5

Separace pneumokokového polysacharidového hydrolyzátu typu 6B



Obr. 6

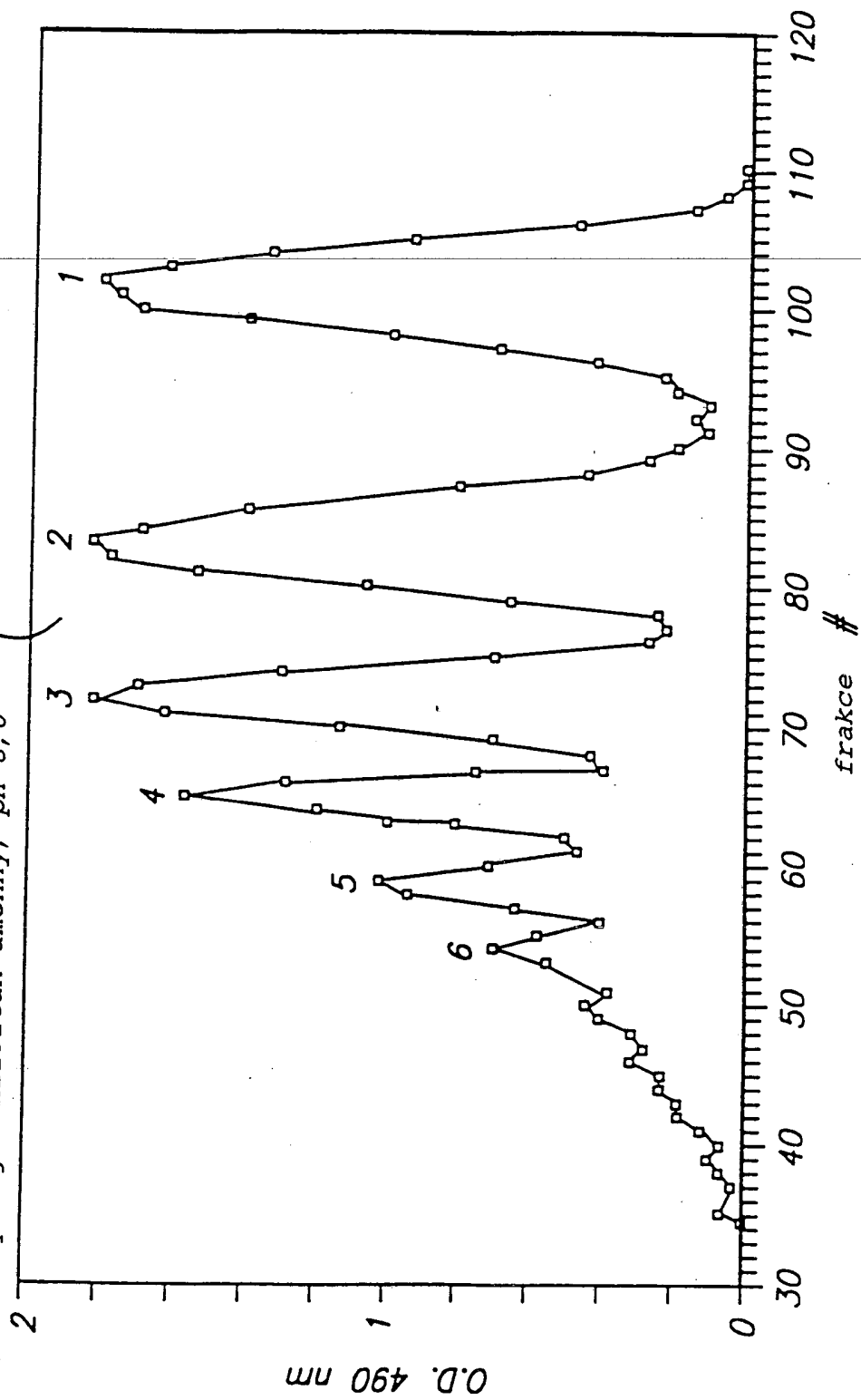
15.10.97 7278-97

Separace pneumokokového polysacharidového hydrolyzátu typu 6B

Hydrolyzáta: 1,0-M TFA, 7 h, 70 °C

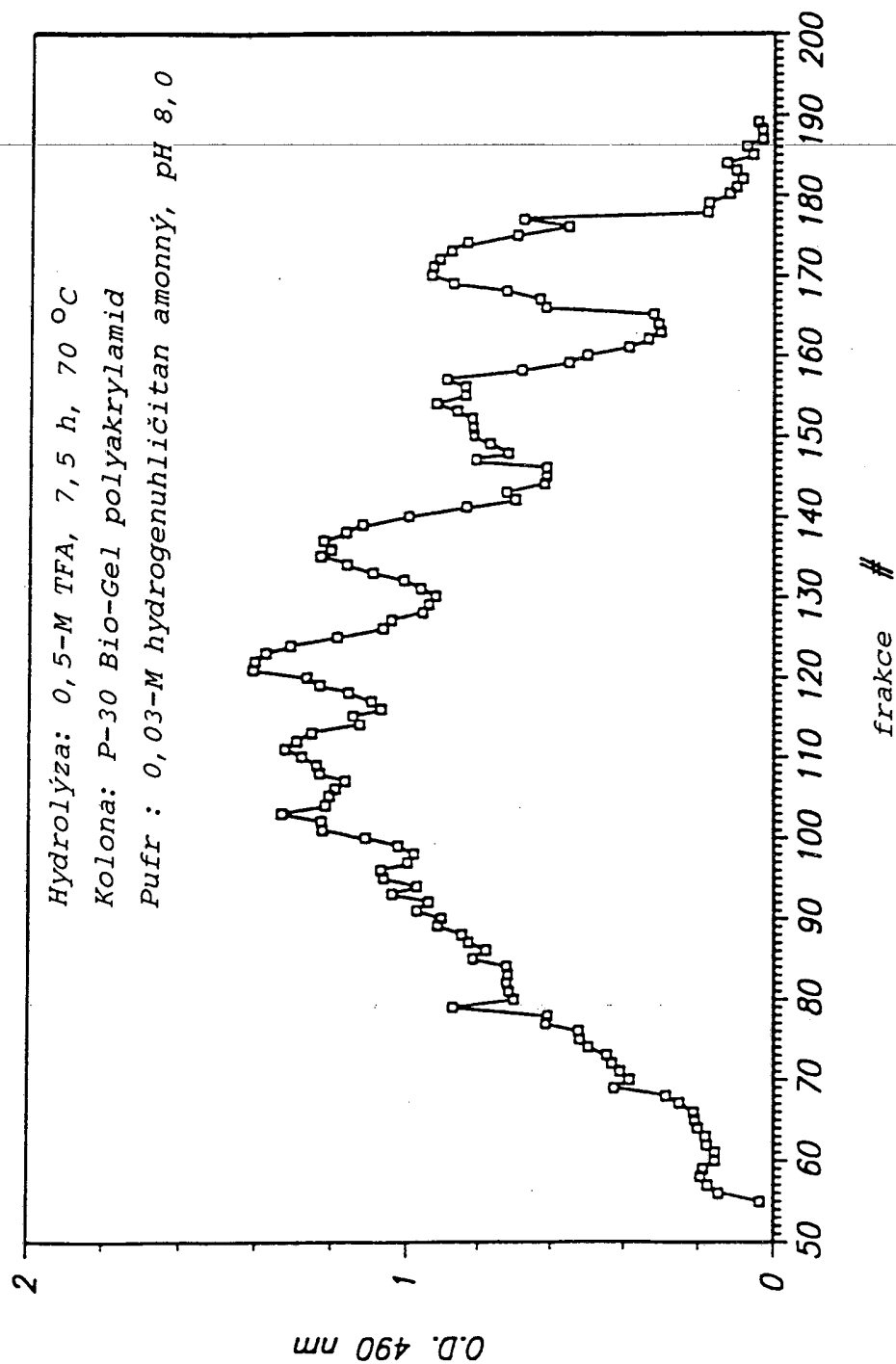
Kolona: prostředí P-60 Bio-Gel polyakrylamid

Puf: 0,03-M hydrogenuhličitan amonný, pH 8,0



Obr. 7

Separace pneumokokového polysacharidového hydrolyzátu typu 14



Obr. 8

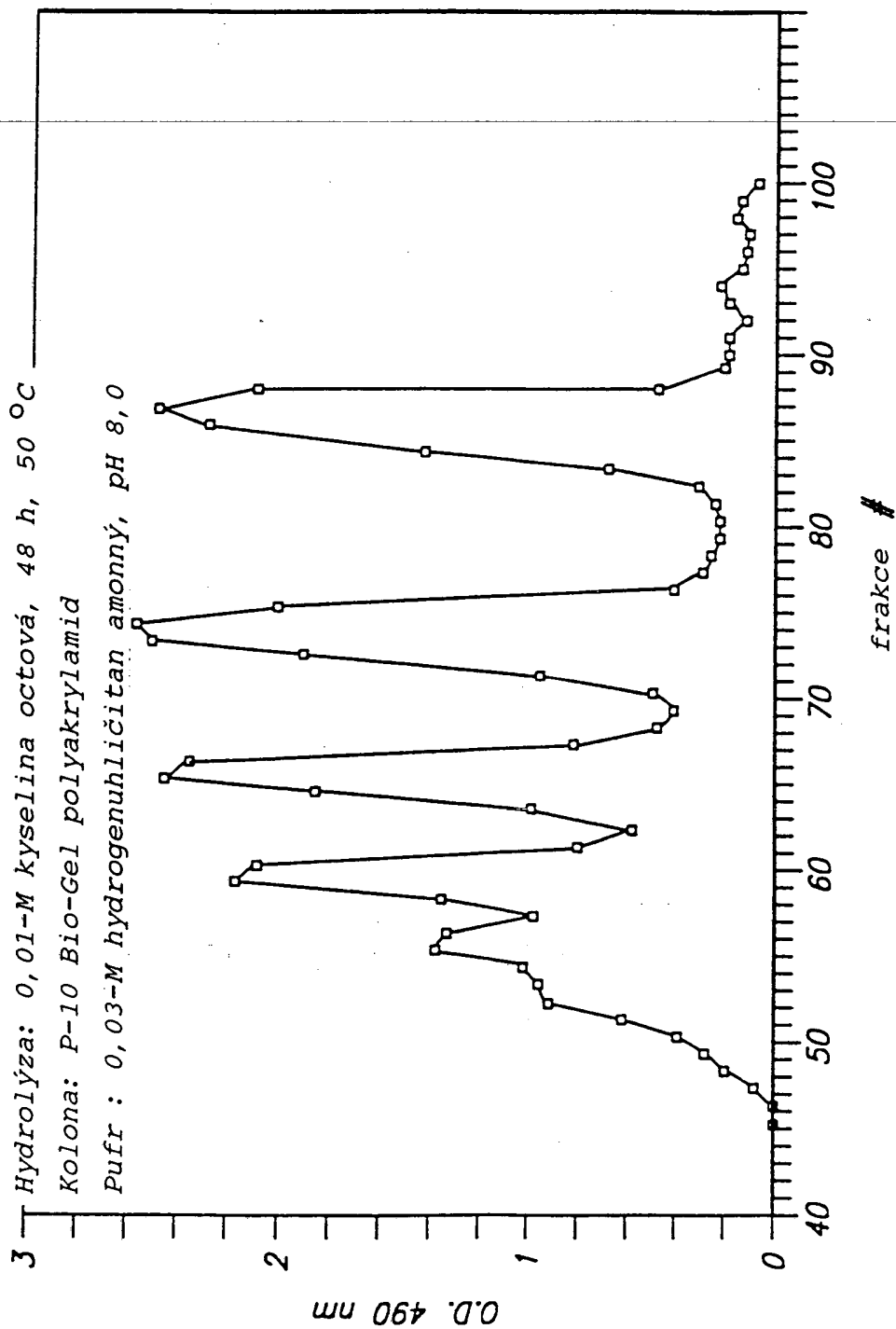
15.10.97

2278-47

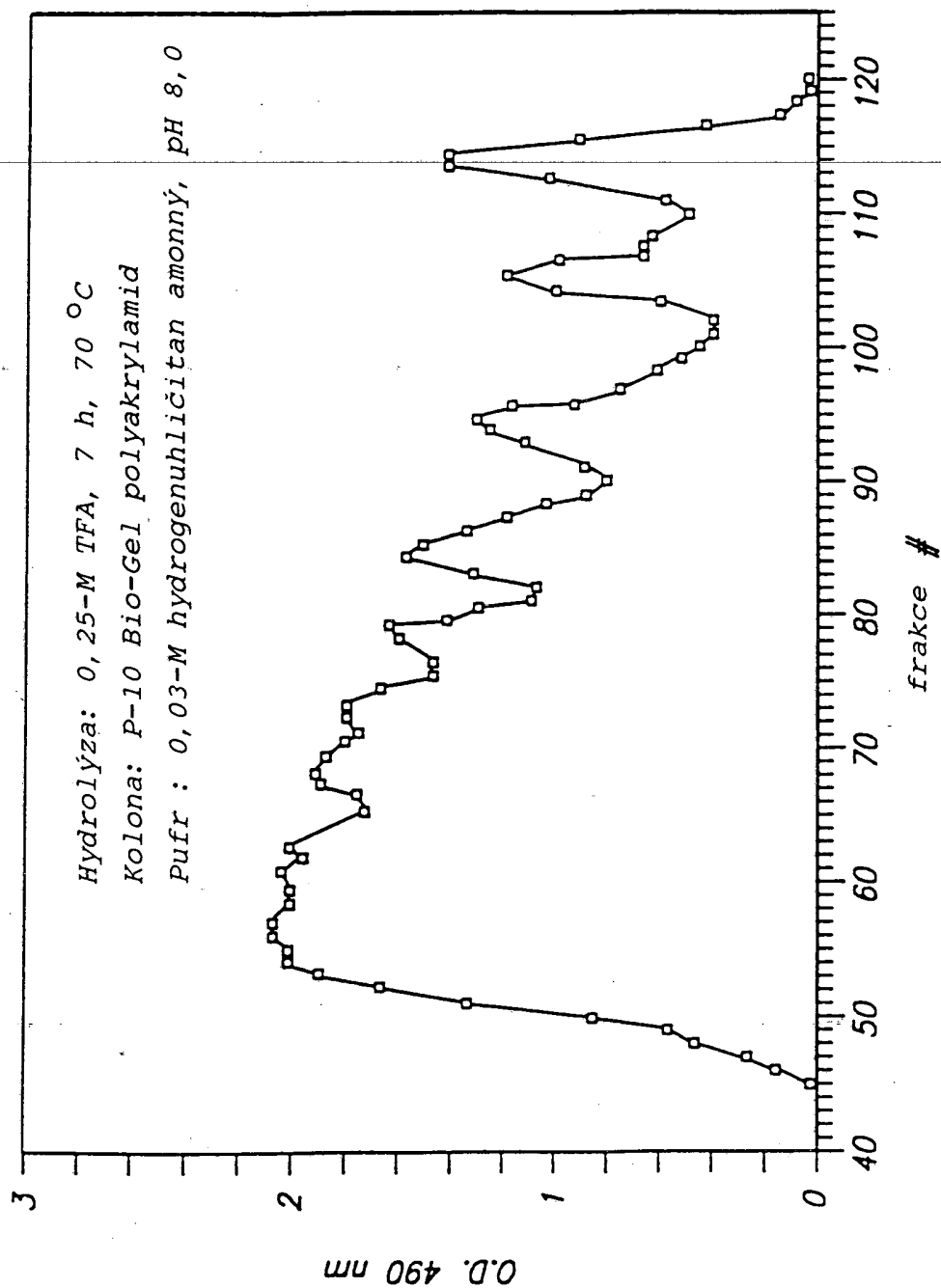
15.10.97

1278-97

Separace pneumokokového polysacharidového hydrolyzátu typu 19F



Separace pneumokokového polysacharidového hydrolyzátu typu 23F



Obr. 10

15.10.97

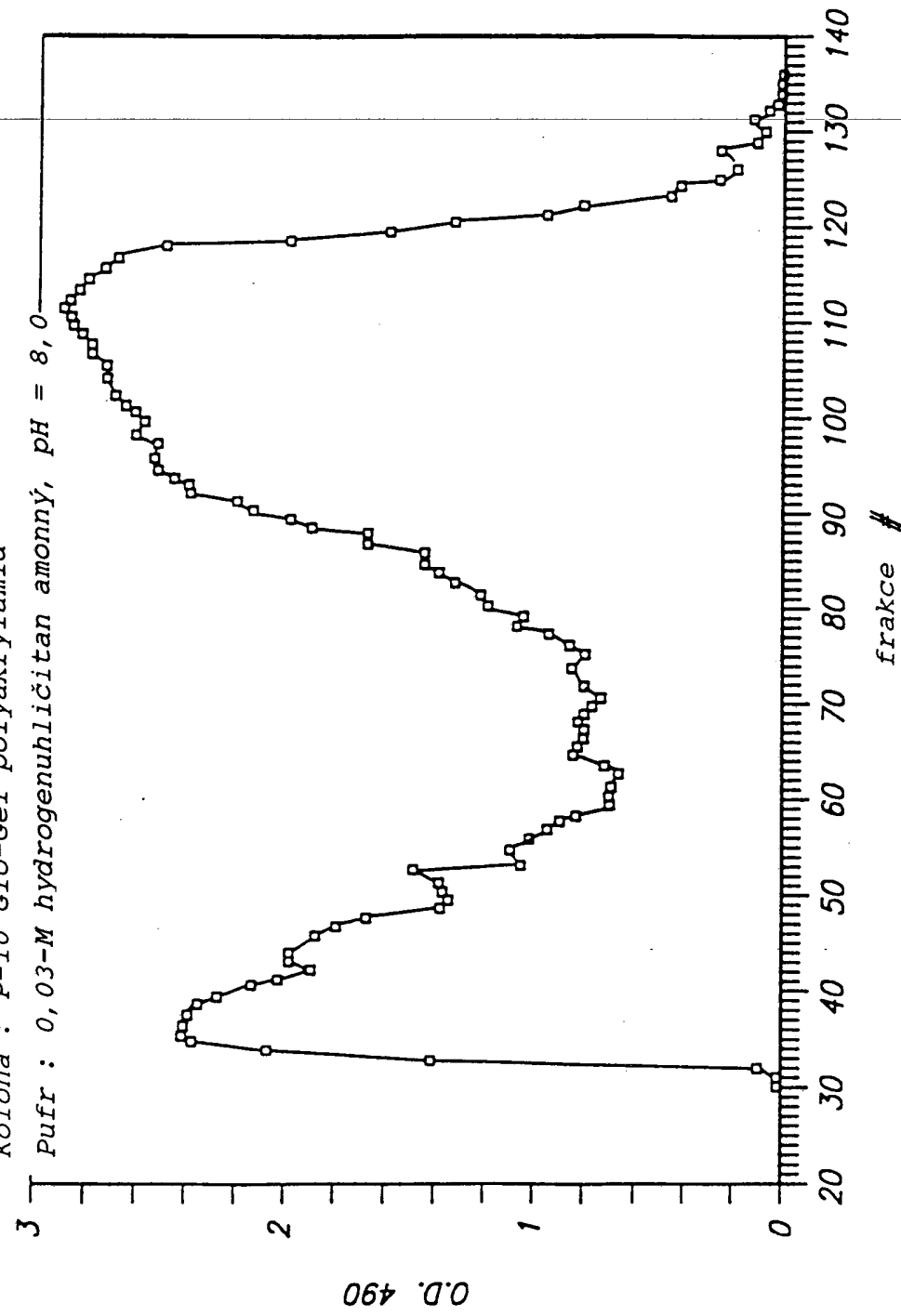
3878-9+

Separace celulázou štěpeného typu 8 pneumokokového polysacharidu

Hydrolýza: celulóza, 37 °C, 8 h

Kolona : P-10 Gio-Gel polyakrylamid

Pufr : 0,03-M hydrogenuhlíčitán amonný, pH = 8,0

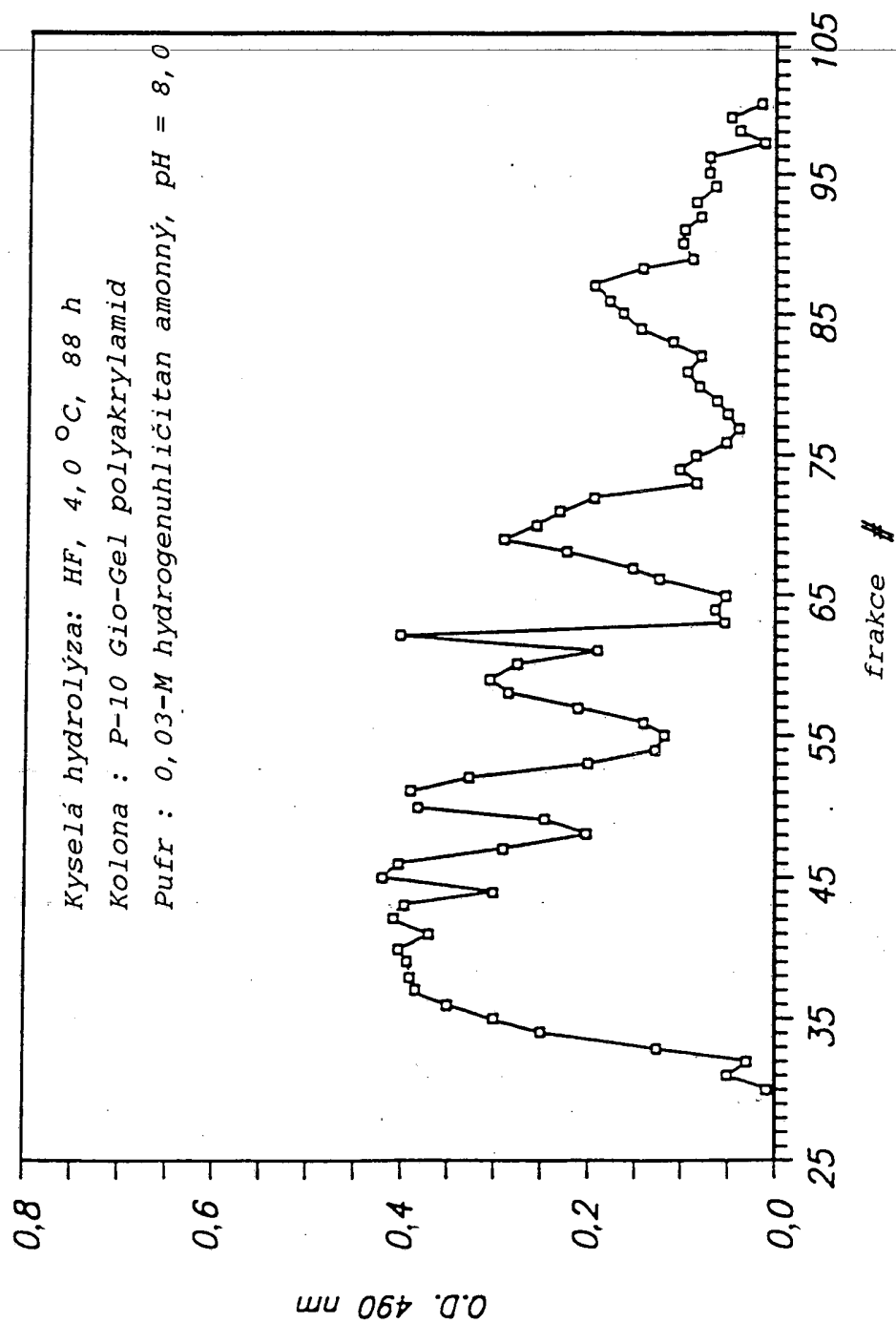


Obr. 11

15.10.97

5278-7+

Separace pneumokokového polysacharidového hydrolyzátu (C-substance)



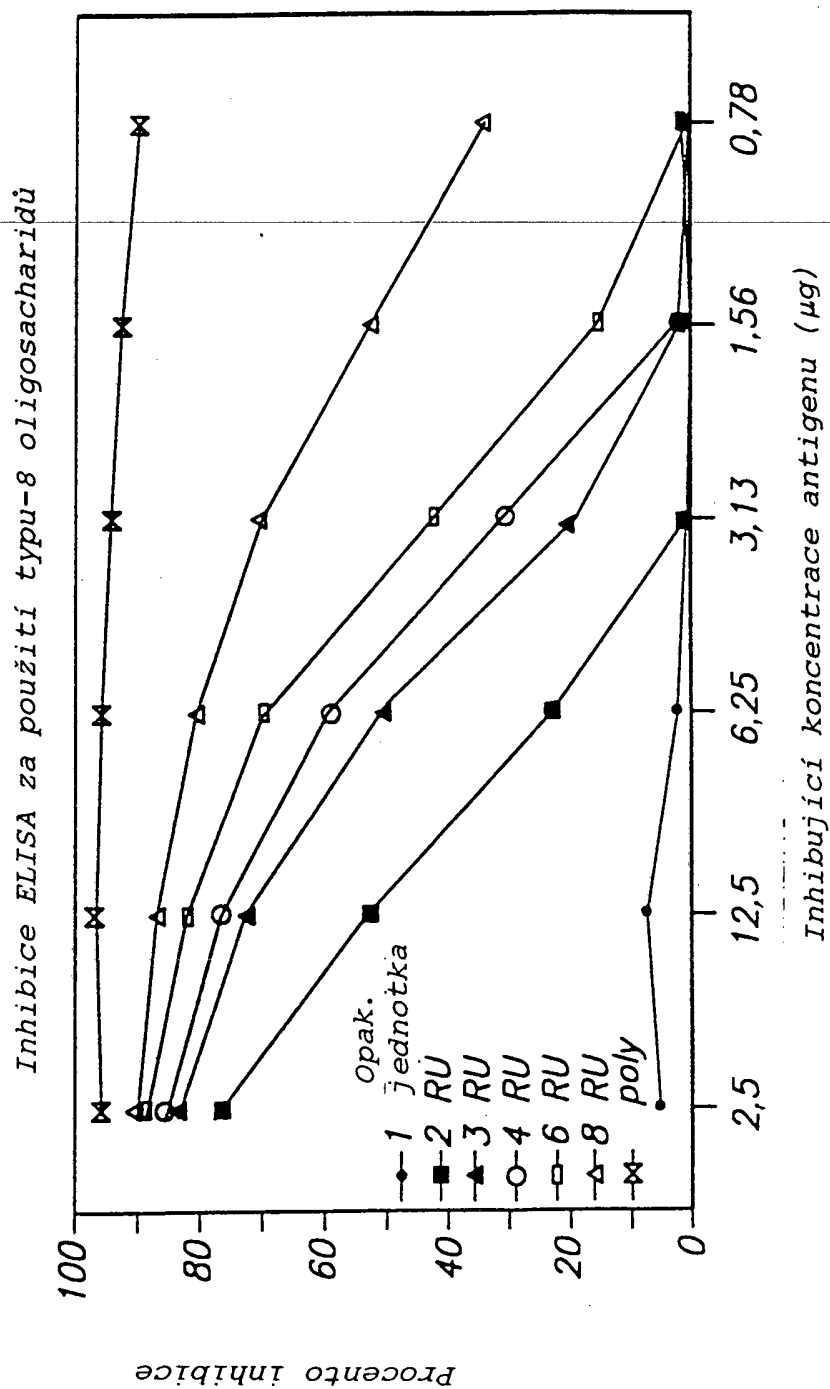
Obr. 12

13.10.97

5278-17

15.10.97

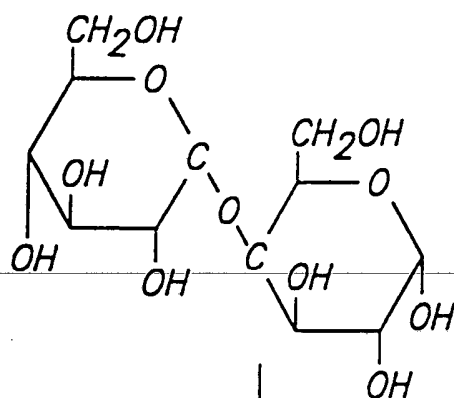
3078-97



Obr. 13

15.10.97

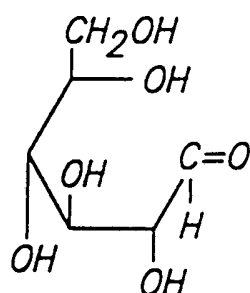
Acidifikace oligosacharidu pro karbodiimidovou kondenzaci



TFA

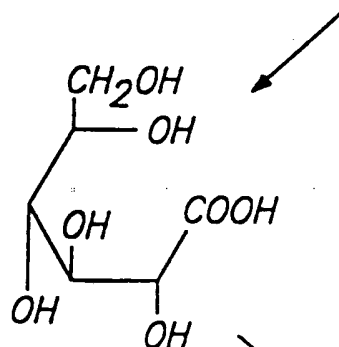
(kyselina trifluoroctová – CF_3COOH)

štěpení se vyskytuje mezi
 $\beta\text{-D-Glcp}(1\text{-}4)\beta\text{-D-Gal}$

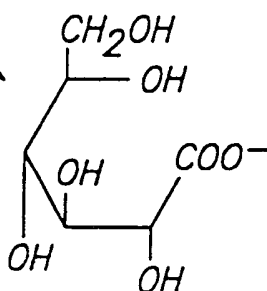


(vzniká hydroxyskupina)

(vzniká aldehydová skupina)

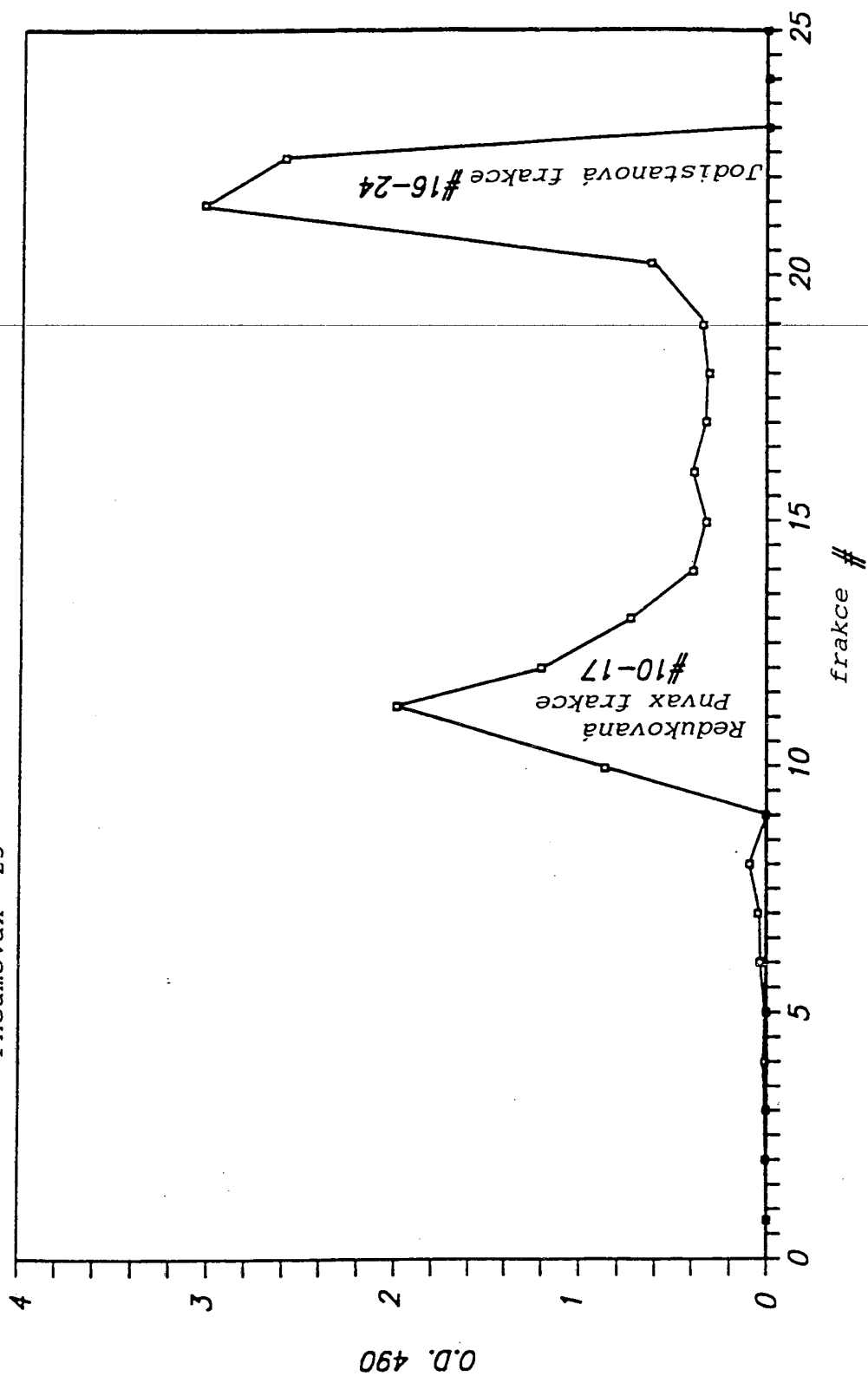


Aldehydová skupina je dále oxidována
na karboxylovou skupinu (TFA)



Rexyn 101 (H) kolona

Separace jodistanem aktivovaných polysacharidů vakciny
Pneumovax^R 23



Obr. 15

15.10.97

3248-97

15.10.97

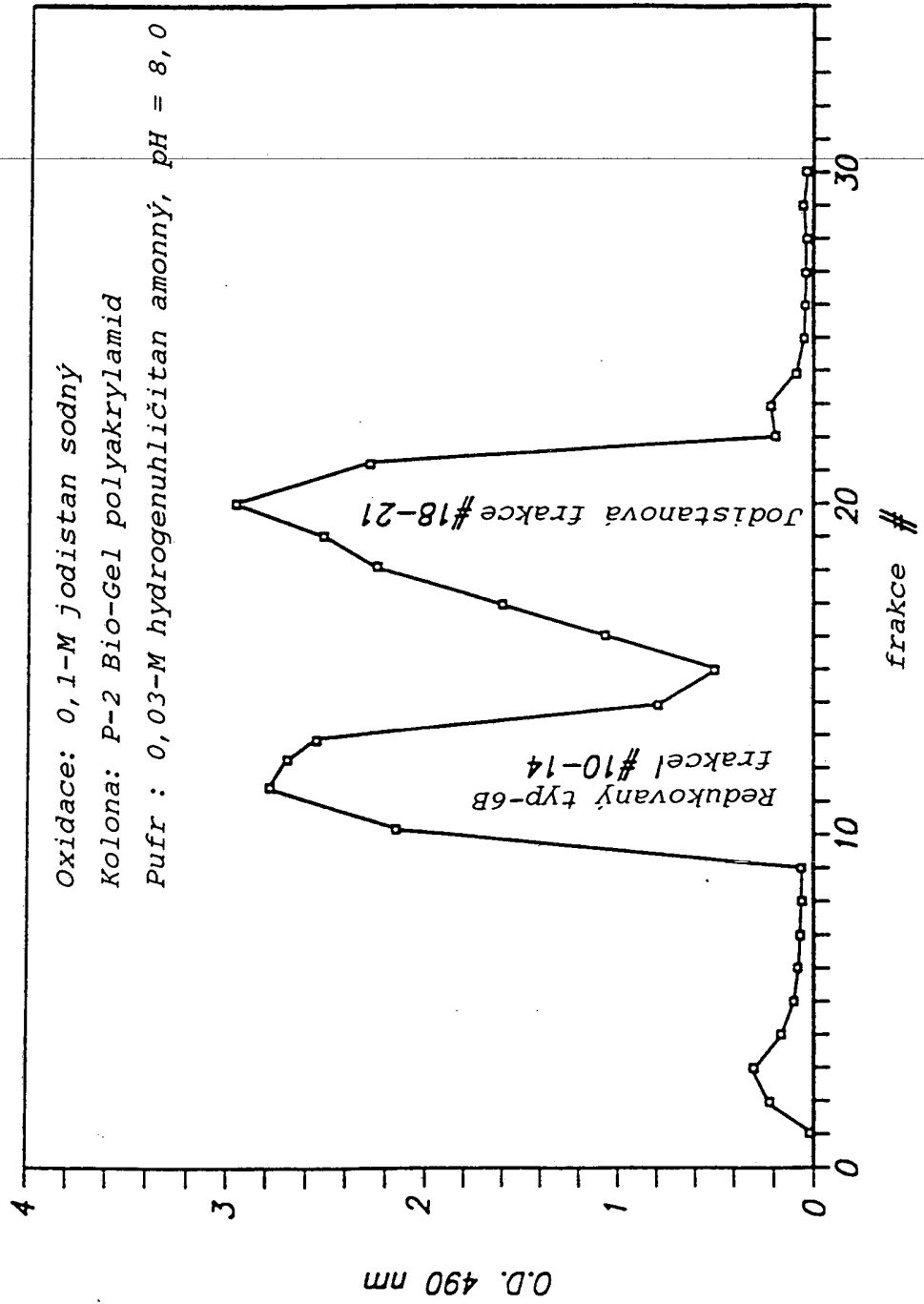
3248-97

Separace jodistanem aktivovaných 6B-oligosacharidů

Oxidace: 0,1-M jodistan sodný

Kolona: P-2 Bio-Gel polyakrylamid

Pufr : 0,03-M hydrogenuhličitan amonný, pH = 8,0

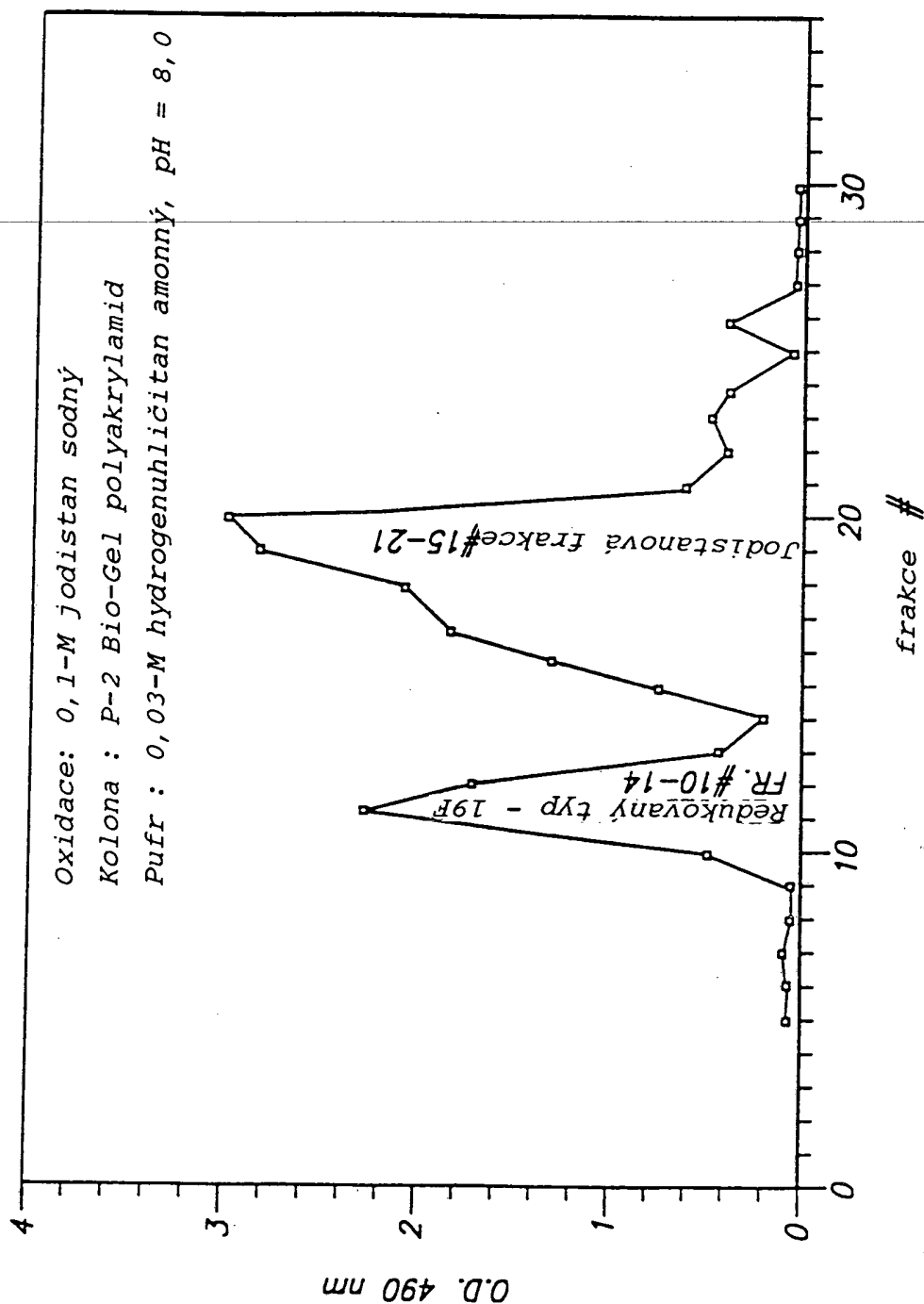


Obr. 16

15.10.97

3278-97

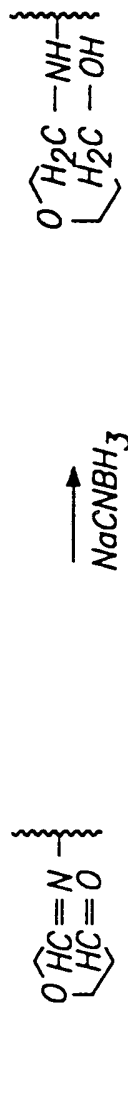
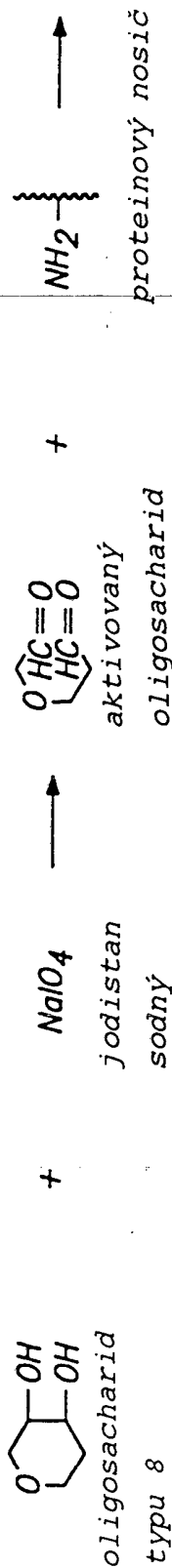
Separace jodistanem aktivovaných 19F-oligosacharidů



Obr. 17

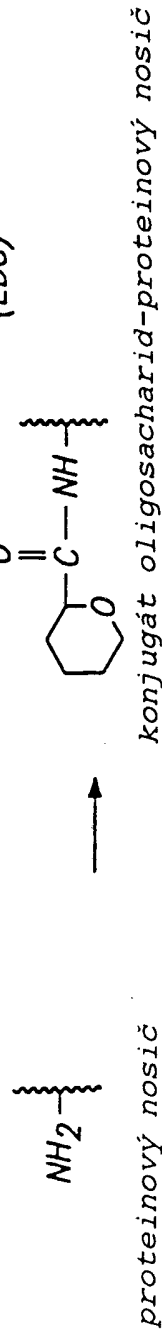
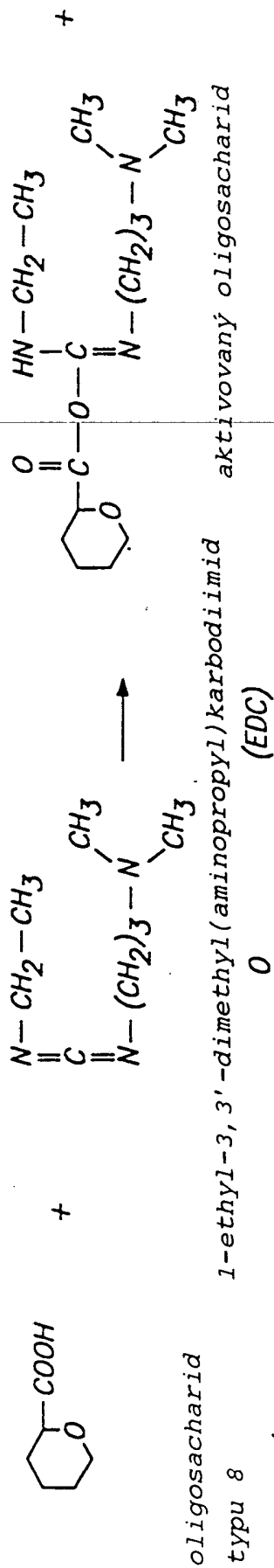
Kondenzační reakce

1. Jodistanová kondenzace (reduktivní aminace)



1) Oxidativní aminace jodistanem sodným aktivuje diolové skupiny v oligosacharidu a s přidáním aminokupiny, nacházející se na proteinovém nosiči, se tvoří meziproduct (Schiffova báze). Reduktivní aminací natriumkyanborhydridem se protonuje Schiffova báze a vzniká tak stabilní konjugát oligosacharid-proteinový nosič.

2. Karbodiimidová kondenzace (EDC)



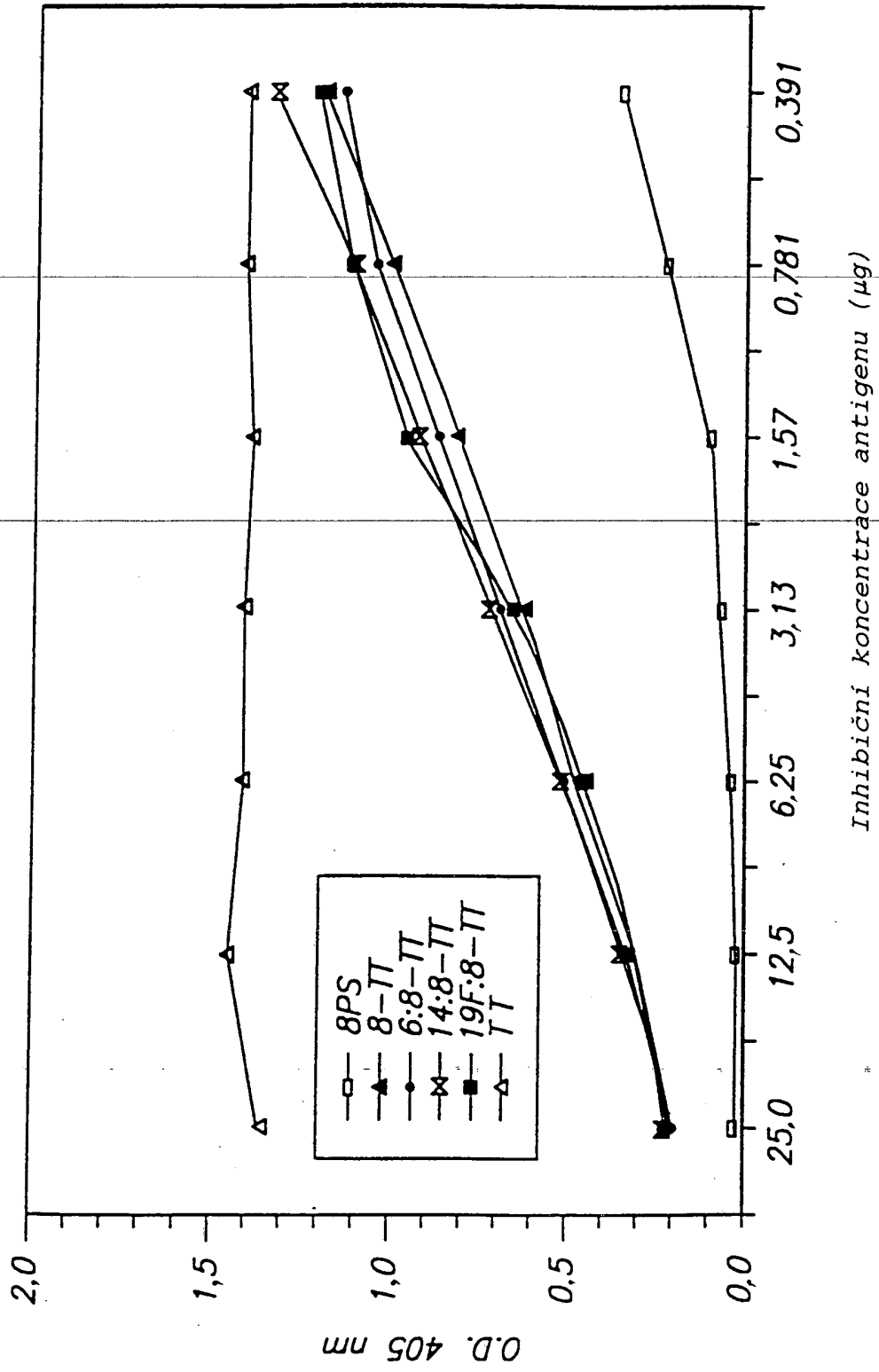
2) Karbodiimidové aktivované karboxylové skupiny na oligosacharidu reagují s aminokupinami, nacházejícími se na proteinovém nosiči a vznikají konjugáty karbohydrát-protein.

Obr. 18

15.10.97

3248-94

Inhibice ELISA za použití konjugátů typu-8

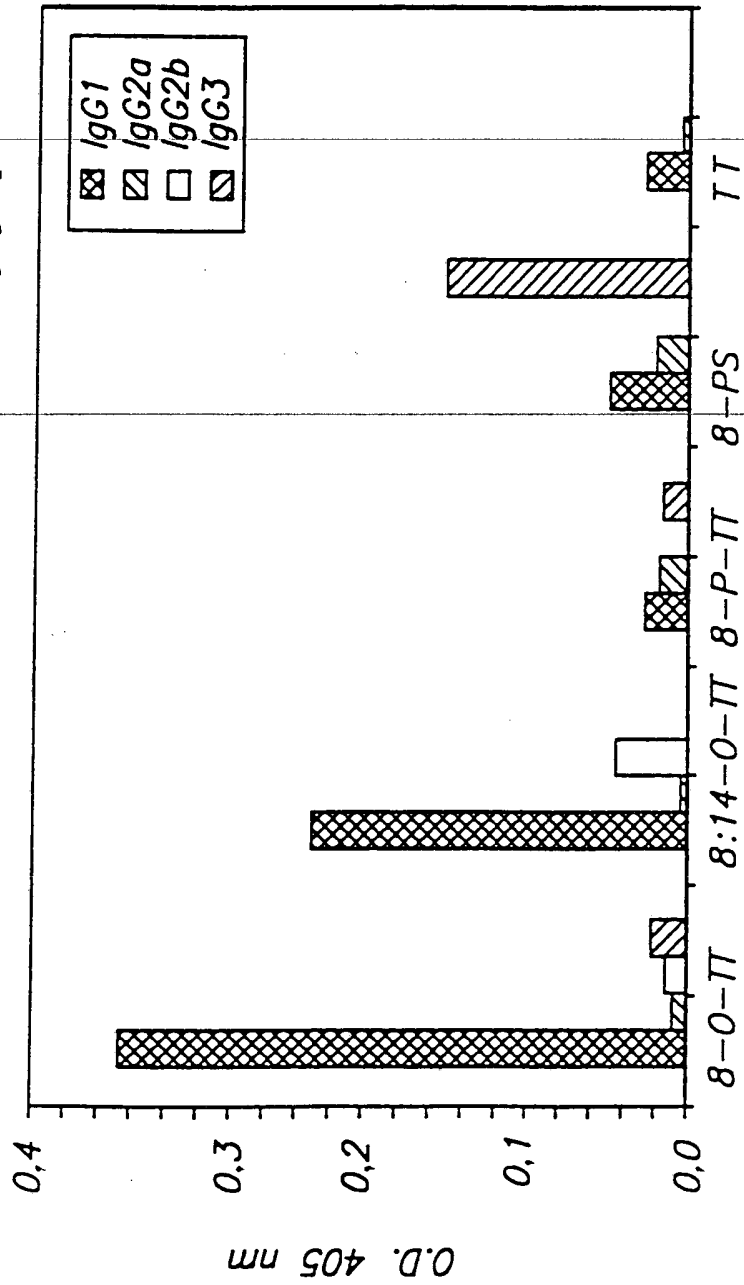


Obr. 19

15. 10. 97

3248-97

IgG isotopy odpovědi terciární protilátky na typ-8
polysacharidu z myši imunizovaných 8 konjugáty

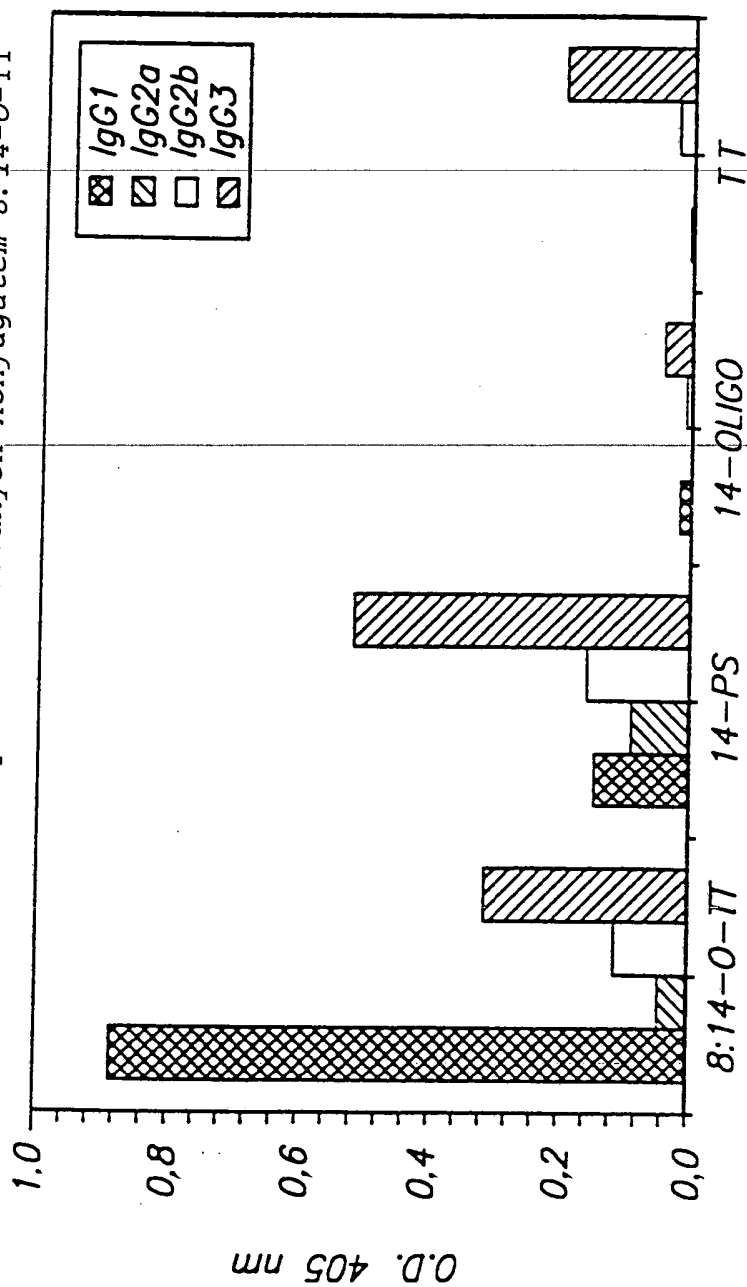


Testované skupiny

Obr. 20

15.10.97

IgG isotopy odpovědi terciární protilátky na typ-14
polysacharidu z myši imunizovaných konjugátem 8:14-O-TT



Testované skupiny

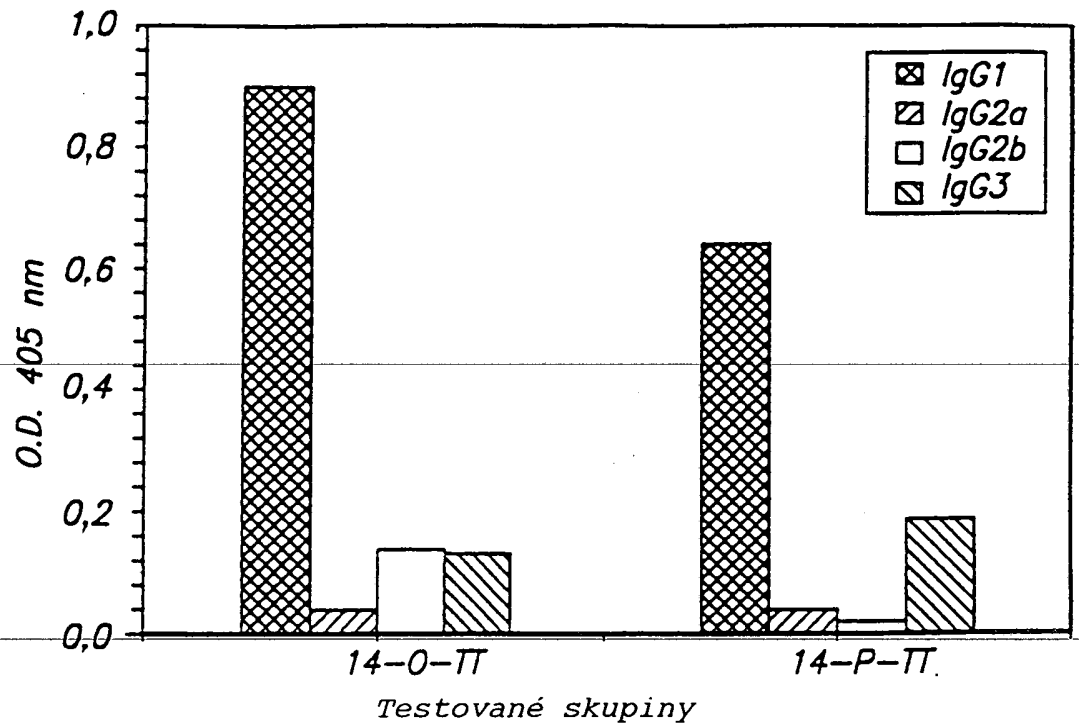
Obr. 21

15.10.97

1278-97

Obr. 22A

IgG isotopy vyvolané 14 konjugáty



FCA zvýšení IgG isotopů vyvolané 14 konjugáty

Obr. 22B

