

Lipoglikán kompozíciók és alkalmazásuk parazita fertőzések
kezelésére alkalmas gyógyászati készítmények előállítására

K I V O N A T

A találmány eukarióta paraziták felületéről izolált lipoglikánokból kinyert oligoszacharidokhoz kapcsolt hordozócsoportokból álló kompozíciókra vonatkozik. A kompozíciók felhasználhatók gerincesekben eukarióta paraziták (így protozoák, laposférgek) elleni protektív immunválasz kiváltására, és alkalmazható megelőzésre, valamint már fennálló parazitás fertőzések leküzdésére egyaránt. Így a találmány tárgyát képezi a kompozíciók alkalmazása gyógyászati készítmények előállítására, továbbá a találmány oltalmi körébe tartoznak maguk az izolált lipoglikánok is.

Képviselő:

"A2"

Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.

Budapest

**Lipoglikán kompozíciók és alkalmazásuk parazita fertőzések
kezelésére alkalmas gyógyászati készítmények előállítására**

A találmány a szénhidrát kémiával és a vakcinológia területével kapcsolatos.

Állatok és emberek parazitái világszerte problémát jelentenek. A malária utáni schistosomiasis például a leggyakoribb oka humán betegségnek és halálozásnak. Mintegy 600 millió ember veszélyeztetett schistosome laposféreg fertőzéssel és mintegy 200 millió ember fertőzött 74 országban. 20 millió ember (többségében gyermekek) a betegség egy súlyos formájában szenved, és évente 200 ezren halnak meg a betegség miatt.

Az emlősök parazitái például a *Fasciola* vagy *Schistosoma* nemzetségébe tartozó laposférgek és a *Trichomonas* nemzetségébe tartozó protozoák el tudják kerülni az immun eliminációt és hónapokig vagy évekig képesek életben maradni teljesen ép immunrendszerű gerinces gazdaszervezetben. Ezeknek a parazitáknak a felülete T-sejttől független immunválaszt vált ki, amelyre jellemző, hogy túlnyomóan IgM antitestek termelődnek, de nem indukál

T-sejttől független olyan választ, amelyre az IgG, IgE és IgA izotípusú antitestek termelődése jellemző.

Az IgG (valamint az IgE és IgA) termelődése és ezek kötődése a patogén külső részéhez általában szükséges az antitesttől függő sejtmediált citotoxicitáshoz, mely mechanizmusról bemutatták, hogy hatékony parazita férgek elpusztításában. A csecsemőmirigytől függő (tímusz-dependens) antitestek (IgG, IgE és IgA) kötődése az extracelluláris patogének felületéhez szintén általánosan megkívánt a gazdaszervezet makrofágjai által végzett fagocitózishoz és más immunfunkciókhoz, amelyek egy immun aktiválási folyamatban az "opszonizációban" indukálódnak. Az opszonizáció egy immun mechanizmus, amelyet gyakran kapcsolatba hoznak az extracelluláris protozoa paraziták elpusztításával. Általános vélelem, hogy több emlős parazita elkerüli az immun eliminációt azáltal, hogy nem indukál felületspecifikus T-sejt-dependens funkciókat, például IgG, IgE és IgA termelést.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

A találmány laposférgek felületén lévő új lipoglikánok izolálásán alapul. Ezek a lipoglikánok, valamint bizonyos protozoa parazitákból izolált lipoglikánok alkalmazhatók paraziták fertőzés gátlására, kezelésére vagy diagnosztizálására alkalmas készítményekben.

A találmány tehát lehetővé teszi, hogy egy gerincesben protektív immunválaszt (azaz T-sejt-dependens antitest választ magában foglaló immunválaszt) váltsunk ki eukarióta

parazita ellen úgy, hogy a gerincesnek egy eukarióta felületén található lipoglikánból kapott oligoszacharidhoz (vagy oligoszacharidok keverékéhez) kapcsolt hordozó csoportból álló kompozíciót adunk be. A kompozíciót olyan mennyiségben adjuk be, amely elegendő ahhoz, hogy protektív immunválaszt váltsunk ki eukarióta parazitával szemben.

Az oligoszacharidot izolálhatjuk vagy kinyerhetjük egy mintegy 180 kD molekulatömegű lipoglikánból (azaz olyan molekulából, amely legalább egy lipidcsoporttal és legalább egy szénhidrogén csoporttal rendelkezik). Továbbá, a lipoglikán legalább egy lipid csoportot és legalább egy szénhidrát csoportot tartalmaz. A lipoglikán például tartalmazhat egy lipidcsoportot, egy vagy több fukózcsoporthoz, fukózcsoporthozként 3-5 galaktózamincsoportot, fukózcsoporthozként 2-4 glükózamincsoportot, fukózcsoporthozként 1-2 galaktózcsoporthoz, fukózcsoporthozként 1-2 ramnózcsoporthoz és fukózcsoporthozként 1-3 mannózcsoporthoz. Alternatív módon a lipoglikán tartalmazhat egy lipidcsoportot, egy vagy több fukózcsoporthoz, fukózcsoporthozként 3-5 galaktózamincsoportot, fukózcsoporthozként 7-11 glükózamincsoportot, fukózcsoporthozként 3-5 galaktózcsoporthoz, fukózcsoporthozként 1-2 glükózcsoporthoz és fukózcsoporthozként 3-5 mannózcsoporthoz.

Az eukarióta lehet protozoa vagy egy felnőtt laposféreg [például a *Schistosoma* vagy *Fasciola* nemzetségből vagy a galandférgek (Cestodes) osztályából]. Az eukarióta para-

zita lehet protozoa vagy patogén laposféreg (például a *Schistosoma* vagy *Fasciola* nemzetségből vagy a galandférgek osztályából).

A hordozócsoporthoz kapcsolódhat az oligoszacharidhoz egy összekötő csoporton (linker) keresztül [például 2-(4-aminofenil)-etil-amin].

A találmány körébe tartoznak izolált lipoglikánok (például mintegy 180 kD méretűek), amelyek lipidcsoportot, egy vagy több fukózcsoportot, fukózcsoportonként 3-5 galaktózamincsoportot, fukózcsoportonként 2-4 glükózamincsoportot, fukózcsoportonként 1-2 galaktózcsoportot, fukózcsoportonként 1-2 glükózcsoportot, fukózcsoportonként 1-2 mannózcsoportot vagy fukózcsoportonként 1-3 mannózcsoportot tartalmaznak. Egy konkrét megvalósítási módban ez a lipoglikán fukózcsoportonként 4 galaktózamincsoportot, 3 glükózamincsoportot, 2 galaktózcsoportot, 2 glükózcsoportot és 2 mannózcsoportot tartalmaz. A lipoglikánt a *Schistosoma* törzsbe tartozó egyik fajból nyerhetjük ki.

A találmány továbbá izolált lipoglikánra vonatkozik (például mintegy 180 kD méretűre), amely lipidcsoportot, egy vagy több fukózcsoportot, fukózcsoportonként 3-5 galaktózamincsoportot, fukózcsoportonként 7-11 glükózamincsoportot, fukózcsoportonként 3-5 galaktózcsoportot, fukózcsoportonként 1-2 glükózcsoportot és fukózcsoportonként 3-5 mannózcsoportot tartalmaz. Egy konkrét megvalósítási módban a lipoglikán fukózcsoportonként 4 galaktózamincsoportot, 9 glükózamincsoportot, 4 galaktózcsoportot, 1 glükózcsoportot és 4 mannózcsoportot tartalmaz. Ez a

lipoglikán egy *Fasciola* nemzetségbe tartozó fajból nyerhető ki, és/vagy inozitot tartalmaz.

A találmány továbbá egy kompozícióra vonatkozik, amely a találmány szerinti lipoglikánokból izolált oligoszacharidhoz kapcsolódó hordozócsoporthoz áll. A hordozócsoporthoz az oligoszacharidhoz kapcsolódhat egy összekötő csoporton keresztül (például 2-(4-aminofenil)-etil-amin).

A lipoglikán olyan molekula, amely legalább egy lipidcsoportot és legalább egy szénhidrátcsoporthoz tartozó csoportot tartalmaz. Az izolált lipoglikán egy adott molekulatömeggel rendelkező lipoglikán preparátum, amely legalább 60 tömeg% arányban az érdeklődés középpontjában álló lipoglikánt tartalmazza. A lipoglikán természetesen izolálható és tisztítható nagyobb tisztaságban is, például a készítmény legalább 80%-a, 90%-a vagy 95%-a a kívánt lipoglikán. A másik 40% tartalmazhat más makromolekulákat, például lipideket, proteineket, szénhidrátokat és nem az adott molekulatömeggel rendelkező más lipoglikánokat. A lipoglikán mentes lehet természetesen előforduló aminosav maradványoktól. A lipoglikán molekulatömegét nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gél elektroforézis (angolszász rövidítéssel: SDS-PAGE) eljárással határozzuk meg redukáló körülmények között.

A leírásban a "protektív immunválasz" kifejezés alatt olyan immunválaszt értünk, amely alkalmas parazita által kiváltott produktív fertőzés megelőzésére, csökkentésére vagy gátlására. Megelőző készítmény esetén az állati vagy emberi gazdaszervezet még nem fertőzött, tehát a készítmény



mény megelőzi vagy gátolja (részlegesen vagy teljesen) bármiféle fertőzés vagy a produktív fertőzés egy vagy több tünetének kialakulását, amelyet parazitáknak való későbbi kitettség okozna. A terápiás készítménynek ebben az esetben az állati vagy emberi gazdaszervezet egy folyamatban lévő produktív fertőzést mutat, és a készítmény a produktív fertőzést csökkenti, vagy véget vet annak. A produktív fertőzés olyan fertőzés, amelynek során életképes paraziták izolálhatók a gazdaszervezetből. A protektív immunválasz IgG antitestek termelését és a T-sejtek aktiválását foglalja magban. Egy protektív készítmény (például vakcina) protektív immunválaszt vált ki.

A hordozócsoporthoz egy olyan molekula, amely az oligoszacharidhoz kapcsolódva segít az oligoszacharid antigén emlős immunrendszerébe való bejuttatásában. A hordozócsoporthoz példaként említhetjük többek között a proteineket, például a borjú szérumból albumint (BSA), a tetanusz-toxoidot, az ovalbumint és a parazita proteint.

Az adjuváns olyan anyag, amelyet a találmány szerinti készítménybe belekeverünk, vagy azzal egyidőben adjuk be. Az adjuváns fokozza az immunválasz időtartamát vagy szintjét az emlősben az antigén beadása után. Egy adjuváns segítheti az antigén emlősbe vagy annak konkrét szöveteibe, sejtjeibe vagy az emlős testének különféle helyeire történő bejuttatását. Az adjuvánsokra nem korlátozó értelmű példaként említhetjük a nem teljes Freund-féle adjuvánst, a teljes Freund-féle adjuvánst és az alumot; és tartalmazhat szkvalént (például MF59, Chiron Corp. Emeryville, CA),



monofoszfolipid A-t (például DetoxJ, Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT), szaponinokat (QS-21, Cambridge Biotech, Cambridge, MA), nem-ionos felületaktív anyagokat (NISV, Proteus, Cheshire, United Kingdom), tokolokat (5 667 784 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat), biodegradábilis-biokompatibilis poli(D,L-laktid-ko-glikolid)-ot (5 417 986 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), immunstimuláló komplexeket (ISCOM-ek) és/vagy liposzómákat.

A nem redukáló végcsoport, mivel a cukrokhoz tartozik, olyan cukrot jelent, amely redukálja a Benedict-féle reagenst a redukáló cukrokra vonatkozó Benedict-féle vizsgálatban (lásd például <http://www.acp.edu/web/genchem/thedisk/food/bened/bened.htm>).

Az új izolált lipoglikánok hasznosak paraziták elleni terápiás és megelőző készítmények, például védőoltások előállításában. Másfelől a készítmények hasznosak protektív immunválasz kiváltásában parazitákkal szemben, ahogyan azt az alábbiakban részletezzük.

A találmány szerinti izolált lipoglikánok, készítmények és alkalmazások új eszközt nyújtanak vakcinák előállítására és alkalmazására számos eukarióta parazita ellen, például laposférgek és protozoák ellen. A természetes fertőzésekben szereplő paraziták többségével ellentétben a találmány különböző aspektusai lehetőséget nyújtanak T-sejt-dependens immunválaszok stimulálására állati vagy emberi gazdaszervetben, ideértve a parazita-specifikus IgG termelést. A találmány szerinti készítmények és alkalmazá-



sok felhasználhatók lipoglikán-specifikus antitestek termelésére, amelyek a fertőzés diagnosztizálásában hasznosak. A találmány szerinti izolált lipoglikánok felhasználók továbbá diagnosztikai vizsgálatokban is, amelyekben a találmány szerinti lipoglikánok a biológiai mintában jelen lévő antitestekhez kötődnek.

Hacsak másképp nem jelöljük, minden műszaki és tudományos kifejezésnek azt a jelentést tulajdonítjuk, amelyet általánosan a találmány területén jártas szakember ért rajtuk. Bár az alábbiakban ismertetünk a találmány gyakorlatbavételére vagy tesztelésére alkalmas módszereket és anyagokat, az ismertetettektől eltérő hasonló vagy ekvivalens egyéb módszerek és anyagok is alkalmazhatók, amelyek a szakterületen jól ismertek. Minden említett publikációt, szabadalmi bejelentést, szabadalmi iratot és minden egyéb referenciát a teljes terjedelmükben a kitanítás részeként tekintjük. Ellentét esetén a találmány leírása - ideértve a definíciókat - a mérvadó. Az anyagok, módszerek és példák csak szemléltető jellegűek, és nem korlátozó értelműek.

A találmány más jellemvonásai és előnyei nyilvánvalóvá válnak az alábbi részletes leírásból és az igénypontokból.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

A találmány parazita fertőzések kezelésében alkalmazható terápiás és megelőző készítményekre vonatkozik, amelyek például úgy hatnak, hogy protektív immunválaszt váltanak ki a paraziták ellen. Számos parazita nem immunogén

vagy nem kellően immunogén ahhoz, hogy hatékony immunválaszt váltson ki. A találmány szerinti megoldás lehetővé tesz egy parazita antigén prezentációs stratégiát, amely protektív immunválaszt vált ki. Ez a stratégia magában foglalja egy lipoglikán izolálását a parazita felületéről, a lipoglikánból oligoszacharidok előállítását, az oligoszacharidok hordozóhoz való kapcsolását és az oligoszacharid/hordozócsoport konjugátum beoltását a beoltandó emlősbe. Ezek az oltások protektív immunitást nyújtanak - legalábbis részben - azért, hogy parazita-specifikus IgG termelést indukálják, ahogyan azt az alábbi példákban bemutatjuk.

A találmány szerinti alkalmazások, lipoglikánok és készítmények felhasználhatók emlős beoltására különféle paraziták ellen. A paraziták egyik általános osztályát alkotják a laposférgek törzsébe tartozó férgek. A laposférgek közé tartoznak a Trematoda (szívóférgek) osztályába tartozó laposférgek (például a *Schistosoma* törzsbe tartozó férgek, úgymint az *S. bovis*, *S. indicum*, *S. japonicum*, *S. mattheei*, *S. spindale*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. mansoni* vagy *S. mekongi*; a *Fasciola* törzsbe tartozó férgek, úgymint az *F. hepatica*, *F. gigantica* és *F. jacksoni*; és a *Fasciolides magna* féreg), amelyek embereket és háztáji állatokat fertőznek. A laposférgek közé tartoznak a Cestoda osztályba tartozó galandférgek, amelyek embereket (a *Taenia* törzsbe tartozó férgek) vagy kutyákat fertőznek (a *Mesocostodes* törzsbe tartozó férgek). A paraziták egy másik általános osztályát alkotják az olyan protozoák,

mint például a *Trichomonas*, *Tritrichomonas*, *Leishmania* vagy *Entamoeba* törzsbe tartozók. A *Trichomonas vaginalis* különösen elterjedt az Amerikai Egyesült Államokban, és szimpomatikus genitourináris traktus fertőzéseket okozhat.

Az alábbiakban ismertetjük a lipoglikánok izolálására vonatkozó általános eljárásokat és a készítmények alkalmazását.

Lipoglikánok izolálása parazitákból

A paraziták általában beszerezhetők a kereskedelmi forgalomban, például az American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD cégtől. A *T. vaginalis* például beszerezhető az ATCC-től a 30001 katalógusszámon. Továbbá az *F. hepatica* metacercaria (betokozott késői lárva) beszerezhető a Baldwin Enterprises, Monmouth, OR cégtől, vagy izolálható vízcicigákából, a paraziták egy természetes gazdaszervezetéből. A paraziták beszerezhetők különféle kutatólaboratóriumokból is, többek között azokból, amelyeket a World Health Organization támogat. Alternatív módon izolálhatók természetes gazdaszervezetekből vagy a környezetből (például a *Fasciola* vágóhidakról vagy *Fascoiloidok* szabadterén levő szarvas kísérleti állomásokról).

A szakterületen ismert a paraziták preparálása életciklusuk különböző állomásain. A tokjukat újonnan elhagyó *F. hepatica* juvenilisek (newly excysted juveniles; a továbbiakban röviden NEJ) például izolálhatók Hanna módszere szerint [lásd Exp. Parasitol., **50**, 103-114 (1980)]. Érettebb férgek általában Gibbs és munkatársai szerinti módszer alapján izolálhatók [Lásd: The Veterinary Clinics of

North America: Food Animal Practice, 2. kötet, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA, 261-275. oldal (1996)].

Lipoglikánok izolálhatók parazitából a szakterületen ismert módszerekkel. A parazitákat jellegzetesen foszfátpufferes sóoldattal (PBS) mossuk, majd a parazita felületén levő kis molekulatömegű lipideket (ideértve az egyszerű és összetett lipideket) szerves oldószerekkel extraháljuk. Ezek a nyers, kis molekulatömegű lipidek, amelyek közé tartoznak glicerofosfolipidek, glikoglicerolipidek és szfingolipidek, extrahálhatók kloroform, metanol és víz 3:2:1 térfogatarányú elegyével, ahogyan azt Turko és munkatársai ismertették [*J. Biol. Chem.*, **259**, 3883-3889 (1984); és Bennett, *Parasitol.*, **77**, 325-332 (1978)]. A nyers lipideket alternatív módon hexán és izopropanol 3:2 térfogatarányú elegyével extrahálhatjuk, ahogyan azt Radin ismertette [*Meth. Enzymol.*, **72**, 5-7 (1981)].

Az extrakciós eljárást a parazitától függően választjuk meg. *Fasciola hepatica*-ból például izolálhatjuk a lipoglikánt a parazita szövet előkezelésével, akár kloroform, metanol és víz elegyével, akár hexán és izopropanol elegyével végzett extrakciós eljárással (lásd az alábbi 1. példát) alacsony molekulatömegű lipidek differenciált eltávolítása céljából. Viszont a *Schistosoma mansoni*-ból származó lipoglikán nem izolálható kloroform, metanol és víz elegyével. Ezek a kis molekulatömegű lipidek azonban differenciálisan extrahálhatók a hexán és izopropanol elegyét alkalmazó eljárással (lásd az alábbi 2. példát).



Fasciola hepatica esetén a kloroform, metanol és víz elegyével vagy hexán és izopropanol elegyével végzett extrakció vagy a *Schistosoma mansoni* esetében a hexán és izopropanol elegyével végzett extrakció olyan maradékot eredményez, amelyből a lipoglikán extrahálható „E oldószerrel”.

A lipoglikánt a kis molekulatömegű lipidmaradékból izolálhatjuk víz, etanol, dietil-éter, piridin és ammónium-hidroxid 15:15:5:1:0,017 arányú elegyével, vagy más néven E oldószerrel végzett extrahálással, ahogyan azt Turko és munkatársai ismertették [lásd fent]. Az E oldószerrel készült extraktumot szárítjuk a lipoglikán izolálása céljából. További eljárásokat is végrehajthatunk a lipoglikán további tisztítása céljából, például gélszűrést, hidrofób kromatográfiás eljárást és metanolos kicsapást.

Az izolált lipoglikánokat SDS-PAGE eljárás alkalmazásával jellemezhetjük a molekulatömegük meghatározása céljából. Továbbá, a lipoglikán szénhidrát részének monoszacharid profilját meghatározhatjuk úgy, hogy a lipoglikánt savas hidrolízisnek vetjük alá, majd pulzáló amperometriás detektorral felszerelt nagyhatékonyságú anioncserélő kromatográfiás rendszer alkalmazásával elemezzük a gyártó utasításai szerint. Ilyen rendszerek és detektorok beszerezhetők a Dionex Inc. Sunnyvale, CA cégtől.

Oligoszacharid/hordozócsoporthoz konjugátumok előállítása

A terápiás vagy profilaktikus készítményben, például a parazitaellenes vakcinában hasznos antigén előállítása

céljából oligoszacharidokat szabadítunk fel az izolált lipoglikánból. Ezt végrehajthatjuk például szokásos enyhe savas hidrolízis vagy glikozidáz kezelés alkalmazásával. Lásd például: Semprevivo és munkatársai: *Carbohydr. Res.*, **177**, 222-227 (1988). Az oligoszacharidok további tisztítását is végrehajthatjuk (például oszlopkromatográfiás eljárással) specifikus mérettartományú (például 800-3000 dalton) oligoszacharidok izolálása céljából. Ezek az oligoszacharidok tartalmazhatnak nem redukáló végcsoportokat, ismétlődő alegységeket és/vagy a lipoglikán mag részzeit. Továbbá, egy adott lipoglikánból (a továbbiakban röviden LG) kinyert oligoszacharidokról azt várjuk, hogy ugyanazokat a szénhidrát maradékokat tartalmazzák, mint maga az LG.

Az oligoszacharidokat vagy az oligoszacharidok keverékeit ezután szokásos eljárásokkal hordozócsoporthoz kapcsoljuk hatékony immunogének előállítására céljából, mivel hapténekként önmagukban véve az oligoszacharidok valószínűleg gyenge immunogének lennének. Hordozócsoport lehet bármely polipeptid, szerves polimer vagy kisebb molekula, amely alkalmas emlősnek való beadásra. Az oligoszacharidhoz kapcsolódva a hordozócsoportok fokozzák az oligoszacharid epitópok bejutását az emlős immunrendszerébe, ezáltal az oligoszacharidra specifikus, és tágabb értelemben a parazita felületén levő lipoglikánra specifikus immunválaszt indukálnak. Sok különböző oligoszacharid keverékének alkalmazása segít megelőzni azt, hogy a célzott eukarióta alkalmazkodjon, és elkerülje az immunválaszt.

Bármely szokásos kémiai összekötő csoport (például bifunkcionális összekötő csoport, amely például reaktív aminocsoportokat tartalmaz) felhasználható az oligoszacharidok hordozócsoportához való kapcsolásához. Az ilyen összekötő csoportokra példaként említhetjük többek között az 1-ciano-4-dimetilaminopiridinium-tetrafluorborátot, a 4-(4-N-maleimidometil)-ciklohexán-1-karboxil-hidrazidot és valamely fenetilamin-izocianát-származékot. Lásd például: Lee és munkatársai: *Vaccine*, **14**, 190-198 (1996); Ragupathi és munkatársai: *Glycoconjugate J.*, **15**: 217-221 (1998); Roy és munkatársai: *Canad. J. Biochem. Cell. Biol.*, **62**, 270-275 (1984); és Smith és munkatársai: *Methods Enzymol*, **50**, 169-171 (1978)].

Az oligoszacharidok hordozócsoportához, például BSA-hoz való kapcsolásának kémiája, és az alkalmas eljárások a szakterületen ismertek. Például egy oligoszacharid terminális redukáló monoszacharid maradékának karbonilcsoportját reagáltathatjuk egy összekötő csoport, például 2-(4-aminofenil)-etil-amin primer alkilamin-csoportjával köztitermék előállítására céljából. Ezt a köztiterméket ezután nátrium-borohidriddel redukáljuk nem stabil köztitermék előállítására céljából, és a köztitermék összekötő csoport részének terminális arilaminocsoportjának és egy diazo hídnak maradékokkal, például egy polipeptid hordozó, például BSA lizin maradékaival való kondenzálásának elősegítése céljából. Lásd: Zopf és munkatársai: *Meth. Enzymol.*, **50**, 163-169 (1978); és Semprevivo és munkatársai, a fentiekben idézett irodalmi helyen.



Míg a fenti módszerekkel egyetlen lipoglikán forrás emésztéséből származó különböző oligoszacharid molekulákat kapcsolunk a hordozócsoporthoz, egynél több lipoglikánból (például két parazita fajból származó lipoglikánból) származó oligoszacharidokat is kapcsolhatunk egyetlen hordozócsoporthoz. Az ilyen multispecifikus konjugátumok különösen hasznosak széleskörű védőhatással rendelkező vakcinák előállításában.

Eljárás oligoszacharid/hordozócsoporthoz konjugátumokat tartalmazó készítmények előállítására

A készítmények tartalmazhatnak egy vagy több különböző típusú oligoszacharid/hordozócsoporthoz konjugátumot. Például különböző lipoglikánokból előállított konjugátumokat elvegyíthetünk ugyanabban a készítményben kereszt védőhatású vakcina készítmény előállítására céljából. A vakcina készítmények általában lehetnek megelőző hatásúak (nem fertőzött egyedek számára), vagy terápiás hatásúak (a már fertőzött egyedek számára).

A készítmények adott esetben tartalmazhatnak gyógyászatiilag elfogadható segédanyagot, például foszfátpufferes sóoldat vagy hidrogén-karbonát (például 0,24 M NaHCO_3) hígítószeret. Az új készítményekben alkalmazott segédanyagokat szakember képes megválasztani a beadás módjától és útjától, és a szokásos gyógyszerészeti gyakorlattól függően, felesleges kísérletezés nélkül. Alkalmas gyógyászati segédanyagok és hígítószeret, valamint alkalmazásuk gyógyszerészeti szükségességei megtalálhatók például a Remington's Pharmaceutical Sciences c. könyvben. A vakcina

készítmények tartalmazhatnak továbbá adjuvánst is, például koleratoxint, *Escherichia coli* hőlabilis enteroxint (LT), liposzómát vagy immunstimuláló komplexet (ISCOM).

A gyógyászati készítmények formulázásához az oligoszacharid/hordozócsoporthoz konjugátumot tovább tisztíthatjuk szokásos eljárásokkal az adott esetben jelen lévő szennyezők, például endotoxinok eltávolítása céljából. A végső konjugátum készítményt liofilizálhatjuk és steril ionmentesített vízben szuszpendálhatjuk. Ezután hozzáadhatunk megfelelő gyógyászati kötőanyagokat.

A terápiás készítményeket formulázhatjuk oldat, szuszpenzió, kúp, tablettá, granulátum, por, kapszula, kenőcs vagy krém formájában. Ezeknek a készítményeknek az előállításánál legalább egy gyógyászati segédanyagot is bekeverhetünk. A gyógyászati segédanyagokra példaként említhetjük az oldószereket (például víz vagy fiziológiás sóoldat), szolubilizálószereket (például etanol, poliszorbátok vagy Cremophor EL7), izotonicitás elérését biztosító szert, tartósítószer, oxidálószer, laktózt, keményítőt, kristályos cellulózt, mannitot, maltózt, kalcium-hidrogén-foszfátot, könnyű kovásvanhidridet, kalcium-karbonátot, kötőanyagot (például keményítő, polivinil-pirrolidon, hidroxipropil-cellulóz, etil-cellulóz, karboximetil-cellulóz vagy gumiarábikum), síkosítót (például magnézium-sztearát, talkum vagy megszilárdított olajat), vagy stabilizálószer (például laktóz, mannit, maltóz, poliszorbátok, makrogolok vagy polioxietilén-megszilárdított ricinusolaj). Kívánt esetben hozzáadhatunk glicerint, dime-



til-acetamidot, 70%-os nátrium-laktátot, felületaktív anyagot vagy bázikus vegyületet, például nátrium-hidroxidot, etilén-diamint, etanolamint, nátrium-hidrogén-karbonátot, arginint, meglumint vagy trisz-aminometánt. Ha a készítmény lassú kioldódása a cél, biodegradábilis polimerek, például poli-DL-laktid-koglikolid vagy poliglikolid alkalmazható alap mátrixként (lásd például: 5 417 986, 4 675 381 és 4 450 150 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok). Ezekkel az összetevőkkel gyógyászati készítmények, például oldatok, tabletták, granulátumok vagy kapszulák állíthatók elő. Ha a készítményt orálisan adjuk be, aromaanyagokat és/vagy színezékeket is hozzáadhatunk.

Oligoszacharid/hordozócsoporthoz konjugátumokat tartalmazó készítmények beadása

Az új készítményeket beadhatjuk bármilyen megfelelő módon, például intravénásan, intraartériásan, topikálisan, injektálással, intraperitoneálisan, intrapleurálisan, orálisan, szubkután, intramuszkulárisan, szublingválisan, nazálisan, inhalálással, intraepidermálisan vagy rektálisan.

A találmány szerinti beadandó dózisok több tényezőtől függenek, többek között a konkrét vakcina antigéntől és annak készítménybeli koncentrációjától, attól, hogy az adjuvánst az antigénnel együtt adjuk-e be, az együtt beadott adjuváns típusától, a beadás módjától és gyakoriságától és az elérni kívánt hatástól (például fertőzés elleni védelem vagy már létrejött fertőzés kezelésére). Az alkalmas dózisokat szakember felesleges kísérletezés nélkül képes meg-



határozni. Az új készítményeket általában 0,01 μ g és 1 mg közötti mennyiségben adjuk be testtömeg kg-ra vonatkoztatva. Ha a készítménnyel együtt adjuvánsokat adunk be, alkalmazhatjuk a közvetlenül előbb megadott dózisoknak csupán 1%-át. Az állatorvosi felhasználásban a dózistartományt a testtömeggel összhangban állíthatjuk be.

A beadást szükség esetén megismételjük, ahogyan azt a szakember meghatározza. Megelőzés esetén például egy indító dózist követhet három erősítő dózis egyhetes időközökkel. Az első immunizálás után 8-12 héttel egy erősítő löketet adhatunk be, és egy második erősítőt adhatunk be a 16-20. héten ugyanannak a készítménynek az alkalmazásával. Az egyénből szérumot vagy T-sejteket vehetünk a parazita (vagy parazita felületi antigének) elleni készítmény alkalmazásával kiváltott immunválasz *in vitro* vizsgálata céljából. A szakterületen jól ismertek egy specifikus antigén elleni antitestek, citotoxikus T-sejtek vagy más immun funkciós mediátorok vizsgálatai, és ezek parazitákat elpusztító képességének *in vitro* vizsgálati eljárásai; többek között ezek közé tartoznak az alábbi példákban ismertetett eljárások. Lásd továbbá például a 4 656 033 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást; a WO 90/02563 számú nemzetközi közrebocsátási iratot; Vieira és munkatársai: *Comp. Biochem. Physiol.*, **100B**, 507-516 (1991), Butterworth és munkatársai: *Immunol. Res.*, **61**, 5-39 (1982); Bickle és munkatársai: *J. Immunol.*, **128**, 2101-2106 (1982); és Simpson és munkatársai: *Infect. Immun.*, **41**, 591-597 (1983). Szükség esetén további erősítő-

ket adhatunk be. Az immunogén vagy a készítmény mennyiségének változtatásával optimalizálhatjuk az immunizációs protokollt maximális immunválasz kiváltása céljából.

Mielőtt a fenti készítményeket embereknek beadnánk, toxicitási és hatékonysági vizsgálatokat végezhetünk állatokon. A hatásvizsgálat egyik példájában egereket oltunk be orális vagy parenterális úton oligoszacharid/hordozócsoporthoz konjugátum antigént tartalmazó készítménnyel. A kezdeti beoltás után vagy adott esetben erősítő oltások után az egereket (és a megfelelő kontroll egereket, amelyek oltás utánzatot kapnak) a parazita LD₅₀ dózisával kihívjuk. A protektív immunitást ezután az életképes paraziták hiányával vagy számának csökkenésével (például 70%, 80%, 90%, 95%, 99% vagy 100% csökkenés) jellemezzük. Alternatív módon a kihívást halálos dózissal végezzük, és a protektív immunitást a halálozás hiányával határozzuk meg. Általában a *Fasciola* halálos dózisa egerekben 5 vagy több ciszta (betokozódott parazita), és a halálos schistosome dózis egerekben mintegy 50 vagy több cercaria (lárva).

Például egy schistosome lipoglikánból származó oligoszacharidok konjugálhatók BSA-val, hígíthatók PBS-ben és beadhatók egérnek. Kontrollként egy nemspecifikus oligoszacharidot (például maltotriózt) konjugálhatunk BSA-val, hígíthatunk PBS-ben és ugyanezen a napon beadhatjuk egereknek. Az első oltás után mintegy 1 hónappal egy erősítő oltást adunk be. Mintegy 2 héttel később az egereket 50-500 *Schistosoma mansoni* lárvával próbára tesszük. Az egereket a kihívás után 1 héttel elaltatjuk és felboncoljuk,

és minden egérben megszámoljuk a tüdőben levő életképes férgek számát. A protektív immunitást a teszt egerekben lévő életképes férgek hiányával vagy számuk csökkenésével jellemezzük a kontroll egerekben lévő életképes férgekhez viszonyítva. A schistosome fertőzés állatkísérleti modelljeire vonatkozó további részleteket megtaláljuk az alábbi szakirodalmi helyen: Sher és munkatársai: *J. Inf. Dis*, **130**, 626-6333 (1974); és Bergquist és munkatársai: *Parasitol. Today*, **14**, 99-104 (1998).

Egy *Fasciola* lipoglikán oligoszacharid/hordozócsoport konjugátumon alapuló vakcinát vizsgálhatunk a schistosome vakcinára a fentiekben ismertetett eljáráshoz hasonlóan, azzal a különbséggel, hogy a különböző lépések időzítését szükségyszerűen módosítjuk, és az elaltatott egereknek nem a tüdejét, hanem a máját vizsgáljuk a fertőzés jeleire. A protektív immunitást itt is a teszt egerekben levő életképes férgek teljes számának a kontroll egerekben levő életképes férgekhez viszonyított csökkenésével vagy hiányával jellemezzük, vagy a fertőzéssel kapcsolatos tünet csökkenésével. A *Fasciola* fertőzés állatkísérleti modelljeire vonatkozó további részleteket megtaláljuk az alábbi szakirodalmi helyeken: Morrison és munkatársai: *Vaccine*, **14**, 1603-1612 (1996); Hughes és munkatársai: *Res. Vet. Sci*, **30**, 93-98 (1981); és Rajasekariah és munkatársai: *Exp. Parasitol*, **44**, 233-238 (1978).

A protozoa fertőzés állatkísérleti modelljeire vonatkozó részleteket megtaláljuk az alábbi szakirodalmi helyeken: Corbeil, *Parasitol. Today*, **10**, 103-106 (1994);

Ghadirian és munkatársai: *Parasite Immunol.*, **7**, 479-487 (1985); Farrell, *Exp. Parasitol.*, **40**, 89-94 (1976) és Gorczynski, *Cell. Immunol.*, **94**, 1-10 (1985).

Az egyednek beadott konjugátum dózisa általában függ a betegség súlyosságától (ha egyáltalán fennáll betegség), a kortól, a testtölegetől, a nemtől és az egyed általános egészségi állapotától.

Orvosok, gyógyszerészek és más szakemberek képesek meghatározni a terápiásan leghatékonyabb kezelési rendet, amely betegről betegre változik. Egy adott készítmény hatékonysága és hatásának időtartama megkívánhat ritka beadást, ideértve a polimerből készült implantátumok beadását, amelyek a konjugátum lassú felszabadulását teszik lehetővé. Gyakorlott szakemberek azzal is tisztában vannak, hogy a kezelési rendnek arányosnak kell lenniük biztonságossági szempontokkal és a lehetséges toxikus hatásokkal, amelyet a konjugátum vagy a készítmény más komponensei, például az adjuvánsok okozhatnak.

Variációk

A lipoglikán molekulának azok a részei, amelyek protektív antitesteket indukálnak, meghatározhatók úgy, hogy a lipoglikán adott régióira specifikus monoklonális antitesteket termelünk, és meghatározzuk, hogy a lipoglikánnak ezen részei közül melyik vesz részt a parazita elpusztításában vagy eliminálásában. Az antitestek termelődését általában előidézhetjük úgy, hogy az állatnak az itt ismertetett immunogén készítményeket beinjektáljuk. A monoklonális antitesteket és az ezeket termelő



hibridómákat az immunizált állatból izolált vérsejt-populációból a molekuláris biológia területén szokásos módszerek alkalmazásával klónozzhatjuk és szkrínelhetjük (befogó részként az eredeti antigén komplexet használva).

Miután az antitesteket szelektáltuk az említett szkrínek alkalmazásával, legalább kétféle eljárással határozhatjuk meg a konkrét oligoszacharid szerkezeteket, amelyekhez kötődnek. Az első eljárásban az antitesteket használjuk oligoszacharid molekulák egy könyvtárának szkrínelésére, ahol a könyvtár minden tagjának ismert kémiai szerkezete van. A második eljárásban az antitesteket arra használjuk, hogy "kihalásszuk" a specifikus oligoszacharidokat oligoszacharidok egy összetett keverékéből, amelyet egy lipoglikán emésztésével állítunk elő az itt ismertetett módszerekkel. A specifikus oligoszacharidok szerkezetét ezután a szénhidrát kémia területén ismert kromatográfiás, spektrometriás vagy más fizikai és/vagy kémiai eljárások alkalmazásával azonosítjuk.

Egy másik variáció a hordozócsoporthoz szelekcióját foglalja magában. Egy parazitával való fertőzés jellegzetesen specifikus humorális és celluláris immunválaszokat indukál egy gazdaszervezetben. Azonban a parazitafehérjék önmaguktól ritkán indukálnak jelentős rezisztenciát homológ kihívás ellen. Ezek a parazitafehérjék tehát ideális hordozók lehetnek, amelyekhez konjugálhatjuk a lipoglikán oligoszacharidokat. Azok a fehérjék, amelyek immunválaszt váltanak ki a fertőzés korai szakaszában, hatékony hordozó



csoportként működhetnek a fertőzések elleni rezisztencia indukálásánál.

Az oligoszacharidok hordozócsoporthoz való konjugálásának eszközei is fejleszthetők. Számos eljárás és összekötő csoport áll rendelkezésre, amelyekkel megkönnyíthetjük a szénhidrátok hordozómolekulákhoz való konjugálását a fentiek szerint.

Példák

A találmányt részletesebben ismertetjük az alábbi példákban, amelyek semmilyen tekintetben nem korlátozzák a találmány oltalmi körét vagy tartalmát.

1. példa

Védőoltás *Fasciola* ellen

Annak meghatározásához, hogy *Fasciola hepatica* képes-e a gazdaszervezet immunválaszait elkerülni az IgM-re adott válasz korlátozásával, először az antitest termelést vizsgáltuk.

Lipoglikán izolálás

Egy paraziták elleni vakcina előállítására hasznos lipoglikán izolálása céljából felnőtt *F. hepatica* példányokat dolgoztunk fel szokásos eljárásokkal a béltartalom eltávolítása céljából [Lung és munkatársai: *J. Parasitol*, **63**, 1046-1049 (1977)], majd gyorsfagyasztást végeztünk. A gazdaszervezetből való begyűjtés után közvetlenül a felnőtt mótelyeket steril foszfátpufferes sóoldat (pH = 7,2) feleslegével mostuk mintegy 37-38 °C hőmérsékleten 30 percen át, majd egy második mosást végeztünk ugyanebben az

oldatban 20 percen át. A felületi kültakaróval rendelkező kizsigerelt *F. hepatica* tetemet először a felületi bőrréteg lipidmentesítésére izopropanol és hexán 2:3 térfogatarányú elegyével kezeltük, ahogyan azt Radin (lásd fent) ismertette, majd extrahálást végeztünk E oldószerrel Turco és munkatársai szerint (lásd fent). Az extraktumot száraz nitrogéngáz áramban szárítottuk és egy maradékot kaptunk.

Egy külön kísérletben meghatároztuk, hogy egy kloroform, metanol és víz 1,0:1,0:0,3 térfogatarányú elegyével végzett extrakció Turco és munkatársai szerint (lásd fent) az izopropanol és hexán elegyével végzett extrakció helyett ugyanúgy használható-e a felület lipidmentesítésére, a lipoglikán extrahálása céljából az E oldószerrel végzett kezelés előtt.

Az E oldószer maradékát 40 mM ammónium-hidroxid-oldatban újra szuszpendáltunk és analizáltuk: 1) az orcinol-kénsav eljárás alkalmazásával, ahogyan azt White és munkatársai módosították [lásd: Oligosaccharides, 2. fejezet, Carbohydrate Analysis, A practical approach (Chaplin és munkatársai, szerkesztők), IRL Press, Oxford, 3. oldal (1996)]; és 2) a mikro Lowry módszer Peterson-féle módosításával a proteinek mennyiségi meghatározására [Yamato és munkatársai: Lipid, 5, 442 (1970)] kereskedelmi forgalomban kapható kit alkalmazásával (Sigma, katalógusszám P5656). Ezek az elemzések azt mutatták, hogy az E oldószeres extraktum mintegy 0,5 mg szénhidrátot tartalmazott a szövet 1 g-jára vonatkoztatva. Nyomnyi mennyiségű proteint mutattunk ki.

Az E oldószeres maradékot tovább tisztítottuk gélszűréssel, egy Sepharose Cl-4B oszlopon (Pharmacia). A CL-4B oszlopot (2,5 x 40 cm) 40 mM ammónium-hidroxidot és 1 mM EDTA-t tartalmazó oldattal eluáltuk, és figyelemmel kísértük minden frakció OD₄₉₀-es (az optikai sűrűség 490 nm-en végzett) leolvasását. A 12.-33. csúcsfrakciót egyesítettük és hidrofób oktil Sepharose oszlopra vittük fel, amelyet 0,1 M ammónium-acetátot és 5% n-propanolt tartalmazó oldattal ekvilibráltunk. Az oktil Sepharose oszlopot (Pharmacia) n-propanollal eluáltuk (5%-tól 60%-ig terjedő gradienssel), és ismét figyeltük az OD₄₉₀-et. A fenti izolálási eljárás további részleteit megtaláljuk az alábbi szakirodalmi helyen: Shing és munkatársai: *J. Biol. Chem.*, **269**, 21972-21982 (1994). Az oktil Sepharose oszlopról a csúcs frakciókban lejövő lipoglikánt metanolos kicsapással izoláltuk.

Lipoglikán szerkezet

Az *F. hepatica* lipoglikán méretének felméréséhez az izolált lipoglikánt redukáló SDS-PAGE eljárásnak vetettük alá egy 12%-os gélen. A gélen a szénhidrát sávokat perjódsav-Schiff reagens alkalmazásával hívtuk elő, amely kis közönként elhelyezkedő sávokat tett láthatóvá mintegy 180 kD-nak megfelelő mérettartományban. A gél Coomassie késsel való festése nem mutatott ki proteint az izolált lipoglikán preparátumban.

A lipoglikán monoszacharid-összetételének meghatározásához a preparátumot enyhe savas hidrolízisnek vetettük alá inkubálással. Mintegy 225 µg lipoglikánt kezeltünk 2

ml 2,5 M trifluor-ecetsavval 100 °C hőmérsékleten 3 órán át (Singh, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **57**, 281-294 (1993)). Ez a kezelés nem specifikusan hasítja a glikozid kötéseket a lipoglikán szénhidrogén komponensében. A kapott monoszacharidokat ezután pulzáló amperometriás detektorral felszerelt nagyhatékonyságú anioncserélő rendszerben elemeztük (Dionex, Inc., Sunnyvale, CA), ahogyan azt Hardy és munkatársai ismertették [*Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **85**, 3289-3293 (1988)]. A lipoglikán mintákat 2,5 M trifluor-ecetsav alkalmazásával hidrolizáltuk a fentiek szerint 13x100 mm-es csavaros tetejű Pyrex csövekben. A tetőket teflon tömítéssel lezártuk. A csöveket hűtöttük és a savat forgó bepárlókészüléken mintegy 40 °C-on eltávolítottuk. A mintákat ezután 15 mM nátrium-hidroxid-oldatban oldottuk és Carbowax-PA1 oszlopra vittük fel 15 mM nátrium-hidroxidot alkalmazva eluensként. A monoszacharid-összetételt pulzáló amperometriás detektorral felszerelt nagyhatékonyságú anioncserélő kromatográfia alkalmazásával határoztuk meg (Dionex Corp., Sunnyvale, CA). Az egyes monoszacharidokat úgy határoztuk meg, hogy összehasonlítottuk a kísérleti retenciós időket a Sigma cégből beszerzett, hasonlóan kezelt monoszacharid kontrollok retenciós idejével. A molarányokat az egyes cukroknak megfelelő kromatográfiai csúcsok alatti területek integrálása alapján határoztuk meg.

Az elemzés azt mutatta, hogy a lipoglikán fukózt, galaktóزامint, glükóزامint, galaktózt, glükózt és mannózt tartalmazott 1,0:4,0:9,0:4,0:1,0:3,8 arányban.

A lipoglikánban lévő terminális monoszacharidok azonosítását úgy végeztük, hogy a lipoglikánt β -galaktozidázal, α -fukozidázal és α -mannozidázal (Oxford Biosystems) emésztettük. A felszabaduló monoszacharidokat nagyhatékonyságú anioncserélő rendszerben azonosítottuk a fentiek szerint. Az emésztés azt mutatta, hogy terminális β -1,4-kapcsolt galaktóz, terminális α -fukóz és terminális α -mannóz maradékok voltak a lipoglikán összetevői. A β -1,4-galaktóz kapcsolást lektin kötéssel igazoltuk.

A β -1,4-galaktóz kapcsolódást immobilizált ricinus lektin alkalmazásával igazoltuk. Galaktóz oxidáz/ $\text{NaB}[^3\text{H}]_4$ -gyel radiojelzett lipoglikánt vittük fel egy *Ricinus communis* agglutinin-1 (RCA-1) oszlopra (1x2 cm). Az RCA-1 lektin kovalensen kötődött egy 7,4-es pH-értékű PBS-sel ekvilibrált agaróz gyöngyhöz (EY Laboratories Inc.). A töltött oszlopot először PBS-sel, majd 0,2 M laktózzal mostuk. Az oszlop öblítésére 0,1% Triton X-100-at tartalmazó PBS-t használtunk. 1,2 ml-es frakciókat gyűjtöttünk, és mértük a radioaktivitásokat. A lipoglikán (LG) fennmaradt az oszlopon, és csak a laktózt tartalmazó oldattal jött le, ami igazolta a β -1,4-galaktóz kapcsolódás jelenlétét.

Ezek az adatok azt mutatták, hogy az *F. hepatica* lipoglikán szénhidrát összetevője különböző terminális monoszacharidokat tartalmazó elágazó poliszacharidot tartalmaz.

Meghatároztuk a lipoglikán foszfortartalmát is. A lipoglikánt perklórsavas emésztésnek vetettük alá, majd

Barlett szerint elemeztük [lásd: *J. Biol. Chem.*, **234**, 466-468 (1959)].

Fasciola és *Schistosoma* LG-ben levő foszfortartalom detektálására a Fiske és munkatársai által ismertetett módszer [*J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925)] Barlett és munkatársai által módosított változatának [*J. Biol. Chem.*, **234**, 466-468 (1959)] egy mikroadaptált változatát használtuk. Ebben az eljárásban szárított parazita LG-t oldottunk 100 μ l 10 N kénsavoldatban, és 3 órán át 160 °C hőmérsékleten melegítettük. Minden ezt követő reagenst a Barlett és munkatársai (lásd fent) által jelzett térfogat vagy tömeg 1/5-öd részében adtuk hozzá. Az eredményeket 830 nm-en olvastuk le, és a foszfortartalmat nátrium-dihidrogén-foszfát alkalmazásával felvett standard görbe alapján határoztuk meg.

200 μ g szárított mótely LG-t használtunk a mennyiségi foszfát-meghatározási eljárásban [Barlett és munkatársai, lásd fent]. A kísérlet azt mutatta, hogy 200 femtogramm mótely LG mintegy 0,1 femtogramm foszfort tartalmazott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy számos foszformaradék van jelen minden mótely LG molekulában, de a molekula glikán része nem tartalmaz ismétlődő foszfodiészter-csoportokat, mint a protozoák LG-je. A protozoa LG-ben a cukorcsoportok között levő foszfodiészter kötések nagyfokú labilitást kölcsönöznek ezeknek a molekuláknak enyhén savas körülmények között. A protozoa LG-ben a foszfor és a szénhidrát aránya mintegy 1:3 (Singh és munkatársai: *J. Biol. Chem.*, **269**, 21972-21982 (1994)].

Az a megállapítás, hogy a métely LG nem különösebben hajlamos enyhe savas hidrolízisre, és hogy a foszfor szénhidrogénhez viszonyított aránya ebben a molekulában szintén alacsony, arra utal, hogy a métely LG nem tartalmaz foszfodiészter kötéseket a szénhidrátcsoporthoz között. Ez a megállapítás összeegyeztethető a másik kísérlettel, amelyben azt találtuk, hogy a lipoglikán nem degradálódott enyhén savas hidrolízis (40 mM trifluor-ecetsavval) vagy salétromos savas dezaminálás során.

Vizsgáltuk azt is, hogy az inozit összetevője volt-e az *F. hepatica* lipoglikánjának, ezáltal utalva arra, hogy a lipoglikán glikozilfoszfatidilinozithoz (GPI-hez) kötött molekulaként létezik a felnőtt féreg felületén. A lipoglikánt ^3H -val jelöltük szokásos eljárásokkal, majd foszfolipáz C-vel kezeltük (Oxford GlycoSystems, Inc., Rosedale, NY) az inozit maradékok eltávolítására, ha egyáltalán jelen vannak. A ^3H -jelzett LG-t úgy állítottuk elő, hogy az előzőleg galaktóoxidázzal (Boehringer Mannheim Biochemica) kezelt LG molekulát $\text{NaB}[^3\text{H}]_4$ -gyel (New England Nuclear) [Gahmber és munkatársai: *J. Biol. Chem.*, **248**, 4311-4317 (1973)] redukáltuk. A digerált anyagot és a nem digerált jelzett kontroll lipoglikánt külön-külön egy fenil-Sepharose oszlopra vittük fel (Pharmacia), majd 0,1 M ecetsavat és 0,1 M nátrium-kloridot tartalmazó vizes oldattal, és külön E oldószerrel eluáltuk. A digerált mintából származó radio-jelzett anyag a vizes eluenssel eluálódott, míg a kontroll mintából származó anyag csak a szerves eluenssel eluálódott. A vizes fázissal eluálódó

radiojelzett anyagról gáz/folyadékkromatográfiás eljárással [Singh és munkatársai: *J. Biol. Chem.*, **269**, 21972-21982 (1994); és Singh, *Mol. Biochem. Parasitol*, **57**, 281-294 (1993)] igazoltuk, hogy inozit.

***F. hepatica* vakcina készítmény**

Annak a meghatározásához, hogy az izolált *F. hepatica* lipoglikánból származó oligoszacharidok hatékony immungénként szolgálhatnak-e, a lipoglikánt enyhe trifluoracetolízisnek és 2-(4-aminofenil)-etil-aminnal végzett származékképzésnek vetettük alá (lásd Semprevivo, fent). A származékolt köztiterméket ezután BSA-hoz kapcsoltuk oligoszacharid/BSA konjugátum előállítására céljából (lásd Semprevivo, fent).

Az izolált oligoszacharid/BSA konjugátumot SDS-PAGE és Western blot eljárással vizsgáltuk. A konjugálás előtt egy BSA kontroll minta mintegy 67 000 dalton molekulatömeggel rendelkezett, és immunológiailag detektálható volt kereskedelmileg kapható anti-BSA antitesttel. A konjugátum azonban a gélben nagyobb mobilitást mutatott, és nem volt detektálható *F. hepatica*-fertőzött patkányból származó szérum antitestekkel, valamint BSA elleni antitestekkel, ahogyan azt vártuk.

Maltotriózt (Sigma, katalógusszám: M 8378) konjugáltunk BSA-hoz a fenti eljárást követve negatív kontroll konjugátum előállítására céljából.

Az *F. hepatica* vakcina készítményt teljessé tettük a lipoglikán oligoszacharid konjugátum alumínium-hidroxid géllel (Malox) való elegyítésével. Az alumínium-hidroxid

gél egy alkalmas adjuváns emberekben való alkalmazásra, és gyakran alum néven említik.

Egy rágcsáló modell validálása

Az alábbiakban ismertetett oltási kísérletre pozitív kontroll kísérletként öthetes hím Wistar patkányokat óránként beoltottuk 10 *F. hepatica* metacercaria-val, majd 7 héttel később 20 metacercaria-val kihívtuk, és a kihívás után 1 héttel vért vettünk. Minden *F. hepatica*-val fertőzött patkányból immunszérumot nyertünk ki (a módszert lásd Hanna, fent). Szérumokat nyertünk ki *F. hepatica*-val fertőzött patkányokból, egerekből, juhokból és szarvasmarhák-ból is.

Az egyes szérummintákban levő antitestek osztályát indirekt immunfluoreszcens vizsgálattal határoztuk meg. A vizsgálat célpontja az élő *F. hepatica* NEJ volt. Az NEJ-t elegyítettük mindegyik szérummintával, hogy lehetővé tegyük a szérum antitestek és az NEJ közötti kötés kialakulását. A szérum antitesthez kötött NEJ-t azután kecske fluoreszcein-jelzett IgM-specifikus vagy IgG-specifikus szekunder antitestekkel (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) inkubáltuk. A szekunder antitest megfelelt annak a releváns fajnak, amelyből a szérumot elkülönítették. A szekunder antitestek hígításai mintegy 1:200 és 1:300 közöttiek voltak. A szekunder antitesttel való inkubálás után az NEJ-eket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk. Intenzív fluoreszcenciát figyeltünk meg az IgM-specifikus szekunder antitestekkel kezelt NEJ-ken, azonban az IgG-specifikus szekunder antitestekkel kezelt

NEJ-ken nem figyeltünk meg fluoreszcenciát. Ez az eredmény azt mutatta, hogy a várt módon az *F. hepatica*-val fertőzött emlősök képtelenek voltak T-sejt-függő immunválasz létrehozására, amely a jótékony hatású IgG antitestek termelődését indukálná.

Rágcsálók beoltása

A beoltási kísérlethez érett nőstény patkányokat (Wistar fajta, Charles River Laboratories) és érett hím egereket (CD1 fajta, Charles River Laboratories) oltottunk be oligoszacharid és maltotrióz konjugátumokkal. A patkányonkénti dózis 40 μ g konjugátum volt 0,4 ml alumban. Az egerenkénti dózis 20 μ g konjugátum volt 0,2 ml alumban. Egyes állatokat csak alummal oltottunk be, további negatív kontrollként. A vizsgálatban 15 egeret és 15 patkányt használtunk, ezek közül 5 patkány és 5 egér kapott lipoglikán oligoszacharid/BSA konjugátumot, 5 patkány és 5 egér kapott maltotrióz/BSA konjugátumot és 5 patkány és 5 egér kapott csak alumot. A beoltás után 30 nappal az állatok a kezdeti beoltástól függően 0,1 ml alumban elkevert 5 μ g konjugátumot tartalmazó homológ erősítőt vagy alumot kaptak. Minden állattól szérumot gyűjtöttünk a beoltást megelőző napon és 40 nappal a beoltás után.

Beoltott rágcsálók kihívása

Egészséges *F. hepatica* metacercaria-kat válogattunk bonctani mikroszkóp alatt a beoltott állatok következetes kihívó fertőzésének biztosítására. Csak azokat a metacercariális cisztákat (betokozott késői lárvákat) választottuk ki a kihíváshoz, amelyek meghatározott belső morfo-

lógiaival rendelkeztek életképes lárvákra utalva. 40 nappal a beoltás után minden állatot orálisan fertőztünk, egerek esetén 3, patkányok esetén 5, *F. hepatica* metacercaria-val. A fertőzés után 30 nappal az állatokat elaltattuk és felboncoltuk. Minden állatból kimetszettük a májat, és bonctani mikroszkóp alatt vizuális megfigyeléssel vizsgáltuk élő férgekre, és a férgek által indukált betegségek, például májgyulladás vagy máj nekrózis jeleire. Az alumot vagy maltotriózt kapó negatív kontroll egerek májaiban átlagosan 2,4 laposféreg volt májanként, és gyulladás és nekrózis volt megfigyelhető. Az *F. hepatica* lipoglikán oligoszacharid/BSA konjugátumot kapó egerek májaiban nem találtunk férgeket, sem gyulladást, sem nekrózist. Hasonló eredményeket kaptunk patkányokban is azzal a különbséggel, hogy a negatív kontroll patkányok májaiban átlagosan 4,6 laposféreg volt májanként. Nem találtunk férgeket az *F. hepatica* lipoglikán oligoszacharid/BSA konjugátummal oltott patkányok májaiban.

Annak a megerősítésére, hogy az immunogenicitás a lipoglikán oligoszacharid/BSA konjugátumnak volt tulajdonítható, kontroll beoltások sorozatát hajtottuk végre a fentiek szerint, azzal a különbséggel, hogy a vakcina készítmények izolált lipoglikánt, lipoglikán oligoszacharidokat vagy lipoglikán oligoszacharid/BSA konjugátumot tartalmaztak, amelyet perjodáttal kezeltünk a komplex szénhidrátok monoszacharid egységekre való roncsolása céljából. Ismert volt, hogy a perjodátos kezelés alatt a glikolcsoportokat tartalmazó szénhidrát maradékok

dialdehidekké oxidálódnak, de ha három szomszédos szénatom mindegyike tartalmaz hidroxilcsoportot, hangyasav képződik a cukorgyűrűk nyílásaiból, ezáltal elromlik a cukrok konfigurációja.

Azok a patkányok, amelyek ezeket a vakcina készítményeket kapták a fentiekben ismertetett módon, sohasem váltak védetté *F. hepatica* kihívás ellen. Ez az eredmény azt mutatta, hogy (1) a lipoglikán önmagában nem képes protektív immunválasz kiváltására; (2) a lipoglikánból származó oligoszacharidok önmagukban nem képesek protektív immunválasz kiváltására, és (3) az oligoszacharid/BSA konjugátum által biztosított protektív immunválasz függ az oligoszacharidok összetett szerkezetétől.

Beoltott patkányokból származó szérumok kiértékelése

F. hepatica oligoszacharid/BSA konjugátum vakcinával beoltott patkányokból származó szérumokat vizsgáltunk *in vitro* élő férgekkel való reagálásuk és/vagy ölképességük szempontjából. Célpontként *F. hepatica* NEJ-ket vagy fertőzés után 30 nappal egerekből izolált májmételyeket használtunk.

A reaktivitás meghatározásához indirekt immunofluoreszcenciát alkalmaztunk a fentiekben ismertetett módon. Osztályozott májmételyeket tenyésztettünk külön-külön 5 napon át 15% pre-immun patkányszérummal kiegészített „Medium 199” (Sigma) tápközegeben. Az *F. hepatica* NEJ-ket vagy 30 nappal a fertőzés után levő máj mételyeket ezután külön-külön inkubáltuk (1) egy hígítatlan patkány preimmun szérumban; vagy (2) *F. hepatica*-val fertőzött patkányból,

egérből, szarvasmarhából vagy juhból izolált szérumban; vagy (3) maltotrióz/BSA konjugátummal beoltott patkányokból származó szérumokban; vagy (4) *F. hepatica* oligoszacharid/BSA konjugátummal beoltott patkányokból származó szérumokba. A szérumokat 100-1000-szeresen hígítottuk a közegben az *F. hepatica* férgekkel való érintkezés előtt.

A patkány preimmun szérumoknak vagy a maltotrióz/BSA-val beoltott patkányokból származó szérumoknak kitett NEJ-k egészségesnek és változatlanak tűntek. Az *F. hepatica*-val fertőzött állatokból származó bármely szérumban inkubált NEJ-k látható felületi csapadékokat mutattak, amelyek az IgM antitest komplexekből származtak. Ezek a szérumok bár képesek voltak ilyen komplexek képzésére, képtelenek voltak *in vitro* elpusztítani mind a NEJ-ket, mind a 30 nappal fertőzés utáni májmételyeket.

Ezzel szemben az oligoszacharid/BSA konjugátummal beoltott patkányokból származó szérum megölte az *F. hepatica* NEJ-ket és a 30 nappal a fertőzés utáni májmételyeket. A szérumok citopátiás hatását igazolták a férgek fizikai jellemzői is, úgy mint a feltekeredés, a felületükön hólyagok képződése, és a kültakaró vesztesége. Az ultrastrukturális hibák, például a hólyagok detektálására optikai mikroszkópokat használtunk. Elektronmikroszkópot használtunk a kültakaró veszteségének detektálására. Kritikusan szemügyre véve a férgek nem voltak életképesek (azaz elpusztultak vagy haldokoltak) ezekkel a szérumokkal való inkubálás után. Tehát bár a protektív *F. hepatica* vakcina eredetileg csak felnőtt férgekkel izolált oligo-

szacharidokat tartalmazott, a beoltott állatokból származó szérum a fiatal férgeket is elpusztította. Ez az eredmény azt mutatta, hogy bármilyen humorális immunválaszt váltottunk ki az oligoszacharid/BSA konjugátummal, a kiváltott válasz hatásos volt mind fiatal, mind felnőtt életszakaszban levő férgek esetén.

Annak igazolására, hogy a szérum *in vitro* ölképessége inkább a komplex oligoszacharid szerkezetekre specifikus antitestektől, semmint az egyetlen monoszacharid egységhez kötődő antitesttől függött, az alábbi kísérletet hajtottuk végre. Az *F. hepatica* lipoglikánjának szénhidrátjait egyedi monoszacharid egységekre redukáltuk a fentiek szerint. A monoszacharidokat ezután a szérum/féreg inkubációkhoz adtuk 100 μ M monoszacharid koncentráció eléréséig. A szérum férgeket ölő képessége nem változott, ami azt jelenti, hogy az ölképesség nem a féreg felületén levő egyszerű monoszacharid egységekhez kötődő antitesttől ered.

A beoltott patkányokból származó szérumokban levő antitestek osztályait a fentiek szerint határoztuk meg. Az eredmények azt mutatták, hogy ezekben a szérumokban IgG antitestek voltak túlnyomó többségben, nem pedig a DGM antitestek.

Hosszútávú védelem

Annak a meghatározására, hogy az oligoszacharid/BSA konjugátum vakcina hosszútávú védelmet nyújt-e, szérumokat gyűjtöttünk 5 beoltott patkányból 3 éven át. Minden szérumot vizsgáltuk *F. hepatica* NEJ-kkel szemben a fentiek szerint. Az ölkapacitás és a szérum reaktivitása nem csök-

kent 3 év alatt. A beoltott patkányok továbbá nem mutattak rövidebb élettartamot, és egészségesnek tűntek ugyanezen időszak alatt, amely a vakcinával kapcsolatos kis toxicitására vagy a toxicitás hiányára utal.

Keresztvédelem

Annak a vizsgálatára, hogy az *F. hepatica* lipoglikánból származó oligoszacharid/BSA konjugátum képes-e keresztvédelmet nyújtani más fajok ellen, beoltott patkányokból származó szérumot vizsgáltunk fiatal *Fasciola magna* férgekkel szemben úgy, ahogyan azt a fentiekben *F. hepatica* férgeknel ismertettük. A beoltott patkányból származó szérummal kezelt *F. magna* fiatal laposférgek feltekeredtek, és néhány napon belül elpusztultak. A kontroll szérum (azaz maltotrióz/BSA konjugátummal beoltott patkányokból származó szérum) nem befolyásolta az *F. magna* életképességét. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy az *F. hepatica* lipoglikán oligoszacharid/BSA konjugátumot tartalmazó vakcina készítmények képesek kereszt-protektív immunitás kiváltására olyan fajokban is, amelyek eltérnek azoktól, amelyekből a lipoglikán ered.

Azt is megfigyeltük, hogy a beoltott patkányok szérumaiban található IgG antitestek képesek voltak kötődni *Schistosoma mansoni* laposféreg felületén található izolált lipoglikán molekulához (ezt az alábbiakban a 2. példában ismertetjük), ahogyan azt a Western blotolás mutatja. Ez arra utal, hogy a keresztvédelem mértéke elég széles ahhoz, hogy magában foglaljon egy eltérő nemből (genus) származó laposféreg elleni védelmet is.

Az 1. példában ismertetett eredmények ésszerű alapot szolgáltatottak arra, hogy feltételezzük, hogy egy fentiek szerint készített *F. hepatica* vakcina a testtömeggel arányos mennyiségben beadva védelmet nyújt háztáji állatoknak, például szarvasmarhának egy új produktív *F. hepatica* fertőzéssel vagy más férgectől eredő fertőzéssel szemben. Ezek az eredmények továbbá azt jelezték, hogyha a fenti vakcina képes lenne IgG válasz indukálására egy már fertőzött szarvasmarhában, egy ilyen szarvasmarha leküzdhet egy már fennálló produktív fertőzést.

2. példa

Védő vakcina *Schistosoma* ellen

Annak meghatározására, hogy az 1. példában ismertetett vakcina stratégia használható-e más, kevésbé rokon laposférgekre, lipoglikánt izoláltunk *Schistosoma mansoni*-ból az 1. példában ismertetett eljárás alkalmazásával. Egy külön kísérletben megfigyeltük, hogy az izopropanol/hexán extrakció kloroform, metanol és víz elegyével végzett extrakcióval való helyettesítése, ahogyan azt Turco és munkatársa ismertették (lásd fent) az izolálási eljárásban nem használható *S. mansoni* lipoglikán izolálására. Ezt a lipoglikánt mintegy 180 kD-ra becsültük redukáló SDS-PAGE vizsgálattal, és egyetlen sávként futott az SDS-PAGE gélen. Az *S. mansoni* lipoglikán izolátum mentes volt más perjódsav-Schiff specieszektől, és mentes volt bármiféle detektálható proteintól is.

Az *S. mansoni* lipoglikán szénhidrát komponensének monoszacharid elemzését az 1. példában ismertetett módon

hajtottuk végre. Ezeket az eredményeket azután összehasonlítottuk a gázkromatográfiás és tömegspektrometriás szénhidrát elemzéssel. Az elemzés azt mutatta, hogy a lipoglikán fukózt tartalmazott, és hogy a lipoglikán minden fukóz maradékra 4 galaktózamin maradékot, 3,1 glükózamin maradékot, 1,84 galaktóz maradékot, 1,84 glükóz maradékot, 1,45 ramnóz maradékot és 2,17 mannóz maradékot tartalmazott.

Az *S. mansoni* lipoglikánból digeráltuk az oligoszacharidokat, és BSA-val konjugáltuk az 1. példában ismertetett módon. Az oligoszacharidokat továbbá tetanusz toxoiddal mint hordozóanyaggal konjugáltuk (SSI-TetanexTox; Accurate Chemical and Scientific Corp.) az 1. példában a BSA konjugálására ismertetett eljárás alkalmazásával. Az oligoszacharid konjugátumokat tartalmazó vakcina készítményeket a korábban ismertetett módon állítottuk elő. Kontrollokat készítettünk úgy, hogy csak BSA-t kevertünk alummal, vagy csak tetanusz-toxoidot kevertünk alummal.

Kezdetben az egerekbe vakcinát és kontroll készítményeket injektáltunk az 1. példában megadott mennyiségekben. A kezdeti beoltás után 28 nappal egy erősítőt adtunk be az 1. példában ismertetett módon. A kezdeti beoltás után 30 nappal az egereket *S. mansoni* cercariákkal kihívtuk. Azokat az egereket, amelyeket tetanusz toxoiddal konjugált felnőtt lipoglikán oligoszachariddal immunizáltunk, egerenként 200 cercariával hívtunk ki. Azokat az egereket, amelyeket BSA-val konjugált felnőtt lipoglikán oligoszachariddal immunizáltunk, egerenként 100 cercariával

hívtuk ki. Az egyenként 5 állatból álló 4 állatcsoport rendre BSA-t, oligoszacharid/BSA konjugátumot, tetanusz toxoidot vagy oligoszacharid/tetanusz toxoid konjugátumot kapott.

6 nappal a kihívás után az egereket elaltattuk és boncoltuk. Minden állat tüdejét eltávolítottuk és a férgeket megszámoltuk és megvizsgáltuk. A BSA-t kapó egerek tüdeje átlagosan állatonként 20,2 férget tartalmazott, míg az oligoszacharid/BSA konjugátummal kezelt egerek tüdeje átlagosan állatonként 5,5 férget tartalmazott. A férgek számának ennél a 73%-os csökkenésénél még fontosabb az a megfigyelés, hogy a beoltott egerek tüdejében talált férgek mindegyike elpusztult vagy haldoklott, míg a kontroll egerek tüdejében talált férgek egészségesek és mozgékonyak voltak.

A tetanusz toxoiddal kezelt egerek tüdeje átlagosan állatonként 30,9 férget tartalmazott, míg az oligoszacharid/tetanusz toxoid konjugátummal kezelt egerek tüdeje átlagosan állatonként 3,9 férget tartalmazott. A férgek számának 88%-os csökkenésén túlmenően itt is még fontosabb az a megfigyelés, hogy a beoltott egerek tüdejében talált férgek mindegyike elpusztult vagy haldoklott, míg a kontroll egerek tüdejében talált férgek egészségesek és mozgékonyak voltak. A tetanusz toxoid hordozóként való alkalmazása azt mutatta, hogy a vakcina készítmény tartalmazhat különféle hordozó molekulákkal konjugált oligoszacharidokat.

Annak az ismételt megerősítésére, hogy az *S. mansoni* lipoglikán oligoszacharid/tetanusz toxoid konjugátum protektív immunválaszt biztosít, egy második beoltási/kihívási kísérletet hajtottunk végre közvetlenül az előbbiekben ismertetett eljárás alkalmazásával. Ebben a második kísérletben a férgek számának csökkenése 89% volt, ezzel igazoltuk, hogy a vakcina által kiváltott protektív immunitás reprodukálható különálló kísérletekben.

Vizsgáltuk az *S. mansoni*-val történő kihívás után a beoltott állatok túlélését és egészségi állapotát a be nem oltott állatokkal szemben. 5 egeret oltottunk be lipoglikán/tetanusz toxoid konjugátum vakcinával a fentiekben ismertetett protokoll alkalmazásával. Másik 5 egér be nem oltott kontrollként szolgált. A vakcinált egereket egyszer a kezdeti beoltás után 28 nappal megerősítettük, és mind a 10 egeret perkután fertőzőképes cercariával hívtunk ki 93 nappal a beoltás után.

Minden állatnál meghatároztuk (ha beállt) a haldokló állapotig eltelt időt. Az egereket naponta megfigyeltük általános megjelenés és állapot szempontjából. A fertőzés utáni 50. napon minden be nem oltott állat letargiával volt jellemezhető, vagy más módon tűnt betegnek. A kontroll csoportból egy egér elpusztult a fertőzés utáni 55. napon, egy másik pedig a fertőzés utáni 57. napon. A megmaradó 3 egér nyilvánvalóan haldoklott a fertőzés utáni 58. napon, és elaltattuk őket a további szenvedés elkerülésére. Boncoláskor minden kontroll egérnél azt találtuk, hogy májuk súlyos parazita pete terheléssel rendelkezik.

A beoltott egerek azonban életben voltak, és nem mutatták betegség jeleit 101 nappal a kihívás után. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy ezek a beoltott egerek nem szenvedtek a tömeges parazita petelerakással kapcsolatos patológiai hatásoktól, alátámasztva azt a következtetést, hogy a kihívó parazita terhelés elpusztult és/vagy megakadályozódott annak sikeres petelerakása.

Tehát a védelmet igazoltuk a beoltott állatokban levő férgek számának drámai mértékű csökkenésével, valamint az *S. mansoni* fertőzés által jellegzetesen kiváltott megfigyelhető tünetek - ideértve a halált is - elkerülésével. Továbbá a beoltott állatokból izolált férgek mindegyike elpusztult vagy haldoklott (azaz nem volt életképes).

Ezek az eredmények az 1. példa eredményeivel kombinálva azt jelezték, hogy egy második (BSA konjugátum) és egy harmadik (tetanusz konjugátum) védőoltás is kifejleszthető lenne laposférgek ellen. Mivel a szakterületen jártas szakember számára ismert, hogy a schistosome fertőzés egér állatkísérleti modellje ésszerű mértékben előreláthatóvá teszi az emberek esetén mutatott hatékonyságot, az ebben példában ismertetett eredmények szintén ésszerű alapot szolgáltatnak arra a következtetésre, hogy az itt ismertetett *S. mansoni* vakcina a testtömeggel arányosan beadva embereket is megvédené schistosome fertőzésektől (azaz schistosomiasistól).

3. példa

Vakcinák protozoák ellen

Az 1. példában ismertetett eljárást követve felületi lipoglikánokat izoláltunk *Leishmania tropica*, *Trichomonas vaginalis* és *Tritrichomonas foetus* humán protozoa patogénekből.

Annak meghatározására, hogy ezekkel a protozoákkal fertőzött egyének IgM vagy IgG antitest választ produkáltak-e, a protozoa lipoglikánok mindegyikét mikrocellulóz membránra rögzítettük "dot blot" formában. A lipoglikánokat ezután az említett egyes protozoákkal fertőzött egyénekből származó szérumoknak tettük ki olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik, hogy a szérum antitestek az immobilizált lipoglikánokhoz kötődjenek. 3 μ l E oldószemben oldott 2 μ g lipoglikánt blottoltunk egy 3 mm átmérőjű, kör alakú polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra (BioRad, Hercules, CA). Az IgG vagy IgM lipoglikánokhoz való kötődésének szintjét ezután lúgos foszfatazzal jelzett anti-humán IgM vagy anti-humán IgG antitest alkalmazásával határoztuk meg. A foszfataz-konvertált kromogén reagens előhívása után megfigyeltük, hogy az izolált lipoglikánokhoz kötődő szérum antitestek túlnyomó többségben IgM-ek voltak. Tehát ezek a protozoák nem indukáltak jótékony hatású IgG választ, ahogyan ezt az 1. példában megfigyeltük az *F. hepatica*-val fertőzött állatoknál.

5 egérből álló csoportokat oltottunk be minden protozoa LG konjugátum vakcinával (20 femtogramm/egér) és szintén 5 egérből álló más csoportokat oltottunk be az izolált

LG-k mindegyikével (20 femtogramm/egér). Egyetlen 5 egérből álló csoportot oltottunk be csak BSA-val (20 femtogramm/egér). 28 nappal később minden egérnek erősítő oltást adtunk a kezdetben kapott anyagból 10 femtogrammmal. Az immunizálás utáni 27. és 35. napon szérumot gyűjtöttünk. Az izolált LG-vel beoltott egerek gyakran nem fejlesztettek ki specifikus antitest választ vagy gyenge IgM válasszal rendelkeztek. Az LG oligoszacharid protein konjugátum vakcinával immunizált egerek túlnyomó többségben IgM válasszal rendelkeztek a 27. napon, de domináns IgG választ mutattak a 35. napon. A BSA-val beoltott egerek nem fejlesztettek ki anti-LG antitest válaszokat.

Ez az eredmény az 1. és 2. példák eredményeinek fényében azt jelezte, hogy a laposférgek ellen védő immunitáshoz vezető vakcina stratégia hasznos volt protozoák esetében is.

Más megvalósítási módok

Magától értetődő, hogy bár a találmányt a részletes leírásával összhangban ismertettük, az előző ismertetés szemléltető célzatú, nem pedig a találmány oltalmi körének behatárolására szolgál; azt az igénypontok köre határozza meg. Más aspektusok, előnyök és módosítások is a következő igénypontok oltalmi körébe esnek.

Például a fentiekben ismertetett eljárások alkalmazhatók más laposférgekre is. Minden laposféreg - ideértve az aspidobothreámokat, az ivartalanokat, az ivarosokat és a galandférgeket - testtakarója egy közös alapon strukturált [Mehlhorn és munkatársai: *Parasitology in Focus, Facts and*

Trends, Springer Verlag, NY, 238-240. oldal (1988)]. Ez a megfigyelés arra utal, hogy minden parazita laposféreg elkerülheti az immun eliminációt azáltal, hogy a felületén lipoglikán borítással rendelkezik. Az itt ismertetett kitanítással összhangban egy fehérje hordozóhoz kapcsolt specifikus laposféreg felületi lipoglikán oligoszacharidokból felépülő vakcina protektív immunválaszt képes indukálni. Egy konjugátum vagy anti-idiotípus előállítható kloroform eukarióta paraziták specifikus LG-jére.

Tehát bármely eukarióta parazita ellen védelem érhető el a találmány szerinti készítményekkel. A találmány szerinti készítmények által nyújtott védelemért felelős eukarióta paraziták közé tartoznak az alábbiak: (1) ivaros szaporodó trematódák, amelyek súlyos patogének emberek és háziállatok számára, és közéjük tartoznak többek között az alábbiak (*Fasciolopsis buski*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Paragonimus westermani* és *Clonorchis sinensis*); (2) ivartalanul szaporodó laposféreg paraziták, amelyek halakat fertőznek; és (3) cestoda (galandféreg) paraziták.

Különösen érdekes a vakcinák kifejlesztése *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, és *Echinococcus multilocularis* ellen. A vakcina ezen paraziták közül az első esetben emberekben, az utóbbi két esetben kutyafélékben a felnőtt állapotú férgek ellen hat.

Többek között a malárai parazitája egy másik olyan parazita, amely ellen védelmet lehet nyújtani. Az összetett szénhidrátok gyakran T-independens típusú 2 (TI-2) antigénként működnek. Az ilyen típusú antigének T-independens

immunválaszokat indukálnak, amelyek immun memóriával nem rendelkező, későn kifejlődő, elsődlegesen IgM típusú válaszokat eredményeznek. A malária jellegzetesen olyan immunitást indukál, amely túl lassan fejlődhet ki, az IgM antitestek számának növekedését foglalja magában, és 1 éven belül legyengül, így az áldozatot fogékonyá teszi új fertőzésre a következő évben. A jelen kitanítás alkalmazásával meghatározható, hogy az emlős stádiumban levő maláriaformák nagyobb szénhidrogénben gazdag glikokonjugátumai közül melyik indukál elsősorban IgM válaszokat. Ezután lehetséges ezeknek a glikokonjugátumoknak az oligoszacharid alegységekre való csökkentése. Az itt ismertetett eljárások alkalmazásával ezután az oligoszacharidokat konjugálhatjuk egy protein hordozóhoz, mint T-sejt dependens immunválasz indukáló eszközhöz a specifikus szénhidrátok számára. A megközelítés validálására beoltott állatokat hívhatunk ki fertőzőképes homológ parazitákkal a vakcina molekula protektív kapacitásának megállapítása céljából. Ez a megközelítés sikeres lesz az Apicomplexa család minden tagja esetén; ezek közé tartozik a malária parazita is.

Nematódák elleni protektív immunválaszok is produkálhatók a találmány szerinti készítményekkel. A nematódák zsigerei egyetlen sejtsorral határoltak, amelyekben Golgi testek és membránokhoz kötött zárványok vannak. A zsigerek a luminális oldalukon egy amorf anyag lazán kötött rétegével védettek [Mehlhorn és munkatársai: Parasitology in Focus, Facts and Trends, 3. fejezet, Springer-Verlag, NY

(1988)]. A helyzet emlékeztet a parazita laposférgek felületére. Az itt ismertetett eljárások alkalmazásával a lazán kötött réteget alkotó anyagot izolálhatjuk és felhasználhatjuk oligoszacharid konjugátum vakcinák előállítására. Az ilyen vakcinák használhatók a gazdaszervezetek beoltására orsóféreg fertőzések ellen, különösen a Trichostongylidae családba tartozó férgek ellen, melyek a háztáji állatállományok súlyos kórokozói.

Anti-idiotípus vakcinák is tartoznak a találmány körébe. A találmány szerinti készítményekkel nagy támadóerejű anti-LG monoklonális antitestek termelése válik lehetővé. Ismert monoklonális antitest (mAb) technológia alkalmazható nagymennyiségű anti-idiotípus (anti-id) előállítására egy bebizonyított protektív értékkel rendelkező antitest V régiója (idiotípus) ellen szokásos eljárások alkalmazásával. Egy specifikus antitest protektív értéke megállapítható *in vitro* inkubálási eljárásokkal, amelyekben élő parazitákat szuszpendálunk antitest különböző koncentrációival, és az időben figyeljük a parazita életképességét. A védettséget specifikus monoklonálisok fogékony gazdaszervezetekbe való passzív átvitelével mérjük, majd ezt követően kihívást végzünk a homológ fertőzőképes parazitával, például ahogyan ebben a leírásban ismertettük. Az antitest élő emlős gazdaszervezeteket megölő kapacitása egy mAb terápiás vagy megelőző értékének legjobb bizonyítékának tekinthető. Ez az eljárás különösen releváns azokban a helyzetekben, ahol egy adott eukarióta parazita LG-jét nehéz vagy drága megszerezni.

Szabadalmi igénypontok

1. Kompozíció, mely lipidcsoportot, egy vagy több fukózcsoportot, fukózcsoportonként 3-5 galaktózamincsoportot, fukózcsoportonként 2-4 glükózaminocsoportot, fukózcsoportonként 1-2 galaktózcsoportot, fukózcsoportonként 1-2 glükózcsoportot, fukózcsoportonként 1-2 ramnózcsoportot és fukózcsoportonként 1-3 mannózcsoportot tartalmazó izolált lipoglikánból kinyert oligoszacharidhoz kapcsolt hordozócsoporthból áll.

2. Kompozíció, mely lipidcsoportot, egy vagy több fukózcsoportot, fukózcsoportonként 3-5 galaktózamincsoportot, fukózcsoportonként 7-11 glükózaminocsoportot, fukózcsoportonként 3-5 galaktózcsoportot, fukózcsoportonként 1-2 glükózcsoportot, és fukózcsoportonként 3-5 mannózcsoportot tartalmazó izolált lipoglikánból kinyert oligoszacharidhoz kapcsolt hordozócsoporthból áll.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti kompozíció - ahol a lipoglikán egy eukarióta felületéről származik - alkalmazása gerincesben eukarióta parazita elleni protektív immunválasz kiváltására alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.

4. Az 1-3. igénypontok szerinti kompozíció vagy alkalmazás, ahol a lipoglikán molekulatömege mintegy 180 kD.

5. A 3. vagy 4. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az eukarióta protozoa.

6. A 3. vagy 4. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az eukarióta felnőtt laposféreg.

7. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a felnőtt laposféreg a *Schistosoma* törzsből származik.

8. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a felnőtt laposféreg a *Fasciola* törzsből származik.

9. A 6. igénypont szerinti alkalmazás készítmény, ahol a felnőtt laposféreg a galandférgek osztályából származik.

10. A 3-9. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol protektív immunválasz T-sejt dependens antitest választásból áll.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti kompozíció vagy alkalmazás, ahol a hordozócsoport egy összekötő csoporton keresztül kapcsolódik az oligoszacharidhoz.

12. A 11. igénypont szerinti kompozíció vagy alkalmazás, ahol a összekötő csoport 2-(4-aminofenil)-etil-amin.

13. Izolált lipoglikán, mely lipidcsoportot, egy vagy több fukózcssoportot, fukózcssoportonként 3-5 galaktózamincsoportot, fukózcssoportonként 2-4 glükózaminocsoportot, fukózcssoportonként 1-2 galaktózcssoportot, fukózcssoportonként 1-2 glükózcssoportot, fukózcssoportonként 1-2 ramnózcssoportot és fukózcssoportonként 1-3 mannózcssoportot tartalmaz.

14. A 13. igénypont szerinti lipoglikán, ahol a lipoglikán molekulatömege mintegy 180 kD.

15. A 13. vagy 14. igénypont szerinti lipoglikán, ahol a lipoglikán fukózcssoportonként négy galaktózamincsoportot, három glükózamincsoportot, két galaktózcssoportot, két glükózcssoportot, 1-2 ramnózcssoportot és két mannózcssoportot tartalmaz.

16. A 13-16. igénypontok bármelyike szerinti lipoglikán, ahol a lipoglikánt egy *Schistosoma* törzshöz tartozó fajból nyerjük ki.

17. Izolált lipoglikán, amely lipidcsoportot, egy vagy több fukóz csoportot, fukóz csoportonként 3-5 galaktózamincsoportot, fukóz csoportonként 7-11 glükózamincsoportot, fukóz csoportonként 3-5 galaktóz csoportot, fukóz csoportonként 1-2 glükóz csoportot, és fukóz csoportonként 3-5 mannóz csoportot tartalmaz.

18. A 17. igénypont szerinti lipoglikán, ahol a lipoglikán molekulatömege mintegy 180 kD.

19. A 18. vagy 19. igénypont szerinti lipoglikán, ahol a lipoglikán fukóz csoportonként négy galaktózamincsoportot, kilenc glükózamincsoportot, négy galaktóz csoportot, egy glükóz csoportot és négy mannóz csoportot tartalmaz.

20. A 17-19. igénypontok bármelyike szerinti lipoglikán, ahol a lipoglikánt egy *Fasciola* törzshöz tartozó fajból nyerjük ki.

21. A 17-20. igénypontok bármelyike szerinti lipoglikán, mely továbbá inozitot tartalmaz.

22. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti kompozíció vagy alkalmazás, ahol a hordozócsoport a lipoglikánból kinyert oligoszacharidok keverékéhez kapcsolódik.

23. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti kompozíció vagy alkalmazás, ahol az oligoszacharid nem redukáló végcsoportot tartalmaz.

24. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti kompozíció vagy alkalmazás, ahol az oligoszacharidok keveréke

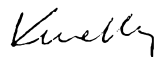
800-3000 dalton molekulatömegű oligoszacharidokat tartalmaz.

51 oldal



A meghatalmazott:

Danubia Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft.



Kmethy Boglárka
szabadalmi ügyvivőjelölt