

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18.08.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.08.1998 18.08.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/097120 1999/376911**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.01.2002**

(Věstník č. 1/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/18982**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/10599**

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 622

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/00

(71) Přihlašovatel:

**NORTH AMERICAN VACCINE, INC., Columbia,
MD, US;**

(72) Původce:

**Michon Francis, Bethesda, MD, US;
Huang Chun-Hsien, Bethesda, MD, US;
Uitz Carherine, Arlington, VA, US;**

(74) Zástupce:

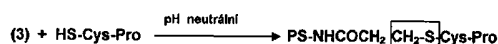
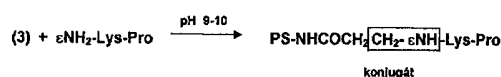
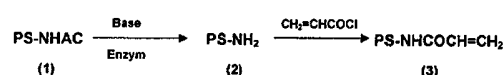
Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Imunogenní konjugát polysacharid-protein s β -
propionamidovým spojením výhodný jako
vakcína produkovaná za použití N-
akryloylovaného polysacharidu**

(57) Anotace:

Jsou poskytovány nové imunogenní konjugáty polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením a oligosacharid-protein s N-propionamidovým spojením právě tak jako metoda pro produkci konjugátů. procedura konjugace je jednoduchá, rychlá, reprodukovatelná a aplikovatelná na rozličné polysacharidy a oligosacharidy pocházející z bakteriálních species, kvasinek, rakovinných buněk nebo chemicky syntetizované. Popisovány jsou rovněž vakciny a způsoby imunizace proti infekci nebo rakovině za použití imunogenních konjugátů polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením a oligosacharid-protein s β -propionamidovým spojením.



**Imunogenní konjugát polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením
výhodný jako vakcína produkovaná za použití N-akryloylovaného
polysacharidu**

Oblast techniky

Předložený vynález se týká imunogenních konjugátů polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením a způsobů pro produkci konjugátů z bakterií, kvasinek a rakovinných buněk. Konjugáty jsou použitelné jako vakcíny.

Dosavadní stav techniky

Bakteriální infekce způsobované grampozitivními bakteriemi jako je *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrix* a *Clostridium* a gramnegativními bakteriemi jako je *Haemophilus*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Nesseria* a určité typy *Escherichia coli* působí ve světě závažná onemocnění. To spolu se vznikající resistencí, kterou bakterie vykazují proti antibiotikům, naznačuje potřebu vyvíjet bakteriální vakcíny. Na příklad, streptokoky jsou rozsáhlý a rozmanitý rod grampozitivních bakterií, který byl uspořádán do několika skupin založených na antigenicitě a struktuře polysacharidů jejich buněčných stěn (26, 27). Dvě z těchto skupin byly přiřazeny k závažným humánním infekcím. Streptokoky skupiny A způsobují různé infekční choroby včetně anginy, reumatické horečky, streptokokálního impetigo a sepse. Streptokoky skupiny B jsou významnými perinatálními patogeny ve Spojených státech právě tak jako v rozvojových zemích (37).

Gramnegativní bakterie jsou rovněž závažnou příčinou nemoci. Až do současného vývoje a využití vakcín polysacharid-protein zaměřených proti *Haemophilus influenzae* typ b bakterie (Hib), byly Hib bakteriální infekce zodpovědné za mnoho případů mentální retardace u dětí. Infekce *N. meningitidis* a *E. coli* K1 jsou zodpovědné za neonatální meningitidu. Kmen gramnegativních bakterií *E. coli* byl spojován s vážnými onemocněními včetně smrti z požívání masa nakaženého kmeny *E. coli*.

Polysacharidy byly využívány pro vyvolání odezev protilátek vůči řadě gramnegativních a grampozitivních bakterií, když byly konjugovány s jinou

imunogenní molekulou jako polypeptidem nebo proteinem. Konjugace polysacharidu nebo oligosacharidu s polypeptidem změní imunitní odpověď na polysacharid nebo oligosacharid, která je typicky na T-buňce nezávislá na tu, která na T-buňce závislá je.

Dřívější technika popisuje jak přímé spojování tak nepřímé spojování polysacharidů s proteiny za vzniku konjugátů [souhrnněv odkazu (11) a U. S. patentu č. 5,306, 492]. Způsoby spojování zahrnovaly diazokopulaci, thioetherovou vazbu, amidaci, redukční aminaci a thiokarbamoyl pro spojení polysacharidu s proteinovým nosičem.

Geyer a spol.: Med. Microbiol. Immunol, **165**:171-288 (1979) popisuje konjugáty určitých kapsulárních polysacharidových fragmentů *Klebsiella pneumoniae* s nitrofenyl-ethylaminovou spojí redukční aminací a připojením derivatisovaného cukru pomocí azo-kopulace.

U. S. patent č. 4,057,685, autor McIntire, popisuje lipopolysacharid *Escherichia coli* se sníženou toxicitou, kovalentně svázaný s proteinovým antigenem reakcí s haloacylhalogenidem.

U. S. patent č. 4,356,170, autor Jennings a spol., popisuje přípravu konjugátu polysacharid-protein redukční aminací.

U. S. patent č. 4,673,574, 4,761,283 a 4,808,700, autor Anderson, popisuje produkci imunogenních konjugátů zahrnující redukční aminaci produktu imunogenního kapsulárního polysacharidového fragmentu, pocházejícího z kapsulárního polymeru *Streptococcus pneumoniae* nebo *H. influenzae*, obsahujícího redukující konec připravený takovými prostředky jako je oxidační štěpení jodistanem nebo hydrolyza glykosidické vazby bakteriálním toxinem nebo toxoidem jako proteinovým nosičem.

U. S. patent č. 4,459,286, autor Hillman a spol., popisuje přípravu konjugátu polysacharid-protein aktivací polysacharidu *H. influenzae* typu b bromkyanem, derivatisací aktivovaného polysacharidu molekulou spaceru, kyselinou 6-aminokapronovou a spojení hlavního proteinu vnější membrány *Nesseria meningitidis* s ve vodě rozpustným karbodimidem za vzniku vazby amidového typu na protein prostřednictvím složité řady vazeb spaceru 6-aminokapronové kyseliny na polysacharid.

U. S. patent č. 4,965,338, autor Gordon, popisuje přípravu ve vodě rozpustného kovalentního konjugátu polysacharid-toxoid difterie, v němž je

polysacharid *H. influenzae* typu b aktivován bromkyanem a bezprostředně smísen s toxoidem difterie, který byl derivatisován ADH spacerem.

U. S. patent č. 4,663,160, autor Tsay a spol., popisuje detoxifikovaný polysacharid z gramnegativní bakterie kovalentně svázaný s detoxifikovaným proteinem z téže species gramnegativní bakterie prostřednictvím části uhlíků 4-12.

U. S. patent č. 4,619,828, autor Gordon a spol., popisuje konjugáty mezi polysacharidovými molekulami z pathogenních bakterií jako *Haemophilus influenzae* typ B, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* a *Escherichia coli* a antigeny závislémi na T-buňkách jako toxoidy difterie a tetanu.

U. S. patent č. 4,711,779, autor Porro a spol., popisuje vakciny glykoproteinových konjugátů mající trivalentní imunogenní aktivitu zahrnující antigenní determinanty z kapsulárních polysacharidů gram pozitivních bakterií, právě tak jako buď CRM₁₉₇, toxoidu tetanu nebo pertusis toxinu.

U. S. patent č. 5,306,492, autor Porro, popisuje konjugát oligosacharid-proteinový nosič, připravený reakcí terminální redukující skupinu majícího oligosacharidu s diaminomethanem v přítomnosti pyridinboranu tak, že dojde k redukční aminaci, reakcí aminovaného oligosacharidového produktu s molekulou mající dvě funkční skupiny a potom reaguje aktivovaný polysacharidový produkt s proteinovým nosičem.

U. S. patent č. 5,192,540, autor Kuo a spol., popisuje konjugát polysacharid-protein zahrnující redukční aminaci produktu oxidovaného polyribosyl-ribitolfosfát polysacharidového fragmentu pocházejícího z kapsulárního polysacharidu z *Haemophilus influenzae* typ b a proteinu vnější membrány z *Haemophilus influenzae* typ b.

Evropská publikace č. EP 0747063 A 2 popisuje kapsulární polysacharid obsahující mnohočetné deriváty sialové kyseliny a heterobifunkční molekuly spojek připojené k nosné molekule. Spojky se používají k N-alkylaci až 5 sialových zbytků na polysacharid. Zbylé aminoskupiny jsou potom acylovány propionanhydridem nebo acetanhydridem.

Pro produkci imunogenních vakcin konjugátů polysacharid-protein ve velkém měřítku jsou žádány účinnější, s vyššími výtěžky a jednodušší způsoby získávání vyčištěných imunogenních konjugátů polysacharid-protein.

Podstata vynálezu

Vynálezem je imunogenní konjugát polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením a imunogenní konjugát oligosacharid-protein s β -propionamidovým spojením.

Předmětem tohoto vynálezu je poskytnout způsob přípravy imunogenních konjugátů polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením, které skýtají výhody proti dosud užívaným metodologiím. Dalším předmětem tohoto vynálezu je poskytnout farmaceutické kompozice, vakciny a další imunologická činidla odvozená od imunogenních konjugátů polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením.

Je udáván způsob přípravy imunogenního konjugátu polysacharid-protein, který obsahuje N-deacetylaci polysacharidu nebo oligosacharidu zásadou nebo enzymatickou hydrolýzou, následovanou N-akryloylací N-deacetylovaného polysacharidu. N-Akryloylovaný polysacharid je přímo napojen na protein nosiče za vzniku imunogenního konjugátu polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením.

Kapsulární polysacharidy a polysacharidy buněčného povrchu mohou být podle tohoto vynálezu extrahovány ze supernatantů buď bakteriálních, kvasničných nebo savčích buněk anebo přímo z bakteriálních, kvasničných nebo savčích buněk hydrolýzou vůči basi labilní vazby, která spojuje polysacharid s ostatními buněčnými komponentami či hydrolýzou enzymatickou. Procentický obsah N-acetylových skupin odstraněných z polysacharidu hydrolýzou je nahrazen N-akryloylskupinami, které jsou střídavě napojeny na protein a tvoří konjugát podle předkládaného vynálezu.

Z jednoho hlediska poskytuje vynález oligosacharidy a polysacharidy, které jsou na protein(y) přímo napojeny na četných polohách.

Z jiného hlediska je vynález způsobem imunizace savce vůči bakteriálním a kvasinkovým infekcím nebo rakovině, která zahrnuje podávání účinného množství vakciny podle vynálezu savci, pro prevenci infekce organismy způsobujícími chorobu nebo prevenci rakoviny.

Aspektem vynálezu je způsob vyvolání produkce protilátek u savce použitím konjugátů polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením, které chrání savce proti infekci nebo chorobě.

Jiným aspektem vynálezu je imunoglobulin a izolované protilátky vyvolané jako odezva na imunizaci při použití konjugátů polysacharid-protein s β -

propionamidovým spojením. Takový imunoglobulin a izolovaná protilátka jsou užitečné jako terapeutika a diagnostická činidla.

Podrobný popis vynálezu

Vynálezem je nový imunogenní konjugát polysacharid-protein a imunogenní konjugáty oligosacharid-protein, vhodné jako imunogeny a vakciny proti bakteriálním infekcím, kvasinkovým infekcím a jako terapeutika při rakovině. Polysacharidy nebo oligosacharidy vhodné pro tvorbu konjugátů polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením pocházejí ze zdroje polysacharidu nebo oligosacharidu, který zahrnuje, ale není omezen na gram pozitivní nebo gram negativní bakterie, kvasinka, rakovinové buňky nebo rakovinové tkáně a podobně, kde polysacharid nebo oligosacharid slouží jako faktor virulence pro buňky při unikání obrannému hostitelskému mechanismu. Konjugáty polysacharid-protein podle tohoto vynálezu se tvoří přímým spojením N-akryloylovaného polysacharidu s proteinem Michaelovou adicí nukleofilních poloh na proteinu.

Polysacharidy nebo oligosacharidy mohou být získávány z rozmanitých zdrojů, které představují gram pozitivní nebo gram negativní bakterie, kvasinky, rakovinové buňky nebo rekombinantní forem od každých, za použití basické nebo enzymatické hydrolýzy vazby, kterou je polysacharid nebo oligosacharid připojen na buněčné složky. Polysacharid nebo oligosacharid může být extrahován z organismu nebo buňky kontaktem organismu nebo buňky s basí nebo enzymem. Po basické nebo enzymatické hydrolýze může být polysacharid nebo oligosacharid znovu získán různými způsoby. Neomezujícími příklady gram pozitivních bakterií a jejich rekombinantních kmenů pro použití podle tohoto vynálezu jsou streptokoky, stafylokoky, enterokoky, bacily, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrix* a *Clostridium*. Více se preferuje speciálně používání streptokoků a nejvíce je preferováno používání skupiny B streptokoků typu Ia, Ib, II, III, IV, V a VIII. Neomezující příklady gram negativních bakterií a jejich rekombinantních kmenů pro použití podle tohoto vynálezu zahrnují *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*. Více výhodné jsou speciálně *H. influenzae* typ b, *N. meningitidis* typy B, C, Y a W135, *E. coli* K1 a *E. coli* K92. Příklady kvasinek pro použití podle předkládaného vynálezu představuje *Cryptococcus neoformans*, ale není to omezeno jen na něj. Příklady rakovinných buněk nebo rakovinné tkáně pro

použití podle předkládaného vynálezu zahrnují malé buňky plicního karcinomu, neuroblastomy, rakovinu prsu, rakovinu tlustého střeva a podobně, ale nejsou tím limitovány.

Pro hydrolýzu polysacharidu nebo oligosacharidu může být podle vynálezu, v praxi obvyklými způsoby, aplikována široká variace podmínek buď ve vodném prostředí nebo v organickém rozpouštědle. Rozsah, do kterého se hydrolyzují N-acetyl vazby u sacharidů může být kontrolován reakčními podmínkami. Při jednom provedení může být hydrolýzou odstraněno nejméně kolem 50 % N-acetylskupin, raději se odstraňuje kolem 50 % až kolem 100 % a nejlépe kolem 90% nebo více nativních N-acetylskupin. V určitém provedení se z polysacharidu působením hydrolytického činidla odhydrolyzuje kolem 95 % nebo více N-acetylskupin.

Kapsulární polysacharidy podléhající basické extrakci jsou takové polysacharidy, které postrádají jakýkoliv pro basi labilní substituent, který nemůže být nahrazen, tak jako O-acetylskupiny rozhodující pro imunogenicitu. Jiné kapsulární polysacharidy podléhající basické extrakci jsou ty, které postrádají fosfodiesterovou vazbu a ty, u nichž chybí, v poloze 4-vázané zbytky uranové kyseliny.

Při preferovaném provedení basické hydrolýzy jsou CPS extrahovány ze streptokoků skupiny B (GBS). V nejvíce preferovaném provedení jsou CPS extrahovány ze GBS typů Ia, Ib, II, III a VIII.

Při jiném preferovaném provedení basické hydrolýzy jsou CPS extrahovány ze *S. pneumoniae*. V nejvíce preferovaném provedení jsou CPS extrahovány ze *S. pneumoniae* typů III, IV a XIV.

Při jiném preferovaném provedení basické hydrolýzy jsou CPS extrahovány z bakterií *Neisseria* nebo *Escherichia*. V nejvíce preferovaném provedení jsou CPS extrahovány z bakterií *Neisseria meningitidis* typů B,C,Y nebo W135, *Escherichia coli* K1 nebo *Escherichia coli* K92.

Polysacharidy podléhající enzymatické deacetylaci jsou ty polysacharidy, které postrádají jakýkoliv enzymaticky labilní substituent rozhodující pro imunogenicitu, ve kterém nemůže být substituent zaměněn nebo substituován imunogenním podílem; tyto polysacharidy zahrnují GBS a podobné, ale nejsou omezeny na ně.

Příprava N-akryloylpolysacharidů

1. Deacetylace polysacharidů

a) Výchozí materiály

Polysacharid nebo oligosacharid může být získáván při aplikaci basicke hydrolyzy nebo enzymaticke hydrolyzy z koncentrovaných bakteriálních, kvasinkových, savčích buněk, nebo z rekombinantních forem těchto buněk anebo ze supernatantů od homogenisovaných buněk či z upraveného media za použití standardních metod v praxi běžných. Polysacharid nebo oligosacharid může být izolován a vyčištěn v praxi běžnými způsoby. Jako výchozí materiál může být použit i izolovaný a vyčištěný polysacharid nebo oligosacharid z obchodních zdrojů.

Způsoby izolace polysacharidu závisejí na jednotlivém polysacharidu, který se použije. Obecnou metodou je použití ionogenního detergentu na vytvoření komplexu s polysacharidem nesoucím náboj. Komplex se vysráží a izoluje. Komplex se potom rozpustí v roztoku o velké iontové síle jako je chlorid vápenatý a polysacharid se potom vysráží ethanolem.

Izolované a vyčištěné polysacharidy a oligosacharidy získávané k použití v tomto vynálezu, obsahují výhodně méně než 1 % nukleové kyseliny a proteinových nečistot pro humánní používání. Po vyčištění jsou často kvůli přítomnosti anorganických solí zaznamenávány čistoty 80 až 100 % sacharidu.

b) Basická hydrolyza

Pro odstranění N-acetylskupin mohou být vyčištěné polysacharidy nebo oligosacharidy podrobeny reakcím s basemi. Neomezující příklady basí, které podle tohoto vynálezu mohou být použity jsou NaOH, KOH, LiOH, NaHCO₃, Na₂CO₃, K₂CO₃, KCN, Et₃N, NH₃, H₂N₂H₂, NaH, NaOMe, NaOEt nebo KOtBu. Zásady jako NaOH, KOH, LiOH, NaH, NaOMe nebo KOtBu jsou nejefektivněji používány v rozmezí 0,5 N až 5,0 N. Base jako NaHCO₃, Na₂CO₃, K₂CO₃ a KCN mohou být použity v tak vysokých koncentracích jak dovolí jejich rozpustnosti. Organické zásady jako Et₃N mohou být pro provedení hydrolyzy používány ve středních až vysokých (50 až 100 %) koncentracích, pokud je přítomno činidlo jako voda nebo alkohol pro uskutečnění hydrolyzy. Base jako NH₃ nebo H₂N₂H₂ mohou být používány téměř v jakékoli koncentraci včetně 100 %. Použita mohou být rozpouštědla jako voda, alkoholy (nejvhodněji C₁ - C₄), dimethylsulfoxid, dimethylformamid nebo směsi těchto a jiných organických rozpouštědel. Největší přednost se dává roztokům basí obsahujícím vodu.

Pro odstranění N-acetylskupin z polysacharidu nebo oligosacharidu je nejúčinnější rozsah pH od cca 9 do cca 14, při čemž optimální pH je kolem 12. N-Deacetylovaný polysacharid je potom v praxi známými standardními metodami čistěn od zbytků reagentů ultračistěním pomocí membrán nebo dialysou.

c) Enzymatická hydrolýza

K enzymatickému odstranění N-acetylskupin z polysacharidu nebo oligosacharidu může být použit enzym N-deacetyláza. V odkazech 47, 48 a 49 je popsáno jedno z provedení s využitím enzymu N-deacetylázy pro odstranění N-acetylových zbytků z polysacharidů nebo oligosacharidů. Při enzymatické hydrolýze se polysacharid nebo oligosacharid a enzym deacetyláza smísí s vhodným systémem pufru pro enzym při vhodném pH a teplotních podmínkách a nechají se reagovat po dobu dostačující k odstranění N-acetylskupin. V jednom z provedení se polysacharid a enzym deacetyláza pro vznik N-deacetylovaného polysacharidu smísí s vhodným enzymovým pufrovaným systémem, na příklad 50 mM MES, 10 mM MnCl_2 , pH 6,3 při 37°C na 60 minut. Reakce se ukončí za použití vhodného zastavovacího roztoku na příklad 1 M kyseliny monochloroctové, 0,5 M NaOH, 2 M NaCl nebo zředěním za použití roztoku vhodného pufru.

2. N-Akryloylace polysacharidu

Výsledkem alkalické nebo enzymatické hydrolýzy je odstranění N-acetylskupin z kyseliny sialové a zbytků aminocukrů polysacharidů a oligosacharidů. Po hydrolýze je polysacharid nebo oligosacharid za použití různých akryloylačních činidel podroben N-akryloylaci v požadovaném rozsahu.

Při jednom provedení představuje metoda přidávání akryloylačního činidla pro N-akryloylaci N-deacetylovaného polysacharidu nebo oligosacharidu. Příklady akryloylačních činidel zahrnují, ale nejsou omezeny na akryloylchlorid, akryloylanhydrid, akrylovou kyselinu a dehydratační činidlo jako DCC, $\text{CH}_2=\text{CHCOCN}$ a podobné, použité v přebytku o koncentraci kolem 1 M. Při způsobu N-akryloylace N-deacetylovaného polysacharidu se adjustuje pH a během reakce se udržuje od kolem 9 do kolem 11, nejlépe kolem 10. Teplota během reakce je kolem 2°C až kolem 8°C, nejvhodněji kolem 4°C. Reakce probíhá po dobu kolem 1 hodiny. Vznikající N-akryloylovaný polysacharid nebo N-akryloylovaný oligosacharid je akryloylován nejméně z asi 95 % nebo více.

B. Příprava konjugátu polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením

Polysacharid nebo oligosacharid podle vynálezu, když je konjugován s jinou imunogenní molekulou jako je polypeptid nebo protein, může být u jedince využit pro vyvolání protilátkových odezev vůči řadě gramnegativních a gram pozitivních bakterií, kvasinek a karcinomů. Konjugování polysacharidu nebo oligosacharidu s polypeptidem konvertuje imunitní odezvu na polysacharid nebo oligosacharid, která je nezávislá na T-buňkách na takovou, která je na T-buňkách závislá. Podle toho je velikost polypeptidu nejlépe ta, která stačí ke způsobení konverse odezvy z nezávislé na T-buňkách, na závislou na T-buňkách. Z důvodu poskytnutí druhého imunogenu může být prospěšné používat menší polypeptidy. Typickou velikost proteinového nosiče představuje molekulová hmotnost od cca 50. 000 do cca 500. 000.

Preferované proteinové nosiče zahrnují, ale neomezuji se na toxoid tetanu, toxoid difterie, toxin cholery podjednotka B, proteiny vnější membrány *Neisseria meningitidis*, pneumolysoid, C- β protein ze skupiny B *Streptococcus*, na IgA se nevážající C- β protein ze skupiny B *Streptococcus*, toxoid *Pseudomonas aeruginosa*, toxoid pertuse, syntetický protein obsahující lysinové nebo cysteinové zbytky a podobné. Proteinovým nosičem může být nativní protein, chemicky modifikovaný protein, detoxifikovaný protein nebo rekombinantní protein. Molekuly konjugátů připravené podle tohoto vynálezu mohou být z hlediska proteinové složky monomery, dimery, trimery a výše zesíťované molekuly.

Tento vynález poskytuje schopnost produkovat molekuly konjugátů, v nichž je protein napojen na polysacharid nebo oligosacharid na jedné nebo více poloh na polysacharidu nebo oligosacharidu. Velikost polysacharidu nebo oligosacharidu může být velice různá. Jeden nebo veliký počet polysacharidů nebo oligosacharidů může zesíťovat s jedním nebo mnohočetnými proteiny. Konjugáty podle předkládaného vynálezu mají nejspíše mřížkové struktury. Body připojení jsou mezi lysinovými nebo cysteinovými zbytky proteinu a N-akryloylskupinami polysacharidu nebo oligosacharidu.

Při jednom ze způsobů vytvoření imunogenního konjugátu polysacharid-protein, je nejprve za použití base nebo enzymu podroben hydrolýze izolovaný polysacharid (glykosaminoglykan) obsahující volné aminoskupiny nebo N-acylskupiny (např. N-acetylskupiny) v cukerných zbytcích, které jsou součástí jeho

opakující se jednotky, aby se část nebo všechny z jeho N-acylskupin odstranily. Uvolněné aminoskupiny se potom N-acylují N-akryloylačním činidlem, aby se utvořil nahoře popsáný N-akryloylovaný polysacharid. N-Akryloylovaný polysacharid je potom za optimálních podmínek pH, teploty a doby spojován s proteinem, aby se vytvořil imunogenní konjugát polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením.

Při jednom z provedení se způsob spojování vede při pH nad 9,0, nejraději pH od cca 9,0 do cca 10,0 kvůli optimální reaktivitě volných ϵ -aminoskupin lysinových zbytků u proteinu. V jiném provedení se způsob spojování vede při neutrálním pH kolem 7,0 kvůli optimální reaktivitě thiolových HS-skupin cysteinových zbytků proteinu. Výběr pH pro vedení způsobu spojování může být založen na počtu reaktivních skupin u jednotlivého proteinového nosiče. Na příklad při použití proteinu složeného z více reaktivních lysinových zbytků ve srovnání se zbytky cysteinovými se nejvhodněji uplatní způsob vedený při basickém pH. Způsob spojování při použití proteinu složeného z více reaktivních cysteinových zbytků ve srovnání s lysinovými zbytky se nejvhodněji provádí při neutrálním pH.

Konjugační reakce může být uskutečňována v pufrovaných reagentech zahrnující, ale neomezující se na pufrovaný reagent jako je karbonát / bikarbonát, borátový pufr, fosfát a podobné. Teplota při konjugační reakci je nejméně kolem 25°C, nejlépe kolem 37°C po dobu nejlépe 24 hodin. Jak popisuje Romanowska a spol. (46), klíčovou reakci představuje 1,4-konjugovaná adice (adice Michaelova typu) nukleofilních thiolových skupin cysteinu nebo ϵ -NH₂ skupin lysinu na proteinech s N-akryloylovanými cukernými zbytky, které jsou přítomny v opakující se jednotce polysacharidu, jak je ukázáno na obrázku 1. Vznikající konjugát polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením má poměr polysacharidu k proteinu od kolem 0,1 do kolem 0,6.

Glykosylové zbytky polysacharidu mající N-acylové skupiny podléhající přímé konjugaci s cysteinovými a/nebo lysinovými zbytky u proteinu zahrnují, ale neomezují se na glukosamin, galaktosamin, mannosamin, fukosamin, sialovou kyselinu a podobné. Polysacharid může pocházet z přírodních zdrojů jako bakterií, kvasinek a rakovinných buněk nebo ze zdrojů syntetických. Syntetické zdroje zahrnují chemickou syntézu, enzymatickou syntézu a chemoenzymatickou syntézu. Syntéza může být syntézou *de novo* nebo modifikací přírodních sacharidů. Isolované přírodní

sacharidy mohou být modifikovány alternací funkčních skupin na cukerných zbytcích nebo adicí či odstraněním cukerných zbytků.

Polysacharid nebo oligosacharid pro použití k přípravě konjugátu polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením a konjugát oligosacharid-protein s β -propionamidovým spojením podle předkládaného vynálezu se pro spojení s proteinovým nosičem může lišit velikostí. Jak je zde definováno, oligosacharid pro aplikaci podle předkládaného vynálezu obsahuje nejméně 10 cukerných zbytků a nejvhodněji od 10 do 50 cukerných zbytků. Polysacharid, jak se zde definuje, je větší než 50 cukerných zbytků a může mít velikost až 600 zbytků nebo větší. V některých případech jsou pro zvýšení imunogenicity žádoucí velké útvary. Způsoby podle tohoto vynálezu zajišťují používání skutečně velikých polysacharidů, neboť do jednotlivého polysacharidu může být zavedeno mnoho reaktivních míst. Jinou výhodou tohoto způsobu před dřívější praxí je, že se polysacharid nebo oligosacharid nezmění na funkční skupině s nábojem, která často interaguje s/nebo tvoří část epitopu rozhodujícího pro imunitu.

C. Vakciny

Vynález je zaměřen také na přípravu vakcin. Podle tohoto vynálezu izolovaný, shora popsáný konjugát polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením může být využit jako antigen ke vzniku protilátek, které jsou reaktivní proti polysacharidům nebo oligosacharidům, a tudíž proti organismu nebo buňce, ze které byl polysacharid nebo oligosacharid izolován. Vakciny podle předkládaného vynálezu mohou být kombinací nebo multikomponentní vakcinou obsahující v kombinaci s konjugátem polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením další složky, včetně, ale ne jenom vakciny difterie-tetanus-pertuse (DTP), tetanus-difterie (Td), DTaP, vakciny DTaP-Hib, vakciny DTaP-IPV-Hib a podobně a jejich kombinace, aby poskytovaly multifunkční vakcinu vhodnou pro imunisaci proti řadě chorob, které způsobují organismy nebo buňky.

Vakciny podle tohoto vynálezu mohou poskytovat aktivní nebo pasivní imunitu. Vakciny pro poskytování aktivní imunity obsahují izolovaný a vyčištěný N-akryloylovaný polysacharid nebo oligosacharid konjugovaný alespoň s jedním antigenním peptidem.

D. Farmaceutické kompozice

Farmaceutické kompozice podle tohoto vynálezu mohou obsahovat nejméně jeden konjugát polysacharid-protein a farmaceuticky přijatelný nosič jako je fyziologický roztok soli, dextrosa, glycerol, ethanol a podobně. V jiném provedení obsahuje farmaceutická kompozice jiný imunogenní podíl jako je peptid, nebo kompozice obsahující antilátky vyvolané některým CPS podle tohoto vynálezu. Kompozice může také obsahovat adjuvanty ke zvýšení imunologické odezvy recipienta. Takovými adjuvanty může být hliník ve formě kamence nebo adjuvanty s dlouhým alkylovým řetězcem jako stearyltyrosin (viz U. S. patent serie č. 583,372, podán 9/17/90; Evropský patent EP 0 549 617 B1; Moloney a spol. U. S. patent č. 4,258,029), muramyl dipeptid (MDP) nebo jeho deriváty, monofosforyl lipid A (MPL), saponin (Quil-A) a podobně. Viz také Jennings a spol. U. S. patent č. 5,683,699 a Paoletti a spol. *Infectious Diseases* **175**, 1237-9 (1997). Farmaceutické kompozice mohou dále obsahovat jeden nebo více imunogenů včetně difterie-tetanus-pertuse (DTP), tetanus-difterie (Td), DTaP, DTaP-Hib, DTaP-IPV-Hib a podobně a jejich kombinace, ale nejenom tyto. Tyto farmaceutické kompozice jsou užitečné zejména jako vakciny.

Pro vyvolání pasivní imunity může být farmaceutická kompozice složena z polyklonálních protilátek nebo monoklonálních protilátek, jejich derivátů nebo fragmentů a jejich rekombinantních forem. Množství protilátky, fragmentu nebo derivátu bude terapeuticky a profylakticky efektivní množství, jak se určuje standardními klinickými technikami.

Farmaceutické přípravky podle tohoto vynálezu se podávají jedinci způsoby, o nichž je známo, že jsou v praxi efektivní. Mezi cestami aplikace jsou intradermální, intraperitoneální, intravenosní, subkutánní, intramuskulární, orální a intranasální, ale nejenom pouze tyto.

Kompozice podle vynálezu mohou obsahovat standardní nosiče, pufrý a konzervační prostředky, o nichž je odborníkům známo, že jsou vhodné pro vakciny, včetně jakéhokoli farmaceuticky vhodného nosiče jako je fyziologický roztok soli nebo jiné injektovatelné kapaliny, ale není to na ně omezeno. Přítomny mohou být ve vakcinách rovněž obvyklá aditiva, na příklad stabilizátory jako laktoza nebo sorbitol a adjuvanty ke zvýšení imunogenní odezvy jako je fosforečnan, hydroxid nebo síran hlinitý a stearyltyrosin. Vakciny produkované podle tohoto vynálezu mohou být také

použity jako komponenty multivalentních vakcin, které vyvolávají imunitní odezvu proti řadě infekčních agens.

Vakciny podle předkládaného vynálezu jsou podávány v množstvích dostatečných k vyvolání produkce protilátek jako součásti imunogenní odezvy. Vakcína může být použita parenterálně, aby produkovala IgG a IgM protilátky nebo může být dodána do mukosálních membrán, aby na povrchu tkání produkovala IgA protilátky. Dávkování může být upraveno na základě velikosti, váhy nebo věku jednotlivce přijímajícího vakcinu. Protilátková odezva může být u jednotlivce monitorována analyzováním titru protilátky nebo baktericidní aktivity a pokud je to nutné, stupňována, aby se odezva zvýšila. Typicky je jednotlivá dávka pro dítě kolem 10 μg konjugátové vakciny na dávku nebo kolem 0,5 μg - 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dospělí dostávají dávku konjugátové vakciny kolem 0,5 μg - 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Pro konjugátovou vakcinu CPS-protein je typická dávka kolem 25 μg každého jednotlivého CPS na dávku. To znamená, že vakcína proti streptokoku skupiny B může obsahovat 25 μg každé z forem CPS devíti serotypů.

E. Protilátky

Protilátky zaměřené proti polysacharidu mohou být generovány jakoukoli z technik v oboru běžných. Podle jednoho přístupu mohou být protilátky generovány podáním imunogenního konjugátu polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením hostitelskému živočichu. Hostitelským živočichem může být krysa, myš, králík, primát nebo člověk, ale není to na ně omezeno. Nejvhodnějším hostitelem je člověk. Při jednom provedení mohou být imunologické odezvy zvýšeny použitím v oboru běžných adjuvantů.

Monoklonální protilátky zaměřené proti polysacharidu mohou být rovněž připraveny jakoukoli z technik v oboru běžných. Podle jednoho způsobu se používají kultury řady buněk hybridomu [Kohler a Milstein, *Nature* **256**, 495-497 (1975)]. Monoklonální protilátky zaměřené proti polysacharidu mohou být lidské monoklonální antilátky, chimérické monoklonální protilátky nebo humanisované monoklonální antilátky připravené jakoukoli z technik v oboru běžných. Podle jednoho z přístupů mohou být chimérické monoklonální protilátky generovány tak, že mají nikoliv lidskou (např. myši) antigen vázající doménu kombinovanou s lidskou konstantní oblastí [Takeda a spol., *Nature* 314-452 (1985)]. Humanisované protilátky mohou být

generovány podle procedur Queena a spol., U. S. patent č. 5,585,089 a U. S. patentu č. 5,530,101. Jednoduché řetězce protilátky mohou být vytvořeny v oboru známými metodami [U. S. patent č. 4,496,778; Davis G. T. a spol., *Biotechnology* **9**, 165-169 (1991); Pluckthun A., *Nature* **347**, 497-498 (1990)]. Domény konstantních oblastí protilátky mohou být modifikovány v praxi známými procedurami (WO 89/07142).

Protilátky zaměřené proti polysacharidu nebo oligosacharidu mohou být čistěny jakoukoli z technik běžných v praxi včetně imunoabsorpce nebo imunoafinitní chromatografie anebo jiné chromatografické metody (např. HPLC) , avšak není to omezeno jen na ně. Antilátky mohou být čistěny také jako frakce imunoglobulinu ze séra, plasmy nebo prostředí buněčné kultury.

Molekuly protilátek mohou být intaktní molekuly imunoglobulinu, nebo ony části imunoglobulinové molekuly, na příklad Fab fragmenty, které obsahují vazebná místa antigenu. Molekuly protilátek mohou být z jakékoliv třídy včetně IgG, IgM a IgA.

Fragmenty protilátek zaměřené proti CPS mohou být generovány jakoukoli z technik běžných v praxi [Campbell (1985) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burdon a spol. (vydavatelé), Elsevier Science Publishers, Amsterdam].

Protilátka nebo antigen či antigen vázající fragment z něj jsou užitečné jako terapeutika pro poskytování pasivní ochrany proti nemocem působeným gram pozitivními a gram negativními bakteriemi nebo kvasinkami. Protilátka nebo antigen vázající fragment z něj jsou také jsou také vhodné jako diagnostické činidlo ve standardních imunoesejích pro detekci a/nebo identifikaci bakterií, kvasinek nebo rakovinných buněk. Protilátky mohou být dodávány ve formě souprav samotné nebo se standardními činidly pro imunoeseje.

Při jiném provedení tohoto vynálezu mohou být protilátky zaměřené proti polysacharidu nebo oligosacharidu podle tohoto vynálezu používány jako farmaceutický přípravek při terapeutické nebo profylaktické aplikaci, aby udělily pasivní imunitu z jednoho hostitelského jedince na jiného jedince (např. zvýšit imunitní odezvu jedince proti gram pozitivním a gram negativním bakteriím nebo kvasinkám anebo poskytnout odezvu u jedinců s ohroženou imunitou nebo ochuzenou imunitou včetně pacientů s AIDS). Pasivní transfer protilátek je v oboru běžný a může být uskutečňován některou z obvyklých metod. Podle jednoho způsobu, protilátky zaměřené proti konjugátům z toho podle tohoto vynálezu, jsou

generovány v imunokompetentním hostitelském živočichovi ("donor"), vytěženy z tohoto hostitelského živočicha a přeneseny do jedince příjemce. Na příklad ke generaci protilátek účinných proti konjugátu polysacharid-protein podle tohoto vynálezu může být využit lidský donor. Potom mohou být protilátky podávány v terapeuticky nebo profylakticky efektivním množství lidskému příjemci potřebujícímu ošetření, čímž udělují recipientovi resistenci proti bakteriím, které jsou vázány protilátkami vyvolanými polysacharidovou složkou [viz Grossman M. a Cohen S. N. v "Basic and Clinical Immunology" 7. vyd., (Stites D. P. a Terr A. T. editoři, Appleton & Lange 1991) kapitola 58 "Immunization"].

V některých případech může podle vynálezu použitý polysacharid indukovat protilátku, která křížově reaguje s jinými patogenními organismy, a tudíž mají schopnost ochrany proti infekci těmito jinými bakteriemi.

F. Diagnostické soupravy

V jiném provedení mohou být CPS podle vynálezu nebo jejich fragmenty poskytovány v diagnostických soupravách pro indikaci přítomnosti protilátek zaměřených proti bakteriím, kvasinkám nebo rakovinným buňkám. Přítomnost takových protilátek mohou indikovat před expozicí vůči patogenu a předem určovat jedince, který může být resistentní proti infekci. Diagnostická souprava může obsahovat nejméně jeden z CPS podle tohoto vynálezu, nebo jeho deriváty či fragmenty, samotné nebo konjugované s proteinem a vhodné reagenty pro detekci reakce protilátky, když modifikovaný CPS nebo jeho deriváty či fragmenty se smísí se vzorkem obsahujícím protilátku zaměřenou proti gramnegativním, gram pozitivním bakteriím, kvasinkám nebo rakovinným buňkám nebo rakovinné tkáni. Reakce protilátky může být identifikována některou z metod popisovaných v oboru včetně ELISA esejů, ale neomezuje se to jen na ně. Takový poznatek je důležitý a může zabránit očkování, které není nezbytné.

Alternativně může diagnostická souprava obsahovat dále tuhou podložku nebo magnetické perle nebo plastickou matici a nejméně jeden z CPS podle tohoto vynálezu nebo jeho deriváty či fragmenty.

V některých případech může být výhodné, že CPS nebo fragmenty jsou značkovány. Značkovací činidla jsou v praxi dobře známé. Značkovací činidla zahrnují, ale neomezuji se na radioaktivitu, chemoluminiscenci, bioluminiscenci, luminiscenci nebo jiná identifikační označení pro konvenční analýzu. Tělesné

kapaliny nebo vzorky tkání (např. krev, sérum, sliny) mohou být sbírány, čistěny a aplikovány do diagnostické soupravy. CPS, deriváty nebo fragmenty mohou být vyčistěny nebo nevyčistěny a mohou být složeny z koktajlu molekul.

Tuhé matrice jsou v praxi běžné a dostupné a zahrnují, ale neomezují se na polystyren, polyethylen, polypropylen, polykarbonát nebo jakýkoli plastický materiál ve formě zkušev, perel, mikročástic, měřících tyčinek, desek nebo podobně. Dodatečně obsahují matrice, ale nejsou omezeny na membrány, 96ti-jamkové mikrotitrační desky, zkuševy a Eppendorfovy zkuševy. Takové matrice obecně obsahují jakýkoli povrch, na který může být připojeno ligand vázající činidlo nebo povrch, který samotný poskytuje místo připojení ligandu.

Všechny, k tomuto se vztahující publikace, patenty a články jsou zde mimo to výslovně *in toto* inkorporovány odkazy.

Následující příklady jsou presentovány pro ilustraci předkládaného vynálezu a nejsou žádným způsobem chápány jako omezení rozsahu vynálezu. Odborníci zvěhlí v oboru rozpoznají, že lze provádět řadu změn a náhrad, aniž by došlo k odchýlení se od ducha a dosahu vynálezu.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1. Schema způsobu přípravy imunogenního konjugátu polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava nosiče konjugátu polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením

Následující neomezující příklady popisují přípravu serie klinicky relevantních konjugátů polysacharid-protein pro vakciny proti *Streptococcus pneumoniae* (typ 14), skupině B streptokoku (GBS) typu III a typu II a *E. coli* K1. Všechny hořejší polysacharidy použité v tomto příkladě jsou glykosaminoglykany, které obsahují N-

acetylskupiny v jednom nebo více glykosylových zbytcích, jež jsou konstituenty jejich opakujících se strukturálních jednotek.

A. Depolymerisace pneumokokálního polysacharidu typu 14

Pro zvýšení rozpustnosti byl polysacharid nejprve částečně depolymerisován ultrazvukem. 200 mg *Pneumococcal polysaccharide* type 14 (položka NO 2020510, American Type Culture Collection) bylo rozpuštěno ve 20 ml PBS a sonifikováno 4 hodiny při 0°C pomocí Branson Sonifier Model 450. Vzniklý polysacharid byl dialyzován a lyofilizován a potom nasazen na kolonu superdex 200 ekvilibrisovanou fosfátem pufrovanou solankou (PBS). Píky frakcí byly shromážděny a potom dialyzovány proti deionisované vodě na Spectra/Por® Membrane MWCO:3,500. Po lyofilizaci byl získán výtěžek 157,5 mg tuhé látky. Sonifikovaný polysacharid měl průměrnou molekulovou hmotnost kolem 50. 000 jak bylo naměřeno pomocí SEC-Malls s miniDAWN (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA).

B. N-Deacetylace pneumokokálního polysacharidu typu 14

100 mg pneumokokálního polysacharidu typu 14 bylo rozpuštěno v 10 ml 2 N NaOH a potom bylo do reakční směsi přidáno 10 mg NaBH₄. Tato směs byla jednu hodinu zahřívána na 100°C a potom ochlazená na teplotu místnosti. N-Deacetylovaná komponenta byla dialyzována proti deionisované vodě na Spectra/Por® Membrane MWCO:3,500 a lyofilizována za vzniku 84 mg bílé tuhé látky. N-Deacetylovaný polysacharid byl analyzován ¹H-NMR při 500 MHz a bylo zjištěno, že obsahuje méně než 5 % residuálních N-acetylskupin.

C. N-Akryloylace N-deacetylovaného pneumokokálního polysacharidu typu 14

84 mg N-deacetylovaného pneumokokálního polysacharidu typu 14 bylo rozpuštěno ve 4,2 ml d. i. vody. V ledové lázni byl roztok s 2 N NaOH upraven na pH 10. Potom bylo přidáno 420 µl 1 : 1 (obj./obj.) směsi akryloylchlorid : dioxan a s 2 N NaOH upraveno pH na 11. Reakce byla ponechána stát další hodinu při pH 11, aby se zajistila úplná hydrolýza esterů, které se mohly vytvořit jako výsledek O-acylace.

Roztok byl dialyzován a lyofilizován za vzniku 42 mg suchého prášku. Po $^1\text{H-NMR}$ analýze při 500 MHz bylo zjištěno, že polysacharid byl N-akryloylován z více než 95-ti %.

D. Připojení N-akryloylovaného pneumokokálního polysacharidu typu 14 k monomeru toxoidu tetanu

22 mg N-akryloylovaného pneumokokálního polysacharidu typu 14 bylo rozpuštěno v 1,1 ml pufru karbonát / bikarbonát s pH 9,5. K reakční směsi bylo přidáno 22 mg monomeru toxoidu tetanu. Reakční směs byla přes noc inkubována při 37°C. Postup konjugace byl analyzován pomocí "Biologic system (Bio-Rad)" opatřeným kolonou se superose 12. Konjugace polysacharidu na toxoid tetanu byla při měření UF-absorbance indikována progresivním vzrůstem při 280 nm monitorovaného maxima, vymývajícím se v objemu opouštějícím kolonu. Po dokončení konjugace byl roztok neutralizován na pH 7 pomocí 0,1 N HCl a potom dialyzován proti PBS. Konjugát byl čistěn pasáží kolonou 1,6 x 60 cm, obsahující Superdex 200 PG (Pharmacia) a vymýván s PBS obsahujícím 0,01 % thimerosalu. Maximu ve vymývaném objemu odpovídající frakce byly shromažďovány. Obsah sacharidu a proteinu v konjugátu byl stanoven esejem fenol-sírová kyselina podle Duboise a spol. (51) a Coomassie esejem podle Bradforda (9).

Podobné metody byly použity pro GBS typu II, typu III, právě tak jako pro *E. coli* K1 a meningokokální C polysacharidy. Reakční podmínky pro každý z těchto polysacharidů jsou tabelovány níže.

Tabulka 1

E. N-Deacetylace polysacharidu GBS typu II a typu III

	Velikost PS (kD)	PS v mg	NaOH ml	NaBH ₄ mg	Teplota °C	Reakční doba v h	Výtěžek mg
GBSP II	250	63	6	12	110	6	63
GBSP III	110	50	5	10	110	6	53

* Stanoveno pomocí SEC-MALLS

Tabulka 2

N-Akryloylace polysacharidu GBS typu II a typu III

	Množství PS v mg	Deionisovaná voda ml	akryloylchlorid : dioxan, 1:1 (obj.), μ l	Výtěžek mg
GBSP II	60	3	300	60
GBSP III	55	2,75	275	55

Tabulka 3

Připojení polysacharidu GBS typu II a typu III k monomeru toxoidu tetanu

	PS v mg	TT v mg	Pufr karbonát / bikarbonát pH 9,5, v ml	Teplota °C	Inkubační doba
GBSP II	10	10	0,5	37	přes noc
GBSP III	10,52	9,52	0,5	37	přes noc

F. N-Deacetylce K1 polysacharidu

300 mg K1 PS bylo rozpuštěno v 15 ml roztoku 2,0 N NaOH, ke kterému bylo přidáno 150 mg borohydridu sodného. Roztok byl 6 hodin zahříván na 110°C, ochlazen zpět na teplotu místnosti a zředěn 20ti-násobným objemem deionisované vody. Po diafiltraci membránou Amicon YM3 s deionisovanou vodou byl roztok lyofilizován a poskytl 255 mg N-deacetylovaného K1 PS. $^1\text{H-NMR}$ při 500 MHz potvrdila, že došlo k úplné N-deacetylaci.

G. N-Deakryloylace K1 polysacharidu

K 10 ml roztoku deionisované vody obsahujícím 250 mg N-deacetylovaného K1 PS, ochlazenému v ledové lázni byl přidán po kapkách roztok akryloylchloridu (Aldrich, Milwaukee, WI) připravený smísením 1 ml akryloylchloridu s 1 ml dioxanu.

pH roztoku bylo udržováno mezi 7,0 a 10,5 přidáváním 2 N roztoku hydroxidu sodného. Po dokončení adice bylo pH zvýšeno na 13 a při teplotě místnosti bylo 1 hodinu udržováno mezi 12,9 až 13,1. Přidáváním 1 N HCl po kapkách bylo pH upraveno na 9,5. Roztok byl v míchací kyvetě podroben s deionisovanou vodou diafiltraci membránou Amicon YM3. Filtrát byl lyofilizován do sucha a materiál (N-akryloyl K1 PS) byl uchováván v exsikátoru v mrazáku při -20°C. ¹H-NMR při 500 MHz ukázala, že během reakce došlo k úplné N-akryloylaci.

H. Konjugát K1-r PorB (K1-rPorB I) s β -propionamidovým spojením

Roztok obsahující 8,4 mg N-akryloyl K1 PS a 4 mg rekombinantní *Neisseria meningitidis* Por B v 0,3 ml 0,2 M borátu, 0,05 % ZwittergenuTM 3,14 (Boehringer Mannheim) pH 9,5 byl 3 dny inkubován při 37°C. Konjugát byl čistěn rozdělovací chromatografií přes preparativní kolonu obsahující Superdex 200 pro a eluován PBS obsahujícím 0,01 % thimerosalu. Frakce s aktivním signálem v UF při 280 nm vymývané nebo z mála obsažené objemu uvolňovaném z kolony byl shromážděny a uchovávaly se v lednici. Konjugát byl analyzován na obsah sialové kyseliny a proteinu resorcinolem, respektive Coomassie esejí.

I. Příprava thiolovaného rPorB

K jednomu ml roztoku rPorB porinu o koncentraci 10 mg/ml v 0,25 M HEPES pufru s pH 8,5 obsahujícímu 0,25 M chloridu sodného a 0,05 % zwittergentu 3-14, bylo přidáno 0,2 ml roztoku 0,05 M N-sukcinimidyl-3-[2-pyridylthio]propionátu. Roztok byl dobře promíchán a ponechán stát jednu hodinu při teplotě místnosti. K roztoku bylo přidáno 0,06 ml 1 M roztoku dithiothreitolu v témže pufru. Roztok byl znovu dobře promíchán a ponechán stát další dvě hodiny při teplotě místnosti. Roztok byl zředěn 1,3 ml 0,25 M HEPES pufru o pH 7,0 obsahujícím 0,25 M chloridu sodného a 0,05 % zwittergentu 3-14 a nanesen na odsolovací kolonu Pharmacia PD-10, která byla předem ekvilibrována týmž puftrem. Kolona byla stejným puftrem vymývána, eluát byl shromážděn a koncentrován při 5.000 ot/min na odparce Amicon Centrikon 30. Retentát byl shromážděn a byla stanovena koncentrace proteinu.

J. Příprava N-akryloylovaného konjugátu K1 S-rPorB(K1-S-PorB)

K 0,17 ml roztoku thiolovaného rPorB ze shora, o koncentraci 25 mg/ml bylo přidáno 9 mg N-akryloylovaného K1 polysacharidu. Roztok byl dobře promíchán a v sušárně při 37°C 18 hodin inkubován. Roztok byl čistěn na koloně Superdex 200 (Pharmacia) s PBS jako eluentem. Eluované frakce aktivní při UF 280 nm nebo v objemu uvolňovaném z kolony z mála obsažené, byly shromážděny. Analýzy ukázaly, že konjugát obsahoval 25 µg/ml polysacharidu a 188 µg/ml proteinu.

K. Příprava N-akryloylovaného GCMP-S-rPorB konjugátu (GCMP-S-PorB)

Podobně byl postupem srovnatelným s tím, který je popsán pro N-akryloylovaný K1-S-rPorB konjugát, připraven N-akryloylovaný GCMP-S-rPorB a bylo nařženo, že obsahuje 43 µg/ml polysacharidu a 200 µg/ml proteinu.

Tabulka 4

Analytická data pro shora popsané konjugáty

	Koncentrace proteinu, µg/l	Koncentrace PS µg/l	Procenta PS v konjugátu
Pn14-TT (3)	547	293 (1)	35
GBSII-TT (3)	377	160 (2)	30
GBSIII-TT (3)	365	115 (2)	24
K1-rPorB I (3)	147	17 (2)	10
K1-rPorB II (4)	406	41 (2)	9
K1-S-rPorB (3)	188	25 (2)	12
GCMP-S-rPorB (3)	200	43 (2)	18

(1) Celkový Dubois-esej sacharidů

(2) Esej resorcinolsilalová kyselina

(3) Připraven přímým spojením N-akryloylovaného polysacharidu a odpovídajícího proteinového nosiče

(4) Kontrolní konjugát připravený reduktivní aminací jodistanem zoxidovaného N-akryloylovaného K1 PS s rPorB

Příklad 2

Imunogenicita a potence konjugátu polysacharid-proteinový nosič s β -propionamidovým spojením

Preklinické hodnocení konjugátů u myši

Imunoeseje: protilátka v séru vůči každému polysacharidovému konjugátu byla měřena pomocí ELISA. Konjugáty albuminu lidského séra (HSA) (Sigma, St. Louis, MO), použité při ELISA esejích, byly připraveny reduktivní aminací. Oxidované polysacharidy byly přidány do HSA a následovala reduktivní aminace s NaCNBH_3 . Konjugáty byly izolovány gelovou filtrační chromatografií a vysušené vymrazením byly uchovávány při -70°C . Titry protilátek pro PS specifické byly stanoveny pomocí ELISA následovně. Polystyrenové mikrotitrační desky o 96-jamkách s plochým dnem (NUNC Polysorb) (Nunc, Naperville, IL) byly po $0,25\text{ }\mu\text{g}$ na jamku ($100\text{ }\mu\text{l/jamka}$) pokryty PS-HSA konjugáty v PBS ($0,01\text{ M}$ fosforečnan sodný, $0,15\text{ M}$ NaCl, pH 7,5), inkubovány 1 hodinu při 37°C s následujícím promytím (5-krát) pomocí PBS-Tween ($0,05\text{ obj.} - \% \text{ Tween } 20$ v PBS). Všechny potom následující inkubace byly prováděny při teplotě místnosti. Pro všechna požadovaná promývání byl používán PBS-Tween. Pokryté desky byly potom pro IgG ELISA 1 hodinu po $0,15\text{ ml}$ na jamku blokovány PSB-BSA ($0,5\text{ }\%$ hm./obj. albuminem hovězího séra v PSB) nebo pro IgM ELISA $0,1\text{ }\%$ hm./obj netučného sušeného mléka Carnation s následným promytím. Séra byla dvojmo dvakrát zředěna v misce se $100\text{ }\mu\text{l/jamka}$ a 1 hodinu inkubovány s následným promytím. Konjugát protilátky (peroxidázou labelovaný "goat anti-mouse", Kirkegaard & Perry Lab, Gaithersburg, MD) byl přidán ke $100\text{ }\mu\text{l/jamka}$ a inkubován 30 minut s následným promytím. Roztok barviva a substrátu 1:1 (Kirkegaard & Perry TMB) a peroxid byl přidán po $0,05\text{ ml}$ na jamku a 10 minut inkubován. Reakce peroxidázy byla potom zastavena 1 M H_3PO_4 po $0,05\text{ ml}$ na jamku a deska byla odečtena na Molecular Devices Emax smímači mikrodesek (Molecular Devices, Menlo Park, CA) při vlnové délce 450 nm při použití 650 nm jako referenční vlnové délky. Absorbance pozadí byly stanoveny u několika kontrolních jamek bez séra a zprůměrovány pro každou desku. Pro každé ředění séra byla průměrná absorbance pozadí odečtena a dvojí hodnoty absorbance séra byly

zprůměrovány. Pro následující analýzu dat byl použit modifikovaný Scatchard diagram, kde absorbance (osa y) byla vyhodnocována proti absorbanci krát převrácená hodnota ředění (osa x) (odkaz). Pro podmínky dovolující rovnováhu a přebytek protilátky byla pro každou serii ředění séra získána přímka; tato čára byla pro určení titru protilátky extrapolována na osu x. Aby se získala reference, ke které byla všechna séra standardisována, minimisující variace desky k desce a den ke dni, bylo pro každou desku použito pozitivní kontrolní sérum s předtím stanoveným titrem antilátky. Výsledky těchto analýz jsou uvedeny v tabulkách 5, 6 a 7.

Opsonofagocytární eseje (OP): opsoninová aktivita myšího antiséra ke streptokokálnímu B (GBS) a pneumokokálnímu konjugátům byla testována v opsonofagocytárních umrtvujících esejích za použití řady buněk lidské promyelocytární leukemie HL-60 (ATCC No. CCL 240). Stručně 200 cfu buněk GBS typ III druh M781 nebo druh pneumokokálního typu 14 bylo smíšeno se stejným objemem séra protilátek a za míchání bylo inkubováno 15 minut při 35°C v inkubátoru s 5 % CO₂. Ke směsi byly přidány komplement z králíčích mláďat a HL-60 buňky (5×10^5) kultivované 5 dní v přítomnosti 90 mM DMF a za třepání bylo inkubováno 1 hodinu při 37°C. Pro kvantitativní kulturu byly odebrány alikvotní podíly. Titry byly stanoveny extrapolací zředění protilátky odpovídající padesáti procentům živých bakterií. Výsledky těchto esejů jsou v tabulce 5 uvedeny pro konjugáty pneumokokálního typu 14 a v tabulce 6 pro konjugáty GBS typu III.

Baktericidní esej séra (SBA): protilátka závislá na komplementem zprostředkované baktericidní aktivitě byla měřena v údajích baktericidního titru, nebo recipročního zředění, které poskytují 50 %-ní úmrtnost cílových bakterií. Komplement byl ve všech sérech nejprve 30 minut inkubován při 56°C. Potom byly pro každé sérum ve sterilních mikrotitračních deskách o 96-jamkách s U-dnem (Sigma) vytvořeny dvojité serie ředění s GBSS s konečným objemem 50 µl na jamku. Komplement ze séra králíčích mláďat (Pel-Freez, Brown Deer, WI) byl 1:1 zředěn s účinnou koncentrací GBM bakterií (serotyp 15 kmen, 44/76) nebo skupinou C meningokokálního C11 referenčního kmene a do každé jamky bylo přidáno 50 µl obsahujících zředěné sérum za vzniku konečného objemu reakční směsi 100 µl na jamku. Tato reakční směs, která obsahovala 50 % séra (tepelně inaktivovaného a zředěného), 25 % komplementu králíčího séra a 25 % bakterií (v účinné koncentraci)

byla při 37°C inkubována ve vlhčeném inkubátoru s 5 % CO₂ 60 minut na třepačce pro mikrotitrační desku (LKB-Wallac; pharmacia Biotech) při vysoké rychlosti.

Všechny jamky byly potom pokryty čokoládovým agarem nanesením 30 µl na desku. Bakteriální vzorky v čase nula byly rovněž pokryty. Jako předtím byly všechny desky inkubovány přes noc. Kolonie tvořící jednotky (cfu) byly potom spočítány automatickým počítačem kolonií od Imaging Products International (Chantilly, VA), při čemž byl brán průměr ze tří měření na desku. Reciproká hodnota ředění nebo titr, které udávaly 50 % úmrtnost, byla odečtena přímo ze sestrojeného grafu, kde osa x představovala dekadický logaritmus odpovídající reciproké hodnoty ředění a osa y představovala procenta přežití. Výsledky tohoto eseje jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 5

Imunogenicita konjugátů pneumokokální 14-toxoid tetanu

Vakcina / adjuvant	Elisa 0.den	Elisa 28.den	Elisa 38. den	Elisa 59. den	OP 59.den
Kontrola / solanka	<50	2.250	29.000	32.600	3.100
Kontrola / kamenec	<50	18.200	99.000	265.000	25.000
Pn14-TT / solanka	<50	4.600	89.000	59.200	3.900
Pn14-TT / kamenec	<50	27.000	185.000	251.000	26.000
PBS / kamenec	<50	<50	<50	<50	<50

Kontrolní vakcinou byl konjugát polysacharid typ 14 - toxoid tetanu připravený reduktivní aminací. Konjugát Pn14-TT byl produktem přímého spojení mezi N-akryloylovaným pneumokokálním polysacharidem typu 14 a toxoidem tetanu.

Pro tuto studii byly skupině 10 CD1 myši (Charles River Laboratory), ve stáří 6-8 týdnů, subkutánně injektovány 2,0 µg konjugovaného polysacharidu ve dni 0, 28 a 38. Zvířatům byla odebírána krev ve dni 0, 28 a 38 a 59. den se nechala vykrvácet. ELISA analýzy byly prováděny za použití konjugátu Pn14 polysacharid - HSA připraveného reduktivní aminací. ELISA titry uvedené v tabulce 5 představují celková IgG. Uvedené OP titry jsou proti pneumokokálnímu kmenu typu 14.

Tabulka 6
Imunogenicita konjugátů GBS typu III

Vakcína / adjuvant	Elisa 0.den	Elisa 21.den	Elisa 42. den	Elisa 52. den	OP 52.den
Kontrolní konjugát / kamenec	<50	900	1.800	3.000	170
GBS III-TT / kamenec	<50	500	8.500	25.000	3.100
PBS / kamenec	<20	<20	<20	<20	<20

Kontrolní konjugátovou vakcinou byl konjugát GBS typ III - toxoid tetanu připravený reduktivní aminací jodistanem oxidovaného polysacharidu GBS typu III a toxoidu tetanu. Konjugát GBS III - TT byl produktem přímého spojení mezi N-akryloylovaným polysacharidem typu III a toxoidem tetanu.

Pro tuto studii byly skupině 10 CD1 myši (Charles River Laboratory), ve stáří 6-8 týdnů, subkutánně injektovány 2,0 µg konjugovaného polysacharidu ve dni 0, 21 a 42. Zvířatům byla odebírána krev ve dni 0, 21, 42 a 52. den se nechala vykrváct. ELISA analýzy byly prováděny za použití polysacharidu GBS typu III spojeného s albuminem lidského séra; titry uvedené v tabulce 6 představují celková IgG pro polysacharid typu III.

Tabulka 7
Imunogenicita konjugátů E. Coli K1

Vakcína / adjuvant	Elisa 0.den	Elisa 28.den	Elisa 42. den	Elisa 52. den	SBA 52.den
K1-rPorB II / kamenec Kontrolní podíl 1	<50	1.000	39.000	106.000	450
K1-rPorB II / kamenec Kontrolní podíl 2	<50	450	124.000	250.000	1.000
K1-rPorB I / kamenec Podíl 1	<50	220	27.000	96.000	810
K1-rPorB I / kamenec Podíl 2	neurčeno	neurčeno	24.000	71.000	3.800
K1-S-rPorB / kamenec Podíl 1	neurčeno	neurčeno	45.000	114.000	2.600
K1-S-rPorB / kamenec Podíl 2	neurčeno	neurčeno	41.000	94.000	1.700
PBS / kamenec	<50	<50	<50	<50	<50

Kontrolní vakcinou (K1-rPorB II) byl produkt reduktivní aminace jodistanem oxidovaného N-akryloylovaného K1 polysacharidu a toxoidu tetanu. K1-rPorB I vakcína byla produktem přímého spojení mezi N-akryloylovaným K1 polysacharidem a toxoidem tetanu. K1-S-rPorB byl produktem přímého spojení thiolovaného porinu rPorB a N-akryloylovaného K1 polysacharidu.

Pro tyto studie byly skupiny 10 CD1 myší (starých 4-6 týdnů) z Charles River Laboratory, intraperitoneálně imunizovány ve dnech 0, 28 a 42. Zvířatům byla odebírána krev ve dnech 0, 28, 42 a 52. den se nechala vykrváčet. ELISA titry byly měřeny za použití N-propionylovaného K1 polysacharidu GBS typu III spojeného s albuminem lidského séra. Titry uvedené v tabulce 7 představují celková IgG vůči modifikovanému N-propionylovanému K1 polysacharidu. Baktericidní aktivity séra (SBA) vůči *N. meningitidis* skupina B serotyp kmene 15 H44/76 pro krev odebranou 52. den jsou v tabulce 7 rovněž uvedeny.

Tabulka 8
Imunogenicita GCMP konjugátů

Vakcína / adjuvant	ELISA 38.den	SBA 38. den
GCMP-S-rPorB/ kamenec Podíl 1	44.000	2.100
GCMP-S-rPorB/ kamenec Podíl 2	43.000	2.800
PBS / kamenec	<50	<50

GCMP-S-rPorB byl produktem přímého spojení N-akryloylovaného meningokokálního polysacharidu skupiny C (GCMP) a thiolovaného rPorB. Pro tyto studie na zvířatech byly skupině 10 odchovaným samicím Swiss Webster myší (stáří 6-8 týdnů), subkutánně injektovány 2,0 µg dávky konjugovaného polysacharidu ve dni 0, 28. Zvířata se nechala 28. vykrváčet. ELISA titry vůči polysacharidu skupiny C byly měřeny za použití GCMP konjugovaného s albuminem lidského séra. Baktericidní titry séra byly získány za použití meningokokálního C11 referenčního kmene.

Odkazy

1. Anderson P., Peter G., Johnson R.B., Wetterlow L. H. a Smith D.H. **1972**. Immunization of humans with polyribosylphosphate, the capsular antigen of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Clin. Invest.* 51: 39-44.
2. Avery O.T. a Goebel W.F. **1931**. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-protein V. The immunological specificity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of type 3 pneumococcus with foreign protein. *J. Exp. Med.* 54:437-447.
3. Baker C.J. a Kasper D.L. **1985**. Group B streptococcal vaccines. *Rev. Inf. Dis.* 7:458-467.
4. Baker C.J., Rench M.S., Edwards M.S., Carpenter R.J., Hays B.M. a Kasper D.L. **1988**. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B *Streptococcus*. *N. Engl. J. Med.* 319:1180-1185.
5. Baker C.J., Rench M.S. a Kasper D.L. **1990**. Response to Type III polysaccharide in women whose infants have an invasive Group B streptococcal infection. *New. Engl. J. Med.* 322:1857-1860.
6. Baltimore R.S., Kasper D.L. a Vecchitto J. **1979**. Mouse protection test for group B *Streptococcus* type III. *J. Infect. Dis.* 140:81-86.
7. Bednar B. a Hennessey J.P. **1993**. Molecular size analysis of capsular polysaccharide preparations from *Streptococcus pneumoniae*. *Carbohydr. Res.* 243:115-130.
8. Beri R.G., Walker J., Reese E.T. a Rollings J.E. **1993**. Characterization of chitosans via coupled size-exclusion chromatography and multiple-angle laser light-scattering technique. *Carbohydr. Res.* 238:11-26.
9. Bradford M.M. **1976**. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72:248-254.
10. D'Ambra A.J., Baugher J.E., Concannon P.E., Pon R.A. a Michon F. **1997**. Direct and indirect methods for molar-mass analysis of fragments of the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *Anal. Biochem.* 250(2):228-236.
11. Dick W.E. Jr. a Beurret M. **1989**. Glycoconjugates of bacterial carbohydrate antigens, str. 48-114 v: *Conjugate Vaccines Contribution to Microbiology and Immunology*. Cruse J.M. a Lewis Jr. R.E. (editoři), S. Karger Basel.

12. Dillon H.C. Jr., Khare S. a Gray B.M. **1987**. Group B streptococcal carriage and disease. A 6-year prospective study. *J. Pediat.* 110:31-36.

13. Goebel W.T a Avery O.T. **1931**. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins IV. The synthesis of the p-aminobenzyl ether of the soluble specific substance of type 3 pneumococcus and its coupling with protein. *J. Exp. Med.* 54:431-436.

14. Gold R., Lepow M.L., Goldschneider I., Draper T.L. a Goschlich E.C. **1975**. Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants. *J. Clin. Invest.* 56:1536-1547.

15. Gold R., Lepow M.L., Goldschneider I. a Goschlich E.C. **1977**. Immune response of human infants to polysaccharide vaccines of Group A and C *Neisseria meningitidis*. *J. Infect. Dis.* 136S:S31-S35.

16. Gold R., Lepow M.L., Goldschneider I., Draper T.L. a Goschlich E.C. **1978**. Antibody responses of human infants to three doses of Group A *Neisseria meningitidis* vaccine administered at two, four and six months of age. *J. Infect. Dis.* 138:731-735.

17. Hennessey J.P., Bednar B. a Manam V. **1993**. Molecular size analysis of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *J. Liq. Chromat.* 16:1715-1729.

18. Howard J.G., Christie G.H., Courtenay B.M., Leuchars E. a Davies. **1971**. Studies on immunological paralysis. VI. Thymic-independence of tolerance and immunity to type III pneumococcal polysaccharide. *Cell. Immunol.* 2:614-626.

19. Jennings H.J., Katzellenbogen E., Lugowski C. a Kasper D.L. **1983**. Structure of the native polysaccharide antigens of type Ia and type Ib Group B *Streptococcus*. *Biochemistry* 22: 1258-1263.

20. Jennings H.J., Rossel K.-G. a Kasper D.L. **1980**. Structural determination and serology of the native polysaccharide antigen of type III Group B *Streptococcus*. *Can. J. Biochem.* 58:112-120.

21. Jennings H.J., Rossel K.-G. a Kasper D.L. **1980**. Structure and serology of the native polysaccharide antigen of type Ia Group B *Streptococcus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77:2931-2935.

22. Jennings H.J., Rossel K.-G. Katzellenbogen E. a Kasper D.L. **1983**. Structural determination of the capsular polysaccharide antigen of type II Group B *Streptococcus*. *J. Biol. Chem.* 258:1793-1798.

23. Jennings H.J. a Sood R.K. **1994**. Synthetic glycoconjugates as human vaccines. str. 325-371 v Lee Y.C. a Lee R.T., Neoglycoconjugates as human vaccines: Preparation and applications. Academic Press, New York.

24. Kasper D.L., Baker C.J., Baltimore R.S., Crabb J.H., Schiffman G. a Jennings H.J. **1979**. Immunodeterminant specificity of human immunity to type III group B Streptococcus. J. Exp. Med. 149:327-339.

25. Knobloch J.E. a Shaklee P.N. **1997**. Absolute molecular weight of low-molecular-weight heparins by size-exclusion chromatography with multiangle laser light scattering detection. Anal. Biochem. 245: 231-141.

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

27. Lancefield R.C. **1938**. A micro-precipitin technique for classifying haemolytic streptococci and improved methods for producing antigen. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 38:473-478.

28. Lancefield R.C., McCarty M. a Everly W.N. **1975**. Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci: Special reference to antibodies effective against protein antigens. J. Exp. Med. 142:165-179.

29. Madoff L.C., Paoletti L.C., Tai J.Y. a Kasper D.L. **1994**. Maternal immunization of mice with Grup B streptococcal type III polysaccharide-beta C protein conjugate elicits protective antibody to multiple serotypes. J. Clin. Invest. 94:286-292.

30. Marques M.B., Kasper D.L. Shroff A., Michon F., Jennings H.J. a Wessels M.R. **1994**. Functional activity of antibodies to the group B polysaccharide of group B streptococci elicited by a polysaccharide-protein conjugate vaccine. Infect. Immun. 62:1593-1599.

31. Mäkelä P.R.H., Peltola H., Kayhty H. a spol. **1977**. Polysaccharide vaccines of group A Neisseria meningitides and Haemophilus influenzae type b: A field trial in Finland. J. Infect. Dis. 136:S43-50.

32. Michon F., Brisson J.R., Dell A., Kasper D.L. a Jennings H.J. **1988**. Multiantennary group-specific polysaccharide of group B Streptococcus, Biochem. 27:5341-5351.

33. Peltola H., Käyhty H., Sivonen A. a Mäkelä P.R.H. **1977**. Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide vaccine in children: A double blind field study of 100.000 vaccines 3 months to 5 years of age in Finland. Pediatrics 60:730-737.

34. Peltola H., Mäkelä P.R.H., Jousimies a spol. **1977**. Clinical efficacy of meningococcal group A vaccine in children three months to five years of age. *N. Engl. J. Med.* 297:686-691.

35. Reuter G. a Schauer R. **1994**. Determination of sialic acids, str. 168-199 v Lennarz W.J. a Hart G.W., *Methods in Enzymology Vol. 230 Techniques in Glycobiology*, Academic Press, New York.

36. Robbins J.B. a Schneerson R. **1990**. Polysaccharide-protein conjugates: A new generation of vaccines. *J. Infect. Dis.* 161:821-832.

37. Smith A.L. a Haas J. **1991**. Neonatal Bacterial Meningitis, str. 313-333 v: Scheld W.M., Whitley R.J. a Durack, *Infections of the Central Nervous System*. Raven Press Ltd., New York.

38. Tsunashima T., Moro K., Chu B. a Liu T.-Y. **1978**. Characterization of group C meningococcal polysaccharide by light-scattering spectroscopy.III. Determination of molecular weight, radius of gyration, and translational diffusional coefficient. *Biopolymers* 17: 251-265.

39. von Hunolstein C., Nicolini L., D'Ascenzi S., Volpe C., Alfaroni G. a Orefici G. **1993**. Sialic acid and biomass production by *Streptococcus agalactiae* under different conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:458-462.

40. Wessels M.R., Benedi W.J., Jennings H.J., Michon F., DiFabio J.L. a Kasper D.L. **1989**. Isolation and characterization of type IV group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* 57:1089-1094.

41. Wessels M.R., DiFabio J.L., Benedi W.J. a spol. **1991**. Structural determination and immunochemical characterization of type V group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *J. Biol. Chem.* 266:6714-6719.

42. Wessels M.R., Paoletti L.C., Kasper D.L. a spol. **1990**. Immunogenicity in animals of a polysaccharide-protein conjugate vaccine against type III group B *Streptococcus*. *J. Clin. Invest.* 86:1428-1433.

43. Wessels M.R., Paoletti L.C., Rodewald A.K. a spol. **1990**. Stimulation of protective antibodies against type Ia and Ib group B streptococci by a type Ia polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *Infect. Immun.* 61:4760-4766.

44. Wessels M.R., Poszgay V., Kasper D.L. a Jennings H.J. **1987**. Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsule polysaccharide of Type III Group B *Streptococcus*: A revised structure for Type III Group B streptococcal polysaccharide antigen. *J. Biol. Chem.* 262:8262-8267.

45. Wyle S.A., Artenstein M.S., Brandt B.L. a spol. **1972**. Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines. J. Infect. Dis. 126:514-522.
46. Romanowska A., Meunier S.J., Tropper F.D., LaFerriere C.A. a Roy R. **1994**. Michael Additions for Synthesis of Neoglycoproteins. Methods in Enzymology. Vol. 242:90-101.
47. Orellana A. a Hirshberg C.B. **1994**. Molecular Cloning and Expression of a Glycosaminoglycan N-Acetylglucosaminyl N-Deacetylase / N-Sulfotransferase from Heparin-producing Cell Line. J. Biol. Chem. Vol. 269, No 3, str. 2270-2276.
48. Cheung W-F., Eriksson I., Kusche-Gullberg M., Lindahl U. a Kjellén L. **1996**. Expression of the Mouse Mastocytoma Glucosaminyl N-Deacetylase / N-Sulfotransferase in Human Kidney 293 Cells Results in Increased N-Sulfation of Heparan Sulfate. Biochem 35:5250-5256.
49. Kusche-Gullberg M., Eriksson I., Sandback Pikas D. a Kjellen L. **1998**. Identification and Expression in Mouse of Two Heparan Sulfate Glucosaminyl N-Deacetylase / N-Sulfotransferase Genes. J. Biol. Chem. Vol. 273, No 19, str. 11902-11907.
50. Finke A., Bronner A., Nikolaev A.V. Jann B. a Jann K. **1991**. Biosynthesis of the *Escherichia coli* K5 Polysaccharide, a Representative of Group II Capsular Polysaccharides: Polymerization In Vitro and Characterization of the Product. J. Bacteriology 173, No 13:4088-4094.
51. Dubois M. a spol. **1965**. Colormetric Method for the Determining of Sugars and Related Substance. Analytic. Chem. Vol. 28: 350-366.

03.04.01
P1 2001-622
~~25405~~

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein obsahující N-propionylovaný polysacharid nebo N-propionylovaný oligosacharid přímo konjugovaný na protein v β -poloze propionátového podílu.

2. Konjugát polysacharid-protein podle nároku 1, kde protein obsahuje neméně jeden lysinový nebo cysteinový zbytek.

3. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 1, kde polysacharid nebo oligosacharid je získán z bakterií, kvasinek, rakovinných buněk nebo je chemicky syntetizován.

4. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 1, kde polysacharid nebo oligosacharid je získán z *Escherichia coli*, *Meningococcus*, *Pneumococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Klebsiella* nebo *Pseudomonas*.

5. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 1, kde polysacharid nebo oligosacharid je získán ze streptokoku skupiny B vybraného ze skupiny sestávající ze sérotypu Ia, sérotypu Ib, sérotypu II, sérotypu III, sérotypu V, sérotypu VIII a jejich kombinací.

6. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 4, kde polysacharid nebo oligosacharid je získán ze skupiny *Meningococcus* vybrané ze skupiny sestávající ze skupiny B, skupiny C, skupiny Y, skupiny W135 a jejich kombinací.

7. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 4, kde polysacharid nebo oligosacharid je získán z *E. coli* K1, *E. coli* K92, *Pneumococcus* typu 4, *Pneumococcus* typu 14, *Streptococcus* skupiny A, *Streptococcus* skupiny C nebo jejich kombinací.

8. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 1, kde protein je zvolen ze skupiny, kterou tvoří toxoid tetanu, toxoid difterie, protein vnější membrány *Neisseria meningitidis*, pneumolysoid, C- β protein ze skupiny B *Streptococcus* a IgA nevážající C- β protein ze skupiny B *Streptococcus*.

9. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 8, kde protein je produkován rekombinantně.

10. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 9, kde proteinem je rekombinantní protein vnější membrány *N. meningitidis*.

11. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 1, kde polysacharid nebo oligosacharid obsahuje glykosaminoglykan.

12. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 1, kde polysacharid nebo oligosacharid obsahuje glykosylové zbytky opakujících se strukturních jednotek mající alespoň jednu volnou aminoskupinu nebo N-acylskupinu.

13. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 12, kde glykosylový zbytek je zvolen ze skupiny, kterou tvoří glukosamin, galaktosamin, mannosamin, fukosamin a sialová kyselina.

14. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 1, kde N-propionylovaný polysacharid nebo N-propionylovaný oligosacharid je přímo spojen s volnou ϵ -aminoskupinou lysinového zbytku nebo thiolovou skupinou cysteinového zbytku proteinu.

15. Konjugát polysacharid-protein, obsahující konjugát N-propionylovaný polysacharid *Streptococcus pneumoniae* typ 14 - toxoid tetanu, konjugát N-propionylovaný polysacharid skupiny B streptokoku typ III - toxoid tetanu, konjugát N-propionylovaný polysacharid skupiny B streptokoku typ II - toxoid tetanu,

konjugát N-propionylovaný polysacharid *E. coli* K1 - toxoid tetanu nebo konjugát N-propionylovaný meningokokální C polysacharid - toxoid tetanu.

16. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein, získaný způsobem, který sestává z:

A) N-deacetylace izolovaného polysacharidu nebo oligosacharidu za použití N-deacetylačního činidla za vzniku N-deacetylovaného polysacharidu nebo N-deacetylovaného oligosacharidu,

B) N-akryloylace N-deacetylovaného polysacharidu nebo N-deacetylovaného oligosacharidu akryloylačním činidlem za vzniku N-propionylovaného polysacharidu nebo N-propionylovaného oligosacharidu a

C) přímého napojení N-propionylovaného polysacharidu nebo N-propionylovaného oligosacharidu na protein pro vytvoření konjugátu polysacharid-protein nebo konjugátu oligosacharid-protein.

17. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 16, kde polysacharid nebo oligosacharid je získán z bakterií, kvasinek, rakovinných buněk nebo je chemicky syntetizován.

18. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 16, kde konjugace je prováděna při pH kolem 7,0.

19. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 16, kde konjugace je prováděna při pH nad 9.

20. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 16, kde konjugace je prováděna v činidle, které je voleno ze skupiny, kterou tvoří fosfát, pufr karbonát / bikarbonát a borátový pufr.

21. Konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 16, kde N-acetylačním činidlem je base nebo enzym a akryloylační činidlo je voleno ze skupiny tvořené N-akryloylchloridem, akryloylanhydridem, akrylovou kyselinou a dehydratačním činidlem.

22. Farmaceutická kompozice, vyznačující se tím, že obsahuje konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 1 nebo 16 a farmaceuticky přijatelný nosič.

23. Farmaceutická kompozice podle nároku 22, vyznačující se tím, že dále obsahuje adjuvans.

24. Farmaceutická kompozice podle nároku 24, vyznačující se tím, že adjuvans je zvoleno ze skupiny, kterou tvoří kamenec nebo stearyltyrosin.

25. Farmaceutická kompozice podle nároku 22, vyznačující se tím, že dále obsahuje druhou komponentu, přičemž tato druhá komponenta je zvolena ze skupiny, kterou tvoří DTP, DTaP, Td, DTaP-Hib, DTaP-IPV-Hib a jejich kombinace.

26. Imunogen obsahující konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 1 nebo 16, kde tento imunogen vyvolává polysacharid-specifickou nebo oligosacharid-specifickou imunitní odezvu.

27. Imunogen podle nároku 26, vyznačující se tím, že imunitní odezvou je vytvoření polysacharid-specifického nebo oligosacharid-specifického imunoglobulinu.

28. Imunogen podle nároku 26, vyznačující se tím, že imunoglobulinem je IgG, IgM, IgA nebo jejich kombinace.

29. Způsob přípravy konjugátu polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením nebo konjugátu oligosacharid-protein s β -propionamidovým spojením, vyznačující se tím, že zahrnuje:

A) N-deacetylaci polysacharidu nebo oligosacharidu za použití N-deacetylačního činidla za vzniku N-deacetylovaného polysacharidu nebo N-deacetylovaného oligosacharidu,

B) N-akryloylaci N-deacetylovaného polysacharidu nebo N-deacetylovaného oligosacharidu akryloylačním činidlem za vzniku β -propionylovaného polysacharidu nebo β -propionylovaného oligosacharidu a

C) přímé napojení β -propionylovaného polysacharidu nebo β -propionamido oligosacharidu na protein pro vytvoření konjugátu polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením nebo konjugátu oligosacharid-protein s β -propionamidovým spojením.

30. Způsob podle nároku 29, vyznačující se tím, že N-acetylačním činidlem je base nebo enzym.

31. Způsob podle nároku 29, vyznačující se tím, že N-acetylační činidlo je voleno ze skupiny, kterou tvoří NaOH, KOH a LiOH.

32. Způsob podle nároku 29, vyznačující se tím, že N-akryloylační činidlo je voleno ze skupiny, kterou tvoří akryloylchlorid, akryloylanhydrid, akrylová kyselina a dehydratační činidlo.

33. Způsob podle nároku 29, vyznačující se tím, že polysacharid nebo oligosacharid je získáván z bakterií, kvasinek, rakovinných buněk nebo je chemicky syntetizován.

34. Způsob podle nároku 29, vyznačující se tím, že polysacharid nebo oligosacharid je získáván z *Escherichia coli*, Meningococcus, Pneumococcus, Streptococcus, Haemophilus, Neisseria, Salmonella, Klebsiella nebo Pseudomonas.

35. Způsob podle nároku 29, vyznačující se tím, že protein je volen ze skupiny, kterou tvoří toxoid tetanu, toxoid difterie, protein neisseriální vnější membrány, pneumolysoid, C- β protein ze skupiny B Streptococcus a IgA nevážající C- β protein ze skupiny B Streptococcus.

36. Způsob podle nároku 29, vyznačující se tím, že protein je produkován rekombinantně.

37. Vakcína obsahující konjugát polysacharid-protein nebo konjugát oligosacharid-protein podle nároku 1 nebo 16, vyznačující se tím, že tato vakcína poskytuje protektivní imunitu proti organismu nebo buňce způsobující nemoc.

38. Vakcína podle nároku 37, vyznačující se tím, že nemoc způsobující organismus nebo buňka je zvolena ze skupiny, kterou tvoří bakterie, kvasinky a rakovinné buňky.

39. Vakcína podle nároku 38, vyznačující se tím, že bakterie jsou *Escherichia coli*, Meningococcus, Pneumococcus, Streptococcus, Haemophilus, Neisseria, Salmonella, Klebsiella nebo Pseudomonas.

40. Vakcína podle nároku 37, vyznačující se tím, že dále obsahuje druhý imunogen v kombinaci s konjugátem polysacharid-protein nebo konjugátem oligosacharid-protein, přičemž tento druhý imunogen je zvolen ze skupiny, kterou tvoří DTP, DTaP, Td, DTaP-Hib, DTaP-IPV-Hib a jejich kombinace.

41. Použití vakcíny podle nároku 37 pro výrobu léčiva k imunizaci savce proti nemoc způsobujícímu organismu nebo buňce.

42. Použití vakcíny podle nároku 37 pro výrobu léčiva k imunizaci savce proti *Streptococcus pneumoniae*.

43. Použití vakcíny podle nároku 37 pro výrobu léčiva k imunizaci savce proti skupině B Streptococcus

44. Použití vakcíny podle nároku 37 pro výrobu léčiva k imunizaci savce proti skupině B *Neisseria meningitidis*

45. Použití vakcíny podle nároku 37 pro výrobu léčiva k imunizaci savce proti skupině C *Neisseria meningitidis*.

46. Použití vakcíny podle nároku 37 pro výrobu léčiva k imunizaci savce proti *Haemophilus influenzae* typu B.

47. Použití konjugátu polysacharid-protein nebo konjugátu oligosacharid-protein podle nároku 1 nebo 16 pro výrobu léčiva k vyvolávání odezvy protilátky na polysacharid nebo oligosacharid u savce.

48. Imunoglobulin nebo jeho antigen-vázací fragment, získaný způsobem podle nároku 47.

49. Imunoglobulin podle nároku 48, vybraný ze skupiny, kterou tvoří IgG protilátka, IgM protilátka, IgA protilátka a jejich kombinace.

50. Imunoglobulin podle nároku 49, kde protilátkou je izolovaný IgG.

51. Isolovaná protilátka nebo její antigen-vázací fragment, vyvolané jako odezva na konjugát polysacharid-protein s β -propionamidovým spojením nebo konjugát oligosacharid-protein s β -propionamidovým spojením podle nároku 1 a 16, přičemž tato protilátka nebo její antigen-vázací fragment je specificky imunoreaktivní s N-propionylovaným polysacharidem nebo s N-propionylovaným oligosacharidem a imunoreaktivní s nativním N-acetylovaným polysacharidem, z něhož byl β -propionylovaný polysacharid nebo β -propionylovaný oligosacharid odvozen.

52. Protilátka nebo její antigen-vázací fragment podle nároku 51, kde nativní N-acetylovaný polysacharid je komponentem bakterií, kvasinek nebo rakovinných buněk.

53. Protilátka nebo její antigen-vázací fragment podle nároku 52, kde polysacharid pochází z *Escherichia coli*, Meningococcus, Pneumococcus, Streptococcus, Haemophilus, Neisseria, Salmonella, Klebsiella nebo Pseudomonas.

54. Protilátka nebo její antigen-vázací fragment podle nároku 51, kde protilátka je produkována rekombinantně.

55. Použití imunoglobulinu nebo protilátky podle nároku 48 nebo 51 k výrobě léčiva k pasivní imunizaci proti nemoc způsobujícímu organismu nebo buňkám.

56. Použití podle nároku 55, kde imunoglobulin je izolovaná IgG protilátka nebo její antigen-vázací fragment.

57. Použití podle nároku 55, kde imunoglobulin je izolovaná IgM protilátka nebo její antigen-vázací fragment.

58. Použití podle nároku 55, kde imunoglobulin je izolovaná IgA protilátka nebo její antigen-vázací fragment.

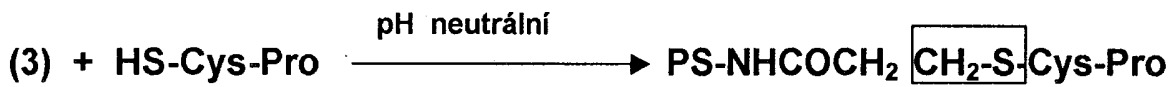
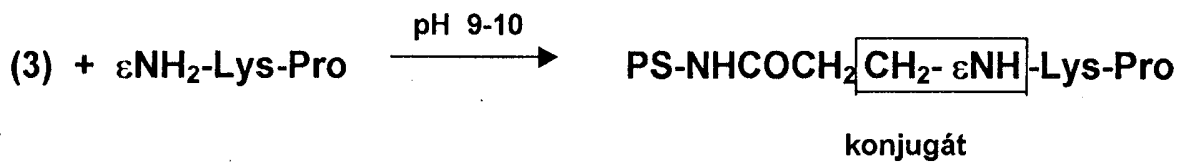
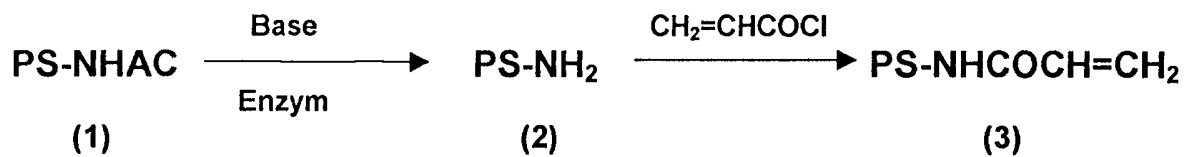
42-

03.04.01

PV 2001-622

25405

OBRÁZEK 1



PS = polysacharid

Pro = protein