(12) **PATENT**

(19) NO (11) **321321** (13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19964413	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.04.20 PCT/US95/04973
(22)	Inng.dag	1996.10.17	(85)	Videreføringsdag	1996.10.17
(24)	Løpedag	1995.04.20	(30)	Prioritet	1994.04.21, US, 231229
(41)	Alm.tilgj	1996.12.17			
(45)	Meddelt	2006.04.24			

(73) Innehaver The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021-6399, US
Baxter Healthcare SA, Hertistrasse 2, Wallisellen Kanton, 8306 ZÜRICH, CH

(72) Oppfinner Joseph Y. Tai, Port Washington, PA, US
Milan S. Blake, Iowa City, IA, US
John B. Zabriskie, New York, NY, US
Francis Michon, Laurel, MD, US

(74) Fullmektig Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, NO

(54) Benevnelse **Immunogen sammensetning inneholdende gruppe A streptokokkisk polysakkarid.**

(56) Anførte publikasjoner
Carbohydrate Research, vol. 232, 1992, s. 131-142, Reimer, K. B. et al.
The Journal of Experimental Medicine, vol. 168, 1988, s. 971-982, Fillit, H. M. et al

(57) Sammendrag

Det er beskrevet nye immunogene sammensetninger og vaksiner, fremgangsmåter for å fremstille disse, samt metoder for immunisering mot infeksjon og sykdom forårsaket av gruppe A streptokokker. Sammensetningene innbefatter gruppe A streptokokkisk polysakkarid kovalent bundet til protein eller liposomer for å danne immunogene konjugater. Fremgangsmåten ved immunisering omfatter å tilføres til et individ en immunogen mengde av gruppe A polysakkarid. Gruppe A polysakkaridet kan bli tilført som en vaksine, enten i seg selv konjugert til proteiner eller konjugert til liposomer. I tillegg kan gruppe A polysakkaridene være assosiert med en adjuvant. Metodene og sammensetningene er spesielt anvendelige for å fremskaffe både aktiv og passiv immunogen beskyttelse for de populasjoner som har størst risiko for å komme i kontakt med gruppe A streptokokke infeksjoner og sykdommer, nemlig voksne, gravide kvinner og spesielt spedbarn og barn.

Foreliggende oppfinnelse angår immunogene sammensetninger omfattende en immunogen mengde av et gruppe A polysakkarid som angitt i krav 1, et immunogent polysakkarid-protein-konjugatmolekyl som angitt i krav 6, vaksiner omfattende slike polysakkarider som angitt i krav 13 et immunogent polysakkarid X-liposomkonjugat ifølge krav 24 samt et immunogent preparat ifølge krav 29 som er virksomme mot infeksjoner og sykdommer forårsaket av gruppe A streptokokker.

Oppfinnelsen omfatter også en fremgangsmåte for kovalent å tilknytte gruppe A polysakkarid til et liposom som angitt i krav 35, anvendelse av et polysakkarid-protein-konjugatmolekyl til fremstilling av medisinske sammensetninger som angitt i krav 36-45, en farmasøytisk sammensetning ifølge krav 46 samt anvendelse av antistoff som medvirker til den baktericide respons ved nærvær av komplement og fagocytter til fremstilling av en farmasøytisk sammensetning ifølge krav 47.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Gruppe A streptokokkisk sykdom som vist ved infeksjonshyppigheten i en aldersgruppe er en barnesykdom (1-3). Meget likt andre sykdommer i denne kategori så som meningokokkisk (4) og hemofilus meningitis (5), difteri (6) og andre (7, 8), opptrer hoveddelen av tilfellene hos unge barn og infeksjonshyppigheten minsker med alderen. Således i en alder på 18 år er hyppigheten av gruppe A streptokokkiske infeksjoner relativt liten (1-3). Dette ville antyde at en eller annen form for naturlig immunitet hos denne gruppe organismer kan inntreffe over tid meget likt hva som blir funnet med andre barnesykdommer.

I forsøk som strekker seg over flere tiår etablerte Lancefield og medarbeidere (9-11) at størstedelen av hemolytiske streptokokker som infiserer mennesker var gruppe A. Denne distinksjon var basert på serologiske reaksjoner overfor gruppe A streptokokkisk karbohydrat. Senere studier

rapporterte at den immunodominante determinant var N-acetylglukosamin (12, 13). Ved å bruke musebeskyttelsesforsøk og utfellingsforsøk ble disse gruppe A streptokokker ytterligere suboppdelt i serotyper basert på tilstedeværelsen av antigenisk forskjellige M-proteiner, som er tilstede på overflaten av organismen. Det er blitt klart vist at antistoff rettet mot en spesifikk M-serotype er beskyttende i en musemodell for infeksjon (14). I mennesker er ofte bedring fra gruppe A streptokokkisk infeksjon assosiert med langvarig immunitet som er typespesifikk overfor den infiserende organisme (11). Imidlertid i begge tilfeller er beskyttelsen M-serotypespesifikk og strekker seg ikke til beskyttelse mot andre serotyper. I tillegg er det blitt vist i flerfoldige studier at humane sera sjelden inneholder multiple M-proteinserotypespesifikke antistoff (11, 15). Disse klassiske forsøk både i mennesker og forsøksdyr etablerte en viktig rolle for M-proteinet i virulensen av gruppe A streptokokker og har dannet basis for flere resultatløse forsøk på å utvikle streptokokkiske vaksiner som ville gi beskyttende antistoff enten overfor den aminoterminale del av M-proteinet hvor den serotypiske spesifisitet har sitt sete eller nyligere overfor de vanlige C-gjentatte områder av molekylet (16).

Imidlertid i betraktning av den aldersrelaterte natur av gruppe A infeksjoner som antyder en stigning i naturlig immunitet overfor denne gruppe bakterier, gjenstår spørsmålet hvorvidt dette representerer en sakte økning i antistoff rettet mot mer vanlige områder på M-proteinet eller hvorvidt andre overflateantigener som har mottatt mindre oppmerksomhet kunne spille en rolle i denne naturlig utviklede ikke-serotype spesifikke beskyttelse. For eksempel spiller hyaluronsyrekapselen en viktig rolle i virulensen av gruppe C infeksjoner hos marsvin (17) og anti-hyaluronalt antistoff er blitt påvist i dyr (18, 34) og mennesker (19). Hyaluronsyre fra gruppe A streptokokker ble rapportert å være immunogen i kaniner etter immunisering

med formaliserte, innkapslede gruppe A streptokokker eller bundet til liposomer (18). Bruk av liposomer i vaksiner er også blitt rapportert (31). Injeksjon av mukopeptid-fraksjonene av den streptokokkiske cellevegg induserer en kortlivet beskyttelse i forsøksdyr (20), men dets rolle i mennesker er ukjent.

Det gruppe-spesifikke karbohydrat består av en poly-rhamnosestamme til hvilken i tilfellet med gruppe A, en N-acetylglukosamin er tilstede ved den ikke-reduserende endedel (fig. 1a). Gruppe A variante streptokokker er blitt beskrevet og karakterisert (12, 13). I disse streptokokker er poly-rhamnosestammen tilstede, men forblir udekorert med N-acetylglukosamin (fig. 1b). I tidlige forsøk ble kaniner injisert med hele gruppe A streptokokker som mangler M-protein og dette ble vist å gi utfellende antistoff overfor gruppe A karbohydratet. Imidlertid var disse antistoff ikke passivt beskyttende mot et M-protein positiv gruppe A streptokokkisk angrep i passive musebeskyttende studier (14). Videre var flere tidlige forsøk på å vise liknende utfellende antistoff hos mennesker mislykket, noe som antyder at de utfellende karbohydratantistoff ikke spilte noen signifikant rolle ved beskyttelse mot streptokokkiske infeksjoner.

Imidlertid fordi de fleste at de tidlige metoder til å påvise en økning i antistoff var avhengige av egenskapen hos disse antistoff å bli utfellbare ved tilsetning av antigen, ble mange antistoff som ikke desto mindre var reaktive mot et spesifikt antigen, men som ikke utfelte i slike forsøk, etterlatt upåvist. Antistoff som er reaktive overfor hyaluronsyrekapselen av gruppe A streptokokker gir et godt eksempel. I studier fokusert på å fjerne dette problem, anvendte en serie av rapporter som startet 1965 (21, 22) både direkte og indirekte agglutineringsteknikker for å påvise antistoff. Direkte agglutinering påviste utfellende antistoff mens den indirekte agglutinering ville

måte både utfellende og ikke-utfellende antistoff. Av interesse var demonstrasjonen av Karakawa et al. (22) at de direkte agglutinerende antistoff, dvs. de utfellende antistoff i disse humane sera var rettet i hovedsak mot gruppe A variant karbohydratet, poly-rhamnosestammen, mens de indirekte agglutineringsteknikker rettet mot de ikke-utfellende antistoff påviste en høy titer av antistoff overfor N-acetylglukosamindeterminanten.

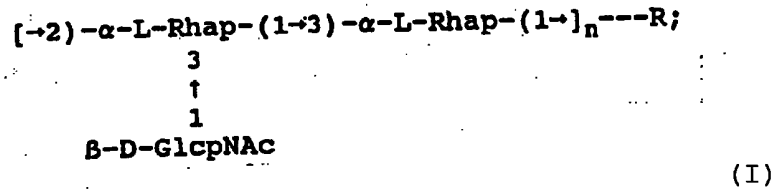
Etterfølgende studier av Zimmerman et al. (23), som anvendte humane sera fra en mengde streptokokkiske infeksjoner indikerte at hyppigheten av disse ikke-utfellende antistoff varierte fra en minstemengde på 30% i en populasjon som var blitt nøyaktig fulgt og behandlet for streptokokkiske infeksjoner til en størstemengde på 84% i en populasjon som nylig var blitt infisert med gruppe A streptokokker. De noterte også at antistofftitere overfor gruppe A karbohydratet hadde en topp ved alder 17 og at det ikke var noen forskjell i antistofftitere overfor dette karbohydrat hos reumatiske pasienter med og uten hjertesykdom. Disse resultater sto i kontrast til dem rapportert av Dudding og Ayoub hvor anti-gruppe A karbohydratantistoff vedvarende var øket i pasienter med reumatisk hjertesykdom sammenliknet med dem uten klaffskade (24).

Spørsmålet om hvorvidt eller ikke disse antistoff spiller en rolle ved beskyttelse har vært vanskelig å vurdere. Det klassiske opsonofagocytose-assayet til Lancefield som ble benyttet utvalgte humant fullblod (15, 25, 26) hvortil hyperimmune kaninsera med kjente M-protein-serotype-spesifikke antistoff ble tilsatt. Utvelgelsen av det humane fullblod var basert på to fakta; (1) det inneholdt ingen M-protein-reaktive antistoff og/eller (2) ville ikke fremme fagocytose av streptokokker ved fravær av det serotype-spesifikke kaninantiserum. Spørsmålet hvorvidt de normale humane sera i seg selv kunne øke fagocytose ble faktisk aldri undersøkt.

I Carbohydrate Research 232:131-142, Rejmer et al., er det beskrevet et polysakkarid som er et polysakkarid som anvendes til diagnostiske formål.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse gir en immunogen blanding for å beskytte pattedyr mot infeksjon av gruppe A streptokokke bakterier. Den immunogene sammensetning omfatter en immunogen mengde av gruppe A Streptococcus polysakkarid (GASP) med den følgende struktur:



(I)

hvor R er en terminal reduserende L-rhamnose eller D-GlcpNAc og n er et tall fra 3 til omkring 30 samt et bæremateriale hvor nevnte sammensetning gir beskyttelse i pattedyr mot infeksjon ava gruppe A streptokokke bakterier. Dette område av GASP definerer en epitop som induserer dannelsen av baktericide antistoff.

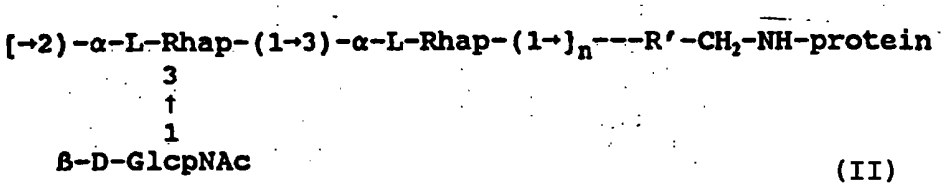
GASP som er tilstede i de immunogene blandinger kan være i form av fritt polysakkarid eller som en komponent av et konjugat hvor GASP er kovalent bundet til fosfolipid som er i stand til å danne et liposom eller et protein. Nativt eller rekombinant bakterielt protein, så som tetanustoksoid, koleratoksin, difteritoksoid eller CRM_{197} er eksempler på passende proteiner som er anvendelige som konjugater. I en annen utførelsesform blir et immunogent protein inkorporert i liposomet inneholdende GASP kovalent bundet til fosfolipidet.

Den immunogene sammensetning er også anvendelig som en

vaksine og kan videre omfatte en adjuvans, så som aluminiumhydroksid, aluminiumfosfat, monofosforyllipid A, QS21 eller stearyltyrosin. Den immunogene sammensetning ifølge foreliggende oppfinnelse er i stand til å gi aktiv og passiv beskyttelse mot infeksjon av gruppe A streptokokkisk infeksjon. For passiv beskyttelse blir immunogene antistoff dannet ved å immunisere et pattedyr med en vaksine dannet fra den immunogene sammensetning ifølge oppfinnelsen og så gjenvinne de immunogene antistoff fra pattedyret.

En immunogen blanding kovalent bundne GASP til liposomer kan fremstilles ved å oppløse liposomene i en buffer som er egnet for solubilisering av hydrofobe proteiner, kombinere de oppløste liposomer med protein oppløst i buffer for å danne et kompleks av liposomer og protein. Protein/liposomkomplekset blir så atskilt fra bufferen.

Et mål for foreliggende oppfinnelse er å fremskaffe immunogene blandinger som er anvendelige for å danne antistoff som har anvendelse for profylaktiske og diagnostiske formål. Et annet mål er å fremskaffe et konjugat med formelen:



(II)

hvor R' er produktet av reduksjon og oksidasjon av det terminale reduserende sukker. Et ytterligere mål for foreliggende oppfinnelse er å bruke de immunogene blandinger til å fremstille vaksiner som kan gi beskyttelse mot infeksjon av gruppe A streptokokker i de populasjoner som har størst risiko for å komme i kontakt med gruppe A streptokokkiske infeksjoner og sykdommer, nemlig voksne gravide kvinner og spesielt spedbarn og barn.

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1 viser skjematisk den strukturelle form av gruppe A

karbohydrat (fig. 1a) og det gruppe A variante karbohydrat (fig. 1b). Avbildningen av den tredimensjonale struktur av gruppe A karbohydratet støtter klart observasjonen at den serologiske spesifisitet av karbohydratet er rettet mot N-acetylglukosaminenheten av karbohydratet.

Fig. 2 illustrerer grafisk ELISA-titerbestemmelsene av gruppe A streptokokkiske karbohydratantistoff hos normale barn ved en alder på 5 og 10 år gamle fra Trinidad og New York. Avlesningene var endepunktbestemmelser av 1,0 OD ved 405 nm.

Fig. 3 illustrerer grafisk inhiberings-ELISA-studiene med humane sera kjent for å ha antistoff som er reaktive overfor gruppe A liposomene. Serumene ble passende fortynnet for å gi en verdi på 1,0 OD-enheter ved 405 nm og blandet med varierende konsentrasjoner av forskjellige antigener i én time ved 37°C, sentrifugert i fem minutter ved 10.000 rpm. Supernatantene ble undersøkt for reaktivitet i ELISA-assayet, som beskrevet i Eksempel 3. Dataene representerer gjennomsnittet av de undersøkte sera.

Fig. 4 illustrerer grafisk det indirekte baktericide assay som bruker vasket humant blod til hvilket forskjellige sera ble tilsatt til rørene inneholdende RPMI og komplement som skissert i Eksempel 1. Det initielle inokulum var ni CFU av gruppe A type 6 streptokokker. Panel A viser veksten av organismene i de roterte rør inneholdende normalt kaninserum. Panel B viser veksten i stasjonære rør med humant serum som har en høy ELISA-titer reaktiv overfor gruppe A karbohydratet. Panel C viser vekstinhiberingen med samme humane serum som i panel B, men i et rotert rør.

Fig. 5 illustrerer grafisk de indirekte baktericide assays som beskrevet i fig. 4. Organismene var en serotype 3 (stamme D58/11/3), en serotype 6 (stamme S43), en serotype 14 (stamme S23/101/5) og en serotype 28 (stamme

T28/isoA/5). Venstre akse viser antallet kolonidannende enheter i de roterte mot de stasjonære rør. Høyre akse viser prosentdelen i avliving av organismene i de roterte mot de stasjonære rør.

Fig. 6 illustrerer grafisk effekten av heparin på indirekte baktericide assays. Det indirekte baktericide assay ble utført som beskrevet, men i duplikat. Heparin (5 enheter pr. ml) ble tilsatt til et sett av stasjonære og roterte rør mens det andre sett av rør virket som de normale baktericide assaykontroller. Standardmengden av heparin som benyttes i de baktericide assays utformet etter hva som er beskrevet av Lancefield var 10 enheter pr. ml (33-35). Slik det kan observeres, reduseres heparin ved halvdelen av den vanligvis beskrevne konsentrasjon drastisk mengden av anti-gruppe A karbohydrat antistoffavhengig avlivning.

Fig. 7 illustrerer grafisk baktericide assays av anti-gruppe A assays karbohydrat-titere som målt i ELISA-assayet. Sytten individuelle humane sera ble undersøkt i begge assays ved å bruke serotype 6 organismene. Merk at alle sera (13/13) som oppviser en CHO-titer større enn 200.000, oppviser mer enn 80% avlivning i det baktericide assay. I motsetning til dette fremmet kun én av fire sera med titere mindre enn 200.000 opsonofagocytose av organismene og graden av fagocytose var mye mindre enn den som ble observert med sera av høyere titere.

Fig. 8 illustrerer grafisk opsonofagocytiske, baktericide assays som beskrevet i Eksempel 1. Fagocytose av organismene er vist i prosentdel av avlivning av organismen sammenliknet med de stasjonære kontroller. Staver indikerer prosentvis avlivning før adsorpsjon med N-acetylglukosaminaffinitetskolonnen etter absorpsjon med affinitetskolonnen og prosentvis avlivning av antistoff eluert fra kolonnen. Merk det fullstendige fravær av avlivning av alle sera etter absorpsjon med N-acetylglukosaminaffinitets-

kolonnen og den partielle tilbakedannelse av den opsonofagocytiske baktericide aktivitet etter eluering av antistoffene fra affinitetskolonnen. Standardavviket er vist i hvert tilfelle, bortsett fra i det absorberte sera hvor det var en fullstendig mangel på avlivning.

Fig. 9 illustrerer grafisk den opsonofagocytiske indeks av et kaninserum kjent for å ha høye titere av anti-Gr.A karbohydratantistoff etter immunisering med gruppe A streptokokkisk karbohydrat. Fagocytose av organismene er vist som prosentvis avlivning av organismen sammenliknet med de stasjonære kontroller. Merk mangelen på fagocytose av organismene med titer mindre enn 50.000, en gradvis økning i avlivning med titere på 75.000 og fullstendig fagocytose med titere over 100.000. Organismen som benyttes for disse studier var en gruppe A type 6 stamme og inokulumet var fire kolonidannende enheter.

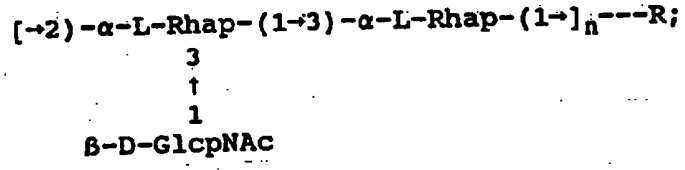
Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

I betraktning av de kjente serologiske data som påviser karbohydratantistoff i humane sera koplet med den aldersrelaterte induksjon av beskyttelse av andre karbohydratantigener, nemlig pneumokokkisk (27), meningokokkisk (4) og Haemophilus polysacharides (5), besluttet søker å undersøke på nytt forskjellige humane sera for tilstedeværelse av karbohydratantistoff både i normale populasjoner og i dem med streptokokkiske infeksjoner. Også inkludert i disse studier var pasienter med post-streptokokkiske etterinfeksjoner. Renset gruppe A karbohydrat ble kovalent bundet til syntetisk fosfatidyletanolamin, inkorporert i liposomer og benyttet i et ELISA-basert assay. Det kan bli vist at antistoff mot gruppe A karbohydrat antigenet lett blir påvist i humane sera. Videre, avhengig av den geografiske populasjon og eksponering til streptokokkisk sykdom, har mengden av disse antistoff en aldersrelatert avhengighet. En økning i antistofftiter overfor gruppe A karbohydratet ble også vist etter en kjent streptokokkisk infeksjon. For å ta opp

spørsmålet hvorvidt eller ikke disse antistoff eller en del av disse antistoff, som er reaktive mot gruppe A karbohydratet, kunne fremme opsonofagocytose, benyttet søker et modifisert Lancefield baktericidisk assay. De resulterende data viser at disse antistoff er opsoniske og epitopen til hvilken disse opsoniske gruppe A karbohydrat-antistoff er rettet, er de ikke-reduserende terminale N-acetylglukosaminresiduer.

Oppfinnelsen fremskaffer en immunogen sammensetning for beskyttelse i pattedyr, fortrinnsvis mennesker, mot infeksjon av gruppe A streptokokkiske bakterier. De immunogene konjugater ifølge foreliggende oppfinnelse blir dannet ved kovalent å feste gruppe A Streptococcus polysakkarid (GASP) til et passende protein eller liposomdannende fosfolipid, som angitt i krav 35.

Isolering og vekst av gruppe A Streptococcus og fremstilling av gruppe A polysakkaridet blir utført i henhold til fremgangsmåtene beskrevet av McCarty (28) og Dubois et al. (31). Det isolerte GASP har den følgende kjemiske struktur.



(I)

hvor R er en terminal reduserende L-rhamnose eller D-GlcpNAc og n er et tall for gjentakende enheter som er tilstrekkelig stort til å definere et polysakkarid av tilstrekkelig gjennomsnittlig molekylvekt til å være immunogent. Fortrinnsvis er n fra omkring 1 til omkring 50. Enda mer foretrukket er n fra omkring 3 til omkring 30 med en optimal størrelse på omkring 20. Som benyttet heri er uttrykket polysakkarid ment å innbefatte enhver polymer av sakkarider og innbefatter disakkarider, oligosakkarider, osv. Kulturer av gruppe A variant Streptococcus, som danner den ovennevnte polysakkaridstruktur er deponert hos the

American Type Culture Collection, Rockville, MD. GASP bør være av tilstrekkelig størrelse til å gi en immunogen respons hos individer. Mest foretrukket er den gjennomsnittlige molekylvekt omkring 10.000 kilodalton. En enkel gjentakende mengde av GASP har en molekylvekt på omkring 500 kilodalton.

I en foretrukket utførelsesform fra oppfinneren er GASP kovalent bundet til protein for å danne et konjugat som angitt i krav 6. Slike konjugater omdanner fortrinnsvis den immunogene respons overfor polysakkaridet fra én som er T-celleuavhengig til T-celleavhengig. Følgelig er ethvert protein eller fragment derav som blir tolerert av individet og som er i stand til å fremskaffe en T-celleavhengig respons, egnet som et konjugeringsmiddel til GASP. I hovedsak kunne ethvert protein virke som et konjugatprotein. Spesielt må det utvalgte protein ha minst én fri aminogruppe for bruk ved konjugering med gruppe A polysakkaridet. Foretrukket er proteinet ethvert nativt eller rekombinant bakterielt protein og er i seg selv et immunogen som gir T-celleavhengige responser både hos unge og voksne pattedyr. Eksempler på slike proteiner innbefatter, men er ikke begrenset til, tetanustoksoid, koleratoksin, difteritoksoid og CRM_{197}. Andre kandidater for konjugatproteiner innbefatter toksiner eller toksider av pseudomonas, staphylococcus, streptococcus, pertussis og enterotoksigene bakterier innbefattende *Escherichia coli*.

I en foretrukket utførelsesform omfatter konjugatmolekylene ifølge foreliggende oppfinnelse en proteinkjerne til hvilken GASP er bundet via en modifisert form av det terminale reduserende sukker. Slike konjugatmolekyler vil følgelig omfatte monofunksjonalisert GASP-bundet protein. Fortrinnsvis er flere GASP, mer spesielt mellom omkring 1 og 12 GASP, bundet til hvert protein. Mest foretrukket er minst omkring 5 GASP bundet til hvert protein.

I en annen utførelsesform er GASP bundet til proteinet via to eller flere områder på hvert GASP. Siden den baktericide epitop synes å være tilstede på forgreningene av de gjentagende GASP-enheter, bør funksjonalisering av GASP og binding til proteinet bli utført på en måte som preserverer en immunogen mengde av den baktericide epitop.

Proteinene til hvilke GASP konjugeres, kan også være nativt toksin eller et detoksifisert toksin (dvs. toksoid). I tillegg kan ikke-toksiske mutasjonsmessige former av proteintoksiner også bli benyttet. Fortrinnsvis opprettholder slike mutasjoner epitoper av det native toksin. Slike toksiner er blitt betegnet "kryssreagerende materialer" eller CRM. CRM_{197}, som har en enkel aminosyreendring i forhold til det aktive difteritoksin og som ikke kan skilles immunogent fra dette, er en komponent av *Haemophilus influenzae* konjugatvaksine, som bredt er blitt benyttet på spedbarn.

En kultur av *Corynebacterium diphteria* stamme C7 (β197), som danner CRM_{197}-protein er deponert hos the American Type Culture Collection, Rockville, MD (tilgangsnummer ATCC 53281).

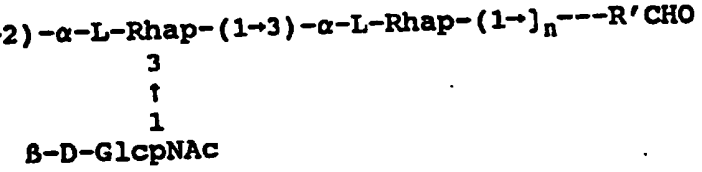
Fragmenter av proteiner kan også bli brukt for konjugering til GASP forutsatt at de er av tilstrekkelig lengde, dvs. fortrinnsvis minst 10 aminosyrer for å definere en T-celle-epitop.

Mange konjugeringsmetoder kan bli benyttet for å danne gruppe A polysakkaridproteinkonjugatet ifølge foreliggende oppfinnelse. Fortrinnsvis vil den benyttede metode være en som opprettholder immunogenisiteten av den baktericide epitop som er tilstede på β-D-GlcpNAc-grenene som er glykosidisk bundet til posisjon 3 av rhamnose. Når et enkelt GASP binder til to eller flere proteinmolekyler, blir det resulterende konjugat kryssbundet med hensyn til proteinet.

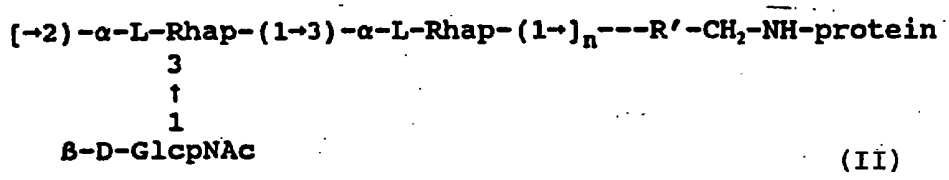
Graden av kryssbinding og total størrelse av konjugat-molekylet kan bli regulert ved rutinemessig variasjon i betingelsene som brukes under konjugeringsreaksjonen og som er velkjent for fagmannen. Slike variasjoner innbefatter for eksempel hastigheten av konjugeringsreaksjonen og forholdet mellom proteiner og GASP som er tilstede i reaksjonsblandingen.

Forskjellige kjemiske metoder for å konjugere polysakkarider til protein er kjent og er blitt beskrevet innen faget. For eksempel beskriver US patent 4 644 059, et konjugat som dannes ved å bruke adipinsyredihydrazid (ADH) som en homodifunksjonell linker. US patent 4 695 624, beskriver metoder for å danne polysakkarider og konjugater ved å bruke bigeneriske avstandsgrupper. En oversikt over forskjellige fremstillingsmetoder og faktorer som brukes for å utforme konjugater er beskrevet i Dick, William E. og Michel Beurret, Contrib. Microbiol. Immunol. (1989), volum 10, side 48-114. Den foretrukne konjugeringsmetode for GASP-proteinkonjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse er reduktiv aminering, som beskrevet i US patent 4 356 170. Kort angitt blir i den foretrukne utførelsesform det terminale reduserende sukker av GASP redusert for å åpne ringen ved å bruke et mildt reduksjonsmiddel, f.eks. natriumborhydrid eller tilsvarende.

Dernest blir selektiv oksidering med natriummetaperjodat eller tilsvarende benyttet for å oksidere de terminale nærliggende hydroksylgrupper av den på forhånd reduserte sukkerenhet for å danne en terminal aldehydgruppe. Dette danner et aktivert GASP som nå er i stand til kovalent å binde til det utvalgte proteinbæremiddel. I en annen utførelsesform av foreliggende oppfinnelse kan dette aktiverte GASP også bli kovalent bundet til et fosfolipid, så som fosfatidyletanolamin, som er i form av liposomer. Den kjemiske struktur for det aktiverte GASP er som følger:



hvor R' er produktet av reduksjon og oksidasjon av det terminale reduserende sukker, bortsett fra for den del av det terminale reduserende sukker som danner aldehydresiduet (CHO). Omtrent 10 mg polysakkarid blir passende oksidert med omkring 1 ml av omtrent 20 mm natriummetaperjodatoppløsning i omkring 10-15 minutter ved romtemperatur. Reaksjonstiden kan bli variert for å tilpasse andre mengder perjodat for å oppnå tilsvarende oksidasjon. Reduksjon og åpning av det terminale reduserende sukker gjør at de nærliggende hydroksylgrupper på det reduserende sukker blir meget mer reaktive enn de som er tilstede på de glykosidisk bundne β-D-GlcpNAc-grener. Imidlertid kan også ytterligere bindingsseter oppstå via oksideringen av enkelte av de glykosidisk bundne β-D-GlcpNAc-residuer. Det aktiverte GASP og det utvalgte konjugerende protein blir så konjugert i nærvær av cyanoborhydrationer eller et annet reduksjonsmiddel ved kopling til aminogrupper av bæreproteinet til de terminale aldehydgrupper av GASP. Gruppe A polysakkaridet og proteinet blir derved bundet via en $-CH_2-NH-$protein-binding som i formel (II).



(II)

De resulterende GASP-proteinkonjugater fra den reduktive amineringsprosess har fortrinnsvis begrenset kryssbinding

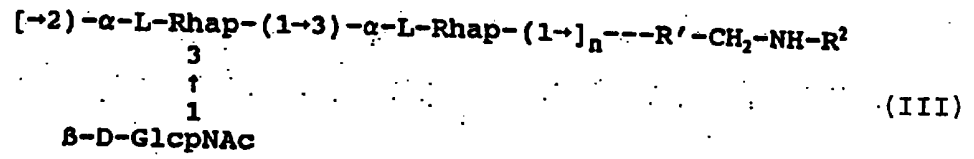
og er fortrinnsvis oppløselige i vandige oppløsninger. Dette gjør GASP-proteinkonjugatet ifølge foreliggende oppfinnelse til en foretrukket kandidat for bruk i vaksiner.

I en annen utførelsesform av oppfinnelsen blir GASP innesluttet i liposomer som danner en immunogen sammensetning. Liposomer blir ofte brukt i konjugater grunnet sin egenskap til å indusere en "hette"-effekt på B-lymfocytter. Uten å være bundet av teori er GASP-liposomkonjugater antatt å øke antistofftitrene ved hettedannelse for derved å aktivere B-cellelymfocytter. Det hettedannende fenomen er velkjent innenfor området av cellulær biologi. Kort angitt, grunnet de liposomale strukturelle trekk, er liposomer i stand til å bli innesluttet med et antigen for derved å danne multivalente immunogene strukturer. Siden receptormolekylet i cellemembranen av liposomer er mobile, kan mange av disse receptorer bli kryssbundet med divalente reagenser for å danne områder av todimensjonal utfelling eller "lapper". Disse lapper vil smelte sammen eller klynge seg ved de polare ender av B-cellelymfocytter for å danne en hette i cellemembranen av lymfocytten. Denne virkning av et antigen å danne hetter i B-cellelymfocytter, om den foretas i nærvær av effektor T-hjelpeceller, vil aktivere antistoffdannelse av B-cellelymfocyttene.

Forskjellige metoder for å konjugere polysakkarider til liposomer er kjent og er blitt beskrevet innen faget. For eksempel beskriver US patent 5 283 185, overføring av nukleinsyrer til celler ved å fremstille en blandet lipiddispersjon av kationisk lipid med et kolipid og så innføre nukleinsyrer i dispersjonen for å danne et kompleks. Celler blir så behandlet med dette kompleks. I en foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse blir liposomer dannet ved å dispergere et lipid i en vandig oppløsning enten ved injeksjon gjennom en fin nål eller fortrinnsvis ved ultralydbehandling som beskrevet i Fillit, H.M. Milan Blake, Christa MacDonald og Maclyn McCarty

(1988), Immunogenicity of liposome-bound hyaluronate in mice, J. Exp. Med. 168: 971-982, som er innbefattet heri pr. referanse.

For å fremstille et liposom inneholdende fosfolipid kovalent bundet til GASP-komponenten, blir liposomer dannet ved kjente metoder. For eksempel blir i én utførelsesform av foreliggende oppfinnelse fosfatidyletanolamin oppløst i et oppløsningsmiddel, så som kloroform og tilsatt til en beholder. Kloroformoppløsningsmidlet fjernes for derved å belegge beholderen med fosfatidyletanolamin. En vandig buffer, så som vann eller fosfatbufret fysiologisk saltvann (PBS) blir så tilsatt til beholderen og blandingen ultralydbehandles for å danne liposomer. GASP som er blitt aktivert fortrinnsvis ved reduksjon fulgt av oksidering, blir så tilsatt til liposomene i en lik molar mengde og de to komponenter blandes over natten i nærvær av enhver egnet buffer, så som fysiologisk saltvann, Ringers oppløsning eller mest foretrukket, fosfatbufret saltvann (PBS). Natriumcyanoborhydrid blir så tilsatt til blandingen for å danne en stabil kovalent binding mellom fosfatidyletanolaminet og GASP-polysakkaridet. Sluttproduktet som vist i formel III, kan bli separert fra natriumcyanoborhydridet ved sentrifugering, gelfiltrering eller dialyse.



(III)

R' og n i formel III er som tidligere beskrevet og R^2 er fosfatidyletanolamin.

I en foretrukket utførelsesform blir GASP-liposomene kombinert med protein for å innbefatte hydrofobisk protein i liposomene. I henhold til én metode blir GASP-liposomene oppløseliggjort i en 5% oppløsning av blanding β-oktylglukosid. Proteinet som skal tilsettes til liposomet blir

også oppløst i 5% β-oktylglukosid og proteinet og liposomene kombineres. Etter blanding for å inkorporere proteinet i liposomet, blir β-oktylglukosidet fjernet ved dialyse. Det resulterende GASP-liposom-protein-kompleks kan så bli benyttet som et immunogen eller en vaksine.

GASP kan også bli bundet til fosfolipider ved å bruke andre mindre foretrukne teknikker, så som ved å bruke benzokinon som beskrevet i Fillit, H.M., M. McCarty og M.S. Blake (1986), the induction of antibodies to hyaluronic acid by immunization of rabbits with encapsulated streptococci. J. Exp. Med. 164: 762-776. Imidlertid behøver bruken av slike reagenser ikke å være ønsket dersom sammensetningen skal bli benyttet som en vaksine.

De immunogene blandinger ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli benyttet som en mulighet for å fremskaffe antistoff som er anvendelige for profylaktiske og diagnostiske formål. Diagnostika er spesielt anvendelige i å overvåke og påvise forskjellige infeksjoner og sykdommer forårsaket av gruppe A streptokokker. De immunogene antistoff benyttet for passiv beskyttelse blir dannet ved å immunisere et pattedyr med et hvilket som helst av de immunogene blandinger ifølge oppfinnelsen og så gjenvinne de baktericide antistoff i en gammaglobulinfraksjon eller som serum eller som spesifikke antistoff fra pattedyrene. Som benyttet heri er vaksinene ifølge foreliggende oppfinnelse i stand til å fremskaffe antistoff som er anvendelige eller som gir beskyttelse mot infeksjon av gruppe A streptokokke bakterier.

I tillegg kan gruppe A polysakkaridet bli benyttet i seg selv som et immuniseringsmiddel fortrinnsvis assosiert med en adjuvant, så som aluminiumhydroksid, aluminiumfosfat, monofosforyllipid A, QS21 eller stearyltyrosin. En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er å bruke de immunogene blandinger til fremstilling av preparater som gir en

immunogen beskyttelse mot infeksjon av gruppe A streptokokker. Spesielt vil slike preparater gi beskyttelse hos de populasjoner som har størst risiko for å komme i kontakt med gruppe A streptokokke infeksjoner og sykdommer, nemlig voksne, gravide kvinner og spesielt spedbarn og barn.

Den immunogene sammensetning og vaksiner ifølge oppfinnelsen blir typisk dannet ved å dispergere GASP eller konjugat i et passende farmasøytisk akseptabelt bæremateriale, så som fysiologisk saltvann, fosfatbufret saltvann eller andre injiserbare væsker. Vaksinen blir tilført parenteralt, for eksempel subkutant, intraperitonealt eller intramuskulært. Additiver som er vanlige i vaksiner, kan også være tilstede, f.eks. stabilisatorer, så som laktose eller sorbitol og adjuvanter, så som aluminiumfosfat, aluminiumhydroksid, aluminiumsulfat, monofosforyllipid A, QS 21 eller stearyltyrosin.

Dosen av immunogene sammensetninger vil være slik at den vil gi immunogent effektive resultater. Doser vil normalt ligge innenfor området omkring 0,01 µg til omkring 10 µg pr. kg kroppsvekt. En serie av doser kan bli gitt for optimal immunitet. Doseenhetsformer av vaksinen kan bli dannet med mengder av GASP eller konjugat som er ekvivalent til å danne omkring 0,01 µg til omkring 10 µg mikrogram.

Oppfinnelsen blir illustrert av de følgende ikke-begrensende eksempler.

Eksempel 1

Metodene for vekst, fremstilling og undersøkelse for gruppe A streptokokkiske karbohydratantistoff og deres bruk som en ny vaksine i voksne og barn blir angitt som følger:

Vekst av gruppe A streptococcus

En -70°C stamoppløsning av gruppe A streptococcus ble streket på en mediumplate som inneholder 3 g/l Todd Hewitt

Broth og 3 g/l gjærekstrakt (GAS-medium). Platen ble inkubert ved 37°C i 48 timer, ved hvilken tid kolonier (8-9) ble overført til en 200 ml GAS-medium risteflaske og dyrket i 18 timer ved 37°C og 120 rpm. Utsåingskulturen (150 ml) ble overført til en 15 l fermentor (New Brunswick, BioFlo 4) i Todd Hewitt Broth. Kulturen dyrkes i 7-8 timer ved pH 7,0 og 37°C. Glukose ble tilsatt ved 3 g/l når kulturen nådde en stasjonær fase (optisk tetthet ved 600 nm omkring 1,5). Kulturen ble tillatt å vokse i ytterligere åtte timer og innhøstes. Den endelige optiske tetthet var omkring 2,7 ved 600 nm.

Fremstilling av gruppe A streptokokkisk polysakkarid

60 g av gruppe A streptokokkiske celler i 600 ml vann ble kombinert med 75 ml 4 N natriumnitritt og 75 ml iseddiksyre. Oppløsningen ble blandet i 15 minutter og sentrifugert i ti minutter ved 11.000 rpm i en SS34-rotor. Supernatanten ble fjernet og dialysert mot vann og frysetørket. Gruppe A polysakkaridet ble renset fra det frysetørkede grovekstrakt ved gelfiltrering gjennom en Sephadex G-50 kolonne (Pharmacia) ved å bruke PBS som elueringsmiddel. Fraksjoner som eluerte fra kolonnen ble overvåket for nærvær av karbohydrat ved å bruke fenolsvovelsyreassayet til Dubois (31). De karbohydratpositive fraksjoner ble slått sammen, dialysert ved 4°C mot vann og frysetørket. Polysakkaridpreparatet (240 mg) inneholdt mindre enn 1% (w/w) proteiner og nukleinsyrer. Dets renhet ble videre bekreftet ved ^{1}H-NMR ved 500 MHz ved å bruke et AM-500-BRUKER-spektrometer.

Fremstilling av liposomer: Gruppe A streptokokkisk karbohydrat ble isolert ved metoder tidligere beskrevet av McCarty (28). Det frysetørkede materiale ble resuspendert, justert til 10 mg/ml og kovalent bundet til liposomer ved å bruke metoder tidligere beskrevet av Fillit et al. (18) ved å bruke benzokinon som et tilknytningsmiddel og som er innbefattet heri pr. referanse for streptokokkisk

hyaluronat. Kort fortalt omsettes GASP med benzokinon for å danne et aktivert intermediat. Dette intermediat blir så videre omsatt med fosfatidyletanolamin i form av liposomer for å danne det immunogene GASP-liposomkonjugat.

ELISA assays: ELISA-metoden var i hovedsak den som beskrevet av Fillit et al. (18) med de følgende modifiseringer. Preliminær undersøkelse med humane sera indikerte at 0,5 µg CHO pr. ml i PBS, pH 7,2 av det liposomale preparat for å sensitivisere mikrotiterplatene gir de beste resultater med minimale bakgrunnsavlesninger mot de liposome kontrollpreparater. Følgelig plasseres 100 µl av preparatet pr. brønn i mikrotiterplater (Dynatech-plater, USA) og inkuberes ved 37°C over natten. Platene ble så vasket tre ganger i ELISA-vaskebuffer (10 mM NA-acetat, 100 mM NaCl, 0,1% Brij 35, pH 8,0). De humane sera ble fortynnet i samme ELISA-buffer og 100 µl av en gitt serumfortynnelse ble plassert i platene og inkubert i én time ved 37°C. Alle sera ble undersøkt i duplikat. Etter passende vasker ble 1:1.000 fortynning av geite-F(ab')2 anti-human IgG (gammakjedespesifikk) eller IgM (Mu-kjedespesifikk) alkalisk fosfatasekonjugat (Tago, Inc., USA) benyttet som det sekundære antistoff og inkubert i ytterligere én time ved 37°C. Etter tre ytterligere vasker i ELISA-buffer ble et fosfatasesubstrat (Sigma 104) i 0,1 M dietanolamin, pH 9,6, tilsatt til brønnene, platene ble inkubert ved 37°C i én time og avlest på Elida V (Physica Co.) instrument ved 405 nm. Titeren ble angitt som den fortynning som gav en avlesning på 1,0.

Baktericide assays: Det indirekte baktericide assay som er beskrevet av Lancefield (15, 25, 26) ble utført som følger: Organismer av de forskjellige stammer dyrkes i 18 timer ved 37°C i Todd Hewitt-medium. En prøve av overnattingskulturen ble først fortynnet 1:2 i fersk Todd Hewitt-medium og dyrket i ytterligere to timer ved 37°C. Suspensjonen ble fortynnet til 1:100 fulgt av seriell togangers fortynninger

for å gi mellom 5 til 15 kolonier i 50 µl av Todd Hewitt-medium. Heparinisert blod ble benyttet som kilde for humane fagocytter. For å unngå nærvær av autologt plasma i den fagocytiske suspensjon, ble blodet sentrifugert ved 2000 rpm i ti minutter, plasma ble fjernet, pelleten ble vasket tre ganger i PBS (pH 7,2) og til slutt resuspendert med RPMI (Gibco-BRL, Co., Rockville, MD) til samme volum som den opprinnelige blodprøve. Komplement ble tilført til assaysystemet ved å bruke ferskt isolert serum fra en normal donor kjent for å inneholde lave mengder anti-karbohydrat-antistoff og som gjentatte ganger var blitt absorbert ved 0°C med gruppe A streptokokker og lagret i aliquoter ved -70°C (29). Før bruk ble denne kilde for komplement analysert for både komplementaktivitet og fravær av gruppe A karbohydratantistoff. Det baktericide assay ble utført i duplikat i forseglede rør. Reaksjonsblandingen var som følger: 300 µl humane fagocytter suspendert i RPMI, 100 µl human kompliment, 200 µl av serumet som skal undersøkes og 50 µl av den fortynnede streptokokkiske kultur. Som i Lancefield-assayet, ble én av duplikatrørene rotert ved tverrdreiing i tre timer ved 37°C og det andre rør, som virker som en kontroll, forblir stasjonært ved samme temperatur. Etter tre timer ble 100 µl fra hvert rør utsådd på blodagarutfelningsplater og inkubert over natten ved 37°C. Antallet kolonier på hver plate ble så opptellet. Den opsonofagocytiske aktivitet ble regnet ut som prosentdel av streptokokkisk avlivning hos et spesielt serum ved den følgende ligning: (1-cfu i rotert forsøksserum/cfu i stasjonært rør) x 100.

Absorpsjon av N-acetylglukosaminantistoff fra humane sera:

600 µl av en 50% suspensjon av et N-acetylglukosamin koplet til Sepharose-kuler (Sigma Chemical Co.) i PBS ble plassert i et sterilt eppendorf-rør og sentrifugert ved 4°C ved 14.000 rpm i ti minutter. Supernatanten ble fjernet og 300 µl serum tilsatt til kulene. Suspensjonen ble rotert ved tverrdreining i én time ved 37°C. Etter en andre sentri-

fugering under samme betingelser ble det absorberte serum fjernet og benyttet i det baktericide assay som tidligere beskrevet. For å fjerne N-acetylglukosaminantistoffene fra affinitetskolonnen ble kulene inneholdende de absorberte antistoff pakket i en 1 ml tuberkulinsprøyte over hvilken enn oppløsning av 0,58% (v/v) iseddiksyre i 0,15 M NaCl, pH 2,2 passeres. Elueringsmidlet overvåkes ved absorpsjon ved 280 nm og toppfraksjonene samles opp, dialyseres mot PBS, pH 7,2 og konsentreres tilbake til det opprinnelige volum av serum ved å bruke en Amicon centriprep 30 konsentrator (Amicon, Beverly, MA).

Humane sera: Individer innbefattet i dette studium var fra Trinidad, New York og the Great Lakes Naval Training Station. Deres alder lå i området fra 5 til 20 år. Blod ble skaffet ved venipunktur og serum samlet opp ved å bruke standard sterile teknikker. Alle sera var alders-, avstamnings- og helsebetingelsesavhengig som vist i Tabell I.

TABELL I

Populasjonsfordeling

Pasienter	Alder (år)	Antall pasienter
Normale barn - Trinidad	5	36
Normale barn - Trinidad	10	16
Normale barn - New York	5	32
Normale barn - New York	10	22
Giktfeber - Trinidad	7	19
Nyrebetennelse - Trinidad	4	18
Ukomplisert skarlagensfeber	18-20	6
Komplisert skarlagensfeber (ARF)	18-20	5

Baktericide assays: Etter å ha etablert at humane sera faktisk inneholder gruppe A karbohydratantistoff og at titrene av disse antistoff faktisk varierer hos individer, konsentrerte søker seg dernest om spørsmålet hvorvidt disse antistoff også ville fremme opsonofagocytose i et *in vitro* assaysystem. Det baktericide assay var i hovedsak det som ble benyttet av dr. Lancefield (15, 25, 26) for å undersøke humane sera med modifikasjonene som skissert ovenfor. Fig. 4 er illustratorisk for resultatene av de fagocytiske assays. Ved å bruke et inokulum av ni kolonidannende enheter av en serotype 6 gruppe A streptokokkisk stamme, var det en markert økning i antall kolonier i de roterte rør i nærvær av normalt kaninserum (panel A). Panel B viser en lett økning i de stasjonære rør hvori det humane serum ble brukt. I markert kontrast fjernet det roterte rør inneholdende det humane serum (panel C) fullstendig veksten av organismene (sammenlikne panel B og C).

For å være sikker på at den observerte opsonofagocytose av gruppe A streptokokker ikke var begrenset til én serotype, ble disse forsøk gjentatt ved å bruke tre andre gruppe A stammer av forskjellige M-protein-serotyper. Som observert i fig. 5, ble alle av disse andre tre stammer fagocytosert i nærvær av humane sera på en lignende måte som den observert for type 6 stammen. Prosentdelen avlivning varierte for 80-100% når de roterte mot stasjonære rør ble sammenliknet. Serotype 3, 14, 28 stammene er de identiske stammer som ble benyttet av dr. Lancefield i hennes fagocytiske assays (15, 25, 26).

Forhold mellom anti-CHO-titere og opsonofagocytose av humane sera: Ved å bruke det fagocytiske assay er det klart at humane sera var forskjellige i sin egenskap i å fremme fagocytose av gruppe A streptokokker. Generelt korrelerte de fagocytiske egenskaper av et gitt serum med titrene av anti gruppe A karbohydratantistoffene. Som observert i fig. 6, oppviste alle sera som hadde titere større enn 200.000

mer enn 80% avlivning, mens tre av de fire sera med titere mindre enn 200.000 ikke gjorde dette. Et serum med en CHO-titer på 40.000 fremmet fagocytose, men graden av avlivning var meget mindre enn den som observeres med de høytitrede anti-CHO-sera.

Studier av fagocytose av humane sera i heparinisert blod mot heparinfrie assays: På grunn av den kjente egenskap av heparin til å binde og inaktivere mange komponenter av komplement og å korrelere søkers fagocytiske assay med dem som tidligere er blitt brukt, ble de opsonofagocytiske egenskaper av normale humane sera beskrevet ovenfor, testet i fagocytiske assays i nærvær og fravær av heparin. Heparinisert humant blod ble fjernet med venipunktur, vasket i stor utstrekning i PBS som beskrevet ovenfor, og oppdelt i to porsjoner. Én porsjon ble resuspendert i det opprinnelige volum med RPMI og det opsoniske assay ble utført som beskrevet ovenfor. Den andre porsjon ble behandlet på samme måte, men med tilsetning av 5 enheter pr. ml heparin, hvorpå assayet ble utført på samme måte som den andre porsjon.

Resultatene angitt i fig. 6 viser at ved fravær av heparin var det gjennomsnittlig 94% fagocytose av gruppe A streptokokkene av det humane serum. Imidlertid, ved fravær av heparin, var det samme serum kun i stand til å oppnå et gjennomsnitt på 12% fagocytose av samme inokulum.

Absorpsjonsforsøk: I et forsøk på å bestemme hvilken del av den streptokokkiske karbohydratenhet som var ansvarlig for den baktericide aktivitet ble humane sera absorbert med N-acetylglukosaminkoblede "Sepharose"-kuler som beskrevet i metodedelen. Absorberte og ikke-absorberte sera ble så benyttet i det standard baktericide assay. Fig. 7 viser resultatene av disse forsøk. Det uabsorberte serum økte klart fagocytose av streptokokkene. I motsetning til dette, fjernet serumet absorbert med de N-acetylglukosaminkoblede

kuler de opsoniserende antistoff. Som en levedyktighets-kontroll økte ikke normalt kaninserum fagocytose. Disse forsøk indikerer at antistoffene rettet mot det ikke-reduserende terminale N-acetylglukosaminresiduum på gruppe A karbohydrat var meget viktige i opsonofagocytosen av gruppe A streptokokker i foreliggende baktericide assays. For å bekrefte disse resultater ble antistoffene fra utvalgte sera som var blitt absorbert til N-acetylglukosamin-affinitetskolonnen, eluert og benyttet i det baktericide assay. Som også vist i fig. 9, demonstrerte disse forsøk at N-acetylglukosaminspesifikke antistoff eluert fra affinitetskolonnen var i stand til delvis å restaurere den opsonofagocytiske baktericide aktivitet av serumet.

Ved å bruke metoder beregnet for å måle både utfellende og ikke-utfellende antistoff som er reaktive overfor gruppe A streptokokkisk karbohydrat, ble dette karbohydrat kovalent bundet til fosfatidyletanolamin og inkorporert i et liposom som var i stand til å binde til mikrotiterplater. Denne metode viser klart at hoveddelen av humane sera inneholder antistoff overfor gruppe A streptokokkisk polysakkarid.

Overraskende fant søker at barn fra forskjellige geografiske steder oppviste markerte forskjeller i sine titere overfor gruppe A karbohydrater. Mens mengden av streptokokkisk eksponering (både impetigo og faryngitis) er større Trinidad enn i New York, er streptokokkiske infeksjoner også vanlige i New York. I denne sammenheng merket Zimmerman et al. (23) lavere gruppe A karbohydratantistoff-titere hos pasienter som ble nøyaktig overvåket og behandlet for gruppe A streptokokkiske infeksjoner, sammenliknet med en ikke-overvåket gruppe. Videre er karbohydratantigener generelt T-celleuavhengige og det er således mulig at gjentatt eksponering til antigenet er nødvendig for å fremskaffe antistoffresponsen.

Studiene med sera fremskaffet fra pasienter under de akutte

og konvalesente trinn av skarlagensfeber antyder at antistofftitrene overfor gruppe A streptokokkisk karbohydrat allerede var tilstede ved starten av sykdommen, men økte faktisk to ganger i løpet av konvalesensen. Når ARF-sera etter akutt streptokokkisk infeksjon ble undersøkt, var titrene overfor gruppe A karbohydratet lavere ved presentasjonstiden i forhold igangsettingen av skarlagensfeber sammenliknet med ukomplisert skarlagensfeberserum, men økte fire ganger ved tiden for presentasjon med ARF, noe som antyder muligens en sterkere immunrespons overfor antigenet sammenliknet med de ukompliserte skarlagensfeberpasienter. Antistofftitrene overfor gruppe A karbohydrat var signifikant lavere enn dem som observeres hos skarlagensfeberpasienter som ikke utviklet ARF. Inhiberingsstudier med gruppe A og gruppe A variant karbohydrat viser klart at hoveddelen av disse antistoff er rettet mot det gruppe A spesifikke ikke-reduserende terminale N-acetylglukosaminresiduum på gruppekarbohydratet og ikke mot rhamnosestammen.

Spørsmålet om hvorvidt disse karbohydratantistoff fremmer opsonofagocytose av gruppe A streptokokker er blitt besvart bekreftende og graden av opsonisering korrelerte godt med nivået av anti-karbohydratantistoff. ELISA-titere på mindre enn 100.000 var generelt ineffektive mens hoveddelen av sera med titere større enn 200.000 fremmet fagocytose. En viktig observasjon var det faktum at denne opsonofagocytose ikke var begrenset til én serotype av gruppe A streptokokker, siden minst tre andre stammer av forskjellige serotyper også ble fagocytert. Viktigheten av rollen til N-acetylglukosaminreaktive antistoff i opsonisering ble bekreftet ved det faktum at absorpsjonen av disse antistoff fra humane sera fullstendig fjernet den baktericide aktivitet av seraene og at når disse antistoff ble eluert og tilsatt tilbake til de baktericide assays, ble avlivning restaurert.

Flere observasjoner angående kinetikken av det baktericide assay med humane sera er verdt å kommentere. For det første var kun små inokula av streptokokker i det baktericide assay effektive, mens større inokula ofte overveldet egenskapen hos humane sera i å opsonisere organismene. For det andre arbeidet den baktericide aktivitet i hovedsak med ufortynnede sera på en måte som lignet den observert av dr. Lancefield i hennes studier av humane sera og typespesifikke antistoff (15, 25, 26). I motsetning til dette, var animale sera immunisert med et gitt typespesifikt protein effektive selv ved fortynninger på 1:20 eller mer.

Eksempel 2

Sammenlikning av gruppe A karbohydrat reaktive antistofftitere hos normale barn: Søkers første undersøkelser var rettet mot å bestemme hvorvidt eller ikke normale barn utviklet antistoff overfor gruppe A streptokokkisk karbohydrat og om titeren av disse antistoff varierte med individets alder og det geografiske område hvor individet levde. Følgelig ble gruppe A karbohydratreaktive antistofftitere målt på sera fremskaffet fra normale 5- og 10-år gamle personer i Trinidad (høy streptokokkisk eksponering) og sammenliknet med alderstilsvarende barn i New York (lav streptokokkisk eksponering) ved å bruke ELISA-assayet beskrevet i materiale- og metodedelen. Fig. 2 illustrerer at ved alderen 5 år oppviste 94% av barna fra Trinidad antistofftitere på mindre enn 1:10.000 med en gjennomsnittlig antistofftiter på 1:158.472. Disse antistofftitere var ikke signifikant forskjellige fra sera fra barn undersøkt ved 10-års alder. I motsetning til dette oppviste 5-års gamle barn fra New York området signifikant lavere titere med et gjennomsnitt på 1:6.100, som økte til 1:25.500 ved 10-års alder. Titere hos barn i New York området i begge aldersgrupper var klart lavere enn de tilsvarende titere fra barn i Trinidad, som vist ved det faktum at 69% av New York barna hadde titere større enn 1:10.000.

For å bestemme hvorvidt immunresponsen overfor gruppe A karbohydratet enten var av IgG- eller IgM-klassen, ble det følgende forsøk utført. Utvalgte sera som oppviste høye titere overfor gruppe A karbohydratet ble passende fortynnet slik at hvert serum gav en avlesning på 1,0 ved 405 nm i ELISA-assayet. Hvert serum ble så undersøkt med enten affinitetsrenset humant angi-IgG eller anti-IgM alkalisk fosfatasekonjugat-sekundært antistoff. Som observert i Tabell II, var hoveddelen av antistoffene påvist mot det streptokokkiske karbohydrat av IgG-klassen og kun få reaksjoner ble sett i IgM-klassen.

TABELL II

ELISA-bestemmelser av IgG- og IgM-antistoff-titere overfor det streptokokkiske CHO-liposomkompleks.

Pasienter	Immunoglobulinklasse	
	IgG	IgM
1	1.200.000	6.000
2	640.000	2.000
3	480.000	2.000
4	360.000	2.000
5	320.000	1.000

Hvert serum var passende fortynnet for å gi en avlesning på 1,0 optisk tetthet ved 405 nm i ELIDA V avleseren.

Eksempel 3

Partiell strukturell bestemmelse av de gruppe A reaktive antistoff: Zimmerman et al. (23) hadde tidligere vist at enkelte humane sera inneholdt antistoff som var reaktive med gruppen karbohydrat som ble isolert fra gruppe A

variante streptokokker og således var rettet mot polyrhamnosestammekjeden av gruppe A polysakkaridmolekylet. For å bestemme mengden av disse rhamnosestammereaktive antistoff sammenliknet med antistoff som var reaktive mot den terminale N-acetylglukosamin gruppe A-determinant i individuelle sera, ble inhiberingsstudier av normale sera ved å bruke både gruppe A og gruppe A variant rensede karbohydrater utført. Som tidligere ble gruppe A karbohydratliposomkomplekset benyttet for å sensitivisere mikrotiterplatene. 100 µl av det passende serum ble blandet med varierende konsentrasjoner av karbohydrat og inkubert i én time i et 37°C vannbad. Blandingen ble så sentrifugert ved 10.000 rpm i fem minutter og supernatanten omsatt i ELISA-assayet. Kontroller innbefattet serumet blandet med fysiologisk saltvann. Som vist i fig. 3 var hoveddelen av det anti-gruppe A karbohydratreaktive antistoff i normale sera rettet mot gruppe A karbohydratenheten, dvs. N-acetylglukosamindeterminanten. En viss inhibering ble observert med et variant karbohydrat, men mengden som var nødvendig for å oppnå samme grad av inhibering, var 1.000-5.000 ganger større enn gruppe A karbohydratet. Siden gruppe A variant karbohydrat er forurenset med omtrent 4% N-acetylglukosamin (sammenliknet med 36% for gruppe A karbohydrat), kunne noe av den påviste inhibering være reaktiv ved det gjenværende N-acetylglukosamin. Dette viste at hoveddelen av immunoreaktiviteten av serumene var rettet mot N-acetylglukosaminenheten, noe som kan observeres ved tap av gruppe A antistoffreaktivitet i ELISA-assayet ved tilsetning av renset N-acetylglukosamin (Sigma). Dette kan bli direkte sammenliknet med mangelen på enhver inhibering ved tilsetning av det nært relaterte monosakkarid N-acetylgalaktosamin.

Eksempel 4

Sammenlikning av anti-gruppe A karbohydrat antistofftitere i ARF mot APSGN-pasienter: For å bestemme hvorvidt anti-gruppe A karbohydrat-antistofftitere var forskjellige i pasienter med veldokumenterte post-streptokokkiske

historier, ble serumprøver fremskaffet fra akutte reumatiske feberpasienter (ARF) sammenliknet med sera fremskaffet fra akutte post-streptokokkiske glomerulonefrittpasienter (APSGN). Alle sera ble fremskaffet fra veldokumenterte ARF- og AGN-pasienter, som var innlagt på sykehus i Trinidad og ble tatt ut før behandling i løpet av de akutte stadier av sykdommen. Tabell III oppsummerer resultatene og det kan observeres at det fantes en øket reaktivitet overfor gruppe A karbohydrat i seraene fra APSGN-pasientene (mindre enn 50%) sammenliknet med ARF-pasienter ved starten av sykdommen. Når dette sammenliknes med normale barn i Trinidad, var det også en signifikant forskjell i titere mellom disse pasienter og titrene fra normale barn i Trinidad (fig. 2).

TABELL III

Gjennomsnittlige titere av anti-karbohydrat-antistoff i sera fra pasienter med APSGN, ARF og ukomplisert skarlagensfeber.

Great Lake serier			
Pasienter	Antall	Gjennomsnittlig titere ved start	Gjennomsnittlig titere etter 4 uker
Skarlagens--feber	6	8.838	18.050
ARF	5	2.045	7.950

Trinidad-serier		
Pasienter	Antall	Gjennomsnittlige titere
ARF	19	202.300
APSGN	18	299.900

Eksempel 5

Bestemmelse av anti-gruppe A karbohydrat-antistofftitere hos pasienter med ukompliserte streptokokkiske infeksjoner mot ARF: Søkers samling av sera fra Great Lakes ble fremskaffet fra pasienter hvor alle hadde vært i kontakt med skarlagensfeber ved the Great Lakes Naval Training Station i 1946. En del av disse pasienter fortsatte å utvikle klassisk ARF. Følgelig ble sera samlet opp fra disse pasienter som følger: 1) under det akutte angrep av skarlagensfeber, 2) under konvalesentstadiet av skarlagensfeberen (4 uker senere) eller 3) under angrep av ARF (3-4 uker) etter den akutte streptokokkiske infeksjon. Tabell III viser at reaktivitet i et lite antall av tilfeller overfor gruppe A karbohydratet økt under konvalesentstadiene av sykdommen sammenliknet med angrepet (definert som tiden for presentasjon med skarlagensfeber). Disse økninger i antistofftitere overfor gruppe A karbohydratet ble observert i både den ukompliserte skarlagensfebergruppe så vel som hos de pasienter som utviklet ARF fire uker etter angrep av skarlagensfeber. Selv om antallet studerte tilfeller var lite, er det av interesse at titrene overfor gruppe A karbohydratet var lavere i ARF-pasienter både ved angrepet av skarlagensfeber og ved angrepet av reumatisk feber fire uker senere, sammenliknet med tilfellene med ukomplisert skarlagensfeber.

Eksempel 6

Gruppe A polysakkaridproteinkonjugater

A. $NaBH_4$-reduksjon av de reduserende ender av gruppe A polysakkarid

Renset gruppe A polysakkarid (GASP-) (100 mg) ble oppløst i 10 ml vann og pH av oppløsningen ble justert til 10 med 0,5 N NaOH. Fast $NaBH_4$ (100 mg) ble tilsatt til oppløsningen, og etter inkubering av reaksjonsblandingen ved romtemperatur i to timer, ble overskudd av borhydrid ødelagt med 1 M AcOH. Oppløsningen ble dialysert mot vann i kulde og frysetørket, noe som gav 91 mg redusert GASP.

B.Innføring av en terminal aldehyd i gruppe A polysakkaridet ved kontrollert perjodatoksidering

Det reduserte GASP (90 mg) ble oppløst i 4,5 ml vann og så kombinert med 4,5 ml 50 mM $NaIO_4$. Etter 30 minutter ved romtemperatur ble overskudd av perjodat ødelagt ved tilsetning av 1 ml etylenglykol og oppløsningen ble dialysert mot vann i kulde og frysetørket, noe som gav 73 mg oksidert GASP.

C.GASP-TT- og GASP-HSA-konjugater

Det oksiderte GASP ble bundet til enten monomerisk tetanustoksoid (TT) (SSI, København, Danmark) eller humant serumalbumin (HSA) (Sigma) ved reduktiv aminering av $NaBH_3CN$.

Oksidert GASP (40 mg) og enten monomerisk TT (20 mg) eller HSA (20 mg) ble oppløst i 0,2 M fosfatbuffer, pH 7,4 (0,7 ml). Etter tilsetningen av $NaBH_3CN$ (20 mg), ble reaksjonsblandingen inkubert ved 37°C i fire dager. Forløpet av konjugeringen ble overvåket med HPLC av små porsjoner av reaksjonsblandingen analysert på Superose-12 (Pharmacia). Konjugatene ble renset med kromatografi på en kolonne av Superdex G-200 (Pharmacia) ved å bruke PBS som et elueringsmiddel. Fraksjoner som eluerte fra kolonnen ble overvåket med et Waters R403 differensialt refraktometer og med UV-spektroskopi ved 280 nm. Fraksjonene som inneholdt gruppe A polysakkaridkonjugatene, ble slått sammen, dialysert og frysetørket. Proteininnholdet av konjugatene ble beregnet ved metoden til Bradford (Bradford, M.M., 1976. Anal. Biochem. 72:248-254) med humant serumalbumin som en standard. Karbohydratinnholdet ble målt ved metoden til Dubois et al. (31) med renset GASP som en standard. TT-konjugatet inneholdt 39% (w/w) karbohydrat og 61% (w/w) protein. Ved å anta en gjennomsnittlig molekylvekt på 10.000 kilodalton for polysakkaridet (som bestemt ved HPLC på Superose-12 ved å bruke dekstraner som molekylvektsmarkører og som målt ved laserspredning som molekylvekts-

markører) og en molekylvekt på 150.000 kilodalton for det monomere TT hadde GASP-TT-konjugatet et molart forhold mellom polysakkarid og TT på henholdsvis 9-10:1.

Eksempel 7

Immuniseringer og immunoassays

A. Immuniseringsprosedyrer

En gruppe på fem hvite New Zealand hunkaniner (7-8 uker gamle) ble vaksinert subkutant ved to områder på ryggen (tre ganger med tre ukers intervaller) med 10 mcg av enten ukoblet nativt gruppe A polysakkarid eller som TT-konjugat i et totalt volum på 0,5 ml. Vaksinen ble gitt enten uadsorbert eller adsorbert på aluminiumhydroksid (Alhydrogel; Superfos, Danmark) eller stearyltyrosin (ST), begge ved en konsentrasjon på 1,0 mg i alun eller ST/ml fysiologisk saltvann. Thimerosal ble tilsatt til vaksinene ved en endelig konsentrasjon på 1/10.000. En gruppe på fem kaniner mottok konjugatvaksinen emulgert i fullstendig Freunds adjuvant (Sigma Laboratories) for første injeksjon og i ufullstendig Freund for de følgende forsterknings-injeksjoner. Serum ble samlet opp fra hvert dyr på dag 0, 21, 42 og 52.

B. ELISA

Mikrotiterplater (Nunc Polysorb ELISA-plater) ble belagt med 100 ng GASP-HSA-konjugat, fortynnet til 1,0 mcg/ml i PBS og plater ble inkubert ved 37°C i én time. Etter belegging ble de vasket med PBS inneholdende 0,05% Tween 20 (PBS-T) og blokkert med 0,5% BSA i PBS i én time ved romtemperatur. Brønnene ble så fylt med 100 µl serielle to-gangers fortynninger i PBS-T av kaninantiserum og platene ble inkubert i én time ved romtemperatur. Etter vask med PBS-T ble platene inkubert i 30 minutter ved romtemperatur med 100 µl av peroksidasemerket geite-anti-kanin-IgG (H&L) (Kirkegaard & Perry Laboratories) og så vasket fem ganger med PBS-T. Til slutt ble 50 µl TMB-peroksidasesubstrat (Kierkegaard & Perry Laboratories) tilsatt til hver brønn,

og etter inkubering av platene i ti minutter ved romtemperatur ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av 50 µl 1 M H_3PO_4. Platene ble avlest ved 450 nm med en Molecular Devices E_{maks} mikroplateavleser ved å bruke 650 nm som en referansebølgelengde (se Tabell IV).

Selv om søker tidligere har beskrevet et antall utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse, er det tydelig at de grunnleggende konstruksjoner kan bli endret for å gi andre utførelsesformer som benytter metodene ifølge foreliggende oppfinnelse. Følgelig vil det bli forstått at omfanget av foreliggende oppfinnelse er definert av kravene som følger i stedet for av de spesielle utførelsesformer som er blitt presentert tidligere som eksempler.

TABELL IV

GAS-polysakkaridspesifikke antistofftitere av kaniner vaksinert med GAS-polysakkarid eller GAS-polysakkarid-tetanustoksoidkonjugat i forskjellige formuleringer.

Vaksine	Antistofftiter i ELISA ved dag*			
	0	21	42	52
GASP (fysiologisk saltvann)	100	100	100	100
GASP-TT (fysiologisk saltvann)	100	100	4.130 (900-12.000	7.600 (2.600-13.500)
GASP-TT ($Al(OH)_3$)	100	10.600 (4.800-21.000	81.800 (51.000-129.000)	141.800 (76.700-287.500)
GASP-TT (ST)	100	6.200 (2.300-12.700)	21.100 (8.300-31.000)	59.600 (21.300-95.500)
GASP-TT (CFA, IFA)	100	188.000 (2.200-428.500)	1.664.000 (1.000.000-2.299.000)	1.760.000 (1.100.000-2.370.000)

*Geometrisk gjennomsnittlig titer (område) med en verdi på 100 som indikerer en antistofftiter på ≤100. Verdier er gjennomsnitt av doble bestemmelser. Kaniner (grupper på fem NZW) ble injisert sc med 100 mcg polysakkarid (nativt eller konjugert) ved dag 0, 21 og 42.

REFERANSER

1. Powers, G.F. og P.L. Boisvert. (1944). Age as a factor in streptococcosis. J. Pediat. 25:481.

2. Paul, J.R: (1957). The Epidemiology of Rheumatic Fever. Anonymous, editor. American Heart Association, New York, N.Y.. 19-21.

3. Zingher, A. (1924). The Dick test in normal persons and in acute and convalescent cases of scarlet fever. *J. Amer. Med. Ass.* 83:432.

4. Goldschneider, I., E.C. Gotschlich, og M.S. Artenstein, (1969). Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J. Exp. Med.* 129: 1307-1326.

5. Fothergill, L.D. og J. Wright, (1933). Influenzal meningitis: The relation of age incidence to the bactericidal power of blood against the causal organism. *J. Immunol.* 24:273.

6. Schick, B. (1942). Brennenmenn's Practice of Pediatrics, Anonymous, editor. W.F. Prior Co. Inc., Hagarstown, MD.

7. Aycock, W.L. og S.D. Kramer, (1930). Immunity to poliomyelitis in normal individuals in urban and rural communities as indicated by neutralization text. J. Prev. Med. 4:189.

8. Stokes, J., Jr. (1959). Mumps. In Textbook of Pediatrics. W.E. Nelson, editor. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA. 505.

9. Dochez, A.R., O.T. Avery, og R.C. Lancefield, (1919). Studies on the biology of Streptococcus. I. Antigenic relationship between strains of streptococcus hemolyticus. *J. Exp. Med.* 30:179-213.

10. Lancefield, R.C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57:571-595.

11. Lancefield, R.C. (1962). Current knowledge of type specific M antigens of group A Streptococci. *J. Immunol.* 89:307-313.

12. McCarty, M. (1956). Variation in the group specific carbohydrate of group A Streptococci. II. Studies on the chemical basis for serological specificity of the carbohydrate. *J. Exp. Med.* 104:629-643.

13. McCarty, M. (1971). The streptococcal cell wall. In The Harvey Lectures, H. Harris, D.E. Koshland, M. McCarty, A.B. Pardee, G. Popjak, R.R. Porter, J.E. Seegmiller, og E.R. Stadtman, editors. Academic Press, New York. 73-96.

14. Lancefield, R.C. og E.W. Todd, (1928). Antigenic differences between matt hemolytic streptococci and their glossy variants. *J. Exp. Med.* 48:769-790.

15. Lancefield, R.C. (1959). Persistence of type specific antibodies in man following infection with group A Streptococci. *J. Exp. Med.* 110:271-292.

16. Fischetti, V.A., (1989). Streptococcal M Protein: Molecular design and biological behaviour. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:285-314.

17. Seastone, C.V. (1939). The virulence of group C streptococci of animal origin. *J. Exp. Med.* 70:361-378.

18. Fillit, H.M., M. McCarty, og M.S. Blake. (1986). The induction of antibodies to hyaluronic acid by immunization of rabbits with encapsulated streptococci. *J. Exp. Med.*

164:762-776.

19. Faarber, P., P.J.A. Capel, G.P.M. Rigke, G. Vierminden, L.B.A. Van de Putte, og RA.P. Koene. (1984). Cross reactivity of acute DNA antibodies with proteoglycans. Clin. Exp. Immunol. 55:502-508.

20. Rotta, J. og B. Bednar, (1969). Biological properties of cell wall mucopeptides of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 130:31-47.

21. Schmidt, W.C. og D.J. Moore, (1965). The determination of antibody to group A Streptococcal polysaccharide in human sera by agglutination. *J. Exp. Med.* 121:793-806.

22. Karakawa, W.W., C.K. Osterland, og R.M. Krause. (1965). Detection of group specific antibodies in human sera. *J. Exp. Med.* 122:195-210.

23. Zimmerman, R.A., A.H. Auernheimer, og A. Taranta, (1971). Precipitating antibodies to group A polysaccharide in humans. *J. Immunol.* 107:832-841.

24. Dudding, B.A. og E.M. Ayoub. (1968). Persistence of group A antibody in patients with rheumatic valvular disease. *J. Exp. Med.* 128:1081-1092.

25. Lancefield, R.C. (1957). Differentiation of group A Streptococci with a common R antigen into three serological types, with special reference to the bactericidal test. J. Exp. Med. 106:525-544.

26. Lancefield, R.C. (1958). Occurence of R antigen specific for group A type 3 Streptococci. *J. Exp. Med.* 108:329-341.

27. Gotschlich, E.C., R. Austrian, B. Cvjetanovic, og J.B.

Robbins, (1978). Prospects for the prevention of bacterial meningitis with polysaccharide vaccines. *Bull. Wld Hlth. Org.* 56:509-518.

28. McCarty, M. (1958). Further studies on the chemical basis for serological specificity of group A Streptococcal carbohydrate. *J. Exp. Med.* 108:311-328.

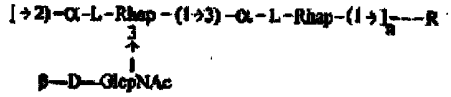
29. Joiner, K.A., K.A. Warren, E.J. Brown, J.L. Swanson, og M.M. Frank, (1983). Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement mediated killing: IV C5b-9 forms high molecular wight complexes with bacterial outer membrane constituents on serum-resistant, but not on serum-sensitive *Neisseria gonorrhoea*. *J. Immunol.* 131:1443-1451.

30. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers og F. Smith, (1956). Colorimetric Method For the Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.* 28:350-356.

31. Fillit. Howard M., Milan Blake, Christa MacDonald og Maclyn McCarty, (1988). Immunogenicity og Liposome Bound Hyaluronate in Mice, J. Exp. Med. 168:971-982.

P a t e n t k r a v

1. Immunogen sammensetning,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en immunogen mengde av et gruppe A polysakkarid av formel (I)



hvor R er en terminal reduserende L-rhamnose eller D-GlcpNAc hvor n er et tall fra 3 til omkring 30, samt et bæremateriale, hvor nevnte sammensetning gir beskyttelse i pattedyr mot infeksjon av gruppe A streptokokke bakterier.

2. Immunogen sammensetning ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at gruppe A polysakkaridet har en molekylvekt på omkring 10 Kd.

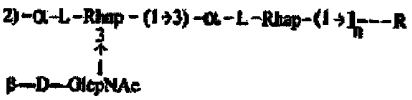
3. Immunogen sammensetning ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at bæremiddelet er valgt fra gruppen bestående av fysiologisk saltvann, Ringers oppløsning og fosfatbufret fysiologisk saltvann.

4. Immunogen sammensetning ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den immunogene sammensetning ytterligere omfatter en adjuvant.

5. Immunogen sammensetning ifølge krav 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at adjuvanten er valgt fra gruppen bestående av aluminiumhydrid, aluminiumfosfat, monofosforyl-lipid A, QS21 og stearyltyrosin.

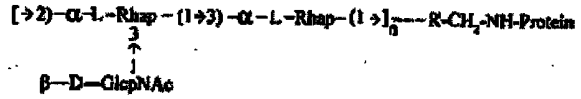
6. Immunogent polysakkarid-protein-konjugatmolekyl som induserer produksjon i pattedyr av opsoniske antistoffer som er baktericide ved nærvær av komplement og fagocytter,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte konjugatmolekyl omfatter et gruppe A polysakkarid av formel

(I)



hvor R er en terminal reduserende L-rhamnose eller D-GlcpNAc og n er et tall fra 3 til omkring 30,og hvor polysakkaridet er kovalent bundet til protein.

7. Immunogent polysakkarid-protein-konjugatmolekyl ifølge krav 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polysakkaridet er bundet til protein via en sekundær aminbinding for a danne et konjugat av formel (II)



hvor R' er produktet av reduksjon og oksydasjon av det terminale reduserende sukker som ikke er representert i den $-CH_2-NH$-protein sekundære aminbinding av formel II.

8. Immunogent polysakkarid-protein-konjugatmoleyl ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet er ethvert nativt eller rekombinant bakterielt protein.

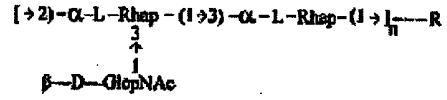
9. Immunogent polysakkarid-protein-konjugatmolekyl ifølge krav 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet er valgt fra gruppen bestående av tetanustoksoid, koleratoksin, difteritoksoid eller CRM_{197}.

10. Immunogent polysakkarid-protein-konjugatmolekyl ifølge krav 9,
k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet er tetanustoksoid.

11. Immunogent polysakkarid-protein-konjugatmoleyl ifølge krav 10,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polysakkaridet har minst en molekylvekt på omkring 10 kD.

12. Immunogent polysakkarid-protein-konjugatmoleyl ifølge krav 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet av konjugatet omfatter en T-celle-epitop og har minst en lengde på omkring 10 aminosyrer.

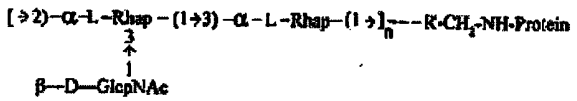
13. Vaksine for å fremskaffe beskyttelse mot infeksjon av gruppe A streptokokker,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en immunogen mengde av gruppe A polysakkarid av formel (I)



hvor R er en terminal reduserende L-rhamnose eller D-GlcpNAc hvor n er et tall fra 3 til omkring 30, samt et bæremateriale, hvor nevnte sammensetning gir beskyttelse i pattedyr mot infeksjon av gruppe A streptokokke bakterier.

14. Vaksine ifølge krav 13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polysakkaridet er kovalent bundet til protein.

15. Vaksine ifølge krav 13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polysakkaridet er bundet til protein via en sekundær aminbinding for å danne et konjugat av formel (II)



hvor R' er produktet av reduksjon og oksydasjon av det

terminale reduserende sukker som ikke er representert i den sekundære $-CH_2-NH-$protein aminbinding av formel II.

16. Vaksine ifølge krav 15,
k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet er ethvert nativt eller rekombinant bakterielt protein.

17. Vaksine ifølge krav 16,
k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet er valgt fra gruppen bestående av tetanustoksoid, koleratoksin, difteritoksoid og CRM_{197}.

18. Vaksine ifølge krav 17,
k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet av polysakkarid-protein-konjugatet er tetanustoksoid.

19. Vaksine ifølge krav 18,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polysakkaridet i konjugatet har en molekylvekt på omkring 10 Kd.

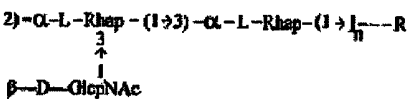
20. Vaksine ifølge krav 13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polysakkaridet er kovalent bundet til liposomer.

21. Vaksine ifølge krav 20,
k a r a k t e r i s e r t v e d at vaksinen ytterligere omfatter native eller rekombinante bakterielle proteiner innesluttet i liposomene.

22. Vaksine ifølge krav 21
k a r a k t e r i s e r t v e d at det bakterielle protein er tetanustoksoid.

23. Vaksine ifølge krav 20,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polysakkarid-liposom-sammensetningen av vaksinen har en molekylvekt på omkring 10 kD.

24. Immunogent polysakkarid-liposom-konjugatmolekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et gruppe A polysakkarid av formel (I)



hvor R er en terminal reduserende L-rhamnose eller D-GlcpNAc hvor n er et tall fra 3 til omkring 30, kovalent bundet til liposomer for å danne konjugatmolekylene.

25. Immunogent polysakkarid-liposom-konjugatmolekyl ifølge krav 24,
k a r a k t e r i s e r t v e d at liposomene er dannet av kationiske lipider.

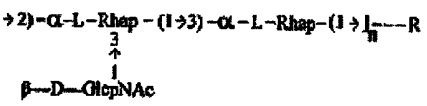
26. Immunogent polysakkarid-liposom-konjugatmolekyl ifølge krav 25,
k a r a k t e r i s e r t v e d at liposomene omfatter fosfatidyletanolamin.

27. Immunogent polysakkarid-liposom-konjugatmolekyl ifølge krav 26,
k a r a k t e r i s e r t v e d at gruppe A polysakkaridet har en molekylvekt på omkring 10 kD.

28. Immunogent polysakkarid-liposom-konjugatmolekyl ifølge krav 24,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polysakkarid-liposom-konjugatet ytterligere omfatter protein innesluttet i nevnte liposom.

29. Immunogent preparat egnet til å gi passiv immunitet overfor gruppe A streptokokke bakterier,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte immunogene preparat omfatter opsone antistoff som er baktericide ved nærvær av komplement og fagocytter mot gruppe A

streptokokke bakterier og hvor nevnte antistoff er a) fremskaffet fra et pattedyr og b) binder til polysakkarid av gruppe A streptokokkbakterier av formel (I)



hvor R er en terminal reduserende L-rhamnose eller D-GlcpNAc hvor n er et tall fra 3 til omkring 30.

30. Immunogent preparat ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at de bakterielle antistoff er tilstede i serum, en gammaglobulinfraksjon eller et renset antistoffpreparat.

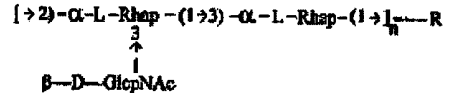
31. Immunogent preparat ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffene blir dannet ved å immunisere et individ med enhver immunogen sammensetning, immunogent polysakkarid-protein-konjugatmolekyl, vaksine eller immunogent polysakkarid-liposom konjugatmoleyl ifølge ethvert av kravene 1, 6, 13 og 24.

32. Immunogent preparat ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffene er fremskaffet fra serum fra et individ.

33. Immunogent preparat ifølge krav 32, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffene er isolert fra humant serum som har en titer større enn omkring 40.000.

34. Immunogent preparat ifølge krav 33, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffene er isolert fra humant serum som har en titer større enn omkring 200.000.

35. Fremgangsmåte ved kovalent å tilknytte gruppe A polysakkarid av formel (I)



hvor R er en terminal reduserende L-rhamnose eller D-GlcpNAc hvor n er et tall for repeterende enheter fra 3 til omkring 30, til et liposom
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

a) å danne et liposom av fosfatidyletanolamin;

b) aktivere gruppe A polysakkarid ved å redusere det terminale sukker og oksidere det reduserte sukker for å danne et terminalt aldehyd;

c) kombinere det aktiverte gruppe A polysakkarid og liposomene og kovalent binde gruppe A polysakkaridet til liposomet ved reduktiv aminering for å danne et gruppe A polysakkarid-liposom-konjugat; og

d) gjenvinne gruppe A polysakkarid-liposom-konjugatet.

36. Anvendelse av immunogen sammensetning ifølge krav 1 til 5, hvor den immunogene sammensetning anvendes til fremstilling av et medikament til beskyttelse i pattedyr mot infeksjon av gruppe A *Streptococcus*-bakterier.

37. Anvendelse av immunogen sammensetning ifølge krav 36, hvor nevnte immunogene sammensetning er egnet til administrasjon til et individ i en dosemengde på omkring 0,01 µg til omkring 10 µg per kilo kroppsvekt.

38. Anvendelse av immunogent polysakkarid-protein-konjugatmolekyl ifølge ethvert av kravene 6 til 12 ved fremstilling av et medikament for å indusere i pattedyr produksjonen av opsoniske antistoff som er baktericide ved nærvær av komplement og fagocytter.

39. Anvendelse av immunogent polysakkarid-protein-konjugatmolekyl ifølge krav 38, hvor nevnte immunogene polysakkarid-protein-konjugat er egnet til administrasjon til et individ i en doseringsmengde på omkring 0,01 µg til omkring 10 µg per kilo kroppsvekt.

40. Anvendelse av vaksine ifølge ethvert av kravene 13 til 19 ved fremstilling av et medikament til beskyttelse mot infeksjon av gruppe A streptokokker.

41. Anvendelse av vaksine ifølge krav 40, hvor nevnte vaksine er egnet til å bli administrert til et individ i en doseringsmengde på omkring 0,01 µg til 10 µg per kilo kroppsvekt.

42. Anvendelse av immunogent polysakkarid-liposom-konjugatmolekyl ifølge ethvert av kravene 24 til 28 ved fremstilling av et medikament til beskyttelse mot infeksjon av gruppe A streptokokkbakterier.

43. Anvendelse av immunogent polysakkarid-liposom-konjugatkolekyl ifølge krav 42, hvor nevnte immunogene polysakkarid-liposom-konjugat er egnet til å bli administrert til et individ i en doseringsmengde på omkring 0,01 µg til omkring 10 µg per kilo kroppsvekt.

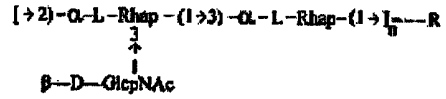
44. Anvendelse av vaksine ifølge ethvert av kravene 20 til 23 ved femstilling av et medikament som gir beskyttelse mot infeksjon av gruppe A streptokokker.

45. Anvendelse av vaksine ifølge krav 44, hvor nevnte vaksine er egnet til å bli administrert i en doseringsmengde på omkring 0,01 µg til omkring 10 µg per kilo kroppsvekt.

46. Farmasøytisk sammensetning,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en

immunogen sammensetning ifølge krav 29 samt et farmasøytisk akseptabelt bæremateriale.

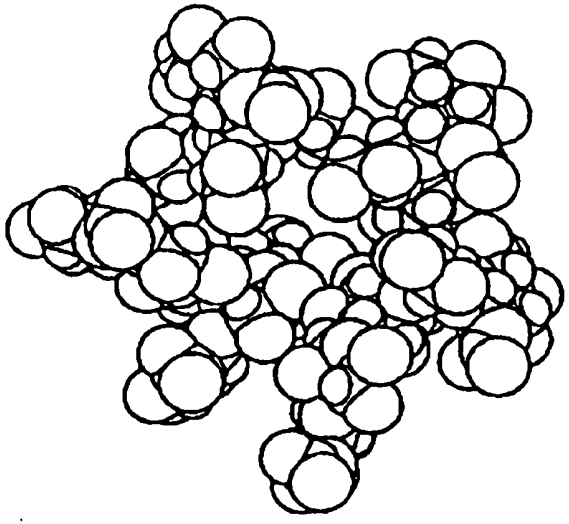
47. Anvendelse av antistoff som medvirker til den baktericide respons ved nærvær av komplement og fagocytter, og som kan fremskaffes fra et pattedyr og som binder polysakkarid fra gruppe A streptokokkbakterier av formel (I)



hvor R er en terminal reduserende L-rhamnose eller D-GlcpNAc, og n er et tall fra 3 til 30, for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling eller forebygning av infeksjon av gruppe A streptokokkbakterier.

FIG. 1

FIG. 1A

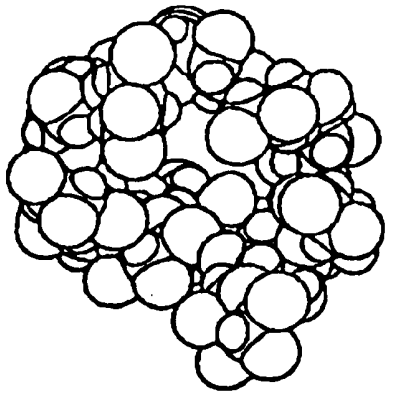


[Rha(α1.3)Rha(α1.2)Rha(α1.3)Rha(α1.2)Rha]

β1.3 β1.3 β1.3

GlcNac GlcNac GlcNac

FIG. 1B



(Rha(α1.3)Rha(α1.2)Rha(α1.3)Rha(α1.2)Rha]

FIG. 2

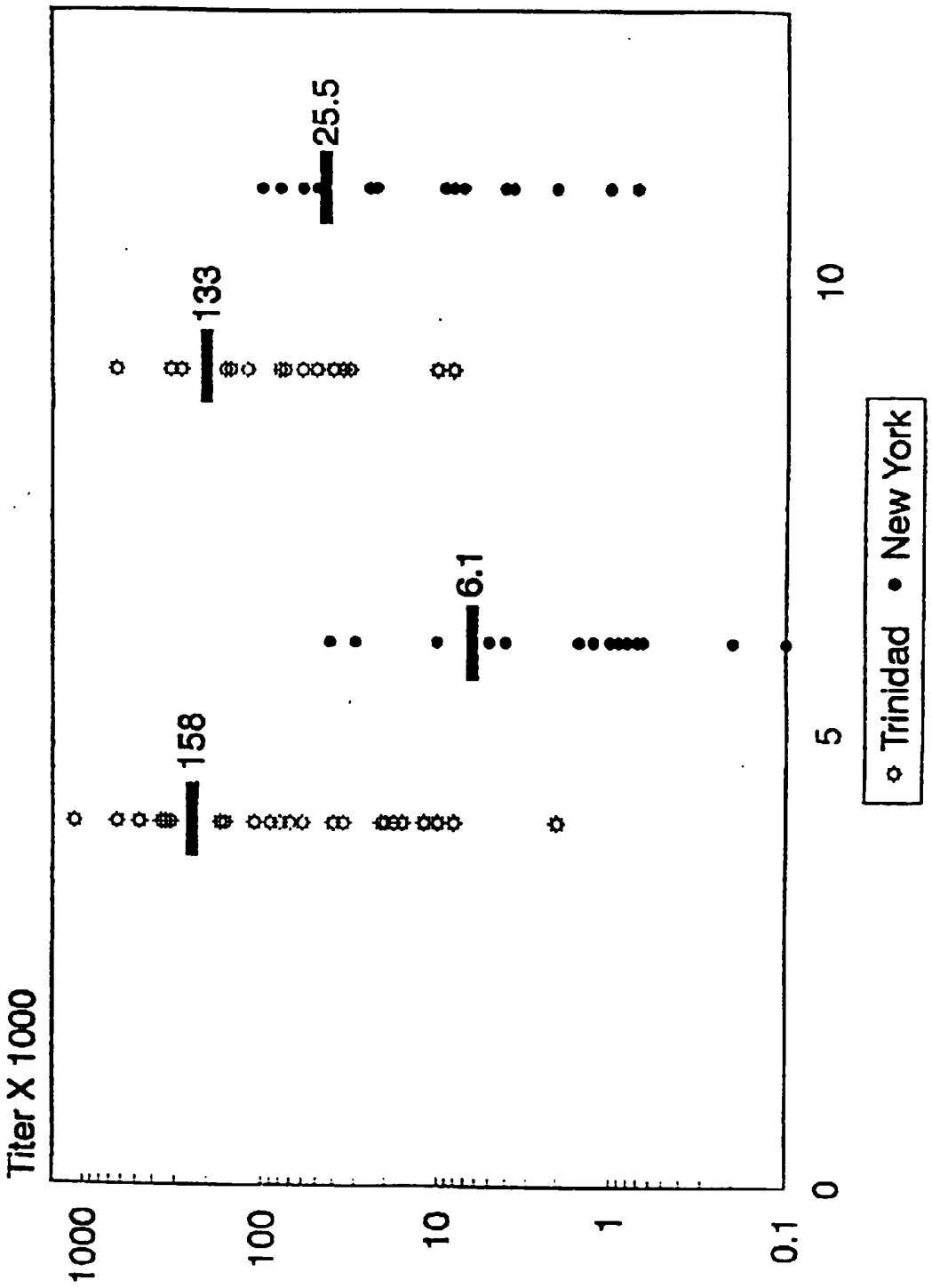

Titer X 1000
1000
100
10
1
0.1
0
5
10
158
133
6.1
25.5
Trinidad
New York

FIG. 3

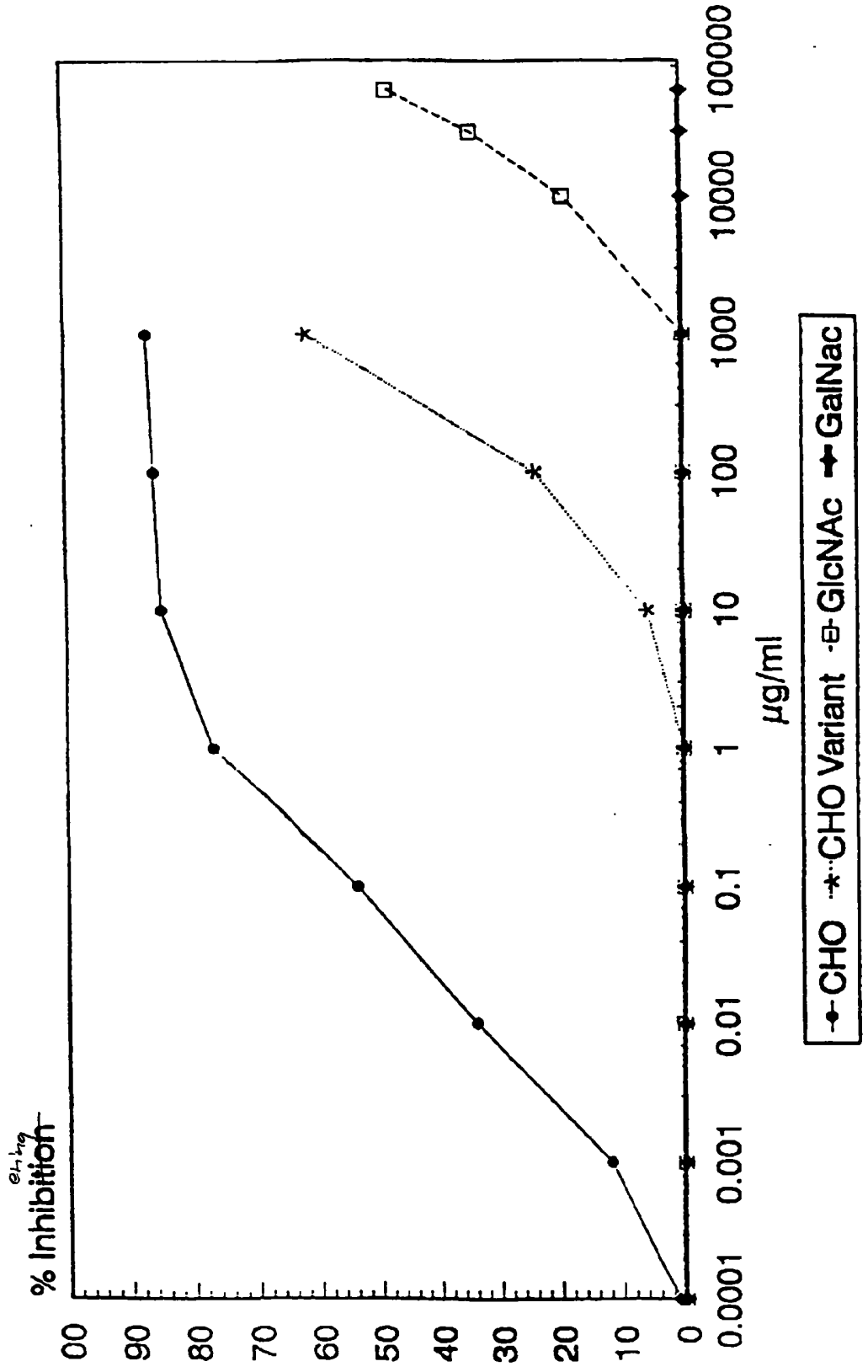

% Inhibition
00
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
µg/ml
CHO
CHO Variant
GlcNAc
GalNac

FIG. 4

FIG. 4A

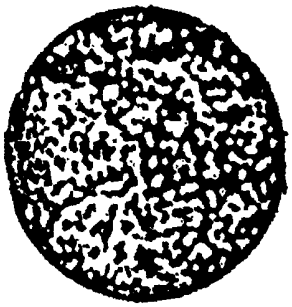


FIG. 4B

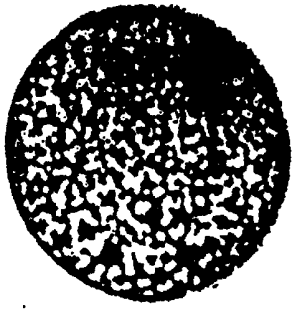


FIG. 4C

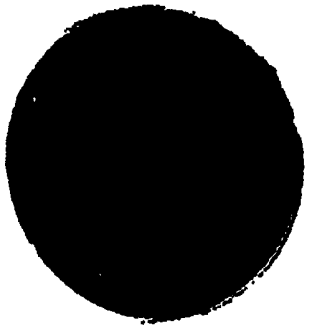


FIG. 5

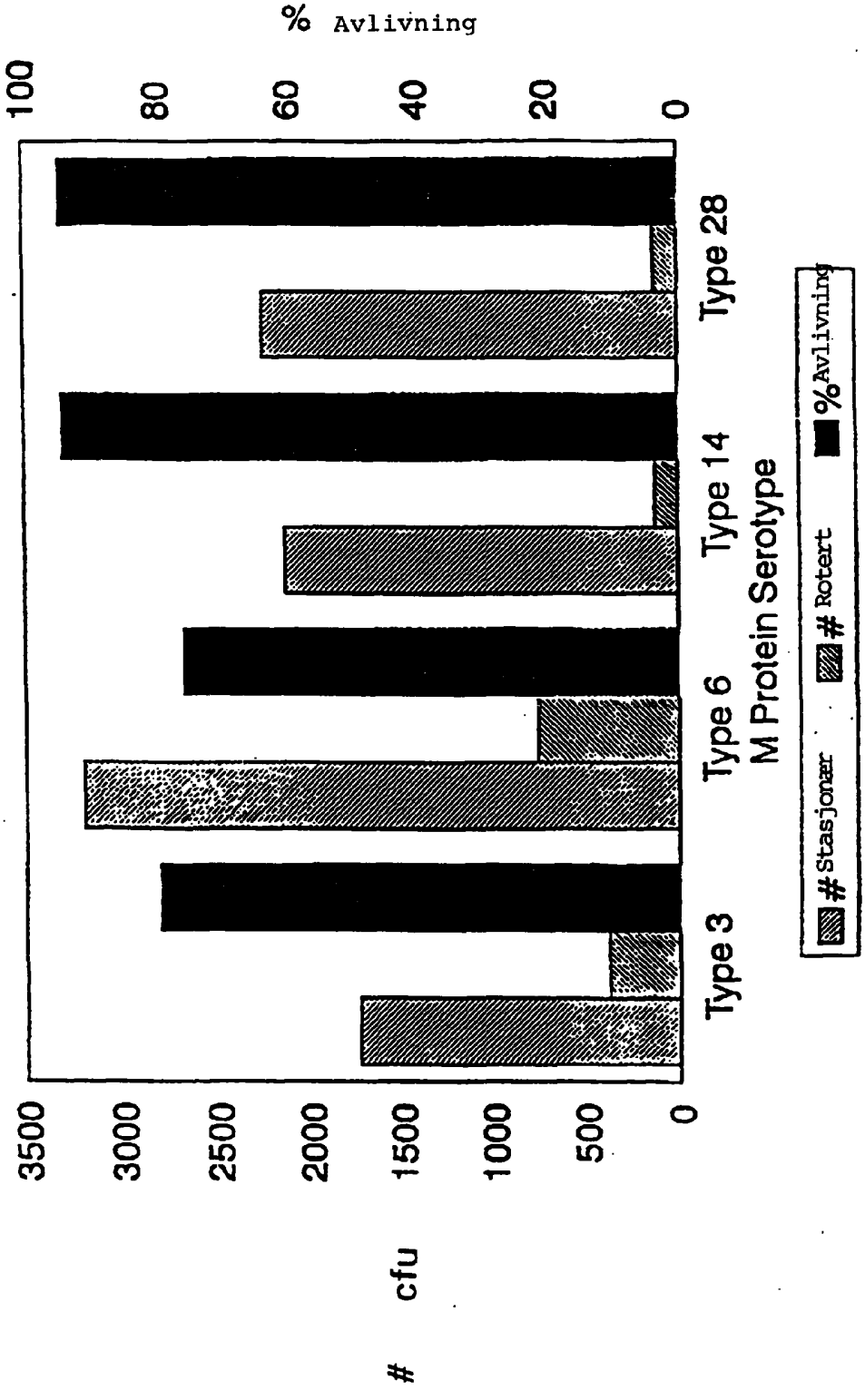

% Avlivning
100
80
60
40
20
0
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
cfu
Type 3
Type 6
Type 14
Type 28
M Protein Serotype
#Stasjonær
#Rotert
%Avlivning

FIG. 6

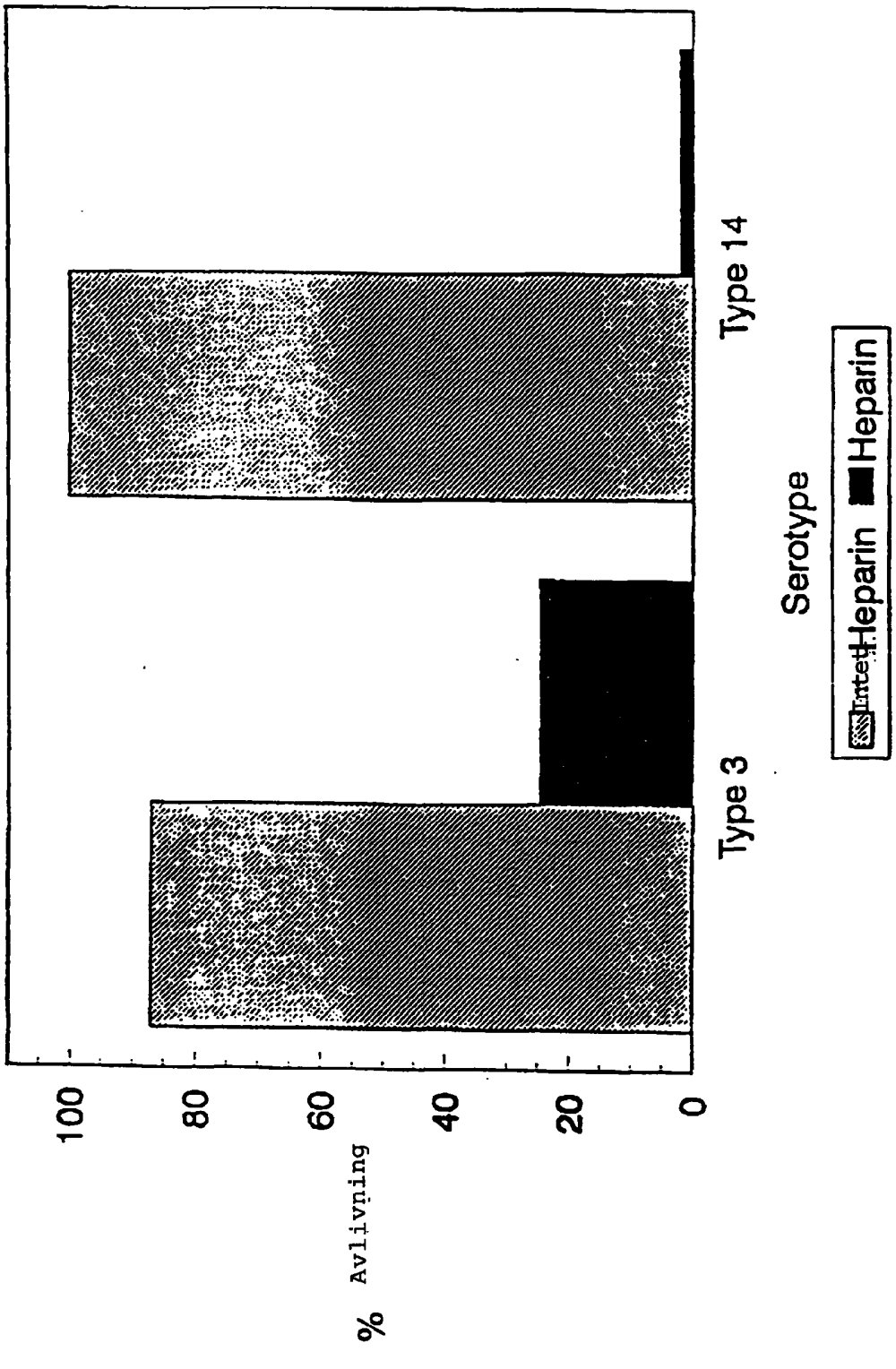

100
80
60
40
20
0
% Avlivning
Type 3
Type 14
Serotype
Heparin
Heparin

FIG. 7

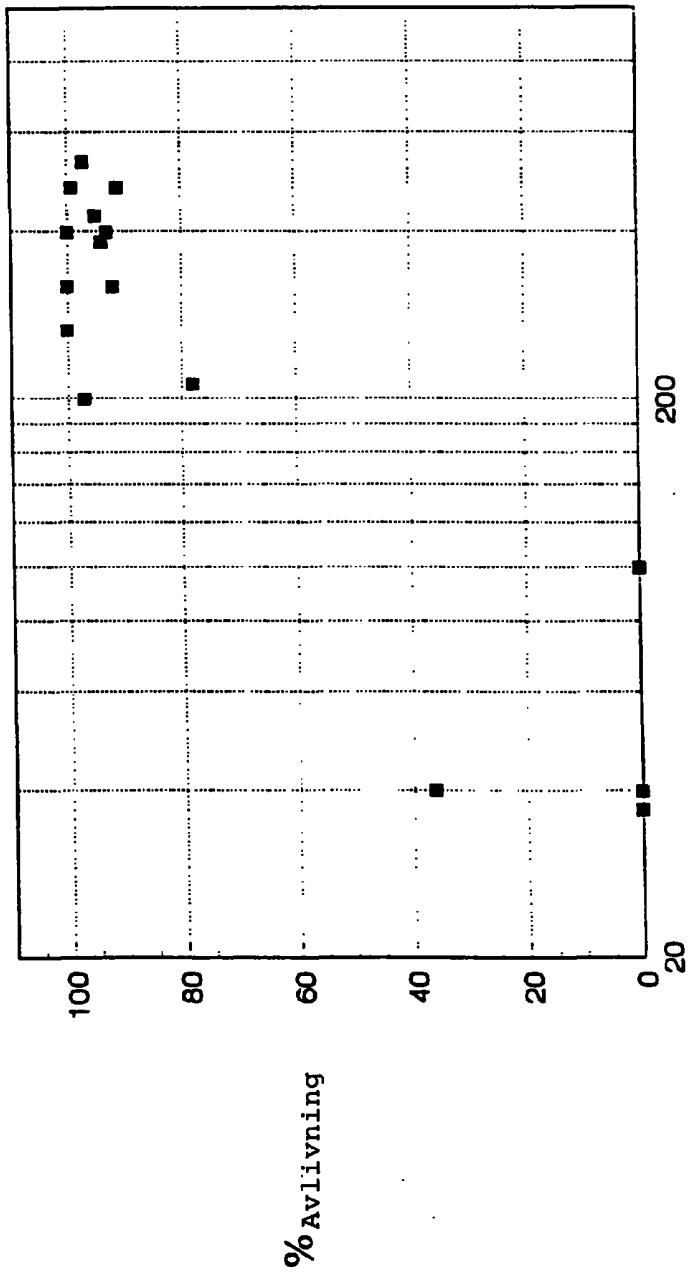


FIG. 8

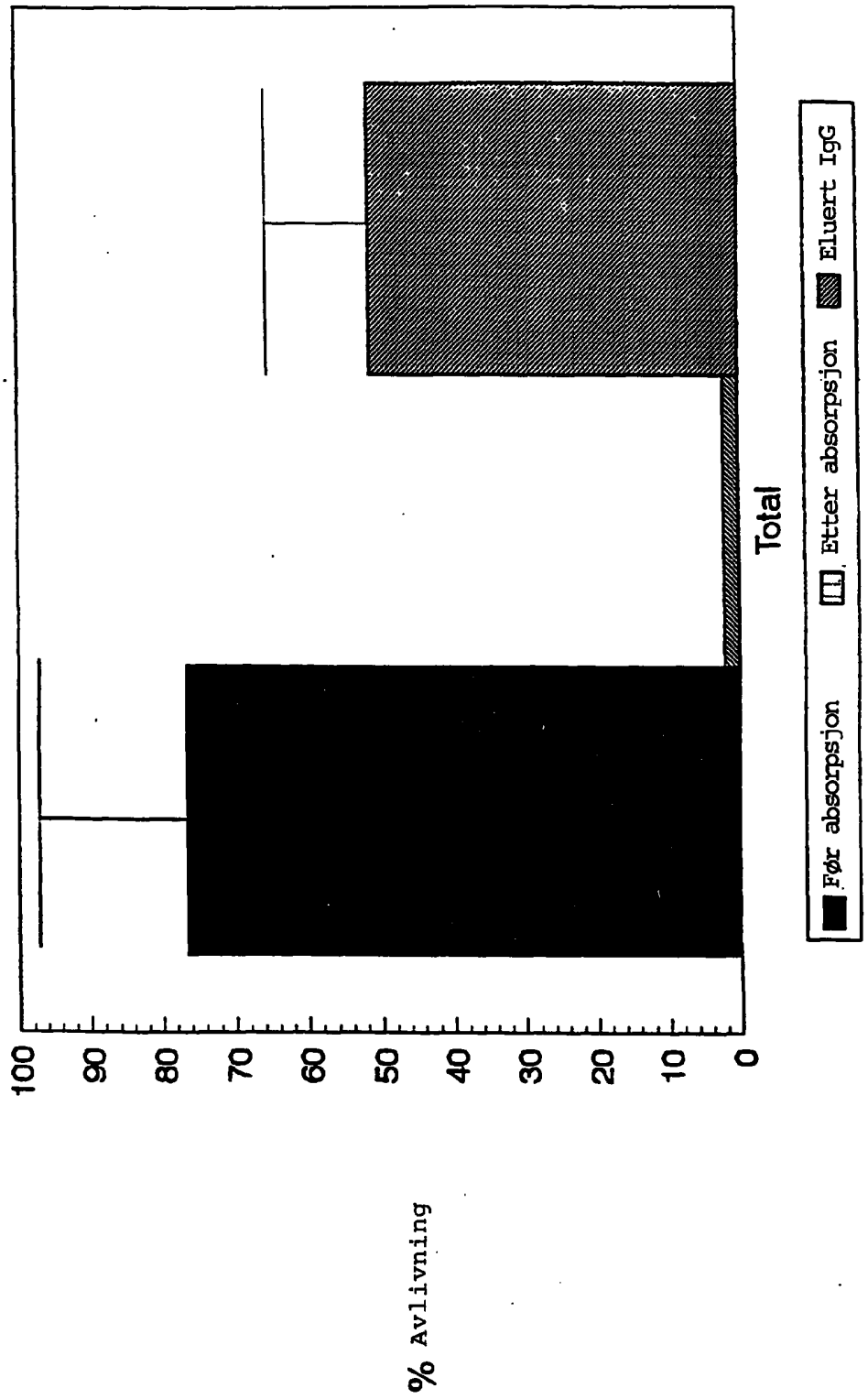
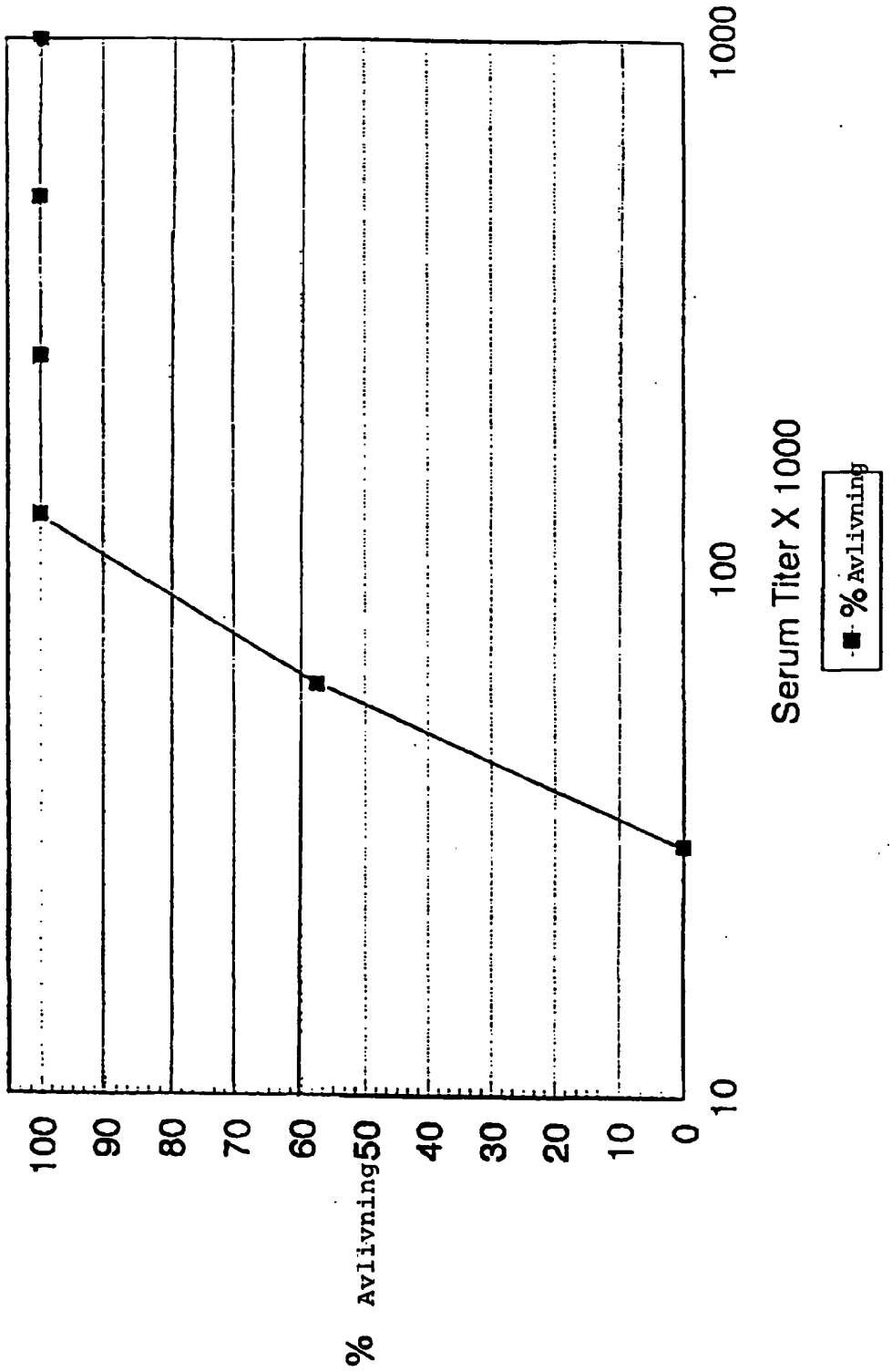

% Avlivning
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Total
Før absorpsjon
Etter absorpsjon
Eluert IgG

FIG. 9


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Avlivning
10
100
1000
Serum Titer X 1000
% Avlivning