

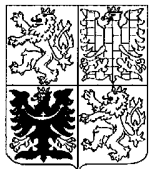
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2375

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18.12.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **24.12.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9727262**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/08562**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/33488**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/00

A 61 K 39/09

//(A 61 P 37/00)

(71) Přihlašovatel:

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A.,
Rixensart, BE;

(72) Původce:

Dalemans Wilfried L. J., Rixensart, BE;
Laferriere Craig Antony Joseph, Rixensart, BE;
Prieels Jean-Paul, Rixensart, BE;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Vakcína

(57) Anotace:

V tomto řešení se popisují vakcinační prostředky obsahující T-nezávislé nebo polysacharidové konjugační vakcíny, kde se jako adjuvans používá imunostimulační CpG oligonukleotid.

CZ 2000 - 2375 A3

Vakcína

Oblast techniky

Vynález se vztahuje k novým vakcinačním formulacím a ke způsobu jejich produkce a jejich použití v medicíně.

Dosavadní stav techniky

Imunomodulační oligonukleotidy obsahující nemetylované CpG dinukleotidy (CpG) jsou dobře známy v oboru (WO 96/02555, EP 468520). CpG je zkratka dinukleotidového motivu cytozin-guanozin přítomného v DNA. Zjistilo se, že frakce DNA BCG mohou vykazovat protinádorový účinek. V další studii se ukázalo, že syntetické oligonukleotidy odvozené genových sekvencí BCG jsou schopny indukovat imunomodulační účinky (jak in vitro tak in vivo). Dále se zjistilo, že jisté palindromické sekvence, které zahrnují ústřední motiv GC, nesou tuto aktivitu (Tokunaga, T. et al., Microbial. Immunol. 36: 55 (1992)). Důležitá role motivu GC v imunostimulaci se později popisuje v publikaci Krieg, Nature, 374, p. 546, (1995). Detailní analýza ukázala, že motiv GC má sekvence, které jsou běžné v bakteriální DNA, ale řídce se vyskytují v DNA obratlovců.

Vědci věří, že tento vývojový rozdíl umožňuje imunitnímu systému obratlovců detekovat přítomnost bakteriální DNA (která se objeví během infekce), což vede následně ke stimulaci imunitního systému. Imunostimulační aktivita se prokázala u sekvencí tak malých, že obsahují 15 nukleotidových bazí (popisuje se v publikaci Krieg, et al., Nature 374: 546 (1995)). Dále se v této publikaci uvádí, že CpG motiv nesmí být metylován. Je nutné říci, že oligo musí být v hexamerovém uspořádání: purin purin CG pyrimidin pyrimidin, ale to není obligátní.

Mikroorganismus *Streptococcus pneumoniae* je gram pozitivní bakterie, která je pro lidi patogenní. Způsobuje invazivní onemocnění, jako je pneumonie, bakteriémie a meningitida a onemocnění spojené s kolonizací, jako je akutní otitida. Mechanizmy, kterými se pneumokoci dostávají do plic, do mozkomíšního moku a krve není zcela znám. Růst bakterií, které napadají normální plicní alveolus, se inhibuje jejich relativní suchostí a fagocytovou aktivitou alveolárních makrofágů. Libovolné porušení anatomického a fyziologického uspořádání těchto obranných tendencí zvyšuje náchylnost k infekci plic. Buněčná stěna mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* má důležitou úlohu při vytvoření zánětlivé odezvy ve veolusu plic (popisuje se v publikaci Gillespie et al., I and I 65: 3936). K uvolnění komponentů buněčné stěny dochází na konci cyklu růstu pneumokoků autolýzí způsobenou syntézou proteinu N-acetylmuramoyl-L-alaninamidázy (lytA). DNA je možné uvolnit do infikované oblasti po autolýzi pneumokoků.

Aby organismus dosáhl účinné imunitní odezvy proti bakteriím, které ho napadly, musí vykazovat mechanismy, které koordinují typ imunitní odezvy, pak dochází k zastavení infekce. V případě vnitrobuněčných patogenů dojde ke koordinaci buněčné a humorální imunitní odezvy. Uvedené odezvy se kontrolují buňkami T typu Th1 a Th2. Avšak extrabuněčné bakterie často využívají polysacharid buď ve formě kapsule nebo ve formě lipopolysacharidu, aby samy sebe ochránily před účinky sérového komplementu, který může lyzovat bakterie nebo je činní náchylnými vůči fagocytům, jako jsou makrofágy a neutrofilny.

V tomto případě imunitní odezva jde po jiné dráze, je to T-nezávislá imunitní odezva. T-nezávislá imunitní odezva se může dále rozdělit na typ 1 a typ 2. T-nezávislé antigeny typ 2 mají charakteristiky vyjádřené polysacharidovými antigeny, které zahrnují opakující se antigenní epitopy s velkou molekulovou hmotností, schopnost aktivovat kaskádu

komplementu, jejich schopnost in vivo degradovat a jejich úplná neschopnost stimulovat MGC třída II závislou na pomocných T buňkách (popisuje se v publikaci Mond et al., Annu Rev Immunol 13: 655-92). Antigeny typu 1, které nejsou podobné polysacharidům, jsou mitogenní pro B buňky a zahrnují lipopolysacharidy (LPS). T-nezávislé antigeny typu 2 nemohou stimulovat odezvy u neonatálních myši nebo myši CBA/N, které nesou X-spojený defekt B buněk (xid myši), zatímco antigeny typu 1 tuto odezvu stimulovat mohou.

Antigeny typu 2 vyvolávají slabší imunitní odezvy ve srovnání s T-nezávislými antigeny, jako jsou proteiny. Proteiny jsou schopny aktivovat B buňky a indukovat vylučování protilátek tím, že se zpracovávají do peptidů a vylučují se na povrchu B buňky v kontextu s MHC třída II, což umožňuje B buňce interagovat s T buňkami a obdržet další signály, které jsou nutné pro maximální proliferaci a dozrávání B buněk. Zatímco oligonukleotidy se mohou v některých případech spojovat s MHC třída II (popisuje se v publikaci Ishioka et al., J. Immunol. 148: 2446-2451) a lipidované polysacharidy se spojují s CD1, které se nacházejí na lymfocytech (Fairhurst, R. M. et al., Immunology Today 19: 257 (1998)), kde je znám mechanismus přítomnosti antigenů typu 2 na T buňkách.

Vícenásobně opakující se základ polysacharidového polymerového antigenu může způsobit řetězení receptorů na povrchu B buněk, což vede k aktivaci B buněk mechanismem, který nevykazují T buňky. Polysacharidy tak jsou T-nezávislé antigeny a jsou charakterizovány u zvířat a u dětí produkcí protilátek IgM a nedostatkem posilovací a imunologické paměti. Pouze dospělí lidé mohou produkovat podstatné množství protilátek IgG proti (ale nikoli vůči všem) polysacharidovým antigenům. Schopnost přeměnit izotyp protilátek na protilátky IgG souhlasí s výskytem receptoru komplementu 2 (CR2) na B buňkách u kojenců a u dětí mezi 1,5 a 2 roky a to může jím

poskytnout další signál nutný pro aktivaci a dozrávání B buněk.

Vynález na jednu stranu popisuje vakcinační formulaci, která je schopna vyvolat imunitní odezvu na antigen nezávislý na T buňce. Produkce protilátek IgG na kapsulární polysacharidy bakterií je podstatná, protože vykazuje základní mechanismus ochrany proti těmto bakteriím. Lyze zprostředkovaná komplementem a opsonofagocytóza jsou s tímto izotypem protilátek nejvíce účinné (popisuje se v publikacích Maslanka et al., Clin Diag Lab Immunol 4: 156-67, and Romero-Steiner et al., Clin Diag Lab Immunol 4: 415-22).

Vakcíny založené na polysacharidovém antigenu jsou dobře známy v oboru a čtyři z nich jsou určeny pro používání u lidí. Jsou to Vi polysacharid mikroorganismu *Salmonella typhi*, polysacharid PRP z mikroorganismu *Haemophilus influenzae*, tetravalentní meningokoková vakcína, která obsahuje sérotypy A, C, W135 a Y a 23 valentní pneumokoková vakcína složená z polysacharidů, která odpovídá sérotypům 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 1F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F a 33.

Poslední tři uvedené vakcíny umožňují ochranu proti bakteriím, které způsobují respirační infekce, jenž vedou k vysoké nemocnosti a úmrtnosti kojenců, tyto vakcíny nejsou vhodné pro děti mladších dvou let, protože v této věkové skupině je vakcína slabě imunogenní.

U shora uvedených polysacharidových vakcín se klinická účinnost demonstruje různými způsoby. Odhadlo se, že vakcína obsahující polysacharid Vi má účinnost mezi 55 a 77 % při prevenci kultury, která způsobuje břišní tyf (popisuje se v publikaci Plotkin and Cam, Arch Intern Med 155: 2293-99). Ukázalo se, že vakcína obsahující meningokokální C polysacharid vykazuje při epidemii účinnost 79 % (popisuje se v publikaci De Wals P, et al., Bull World Health Organ. 74: 407-411). 23 valentní pneumokoková vakcína vykazuje velké

kolísání hodnoty klinické účinnosti od 0% do 81% (popisuje se v publikaci Fedson et al., Arch Intern Med. 154: 2531-2535). Účinnost vakcíny se vztahuje ke skupině, která se imunizuje, například přestárlí lidé, lidé trpící Hodgkinsovou nemocí, splenektomií, srpkovitou anemií a agammaglobulinaemií (popisuje se v publikaci Fine et al., Arch Intern Med. 154: 2666-2677) a také se vztahuje k manifestaci onemocnění. 23 valentní vakcína neprokázala ochranu proti pneumokokovému zápalu plic a otitidě. Je obecně známo, že účinnost ochrany pneumokokové vakcíny je více či méně spojená s koncentrací protilátek indukovaných po vakcinaci. Přijalo se 23 polysacharidů po té, co se prokázala imunogenicita každého komponentu (popisuje se v publikaci Ed. Williams et al., New York Academy of Sciences 1995 pp 241-249).

Aby se zesílila odezva na pneumokokové polysacharidy, které jsou obsaženy v 23 valentní vakcíně, vynálezci se pokusily zlepšit imunitní odezvu přidáním imunostimulačního činidla QS21 EP 362 279 a dQS21 WO 96/33739). U opic Rhesus se však nezjistilo žádné zesílení imunitní odezvy na polysacharidy.

V publikaci Threadgill et al, Veccine 1998 Vol 16(1) p76 se uvádí, že imunostimulační CpG oligonukleotidy snižují polysacharidovou specifickou protilátkovou odezvu, kdy oligonukleotid vytváří formulaci spolu s polysacharidem mikroorganismu *Pseudomonas aeruginosa*.

Překvapivě se zjistilo, že je možné upravit imunitní odezvu vůči pneumokokovým polysacharidovým vakcínám tím, že se připraví spolu s imunostimulačním CpG oligonukleotidem. Takové formulace poskytují imunitní odezvu, která produkuje podstatné množství protilátek IgG.

Vynález poskytuje vakcinační kompozici obsahující polysacharidový antigen spolu s adjuvans, kterým je imunostimulační oligonukleotid.

Polysacharidový antigen může být nebo nemusí být spojen s nosičovým proteinem, který poskytuje epitopy buněk T.

Oligonukleotidy mohou být DNA nebo RNA, ale přednostně obsahují hexamérový motiv: purin purin CpG pyrimidin pyrimidin. Upřednostňuje se, aby se vnitronukleotidová vazba upravila, aby se zvýšila stabilita oligonukleotidu. Preferovanou modifikací jsou fosforothiátové vazby. Protein lytA, který se podílí na katalytické degradaci buněčné stěny pneumokoků se produkuje v době, kdy dochází k autolyzi a součástí indukovaného operonu (popisuje se v publikaci Mol. Microbiol. 29: 1125 (1998)). Během syntézy proteinu lytA je přítomno velké množství mRNA kódující tento protein. Dále protein lytA obsahuje oblast vázající fosforylcholin, která obsahuje opakované sekvence DNA (Yother and Briles, J. Bacteriol. 174: 601 (1992)). Tuto oblast je možné najít na mnoha jiných proteinech přítomných na streptokokách, které vážou cholin. Následující CpG sekvence se identifikovaly z oblastí proteinu lytA a proteinu A (cbpA), které vážou fosforylcholin (popisuje se v publikaci Rosenow et al., Mol. Microbiol. 25: 819-829 (1997)).

OLIGO 1: GCTACTGGTACG TACATTC AGACGGC TCTT (lytA)

OLIGO 2: ACTATCTAAACGCTAATGGTGCTATGGCGACAGGATGGCT (cbpA)

a mohou se použít v souladu s vynálezem.

Následující oligonukleotidové imunostimulační sekvence také tvoří preferované provedení vynálezu.

OLIGO 3: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT

OLIGO 4: TCT CCC AGC GTG CGC CAT

CpG sekvence a lemující sekvence jsou podtrženy a jsou zde také konzervativní motivy ACGT, ACG a GCG. Sekvence získané z oblastí pneumokokových proteinů, které vážou cholin mají dva

CpG motivy, které nezávisle opakují 10 nebo 15 nukleotidových bazí, a motiv založený na této vzdálenosti nukleotidových bazí mezi dvěma CpG se objevuje v proteinu lytA a CbpA třikrát a pětkrát. Publikované sekvence však mají dva motivy CpG, které jsou nezávisle tvořeny sedmi nebo dvěma nukleotidovými bázemi.

V jednom provedení vynálezu, kde se kombinovala komerčně dostupná 23 valentní polysacahridová vakcína (Pneumovax, Pasteur Merieux) s adjuvans CpG se podstatně zvýšila imunitní odezva (protilátky IgG) zvláště na polysacharid typu 19F a 14, kdy se vakcína aplikuje do svalu.

Je výhodné, že uvedené provedení vynálezu je schopné zvýšit účinnost komerčně dostupné pneumokokové vakcíny. To je zvláště důležité u populace s vysokým nebezpečím vakcinace, zvláště u těch, kteří vykazují sub-optimální protilátkové odezvy na polysacharidy. Taková populace může zahrnovat, ale není omezena na přestárlé lidi, pacienty trpící libovolným z následujících onemocnění: splenektomye, kongenitální asplenie, hyposplenie, srpkovitá anémie, cyklická neutropenie, neutropenie indukovaná léky, aplastická anemie, kongenitální agamaglobulinemie, hypogamaglobulinemie, selektivní nedostatečnost podtřídy IgG, myelom, chronická lymfocytární leukémie, lymfom, infekce HIV, multifaktoriální stavy, jako je léčba glukokortikoidy, špatná výživa, cirhóza jater, selhání činnosti ledvin, cukrovka, alkoholismus, chronické onemocnění, hospitalizace, únava, stres, působení nízkých teplot, respirační infekce, chřipka, astma. Tato populace může také zahrnovat pracovníky ve zdravotnictví, vojáky, vězně nebo jiné, kam patří školáci nebo cestovatelé, kterým se aplikuje plné vakcinační pokrytí.

Při preferované aplikaci se CpG používá k zesílení odezvy na polysacharidovou vakcínu, která se používá jako upomínací dávka dětem ve věku mezi 6 a 24 měsíci, u kterých už proběhla primární imunizace s multivalentním konjugátem obsahujícím pneumokokový polysacharid-protein. Takové vakcíny využívané

při primární imunizaci mohou také obsahovat jako adjuvans CpG oligonukleotid. V jednom provedení vynálezu se popisuje metoda imunizace pacienta, která zahrnuje aplikaci účinného množství vakcíny podle vynálezu.

Ve druhém provedení podle vynálezu se popisuje způsob upomínací imunitní odezvy na antigen tím, že se aplikuje antigen nezávislý na T buňkách spolu s CpG imunostimulačním oligonukleotidem. CpG může sloužit jako adjuvans v souladu s vynálezem také v jiné vakcíně založené na jiném polysacharidu a antigenu nezávislém na T buňkách. Tyto vakcíny zahrnují, ale nejsou omezeny na vakcínu obsahující Vi polysacharid proti mikroorganismu *Salmonella typhi*, tetravalentní polysacharidovou vakcínu (obsahující typy A, C, W135 a Y), polysacharid a upravené polysacharidy meningokoků skupiny B, polysacharidy mikroorganismu *Streptococcus agalactae*, polysacharidy z mykobakterií například *Mycobacterium tuberculosis*, jako je například manofosfoinositidázová trehalóza, mykolová kyselina, manóza s čepičkou s arabinomananů, kapsule vytvořené z těchto polysacharidů a arabinogalaktany, polysacharid z mikroorganismu *Cryptococcus neoformans*, lipopolysacharidy netypovatelného mikroorganismu *Haemophilus influenzae*, lipopolysacharidy mikroorganismu *Moraxella catharralis*, lipopolysacharidy mikroorganismu *Shigella sonnei*, lipopeptidofosfoglykan (LPPG) mikroorganismu *Trypanosoma cruzi*, gangliosidy GD3, GD2 spojené s rakovinou, mucíny spojené nádory, zvláště pak T-F antigen a sialylT-F antigen a polysacharid spojený s HIV, který je strukturou příbuzný antigenu T-F. Jiné antigeny nezávislé na T buňkách se mohou získat z mikroorganismů *Salmonella*, *Cholera*, *Echerichia*, *Chlamydia* a *Plasmodium*.

Příprava vakcíny se v obecném případě popisuje v publikaci *Pharmaceutical Biotechnology*, vol 6. *Vaccine Design - the subunit and adjuvans approach*, Powell and Newman, Plenum

Press, 1995. Kapsulizace do lipozomů se popisuje například v dokumentu Fullerton, US patent 4,235,877. Konjugace proteinů na makromolekuly se popisuje například v dokumentu Likhite, US patent 4,372,945 a Armor et al., US patentu 4,474,757.

Množství proteinu v každé vakcinační dávce se vybralo jako množství, které indukuje imunoochrannou odezvu, aniž dochází k podstatnému, nežádoucímu vedlejšímu účinku, jako je tomu u typických vakcín. Takové množství bude kolísat v závislosti na specifickém použitém imunogenu a na jeho prezentaci. V obecném případě se očekává, že každá dávka bude obsahovat 0,1 až 1 000 μg polysacharidu nebo konjugátu polysacharid-protein, upřednostňuje se 2 až 100 μg , nejvíce se upřednostňuje 4 až 40 μg . Optimální množství vhodné pro určitou vakcínu se může zjistit ze standardních studií, které zahrnují pozorování vhodných imunitních odezev u subjektu. Po počáteční vakcinaci se může subjektu aplikovat jedna nebo několik opakovaných adekvátně umístěných imunizací.

Oligonukleotidy využívané podle vynálezu jsou v typickém případě deoxynukleotidy. V preferovaném provedení vynálezu internukleotid vázaný na oligonukleotid je fosfordithioát nebo více se upřednostňuje fosforothioátová vazba, ačkoli fosfodiesterly jsou zahrnuty do vynálezu. Mohou se použít jiné internukleotidové vazby, které stabilizují oligonukleotid.

CpG internukleotidy využívané podle vynálezu se mohou syntetizovat libovolnou metodou, která je známa v oboru (popisuje se například v dokumentu EP 468 520). Takové oligonukleotidy se mohou syntetizovat využitím automatického syntetizéru. Metody vhodné pro produkci fosforothioátových oligonukleotidů nebo fosfordithioátu se popisují v dokumentu US 5,663,153, US 5,278,302 a WO 95/26204.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Použití CpG jako adjuvans spolu s 23 valentním pneumokokovým polysacharidem u myši.

Ochrana proti infekci způsobené pneumokoky je zprostředkována protilátkami IgG vůči kapsulárnímu polysacharidu spolu s uložením komplementu, který činí bakterie náchylné k usmrcení neutrofily prostřednictvím opsonofagocytózy. Účinnost ochrany vakcíny se může odhadnout na základě indukce protilátek IgG. Skupiny deseti myši se jednou imunizovaly s komerčně dostupnou 23-valentní vakcínou obsahující polysacharidy pneumokoků. Dávka tvoří 2/10, 1/50 nebo 1/250 lidské dávky (57,7, 11,5 a 2,3 µg celkového polysacharidu). Vakcína obsahuje jako adjuvans CpG (50 µg oligo 1), CpG + Alum. Po imunizaci se každých 7 dní po dobu čtyř týdnů měřily koncentrace sérového IgG vůči 4 nejdůležitějším sérotypovým polysacharidům (6B, 14, 19F a 23F) testem ELISA.

Materiály a metody

Imunizovaly se následující skupiny (každá skupina obsahuje 10 myši (balb/c)):

23 valent v koncentraci 2,3, 11,5 a 57,5 µg/dávku (1/250, 1/50 a 1/10 lidské dávky)

23 valent + CpG (50 µg) ve stejném rozmezí dávky)

23 valent + CpG + Al(OH)₃ ve stejném dávkovém rozmezí

Použité komponenty

komponent	série	koncentrace µg/ml	pufr
23 valent. Pasteur Mérieux (Pneumovax 23)	95K03-HC56630	1150	fyziológ. roztok
CpG	oligo 3	5 000	voda
Al(OH) ₃	96A0089	10 380	voda

Tvorba formulace

Pneumovax se naředil ve vodě a 10 krát koncentrovaném 10 mM PO_4 , 150 mM NaCl pH6,8, přičemž se získal antigen v množství 2,3, 11,5 nebo 57,7 μg v jedné dávce. Po 30 minutách se přidal CpG a v případě skupin obsahujících $\text{Al}(\text{OH})_3$ se formulace adsorbovaly po dobu 30 minut na buď $\text{Al}(\text{OH})_3$ (50 μg). Jako konzervační činidlo se přidal Thiomersal (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

ELISA

Ve skupině bylo 10 zvířat, ale protože vykrvácení se provádělo každý týden, krvácelo se každý týden pouze 5 zvířat. ELISA a opsonofagocytóza se provedly se sebranými séry.

Test ELISA se provedl měřením myších IgG za použití protokolu, který se získal z workshopu WHO pro test ELISA, který je vhodný pro kvantifikaci protilátek IgG proti kapsulárním polysacharidům mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* v lidském séru. Čištěný kapsulární polysacharid se nanese přímo na mikrotitrační destičku. Vzorky séra se předem inkubují s polysacharidem buněčné stěny, který je běžný pro všechny pneumokoky a který je přítomen v koncentraci 0,5 % (popisuje se v dokumentu EP72513 B1). Činidla (Jackson ImmunoLaboratories Inc.) se použily k detekci navázaného myšího IgG. Titrační křivky se vztáhly k vnitřním standardům (monoklonální protilátky) logistickou log rovnicí. Výpočty se provedly za použití softwaru SoftMaxPro. Maximální absolutní chyba uvedených výsledků se očekávala být dělitelem 2. Relativní chyba je menší než 30 %.

Výsledky

Izotyp protilátek IgG se zjistil proti sérotypu 14 a 19G, ale nikoli proti 6B a 23F a výsledky v případě sérotypu 14 jsou přítomny na obrázku č. 1. Odezva je závislá na dávce, kdy nejsilnější odezva se získala při dávce 1/10 lidské dávky, což indikuje, že IgG odezva je specifická pro polysacharid. To je

neobvyklé, protože myši v normálním případě produkují proti polysacharidům pneumokoků pouze IgM. Nejvyšší odezva se dosáhlo 14-tý den po imunizaci, což není neobvyklé, protože antigeny nezávislé na T buňkách neindukují paměť.

Aby se zjistila odchylka a statistická signifikance (data nejsou uvedena) provedla se další analýza. Odezva na 1/10 lidské dávky 23-valentní vakcíny se (statisticky) podstatně zesílila, když se přidalo samotné adjuvans CpG (v případě typu 19, GMC 0,8 ve srovnání s 3,7 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,07$, v případě typu 14, GMC 0,19 ve srovnání s 3,4 $\mu\text{g/ml}$ $p=0,001$). Tytéž výsledky se získaly při dávce 1/50 a 1/250, kdy se měřily protilátky proti typu 14. Odezvy na typ 14 se podstatně zesílily, když se přidalo adjuvans CpG+Alum.

Nejsilnější odezva se vyvolala, když se jako adjuvans pro vakcínu použilo samotné CpG.

Příklad 2: Účinek použití adjuvans CpG na imunogenicitu tetraivalentních pneumokokových konjugátů PS-PD v modelu narozených myší.

Model narozených myší se vybral proto, že publikovaná data ukazují, že relativní imunogenicitu 4 pneumokokových polysacharidových proteinových konjugátů u novorozenců je více podobná krysám než myším. V případě novorozených krys platí, že 6B<23F<14<19F. Novorozené krysy se vybraly, protože jejich imunitní systém vykazoval vývojovou nezralost, která je podobná jako u lidských novorozenců.

Novorozené krysy se imunizovaly tetraivalentními pneumokokovými polysacharidovými-PD^(a) konjugáty v rozmezí pětinásobku dávky a adjuvans CpG a AlPO_4 + CpG. Oligo 1 se použil v dávce 100 μg . Zvířata se poprvé imunizovala, když byly 7 dní staré a následná imunizace proběhla o 14 a 28 dní později. Serologické testy se provedly ve vzorcích odebraných 42. den (14 dní po III) a 56. den (28 dní po III).

Nejlepší adjuvans byl samotný CpG: zvyšuje hodnoty geometrického průměru koncentrace IgG a opsoninové titry vůči 6B, 23F a 19F, zatímco titry v případě sérotypu 14 byly srovnatelné jinými přípravkami, které obsahují adjuvans. Formulace obsahující samotné CpG je také schopna podstatně zvýšit rychlost konverze séra na sérotyp 6B-PD.

Materiály a Metody

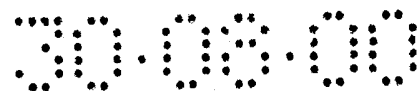
Vakcinační skupiny

Série vakcíny DSP0401x obsahuje Tetravalentní PS-PD klinické série D6BPJ208 + D14PDJ202 + D19PJ206 + D23PDJ212 + D23PDJ212. ESPL001 obsahuje Tetravalentní PS-LPD série E6BL040P + E14L66P + E19FL033P + E23FL21P.

skupina	vakcinační serie	adjuvans	dávka (μg každého PS)
1	žádná	CpG	-
2	DSP0401x	žádné	0,1
3	DSP0401x	žádné	0,5
4	DSP0401x	AlPO ₄	0,1
5	DSP0401x	AlPO ₄	0,5
6	DSP0401x	AlPO ₄	2,5
7	ESPL001	AlPO ₄	0,1
8	ESPL001	AlPO ₄	0,5
9	ESPL001	AlPO ₄	1,25
10	DSP0401x	CpG	0,1
11	DSP0401x	CpG	0,5
12	DSP0401x	CpG/AlPO ₄	0,1
13	DSP0401x	CpG/AlPO ₄	0,5

Použité komponenty

komponent	série	koncentrace ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	pufr



konjugát PD6B	D6BPDJ208	206	NaCl 0,2 M pH6,5
konjugát PD14	D14PDJ202	186	NaCl 0,2 M pH6,5
konjugát PD19	D19PDJ206	175	NaCl 0,2 M pH6,5
monovalentní PD6B	D6BPDD208	100	NaCl 150 mM pH6,1
monovalentní PD14	D14PDD202	100	NaCl 150 mM pH6,1
monovalentní PD19	D19PDD206	100	NaCl 150 mM pH6,1
monovalentní PD23	D23PDD212	96	NaCl 150 mM pH6,1
monovalentní LPD6B	E6BL040P	50	NaCl 150 mM pH6,1
monovalentní LPD14	E14FL66P	50	NaCl 150 mM pH6,1
monovalentní LPD19	E19FL033P	50	NaCl 150 mM pH6,1
monovalentní LPD23	E23FL21P	50	NaCl 150 mM pH6,1
tetravalentní LPD	ESPL001	5/valence	NaCl 150 mM pH6,1
CpG	oligo 1, WD1001	5 000	voda
ALPO4	97D0045	5 040	NaCl 150 mM pH6,1

Postup formulace

Neadsorbované tetravalenty

Čtyři konjugáty se ředily ve vodě a v desetkrát koncentrovaném NaCl 150 mM. Jako konzervační činidlo se přidal fenoxyetanol (500 µg/ml).

Jestliže je potřeba CpG, pak se k neadsorbovanému tetravalentu přidá uvedený oligonukleotid. Je-li třeba, izotonocita a ředění se upraví pomocí NaCl.

Adsorbované tetravalenty

Čtyři koncentrované, adsorbované monovalenty se ředily vodou a v desetinásobně koncentrovaném NaCl 150 mM a pak se přidal komplement AlPO₄. Jako konzervační činidlo se přidal fenoxyetanol (500 µg/ml).

Jestliže je potřeba větší ředění, tetravalenty se ředí v AlPO₄ v koncentraci 1 mg/ml. Tato ředění se připravují v NaCl 150 mM.

Jestliže je potřeba CpG, k adsorbovaným tetravalentům se přidá oligonukleotid. Je-li třeba, izotonocita a ředění se upraví NaCl v koncentraci 1 500 mM a jestliže je potřeba udělat další ředění, přidá se ředidlo AlPO₄ v koncentraci 1,3 nebo 1,8 mg/ml v NaCl.

Všechny formulace se připravují v nesilikonizovaných skleněných zkumavkách.

Imunizační protokol

Novorozené krysy se náhodně rozdělily různým matkám. Když se poprvé imunizovaly, bylo jim 7 dní. O 14 a 28 dní později se provedly další imunizace. Vykrváčení se provedlo v den 42 (14 dní po III) a 56 (28 dní po III). Všechny vakcíny se zavedly podkožní injekcí. V každé vakcinační skupině bylo 10 krys.

Test ELISA

Test ELISA provedl měření krysích IgG za použití protokolu získaného z workshopu WHO „ELISA procedure for the quantitation of IgG antibody against Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharides in human serum“. Čištěný kapsulární polysacharid se přímo potáhl na mikrotitrační destičku. Vzorky

sér se předem inkubovaly s polysacharidem z buněčné stěny, který se běžně vyskytuje u všech pneumokoků a který tvoří přibližně 0,5 % čištěných pneumokokových polysacharidů. Činidla (Jackson ImmunoLaboratories Inc.) se použily k detekci navázaného myšního IgG. Titrační křivky se vztáhly k vnitřním standardům (monoklonální protilátky) logistickou log rovnicí. Výpočty se provedly za použití softwaru SoftMaxPro. Standardní séra se kalibrovala za použití metody barevné odezvy a ukázalo se, že hodnoty odpovídají odhadu koncentrací IgG, které se zjistily při imunoprecipitaci.

Opsonofagocytóza

Opsonofagocytový test se uskutečnil podle následujícího CDC protokolu (*Streptococcus pneumoniae* opsonofagocytóza za použití diferenciovaných buněk HL60, verze 1.1). Úpravy zahrnovaly použití pneumokokových kmenů s domácích zdrojů a fagocytové buňky HL60 se nahradily čištěnými lidskými PMN. Krysí polyklonální séra se použily jako pozitivní kontrola.

Výsledky

Obrázek č. 2 ukazuje hodnotu geometrického průměru koncentrací IgG proti sérotypu 6B tetraivalentními kombinacemi popsány v odstavci Materiál a metody. Za účelem jasnosti se osy rozdělily adjuvans a dávkou. Podobné výsledky se získaly proti sérotypům 19F a 23F, ale typ 14 vykazuje více homogenní odezvu vůči všem adjuvans a dávkám. Biologická aktivita sebraného séra z každé skupiny adjuvans a dávky se měřila opsonofagocytózou. Opsonizační aktivita, která se vztáhla ke koncentraci IgG, dala odhad funkční aktivity antiséra. Hodnoty uvedené v tabulce č. 1 ukazují, že všechny adjuvans indukují protilátky, které mají přibližně stejnou kapacitu opsonizovat streptokoky. Tak CpG indukuje specifické protilátky a zvýšení koncentrace protilátek koreluje se zvýšením účinnosti ochrany.

Závěr

- AlPO4 (ve srovnání s formulací, kde není adjuvans) podstatně zvyšuje rychlost konverze séra, geometrický průměr IgG, opsonizační aktivitu a imunologickou paměť na tetravaletní PS-PD.
- Dávka 0,1 µg je podstatně více imunogenní ve srovnání s dávkou 0,5 µg v případě konjugátů PS-PD sérotypu 6B, 19F a 23F na AlPO4.
- Koncentrace IgG se podstatně zvyšují proti sérotypům 6B, 19F a 23F, když se ve vakcíně použije adjuvans s CpG ve srovnání s AlPO4. To se potvrdilo zvýšením rychlosti konverze séra a zvýšením opsonofagocytových titrů.

Tabulka č. 1: Relativní opsonizační aktivita (koncentrace IgG nutná pro 50 % usmrcení pneumokoků) ve srovnání se sérotypem a adjuvans.

vakcína	adjuvans	dávka	koncentrace IgG nutná pro 50 % usmrcení				průměr adjuvans
			µg	6B	14	19F	
DSP0401 x	žádné	0,1	0,32	0,30	0,30	0,37	0,26±0,14
		0,5	žádná hodnota	0,015	žádná hodnota	žádná hodnota	
DSP0401 x	AlPO4	0,1	0,02	0,31	0,40	0,09	0,20±0,15
		0,5	žádná hodnota	0,05	0,22	žádná hodnota	
		2,5	žádná hodnota	0,32	#Val	žádná hodnota	
ESPL001	AlPO4	0,1	0,08	0,46	žádná hodnota	0,22	0,35±0,27
		0,5	0,11	0,71	0,75	0,08	



		1,25	0,10	0,55	0,66	0,20	
DSP0401 x	CPG	0,1	0,42	0,15	žádná hodnota	0,20	0,24±0, 10
		0,5	0,21	0,30	žádná hodnota	0,17	
DSP0401 x	CPG/AlPO 4	0,1	0,27	0,10	žádná hodnota	0,21	0,20±0, 14
		0,5	žádná hodnota	0,10	0,44	0,09	
průměr	podle sérotypu		0,19±0, 14	0,29±0, 20	0,45±0, 20	0,18±0, 09	

Příklad 3: Účinek adjuvans CpG na imunogenicitu 11-valentních pneumokokových PS-PD konjugátů v modelu novorozených krys.

Příklad 2 ukazuje, že použití adjuvans CpG v konjugačních vakcínách vede k několikanásobnému zvýšení řádu. Řád je 5 až 10 krát vyšší než při použití konvenčního adjuvans (hliník). Za účelem stanovit, zda tyto účinky jsou závislé na oligo sekvenci, dávce nebo formulaci, proběhly další experimenty.

Vybraly se CpG OLIGO 2 a použily se v nízké dávce, která je 1 a 10 µg. Také se adsorboval na Al(OH)₃ a kombinoval se s konjugačními vakcínami.

Protože imunologické charakteristiky každého polysacharidu mohou být různé, testovalo se 11 sérotypů.

Materiály a metody

Tabulka č. 2: Volba série pneumokokového konjugátu PS-PD

sérotyp	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F
číslo série	017	040	218	024	209	019	222	204	221	207	213

Formulace

Aby se zjistil účinek výhodného adjuvans, dávka konjugátu pro každý polysacharid se udržovala konstantní na



hodnotě 0,1 μg a adjuvans AlPO_4 , $\text{Al}(\text{OH})_3$ a CpG se připravily v různých dávkách a kombinacích. Celkem se testovalo 10 různých kombinací, které neobsahovaly žádné adjuvans. Jsou seřazeny v tabulce č. 3.

Příprava ředění

V NaCl 150 mM/fenoxy se připravily dvě ředění

A: AlPO_4 v koncentraci 1 mg/ml

B: CpG na $\text{Al}(\text{OH})_3$ v koncentraci 100 a 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Hmotnostní poměr je CpG / $\text{Al}(\text{OH})_3 = 1/5$

Příprava adsorbovaného undekavalentu

Jedenáct koncentrovaných adsorbovaných monovalentů PS-PD se smíchalo ve správném poměru. Přidal se komplement AlPO_4 . Když je třeba přidal se CpG (CpG adsorbovaný na $\text{Al}(\text{OH})_3$) nebo ředidlo.

Příprava neadsorbovaného undekavalentu

Jedenáct konjugátů PS-PD se smíchalo a ředilo se ve správném poměru v NaCl 150 mM s hodnotou pH 6,1, který obsahuje fenoxietanol. Když je třeba, CpG se přidal buď jako roztok (neadsorbovaný) nebo jako CpG adsorbovaný na $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Tabulka č. 3: Souhrnná tabulka přípravků, které obsahují adjuvans, testovaných s 11-valentními pneumokokovými konjugáty PS-PD u novorozenech krys.

skupina	AlPO_4	CpG	$\text{Al}(\text{OH})_3$	popis
1				žádný
2	100			AlPO_4
3		1		CpG nízké
4		10		CpG vysoká
5		1	4,5	CpG ads. nízký
6		10	50	CpG ads. vysoký



7	100	1		CpG nízký konj. ads.
8	100	10		CpG vysoký konj. ads.
9	95	1	4,5	CpG a konj. ads. nízký
10	50	10	50	CpG a konj. ads. vysoký

Imunizační protokol

Novorozené krysy OFA se náhodně rozdělily různým matkám. Když proběhla první imunizace byly 7 dní staré. O 14 a 28 dní později se jim aplikovaly další imunizace. Myši se nechaly vykrváct 56-tý den (28 dní po III). Všechny vakcíny se zavedly podkožní injekcí. V každé vakcinační skupině bylo 10 krys.

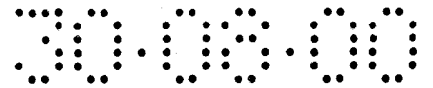
Test ELISA

Test ELISA proběhl, jak se popisuje v příkladu 2.

Opsonofagocytóza

Opsonofagocytický test se provedl podle protokolu CDC (Streptococcus pneumoniae opsonofagocytóza za použití diferenciovaných buněk HL60, verze 1.1). Úpravy zahrnovaly použití pneumokokových kmenů s domácích zdrojů a fagocytové buňky HL60 se nahradily čištěnými lidskými PMN. Do mikrotitračních prohlubní se přidaly skleněné kuličky o velikosti 3 mm, aby se zesílilo míchání. Což umožnilo redukovat poměr fagocytů:bakterie, jehož doporučená hodnota je 400.

Tabulky 4 až 7 dále v textu uvádějí geometrický průměr hodnot koncentrace IgG, rychlosti konverze séra a aritmetický průměr hodnot opsonofagocytového titru stanoveného pro 4 sérotypy



pneumokoků po imunizaci vakcínou s 11-valentním pneumokokovým konjugátem Ps-Protein D a adjuvans s různými formulacemi CpG OLIGO 2.

Ve srovnání s vakcínou, která neobsahuje žádné adjuvans, 10 µg CpG indukovalo podstatně vyšší koncentrace IgG pro všechny sérotypy. CpG indukovalo podstatně vyšší koncentrace IgG ve srovnání s AlPO₄ pro všechny sérotypy 1, 6B, 18C a 19F.

Ke srovnání slouží tabulky, které zahrnují výsledky z příkladu 2 za použití OLIGO 1. Neexistují zde podstatné rozdíly v odezvách IgG indukovaných dvěma sekvencemi OLIGO, když OLIGO 2 se používá v množství 10 µg. OLIGO 2 v množství 1 µg nevykazuje žádné imunostimulační účinky, což dokazuje skutečnost, že indukované koncentrace IgG se podstatně neliší od těch, které se vyvolaly formulací bez CpG.

Adsorpce OLIGO 2 na Al(OH)₃ snižuje imunostimulační účinek a indukce protilátek se podstatně liší, když se použije jako adjuvans AlPO₄.

Tabulka č. 4: Geometrický průměr hodnot koncentrací IgG pro sérotyp 6B, konverze séra a průměr hodnot opsonizačního titru v den 28 po III. imunizaci novorozených krys 11-valentním konjugátem PS-PD za použití různých adjuvans (a srovnání s tetraivalentní imunizací, příklad 2).

skupina	AlPO ₄ µg	OLIGO 1 µg	OLIGO 2 µg	6B GMC IgG µg/ml	6B konve rže séra	6B opso. titr	6B GMC IgG titr	6B konve rže séra	6B opso. titr
				příklad 2			příklad 3		
1				0,047	2/10	12,5	0,004	1/10	<6,25
2	100			0,048	4/10	65	0,019	4/10	<6,25
3			1				0,003	1/10	<6,25
4			10				1,682	10/10	157
		100		0,63	8/10	48			



5			1 µg na Al(OH))3				0,015	6/10	<6,25
6			10 µg na Al(OH))3				0,007	3/10	<6,25
7	100		1				0,029	7/10	<6,25
8	100		10				0,469	9/10	77
	100	100		0,46	7/10	75			
9	95		1 µg na Al(OH))3				0,040	5/10	38
10	50		10 µg na Al(OH))3				0,022	7/10	<6,25

Tabulka č. 5: Geometrický průměr hodnot koncentrací IgG pro sérotyp 14, konverze séra a průměr hodnot opsonizačního titru v den 28 po III. imunizaci novorozeneých krys 11-valentním konjugátem PS-PD za použití různých adjuvans (a srovnání s tetravalentní imunizací, příklad 2).

skupina	AlPO ₄ µg	OLIGO 1 µg	OLIGO 2 µg	14 GMC IgG µg/ml	14 konve rže séra	14 opso. titr	14 GMC IgG titr	14 konve rže séra	14 opso. titr
				příklad 2			příklad 3		
1				0,046	3/10	64	0,022	3/10	<6,25
2	100			0,99	10/10	88	0,237	8/10	27

3			1				0,035	4/10	<6,25
4			10				0,361	10/10	88
		100		0,66	9/10	295			
5			1 µg na Al(OH))3				0,093	9/10	<6,25
6			10 µg na Al(OH))3				0,155	9/10	27
7	100		1				0,134	7/10	<6,25
8	100		10				2,028	10/10	188
	100	100		2,3	10/10	888			
9	95		1 µg na Al(OH))3				0,140	6/10	138
10	50		10 µg na Al(OH))3				0,196	10/10	<6,25

Tabulka č. 6: Geometrický průměr hodnot koncentrací IgG pro sérotyp 19F, konverze séra a průměr hodnot opsonizačního titru v den 28 po III. imunizaci novorozeneých krys 11-valentním konjugátem PS-PD za použití různých adjuvans (a srovnání s tetravalentní imunizací, příklad 2).

skupina	AlPO4 µg	OLIGO 1 µg	OLIGO 2 µg	6B GMC IgG µg/ml	6B konve rze séra	6B opso. titr	6B GMC IgG titr	6B konve rze séra	6B opso. titr
				příklad 2			příklad 3		



1				0,04	2/10	64	0,021	2/10	<6,25
2	100			1,07	9/10	367	0,222	7/10	79
3			1				0,015	3/10	<6,25
4			10				4,287	10/10	415
		100		12	10/10	>1600			
5			1 µg na Al(OH))3				0,417	9/10	32
6			10 µg na Al(OH))3				1,612	9/10	94
7	100		1				0,441	10/10	135
8	100		10				9,475	10/10	>1600
	100	100		11,0	10/10	>1600			
9	95		1 µg na Al(OH))3				0,438	9/10	377
10	50		10 µg na Al(OH))3				0,258	7/10	165

Tabulka č. 7: Geometrický průměr hodnot koncentrací IgG pro sérotyp 23F, konverze séra a průměr hodnot opsonizačního titru v den 28 po III. imunizaci novorozeneých krys 11-valentním konjugátem PS-PD za použití různých adjuvans (a srovnání s tetraivalentní imunizací, příklad 2).

skupi na	AlPO4 µg	OLIGO 1 µg	OLIGO 2 µg	23F GMC	23F konve	23F opso.	23F GMC	23F konve	23F opso.
-------------	-------------	---------------	---------------	------------	--------------	--------------	------------	--------------	--------------

				IgG μg/ml	rze séra	titr	IgG titr	rze séra	titr
				příklad 2			příklad 3		
1				0,06	2/10	<6,25	0,152	3/10	<6,25
2	100			0,29	10/10	70	0,56	8/10	<6,25
3			1				0,114	4/10	<6,25
4			10				1,305	9/10	192
		100		2,0	10/10	454			
5			1 μg na Al(OH))3				0,28	7/10	<6,25
6			10 μg na Al(OH))3				1,612	9/10	94
7	100		1				0,243	4/10	<6,25
8	100		10				1,545	9/10	862
	100	100		1,1	10/10	265			
9	95		1 μg na Al(OH))3				0,255	3/10	44
10	50		10 μg na Al(OH))3				0,331	6/10	<6,25

Příklad 5: Vliv CpG na opakovací dávku polysacharidu po primární imunizaci vakcínou polysacharid-konjugát a na primární imunizaci polysacharidem.

Předchozí příklady ukázaly schopnost CpG tvořit adjuvans pro antigeny nezávislé na T buňkách při vyvolání imunitní odezvy a při spojování antigenů nezávislých na T buňkách s proteinovým nosičem. Zbývá zvážit, zda CpG je vhodným adjuvans pro paměťovou odezvu vyvolanou opakovací dávkou antigenu nezávislého na T buňkách po aktivaci antigenem nezávislým na T buňkách. Dále bylo zajímavé stanovit, zda CpG může působit tak, že indukuje aktivaci T-nezávislým antigenem.

Aby se stanovily tyto účinky, myši se primárně imunizovaly pneumokokovým polysacharidem nebo pneumokokovým polysacharidem spolu s CpG nebo konjugátem proteinu D a pneumokokovým polysacharidem.

Imunizační protokol

Šest až 8 týdnů staré myši balb/c se podkožně imunizovaly vakcinační formulací, která se popisuje dále v textu. Dávka byla 1 μ g polysacharidu v případě formulace, která obsahuje nebo neobsahuje konjugát. O 14 dní později se odebrala krev a stanovila se koncentrace IgG. Po 56 dnech se odebral další vzorek krve a provedla se opakovaná imunizace a o 14 dní později, to je 70 dní po první imunizaci, se provedl konečný odběr krve.

skupina	primární imunizace	opakovaná imunizace
1	fyziol. roztok	konjugát
2	PS	PS
3	PS/Cp	PS
4	PS	konjugát
5	PS/Cp	konjugát
6	konjugát	PS
7	konjugát	PS/CpG
8	konjugát	konjugát

Používané komponenty

komponent	série	koncentrace µg/ml	pufr	adsorpce	kon. PS po adsorpci µg/ml	pufr po adsorpci
PS6B	6b/24	2 000	NaCl 150 mM			
PS14	14/19	2 000	NaCl 150 mM			
PS19	19f/26b	2 000	NaCl 150 mM			
PS23	23f/29	2 000	NaCl 150 mM			
konjugát PDPS6B	D6BPDJ 209			MBSP9801	100	NaCl 150 mM pH6,1 (fe noxy
konjugát PDPS14	D14PDJ 204			MBSP9801	100	NaCl 150 mM pH6,1 (fe noxy
konjugát PDPS19	D19PDJ20 7			MBSP9801	100	NaCl 150 mM pH6,1 (fe noxy
konjugát PDPS23	D23PDJ21 3			MBSP9801	100	NaCl 150 mM pH6,1 (fe noxy
CpG	Oligo 1	5 000	voda			
St Pn AlPO4 ředidlo						NaCl 150 mM pH6,1 (fe noxy

Postup formulace

Příprava 4 koncentrovaných, adsorbovaných monovalentů (PS-PD konjugáty)

Koncentrované, adsorbované monovalenty se připravily podle postupu popsaného shora v textu v příkladu 2.

Příprava tetraivalentu (PS-PD konjugáty)

Čtyři koncentrované adsorbované monovalenty se smíchaly ve správném poměru (1 μg každé valence/dávka) a ředily se NaCl pH6,1. Jako ředidlo v koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se přidal komplement AlPO₄ (10 $\mu\text{g}/\text{dávka}$) NaCl 150 mM pH6,1 obsahující 5 mg/ml fenoxyetanolu.

Příprava nekonjugovaného, neadsorbovaného tetraivalentu s nebo bez CpG (volný PS)

Čtyři volný PS se smíchaly ve správném poměru (1 μg každé valence/dávka) a ředil se v NaCl pH 6,1. Když je potřeba přidá se CpG (100 $\mu\text{g}/\text{dávka}$). Jako konzervační činidlo se přidalo 5 mg/ml fenoxyetanolu.

Formulace pro obě injekce se připravily 6 dní před první aplikací ve skleněných zkumavkách, které neobsahují silikon.

Postup formulace

Příprava 4 koncentrovaných adsorbovaných monovalentů (PS-PD konjugáty). Koncentrované, adsorbované monovalenty se připravily podle postupu popsaného shora v textu.

Příprava tetraivalentu (PS-PD konjugáty)

Čtyři koncentrované adsorbované monovalenty se smíchaly ve správném poměru (1 μg každé valence/dávka). Jako ředidlo se přidal v koncentraci 1 mg/ml komplement AlPO₄ (10 $\mu\text{g}/\text{dávka}$) v NaCl 150 mM s hodnotou pH 6,1, který obsahuje fenoxyetanol v koncentraci 5 mg/ml.

Příprava nekonjugovaného, neadsorbovaného tetravalentu s nebo bez CpG (volný PS)

Čtyři volný PS se smíchaly ve správném poměru (1 μg každé valence/dávka) a ředil se v NaCl pH 6,1. Když je potřeba přidá se CpG (100 μg /dávka). Jako konzervační činidlo se přidalo 5 mg/ml fenoxyetanolu.

Formulace pro obě injekce se připravily 6 dní před první aplikací ve skleněných zkumavkách, které neobsahují silikon.

Test ELISA

Test ELISA se provedl způsobem, který se popisuje v příkladu 1.

Výsledky

Výsledky toho experimentu jsou primární a upomínací imunizace. Výsledky primární imunizace byly shodné s předchozím pozorováním (příklad 1) tím, že se zvýšila konverze séra a zjistila se vyšší koncentrace IgG u myši, které se imunizovaly polysacharidem, který obsahoval jako adjuvans CpG, ve srovnání s pouhým polysacharidem. Jak se zjistilo v příkladu 1, zvýšení koncentrace IgG typ 14 použitím CpG jako adjuvans je statisticky podstatné ve srovnání se samotným PS a zvýšení v případě typu 19F dosahuje podstatnosti. Koncentrace IgG zvýšená použitím CpG jako adjuvans nebyla tak vysoká jak se pozorovalo v příkladu 1. Za účelem vysvětlit tento rozdíl se provedly v experimentech pouze dvě změny. Změnila se valence vakcíny (23 valentní verus 4 valentní) a způsob imunizace (intramuskulární verus podkožní). Protože se neočekává, že snížení valence zvýší imunogenicitu, důkaz indikuje, že způsob imunizace je důležitý pro optimální použití CpG jako adjuvans spolu s T-nezávislými antigeny. To je shodné se současnými aplikacemi, které dokládají jako špatný pokus použití CpG jako adjuvans spolu

s vakcínou, která obsahuje samotný polysacharid. Použil se interperitoneální způsob imunizace (popisuje se v publikaci Threadgill et al., Vaccine 1998, Vol 16(1) p 76).

	konverze séra	GMC
PS 14	2/20*	0,07
PS14/CpG	12/20* δ	0,15
konjugát	24/30 δ	1,04
PS19F	1/20 ξ	0,08
PS19F CpG	4/20 $\xi\varpi$	0,10
konjugát	22/30 ϖ	0,35

* $p = 0,001$ Fisherův exaktní test

δ $p = 0,11$ Fisherův exaktní test

ξ $p = 0,17$ Fisherův exaktní test

ϖ $p < 0,001$ Fisherův exaktní test

V druhé části tohoto experimentu se zvířata primárně imunizovaná buď PS, PS/CpG nebo konjugační vakcínou dále imunizovala PS nebo PS/CpG nebo konjugátem. Aby se normalizovala data pro porovnání, 14 dní po aplikaci upomínací dávky se stanovilo zvýšení IgG a stanovil se počet zvířat, které vykazují zvýšení koncentrace protilátek.

primární imunizace	upomínací imunizace	násobek zvýšení	pozitivně reagující zvířata
PS	PS	1,7*	5/10
PS/CpG	PS	2,8*	6/10
konjugát	PS	0,78 ξ	1/10 δ
konjugát	PS/CpG	1,7 ξ	6/10 δ
konjugát	konjugát	4,2	7/10

* $p = 0,09$ Studentův t-test

δ $p = 0,03$ Studentův t-test

ξ $p = 0,12$ Studentův t-test

Diskuze

Příklad potvrzuje výsledky prezentované v příkladu 1, ale ukazuje, že mód imunizace může být důležitý pro vyvolání optimální imunity. Při rozšíření experimentu na upomínací imunizaci a paměť se ukázaly dvě zajímavé charakteristiky použití CpG jako adjuvans. První je, že první imunizace s PS spolu s CpG jako adjuvans vede k vícenásobnému zvýšení odezvy po upomínací imunizaci polysacharidem a má trend dosáhnout statistické významnosti. To indikuje, že CpG je schopno vyvolat lepší paměť. Druhá charakteristika je, že CpG může u zvířat primárně imunizovaných konjugační vakcínou zvýšit paměťovou odezvu vyvolanou polysacharidem.

CpG je schopen u myši vyvolat „přepínání“ izotypu protilátek proti polysacharidům, které nejsou konjugované. Síla odezvy IgG je vyšší za použití CpG.

1. Přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje imunostimulační oligonukleotid CpG a polysacharidový antigen získaný z mikroorganismu Streptococcus pneumoniae.
2. Přípravek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e polysacharid je spojen s proteinovým nosičem.
3. Přípravek podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e imunostimulační oligonukleotid CpG vykazuje alespoň jednu internukleotidovou vazbu vybranou z fosfodiesterů, fosforodithioátu a fosforothioátu.
4. Přípravek obsahující CpG oligonukleotidovou sekvenci podle libovolného z nároků 1, 2 nebo 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje dvě CpG sekvence, které jsou odděleny sedmi nebo více páry nukleotidových bazí.
5. Přípravek podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje dvě CpG sekvence, které odděluje 10 až 15 párů nukleotidových bazí.
6. Přípravek podle libovolného z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e oligonukleotid CpG se vybral ze skupiny zahrnující:
GCTACTGGTACG TACATTC AGACGGC TCTT
ACTATCTAAACGCTAATGGTGCTATGGCGACAGGATGGCT

TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT
TCT CCC AGC GTG CGC CAT
7. Vakcinační prostředek podle libovolného z nároků 1 až 6 vhodný pro použití v medicíně.
8. Způsob vyvolání imunitní odezvy na polysacharid získaný z antigenu mikroorganismu Streptococcus pneumoniae, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci

bezpečného a účinného množství přípravku podle libovolného z nároků 1 až 7 pacientovi.

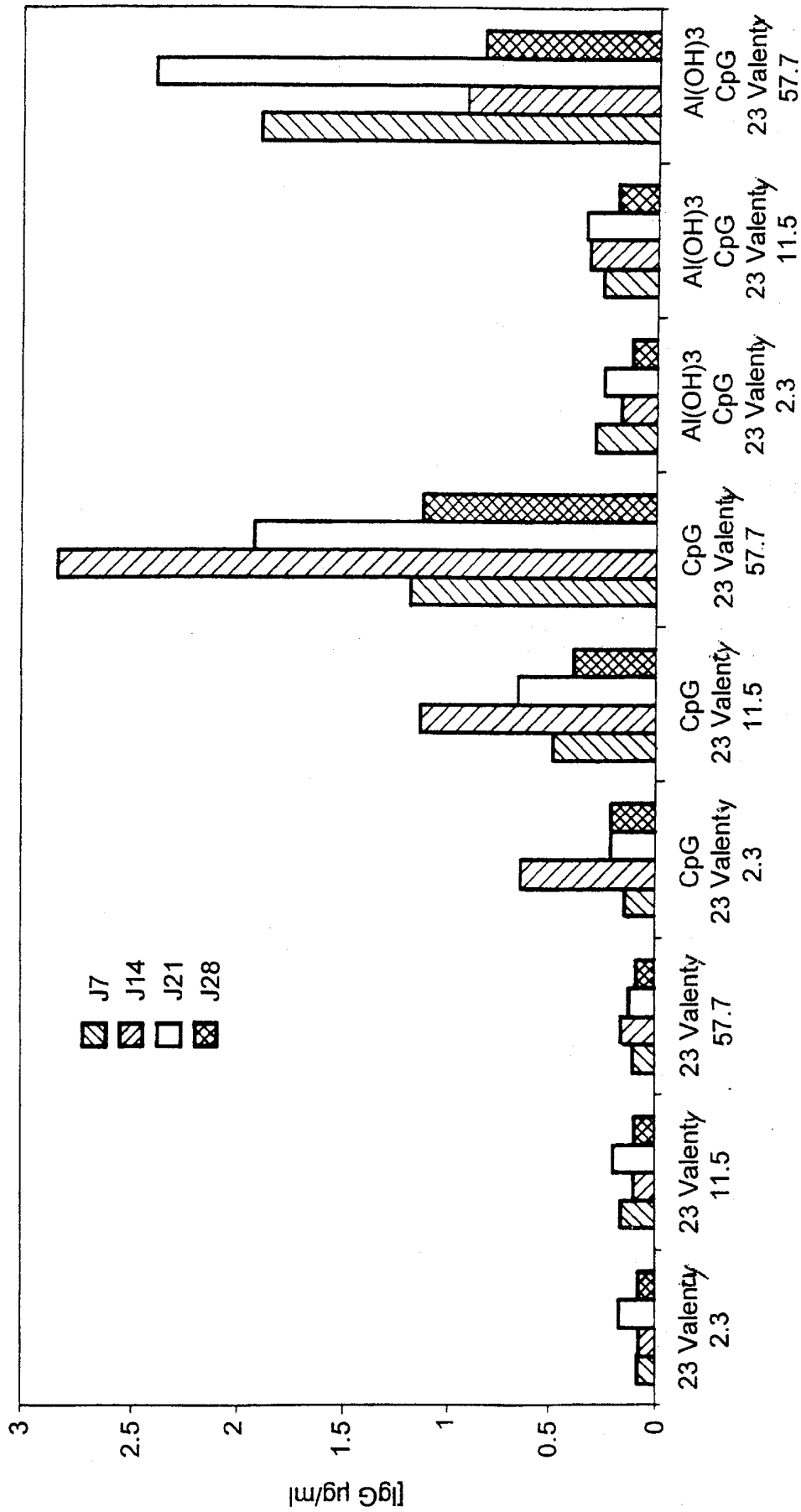


Fig.1 anti-PS14 IgG v séru re únech γ - AS , B45124a

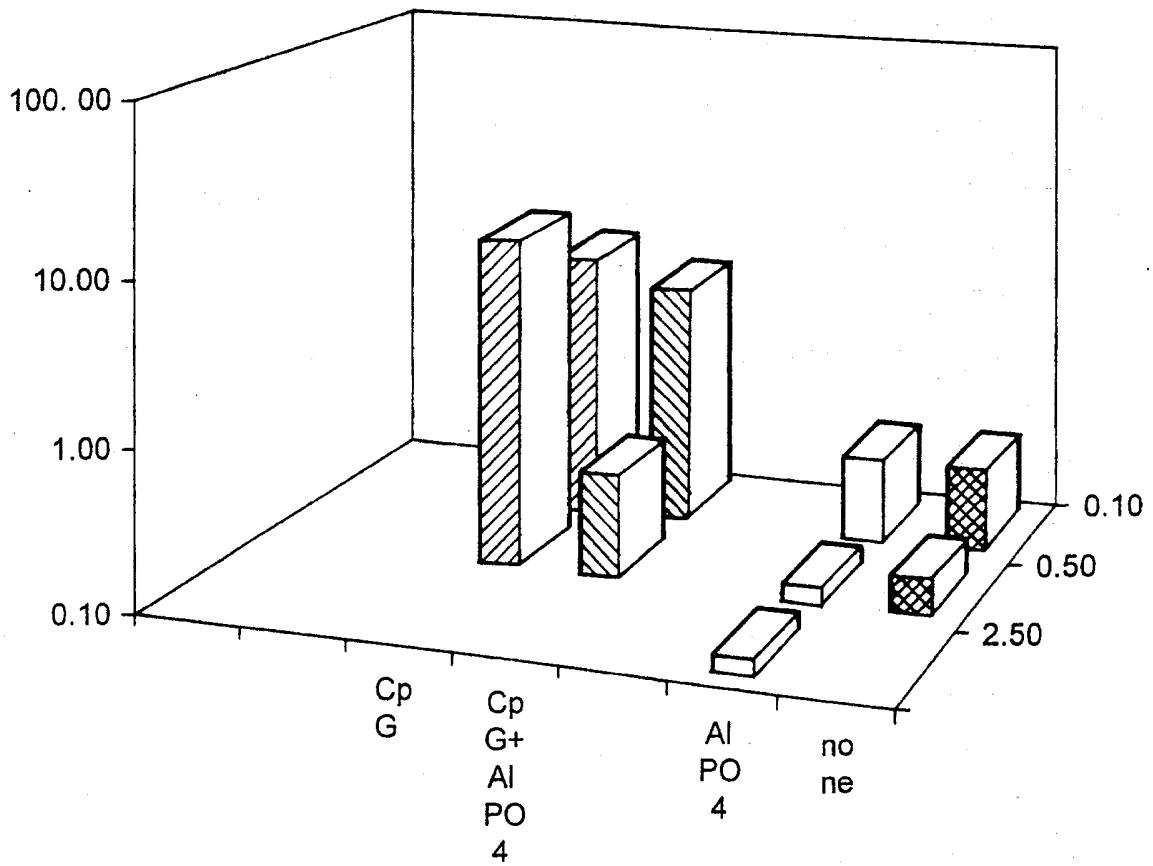


Fig.2 B45124a