

GLYKOKONJUGOVANÉ VAKCÍNY

ANNA FLEISCHHACKEROVÁ, PAVOL FARKAŠ
a SLAVOMÍR BYSTRICKÝ

*Oddelenie imunochémie glykokonjugátov, Chemický ústav,
Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bra-
tislava
chemfleis@savba.sk*

Došlo 16.9.13, prijaté 25.9.13.

Kľúčové slová: glykokonjugát, konjugácia, polysacharid,
antigén, vakcína, lymfocyty, imunologická pamäť

Obsah

1. Úvod
2. Vakcíny na báze sacharidov – glykokonjugáty
3. Chémia glykokonjugátov
 - 3.1. Polysacharidy a oligosacharidy, viacbodové
a jednobodové viazanie
 - 3.2. Syntetické sacharidy
 - 3.3. Využitie ramienok
4. Spracovanie glykokonjugátu bunkami imunitného
systému
5. Záver

1. Úvod

V posledných rokoch bol pozorovaný enormný výskyt infekčných mikroorganizmov rezistentných voči väčšine používaných antibiotík, čím sa významne sťažuje úspešné liečenie týchto infekcií. Ak je liečba neúčinná voči antibiotikám prvej voľby, nastupujú antibiotiká druhej, prípadne tretej voľby, ktoré sú však nákladnejšie a častokrát aj toxické. V súčasnosti sa pozornosť sústreďuje najmä do oblastí profylaxie. Trendom sa stali moderné konjugované vakcíny, ktoré zabezpečujú rýchlu a účinnú ochranu hostiteľa voči útoku mikrobiálnych patogénov. Príprava konjugovaných vakcín spočíva v použití dominantného antigénu. Najčastejšie sa jedná o sacharidové štruktúry nachádzajúce sa na povrchu mikroorganizmov, ktoré sú považované za akési štruktúry „prvého kontaktu“ medzi patogénom a hostiteľskou bunkou. Výhodou konjugovaných vakcín, oproti oslabeným živým alebo inaktivovaným celobunkovým vakcínam, je práve vznik úzko antigén-špecifickej imunitnej odpovede spojenej s tvorbou ochranných protilátok v dostatočnom množstve.

Článok prináša prehľad chemických štruktúr vybraných polysacharidových antigénov a glykokonjugátových vakcín zavádzaných do praxe. Príspevok ďalej poukazuje na význam chemickej konjugácie polysacharidov na proteínové nosiče, zaoberá sa možnosťami chemickej prípravy glykokonjugátov a ponúka základné informácie o prezentácii a spracovaní glykokonjugátu bunkami imunitného systému.

2. Vakcíny na báze sacharidov – glykokonjugáty

Sacharidy ukrývajú vo svojej štruktúre obrovský informačný potenciál. Ich variabilita je výsledkom cyklických foriem (furanóza, pyranóza), rozsiahlej chirality a typu väzby (1-2, 1-3, 1-4, 1-6), α i β a vzrastá počtom sacharidových jednotiek. Sacharidy hrajú dôležitú úlohu v množstve biologických procesov, uplatňujú sa hlavne v medzibunkovej komunikácii a v rozpoznávaní buniek a patogénov.

Množstvo sacharidov v eukaryotických bunkách je konjugovaných s proteínmi (glykoproteíny) alebo lipidmi (glykolipidy, lipopolysacharidy). U prokaryotov sa na povrchu bunky nachádzajú rôzne sacharidové štruktúry, napr. lipopolysacharid (LPS) a polysacharidová kapsula (CPS), ktorá je zložená z množstva opakujúcich sa oligosacharidových jednotiek. Polysacharidový vonkajší obal pridáva povrchu bakteriálnych buniek vysoký stupeň hydrofilnosti, čo zvyšuje ich odolnosť voči fagocytóze bunkami imunitného systému, podporuje bakteriálnu adhéziu, stimuluje mikrokolonizáciu. Nesporne sa tak považuje za významný virulentný faktor¹.

Dôležitú úlohu v patogenéze a manifestácii infekcie teda zohrávajú povrchové polysacharidy mikroorganizmov, ktoré sa stali základom pre konštrukciu subcelulárnych vakcín. Bakteriálne polysacharidy sú však veľmi slabé imunogény a patria do T-nezávislej skupiny antigénov (TI-antigény)². Na rozdiel od T-závislých antigénov (TD), ktorými sú hlavne proteíny, T-antigény (sacharidy) nevyvolávajú tvorbu dlhotrvajúcej imunologickej pamäte, pretože k indukcií imunitnej odpovede nevyžadujú kooperáciu s T_H-lymfocyty. T-nezávislé antigény môžeme rozdeliť do dvoch podskupín podľa toho, akým spôsobom aktivujú B-lymfocyty. Do prvej skupiny (TI-1) patrí hlavne bakteriálny lipopolysacharid (LPS). **TI-1** sú definované ako antigény so schopnosťou indukovať proliferáciu a diferenciáciu zrelých aj nezrelých B-lymfocytov. Pri tomto druhu protilátkovej reakcie dochádza hlavne k tvorbe nízkoafinitných protilátok triedy IgM. Druhý typ T-nezávislých antigénov (**TI-2**) má charakteristickú štruktúru – sú to polyméry zložené z opakujúcich sa základných jednotiek, ako sú napr. mikrobiálne povrchové polysacharidy (kapsulárny polysacharid). TI-2 aktivujú len zrelé

B-lymfocyty, ktoré tvoria špecifické imunoglobulíny, nedochádza však k tvorbe pamäťových buniek^{3,4}.

Vo všeobecnosti stále platí, že pre indukovanie účinnej a dlhodobej imunitnej ochrany je nevyhnutná účasť T-lymfocytov. V roku 1931 Avery a Goebel ako prví pripravili konjugovanú vakcínu pozostávajúcu z povrchového polysacharidu *S. pneumoniae* typu 3 a konského sérového albumínu. Zistili, že práve konjugáciou sacharidu k proteínu je možné vytvoriť z pôvodne T-lymfocyt nezávislého antigénu T-závislý antigén⁵. Imunizácia takto pripravenými glykokonjugátmi vedie teda k spolupráci T- a B-lymfocytov, čoho výsledkom je tvorba vysokoafinitných sacharid-špecifických IgG protilátok, dochádza k prepnutiu protilátkovej triedy IgM na IgG a v neposlednom rade k tvorbe pamäťových B-buniek a dlho žijúcich pamäťových T-buniek, čím sa zabezpečí dlhotrvajúca ochrana.

Glykokonjugátová vakcína proti patogénnym mikroorganizmom bola na imunizáciu ľudí prvýkrát použitá na konci 80. rokov. Prvým veľkým cieľom bolo skonštruovanie účinnej vakcíny, ktorá by dokázala ochrániť deti ako aj dospelých pred infekciou spôsobenou baktériou *Haemophilus influenzae* typu b (Hib). Hib bol dovtedy hlavnou príčinou bakteriálnej meningitídy v USA, avšak po uvedení glykokonjugátovej vakcíny na trh došlo až k 95% zníženiu výskytu meningitídy spôsobenej práve týmto patogénom. Tento obrovský úspech otvoril dvere pre výskum ďalších definovaných glykokonjugátov – z prírodných (natívnych), depolymerizovaných alebo synteticky pripravených sacharidov^{6,7}.

Dnes už existuje niekoľko, do praxe zavádzaných glykokonjugátových vakcín, ktoré úspešne eliminujú výskyt infekčných chorôb, spôsobených patogénmi *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella typhi* Vi, ako aj spomínaným *Haemophilus influenzae* (tab. I). Imunogenicitá glykokonjugátov je rôzna a táto variabilita závisí najmä od štruktúry použitého sacharidu (tab. II).

3. Chémia glykokonjugátov

3.1. Polysacharidy a oligosacharidy, viacbodové a jednobodové viazanie

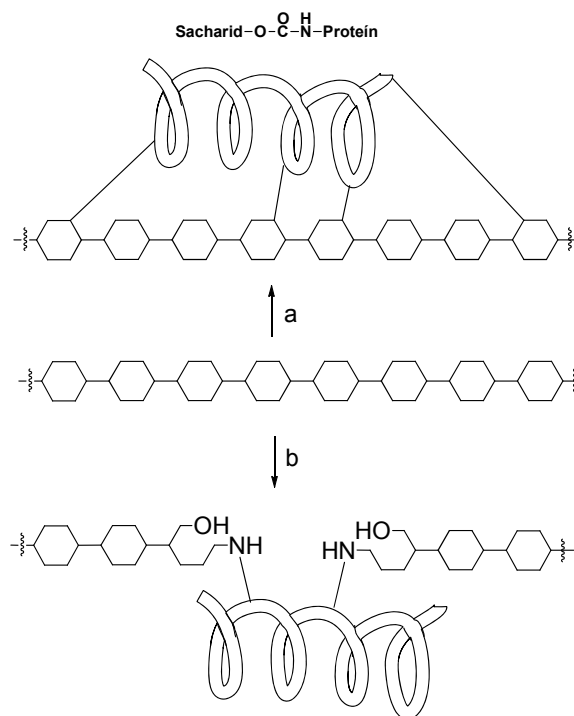
Príprava konjugátov z vysokomolekulových prírodných polysacharidov sa obvykle vykonáva viacbodovým, neselektívnym viazaním na proteín (obr. 1). Ďalšou možnosťou je selektívna degradácia polysacharidu a využitie takto získaných produktov. Menšie polysacharidy a oligosacharidy sa môžu viazať selektívne využitím určitej funkčnej skupiny, napr. redukujúceho konca, karboxylovej skupiny (KDO, 3-deoxy-D-mano-2-oktulozónová kyselina, štruktúrálna súčasť LPS) alebo využitím aminoskupiny (GlcN) na štruktúrnej časti zvanej core (jadro) v prípade lipopolysacharidov a lipooligosacharidov.

Kapsulárny polysacharid *Haemophilus influenzae* typ b ($\rightarrow 3$)- β -D-Ribf-(1 \rightarrow 1)-ribitol-5-(PO₄ \rightarrow) bol využitý na prípravu rôznych typov glykokonjugátov, ktoré sú súčas-

ťou komerčných vakcín³⁴. Selektívnou hydrolyzou polysacharidu sa získala frakcia oligosacharidu ribozylribitolfosfátu ($n = 3-10$), ktorý sa redukčnou amináciou viazal na proteín (obr. 1b)³⁵. Natívny CPS sa po reakcii s brómkyánom (CNBr) a dihydrazidom kyseliny adipovej konjugoval k proteínu (obr. 1a)^{36,37}. Kovalentným viazaním polysacharidov na imunogénne proteíny sa ukázal potenciál konjugovaných vakcín v prevencii bakteriálnych ochorení. Pre *Haemophilus influenzae* typu b sa uvádza veľmi vysoká úspešnosť imunizácie (> 95 %), čo napovedá o možnosti globálnej kontroly ochorenia vyvolaného týmto patogénom³⁸. Výsledky imunizácie podobnými konjugovanými vakcínami na základe kapsulárnych polysacharidov proti *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* a *Salmonella typhi* sú tiež sľubné.

Jodistanová oxidácia vicinálneho diolu na terminálnom neredukujúcom konci polysacharidu meningokoku séroskupiny B (NeuNAc \rightarrow) dáva aldehyd, ktorý sa využil na konjugáciu redukčnou amináciou⁷. Konjugácia meningokokového lipooligosacharidu (LOS) cez redukujúci koniec na štruktúrnej časti lipid A zachováva epitopy (O-špecifický reťazec LOS) a konjugovaná vakcína má vďaka lipidovej časti zlepšené imunologické vlastnosti³⁹.

Viazanie sacharidu kovalentnou väzbou na proteín, úplné odstránenie nezreagovaných molekúl a presná charakterizácia konjugátu sú kľúčové. Voľný sacharid, resp.



Obr. 1. Schématické znázornenie prípravy glykokonjugátu z polysacharidu: viacbodovým neselektívnym viazaním na proteín s využitím BrCN (a); selektívnym jednobodovým viazaním oligosacharidov pripravených degradáciou PS, využitím redukčnej aminácie (b)

Tabuľka I

Prehľad glykokonjugátových vakcín na báze povrchových polysacharidov pochádzajúcich z patogénnych mikroorganizmov

Organizmus	Sacharidová časť ^a	Proteínový nosič ^b	Stav	Referencie
<i>Haemophilus influenzae</i> typ b (Hib)	CPS	CRM197	licencované	HibTiter®, VaxemHib®
	CPS (oligosacharid)	TT	licencované (Kuba)	QuimiHib®
	CPS (vysoká Mw)	TT	licencované	ActHib®
	CPS (redukovaná veľkosť)	OMPs	licencované	PedvaxHIB®
<i>Neisseria meningitidis</i> skupina C	derivát De-O-Ac CPS (oligosacharid)	TT	licencované	NeisVac C®
	CPS (oligosacharid)	CRM197	licencované	Meningitec®, Menjugate®
<i>Salmonella typhi</i> Vi	O-acetyl pektín	rEPA	Fáza III	cit. ³⁰
<i>Shigella flexneri</i>	LPS (O-reťazec)	rEPA	Fáza III	cit. ³¹
<i>Shigella sonnei</i>	LPS (O-reťazec)	rEPA	Fáza III	cit. ³¹
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CPS (sk. 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F a 23F)	CRM197	licencovaná	Prevenar®
<i>S. pneumoniae</i>	CPS (sk. 4, 6B, 9V, 14, 19F, 23F, 18C)	CRM197	licencované	Prevenar®
<i>S. pneumoniae</i>	CPS (sk. 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F)	PHiD	licencovaná	Synflorix®
<i>S. pneumoniae</i> skupina 9V	CPS (sk. 9V)	OMPs	licencované	cit. ³²
<i>S. pneumoniae</i> skupina 7F	CPS (sk. 7F)	DT, TT	Fáza III	cit. ³³

^a CPS – kapsulárny polysacharid, LPS – lipopolysacharid, ^b CRM197 – rekombinantný difterický toxín, TT – tetanový toxoid, OMPs – proteíny vonkajšej membrány (*N. meningitidis* typ b), rEPA – rekombinantný exotoxín A (*P. aeruginosa*), PHiD – rekombinantný proteín D (netypizovaný *H. influenzae*), DT – difterický toxoid

proteín by mohol významne skresľovať imunologickú charakterizáciu produktu. Na prečistenie konjugátu od nezreagovaného proteínu resp. sacharidu sa najviac využíva separácia na základe molekulovej hmotnosti. Problém však nastáva, ak sa na konjugáciu použije polysacharid, ktorého molekulová hmotnosť je rádovo vyššia ako molekulová hmotnosť proteínu. Produkt konjugácie má potom zvyčajne podobnú molekulovú hmotnosť ako pôvodný polysacharid, a preto môže byť zložitý, alebo aj nemožné, tieto časti separovať. V tomto prípade je výhodnejšie využiť iné metódy, napríklad separáciu bielkoviny od polysacharidu a konjugátu na základe ich rôznych hydrofóbných interakcií⁴⁰.

3.2. Syntetické sacharidy

Napriek nesporným úspechom konjugovaných vakcín vyrobených z prírodných polysacharidov alebo ich derivátov, požiadavka presnej charakterizácie konjugátov zvyšuje tlak na prípravu vytipovaných a presne definovaných sacharidových epitopov. Tieto oligosacharidy (tri- až hexasacharidy) sa potom pomocou vhodne zvoleného ramienka

viažu na proteín. Zavedením vhodných funkčných skupín na ramienko (aj na proteín) sa môže efektívnosť konjugácie významne zvýšiť, a navyše nezreagovaný sacharid sa môže recyklovať.

Synteticky pripravený terminálny hexasacharid LPS *Vibrio cholerae* sérotyp O1 Ogawa sa porovnal s mono- až pentasacharidom s cieľom zistiť minimálnu potrebnú dĺžku reťazca pre adekvátnu imunitnú odpoveď po naviazaní na proteín (BSA, bovinny sérový albumín). Zistilo sa, že kým aj konjugáty menších sacharidov sú dobré imunogény, nenavodzujú tvorbu vibriocídnych protilátok na takej úrovni ako hexasacharid alebo prírodný LPS. Uvažuje sa, že menšie sacharidy nemajú celý potrebný epitop na navodenie požadovanej imunitnej odpovede⁴¹. Konjugácia predmetných sacharidov sa uskutočnila naviazaním 3,4-dietoxycyklobut-3-én-1,2-diónu na aminoskupinu ramienka aglykónu pri pH 7. Konjugácia s proteínom prebieha pri pH 9, nezreagovaný sacharid sa môže ľahko izolovať⁴². Podobný postup sa použil aj na prírodný LPS *Vibrio cholerae* sérotyp O1 Inaba a Ogawa⁴³.

Tabuľka II

Prehľad štruktúr povrchových polysacharidov z patogénnych baktérií použitých pri konštrukcii konjugovaných vakcín

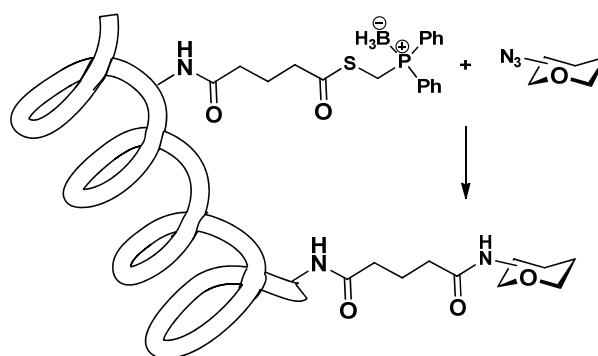
Mikroorganizmus	Polysacharid
<i>Haemophilus influenzae</i> typ b ^{8,9}	→3)-β-D-Ribf-(1→1)-D-Ribitol-(5→OPO3→
<i>Neisseria meningitidis</i> skupina A ^{10,11}	→6)-α-D-ManpNAc(3/4OAc)-(1→OPO3→
<i>Neisseria meningitidis</i> skupina B ¹²	→8)-α-D-Neup5Ac-(2→
<i>Neisseria meningitidis</i> skupina C ^{11,12}	→9)-α-D-Neup5Ac(7/8OAc)-(2→
<i>Neisseria meningitidis</i> skupina W135 ^{13,11}	→6)-α-D-Glcp-(1→4)-α-D-Neup5Ac(9OAc)-(2→
<i>Neisseria meningitidis</i> skupina Y ^{11,13}	→6)-α-D-Galp-(1→4)-α-D-Neup5Ac(9OAc)-(2→
<i>Salmonella typhi</i> Vi ¹⁴	→4)-α-D-GalpNAcA(3OAc)-(1→
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Typ 1 ¹⁵	→3)-D-AAT-α-Galp-(1→4)-α-D-GalpA(2/3OAc)-(1→3)-α-D-GalpA-(1→
<i>S. pneumoniae</i> Typ 3 ¹⁶	→3)-β-D-GlcA-(1→4)-β-D-Glcp-(1→
<i>S. pneumoniae</i> Typ 4 ¹⁷	→3)-β-D-ManpNAc-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-α-D-GalpNAc-(1→4)-α-D-Galp2,3(S)Py-(1→
<i>S. pneumoniae</i> Typ 5 ¹⁸	→4)-β-D-Glcp-(1→4)-[α-L-PnepNAc-(1→2)-β-D-GlcpA-(1→3)]-α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-Sugp-(1→
<i>S. pneumoniae</i> Typ 6A ¹⁹	→2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-D-Rib-ol-(5→P→
<i>S. pneumoniae</i> Typ 6B ²⁰	→2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→4)-D-Rib-ol-(5→P→
<i>S. pneumoniae</i> typ 7F ²¹	→6)-[β-D-Galp]-α-D-Galp-(1→3)-(2-OAc)-β-L-Rhap-(1→4)-β-D-Glcp-(1→3)-[α-D-GlcpNAc-(1→2)-α-L-Rhap-(1→4)]-β-D-GalpNAc-(1→
<i>S. pneumoniae</i> Typ 9V ²²	→4)-α-D-GlcpA(2/3OAc)-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-ManpNAc(4/6OAc)-(1→4)-β-D-Glcp-(1→4)-α-D-Glcp-(1→
<i>S. pneumoniae</i> Typ 14 ²³	→4)-β-D-Glcp-(1→6)-[β-D-Galp-(1→4)]-β-D-GlcpNAc-(1→3)-β-D-Galp-(1→
<i>S. pneumoniae</i> Typ 18C ²⁴	→4)-β-D-Glcp-(1→4)-[α-D-Glcp(6OAc)(1→2)][Gro-(1→P→3)]-β-D-Galp-(1→4)
<i>S. pneumoniae</i> typ 19A ²⁵	→4)-β-D-ManpNAc-(1→4)-α-D-Glcp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→P→
<i>S. pneumoniae</i> Typ 19F ²⁶	→4)-β-D-ManpNAc-(1→4)-α-D-Glcp-(1→2)-α-L-Rhap-(1→P→
<i>S. pneumoniae</i> Typ 23F ²⁷	→4)-β-D-Glcp-(1→4)-[α-L-Rhap-(1→2)]-[Gro-(2→P→3)]-β-D-Galp-(1→4)-β-L-Rhap-(1→
<i>Shigella flexneri</i> ²⁸	→2)-α-L-Rhap-(1→2)-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-β-D-GlcpNAc-(1→
<i>Shigella sonnei</i> ²⁹	→4)-L-AltpNAcA-(1→3)-α-2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-Gal-(1→

3.3. Využitie ramienok

Ramienka pre spájanie molekúl sacharidov a bielkovín sa využívajú z dvoch hlavných dôvodov: *i*) umožňujú funkčnú skupinu „posunúť ďalej“ a urobiť ju tak prístupnejšou a *ii*) umožňujú zabudovať novú, reaktívnejšiu funkčnú skupinu.

Väzby tvorené v kľúčovom kroku sú najčastejšie nasledovné:

- amidová väzba (tvorba amidovej väzby je v skutočnosti najbežnejšia, napr. heterobifunkčné ramienko s neprírodnou skupinou na jednom konci a aminoskupinou na druhom sa použitím vhodného činidla (napr. karbo-diimidu) viaže na molekulu proteínu: Staudingerova ligácia použitá na viazanie čiastočne degradovaného lipopolysacharidu *Vibrio cholerae* sérotyp O1 Inaba)



Obr. 2. Schématické znázornenie prípravy glykokonjugátu Staudingerovou ligáciou

(obr. 2)⁴⁴.

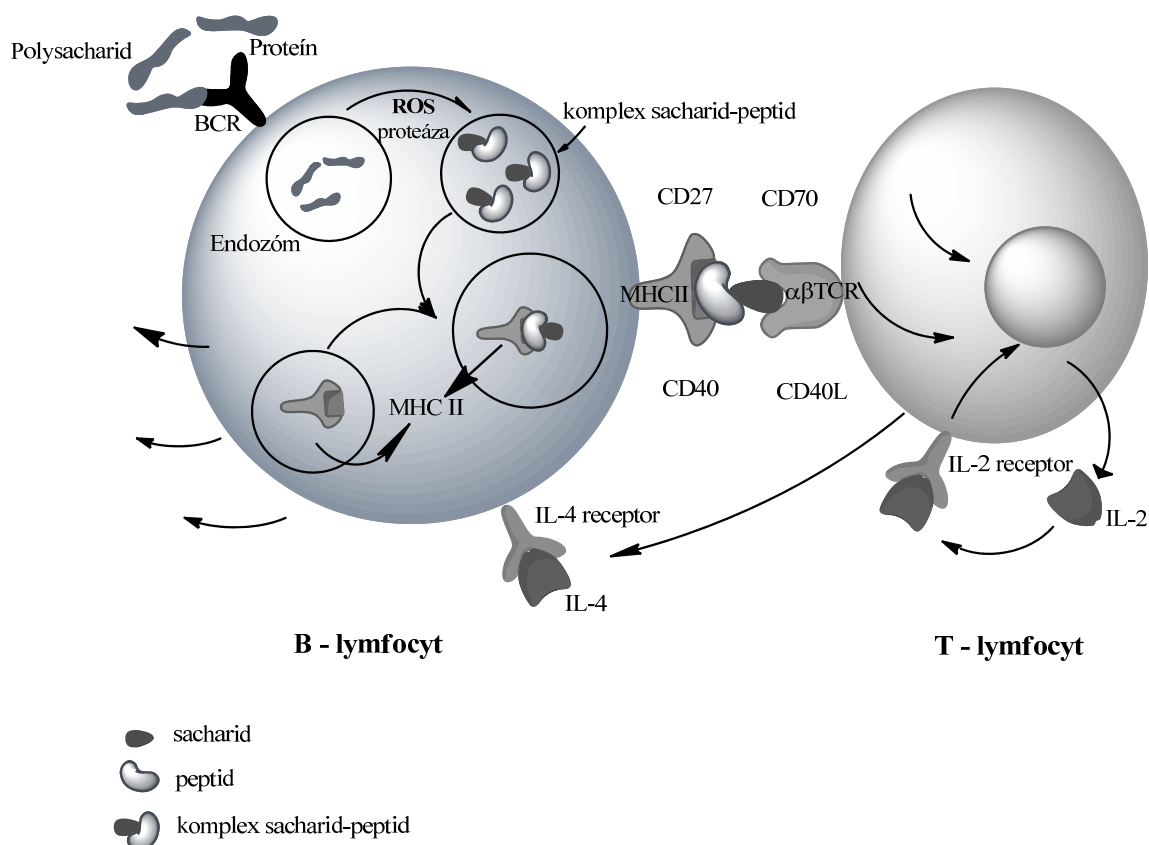
- tioéterová väzba (derivát tiolu a maleimidu sa použil na prípravu konjugátu z čiastočne degradovaného LPS *Vibrio cholerae* sérotyp O1 Inaba)^{45,46}.
- cykloadície (alkín-azid 1,3-dipolárne reakcie, prehľad využitia⁴⁷, Dielsova-Alderova cykloadícia⁴⁸).

Popisovaná chémia je uplatniteľná všeobecne v oblastiach, kde je potrebné spájať rôzne molekuly, makromolekuly či už prírodného, syntetického alebo semisyntetického pôvodu^{49–52}.

4. Spracovanie glykokonjugátu bunkami imunitného systému

Po vniknutí antigénu (glykokonjugátu) do organizmu dochádza k jeho naviazaniu na B-bunkový receptor (BCR), čo predstavuje pre bunku prvý kompetenčný signál, ktorý zabezpečí zvýšenú expresiu MHC II molekúl a kostimulačných molekúl. Glykokonjugát (antigén) sa v ďalšom kroku dostáva dovnútra B-bunky pomocou endocytózy (exogénna cesta prezentácie antigénu), kde sa štiepi na menšie fragmenty. Polysacharidová časť glykokonjugátu je spracovaná v endolizozóme za pomoci ROS (reaktívne

formy kyslíka) na menšie oligosacharidy, proteínová časť je pomocou kyslých proteáz štiepená na peptidy. Výsledným produktom sú menšie fragmenty (komplexy) označené ako sacharid-peptid. Vzniknutý komplex sa pomocou svojej peptidovej časti viaže na MHC II molekuly a celý komplex sa následne presúva do bunkovej membrány. Naviazanie proteínovej časti komplexu sacharid-peptid na MHC II následne umožní naviazaniu viac hydrofilnej sacharidovej časti k $\alpha\beta$ receptoru $CD4^+$ T_H -buniek ($\alpha\beta$ TCR). Proces od väzby antigénu na BCR až po jeho prezentáciu trvá približne 30 až 60 minút. Prezentovaný glykopeptid je rozpoznávaný antigénovým receptorom T_H -lymfocytov (TCR). Dochádza tak k aktivácii T-lymfocytov a k interakcii medzi oboma lymfocytmi. Spojením B- a T-lymfocytov dochádza tiež k interakcii medzi kostimulačnými molekulami. B-lymfocyty vo svojej membráne konštitutívne exprimujú antigén CD40, pre ktorý je partnerskou interakčnou molekulou v membráne T-lymfocytov CD40L. Tento antigén sa objavuje v membráne len aktivovaného T-lymfocytu, na pokojných T-lymfocytoch prítomný nie je. Hoci B-lymfocyt po interakcii s T_H -lymfocytom je schopný proliferácie, na svoju diferenciáciu na plazmatické a pamäťové bunky potrebuje ešte postupový signál. Tento signál vzniká po interakcii diferenciačného antigénu



Obr. 3. Jednotlivé kroky spracovania a prezentácie glykokonjugátu vedúce k aktivácii $CD4^+$ T_H -buniek a následnej indukcii B-buniek produkovať sacharid – špecifické protilátky triedy IgG⁵⁴

CD27 s jeho ligandom CD70 a cytokínmi sekretovanými aktivovanou T-bunkou (napr. IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 a i.) (obr. 3). Výsledkom úplnej aktivácie B-lymfocytov je teda ich diferenciácia na plazmatické bunky a dlhožijúce pamäťové bunky, ktoré produkujú sacharid-špecifické protilátky triedy IgG^{4,53,54}.

5. Záver

Očkovanie, ako účinná ochrana hostiteľa voči útoku mikrobiálnych patogénov, je jedným z najúspešnejších profylaktických metód. Ako perspektívne sa javia hlavne glykokonjugované vakcíny. Príprava týchto vakcín spočíva v naviazaní dominantného povrchového oligo- alebo polysacharidového epitopu, pochádzajúceho z pôvodného patogénu, na proteínový nosič. Pokrok v chemickej konštrukcii glykokonjugovaných vakcín súvisí najmä s najnovšími trendmi v oblasti makromolekulovej chémie, ako aj s detailnými poznatkami o povrchových štruktúrach daného patogénu. Konjugované vakcíny, na rozdiel od čistých polysacharidov alebo oligosacharidov, sú schopné stimulovať T-bunkovo závislú imunitnú odpoveď. Imunizácia glykokonjugátmi tak vedie k diferenciácii B-buniek na plazmatické a dlhožijúce pamäťové bunky, ktoré produkujú vysoko afinitné neutralizujúce protilátky namierené práve voči imunodominantnej sacharidovej časti, pričom celkovo dochádza k tvorbe imunologickej pamäte. Glykokonjugované vakcíny, ako výsledok úspešného spojenia chémie a medicíny, patria nesporne k najväčším úspechom a pokrokom v oblasti boja proti infekčným chorobám.

LITERATÚRA

- Kuberan B., Linhardt R. J.: *Curr.Org. Chem.* 4, 653 (2000).
- Stein K. E.: *Infect. Dis.* 165, 49 (1992).
- Kontseková E., Kontsek P.: *Základy imunológie*. Polygrafické stredisko UK, Bratislava, 2004.
- Buc M.: *Základná a klinická imunológia*. VEDA, Bratislava, 2012.
- Avery O. T., Goebel W. F.: *J. Exp. Med.* 54, 437 (1931).
- Jennings H. J., Lugowski C.: *J. Immunol.* 127, 1011 (1981).
- Robbins J. B., Schneerson D.: *J. Infect. Dis.* 161, 821 (1990).
- Branefors-Helander P., Erbing C., Kenne L., Lindberg B.: *Acta. Chem. Scand. B.* 30, 276 (1976).
- Crisel R. M., Baker R. S., Dorman D. E.: *J. Biol. Chem.* 250, 4926 (1975).
- Bundle D. R., Smith I. C. P., Jenning H. J.: *J. Biol. Chem.* 249, 2275 (1974).
- Lemercinier X., Jones C.: *Carbohydr. Res.* 296, 83 (1996).
- Bhattacharjee A. K., Jenning H. J., Kenny C. P., Martin A., Bundle D. R.: *J. Biol. Chem.* 250, 1926 (1975).
- Bhattacharjee A. K., Jenning H. J., Kenny C. P., Martin A., Bundle D. R.: *Can. J. Biochem.* 54, 1 (1976).
- Heyns K., Kiessling G.: *Carbohydr. Res.* 3, 340 (1967).
- Lindberg B., Lindqvist B., Lönngren J., Powell D. A.: *Carbohydr. Res.* 78, 111 (1980).
- Reeves R. E., Goebel W. F.: *J. Biol. Chem.* 139, 511 (1941).
- Jones C., Currie F., Forster M. J.: *Carbohydr. Res.* 221, 95 (1991).
- Jansson P. E., Lindberg B., Lindquist U.: *Carbohydr. Res.* 140, 101 (1985).
- Rebers P. A., Heidelberger M.: *J. Am. Chem. Soc.* 83, 3056 (1961).
- Kenne L., Lindberg B., Madden J. K.: *Carbohydr. Res.* 73, 175 (1979).
- Moreau M., Richards J. C., Perry M. B., Kniskern P. J.: *Carbohydr. Res.* 15, 79 (1988).
- Rutherford T. J., Jones C., Davies D. B., Elliott A. C.: *Carbohydr. Res.* 218, 175 (1991).
- Lindberg B., Lonngren J., Powell D. A.: *Carbohydr. Res.* 58, 177 (1977).
- Lugowski C., Jennings H. J.: *Carbohydr. Res.* 131, 119 (1984).
- Katzenellenbogen E., Jennings H. J.: *Carbohydr. Res.* 124, 235 (1983).
- Jennings H. J., Rosell K. G., Carlo D. J.: *Can. J. Chem.* 58, 1069 (1980).
- Richards J. C., Perry M. B.: *Biochem. Cell. Biol.* 66, 758 (1988).
- Kenne L., Lindberg B., Petersson K., Romanowska E.: *Carbohydr. Res.* 56, 363(1977).
- Kenne L., Lindberg B., Petersson K., Katzenellenbogen E., Romanowska E.: *Carbohydr. Res.* 78, 119 (1980).
- Kossaczka Z., Bystrický S., Bryla D. A., Shiloach J., Robbins J. B., Szu S. C.: *Infect. Immun.* 65, 2088 (1997).
- Cohen D., Ashkenazi S., Green M., Lerman Y., Slepion R., Robin G., Orr N., Taylor D. N., Sadoff J. C., Chu C., Shiloach J., Schneerson R., Robbins J. B.: *Infect. Immun.* 64, 4074 (1996).
- Blum M. D., Dagan R., Mendelman P. M., Pinsk V., Giordani M., Li S., Bohidar N., McNeely T. B.: *Vaccine.* 18, 2359 (2000).
- Puumalainen T., Zeta-Capeding M. R., Kayhty H., Lucero M. G., Auramen K., Leroy O., Nohynek H.: *Pediatr. Inf. Dis. J.* 21, 309 (2002).
- Lindberg A. A.: *Vaccine.* 17, 28 (1999).
- Anderson P., Pichichero M. E., Insel R. A.: *J. Clin. Invest.* 76, 52 (1985).
- Schneerson J., Barrera O., Sutton A., Robbins J. B.: *J. Exp. Med.*, 152, 361 (1980).
- Schneerson R., Robbins J. B., Parke Jr J. C., Bell C., Schlesselman J. J., Sutton A., Wang Z., Schiffman G., Karpas A., Shiloach J.: *Infect. Immun.* 52, 519 (1986).
- Ada G., Isaacs D.: *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 79 (2003).
- Mieszala M., Kogan G., Jennings H. J.: *Carbohydr.*

- Res. 338, 167 (2003).
40. Suárez N., Massaldi H., Fraguas L. F., Ferreira F.: *J. Chromatogr. A* 1213, 169 (2008).
 41. Saksena R., Ma X., Wade T. K., Kováč P., Wade W. F.: *Carbohydr. Res.* 340, 2256 (2005).
 42. Hou S., Saksena R., Kováč P.: *Carbohydr. Res.* 343, 196 (2008).
 43. Xu P., Alam M. M., Kalsy A., Charles R. C., Calderwood S. B., Qadri F., Ryan E. T., Kováč P.: *Bioconjugate Chem.* 22, 2179 (2011).
 44. Grandjean C., Boutonnier A., Guerreiro C., Fournier J. M., Mulard L. A.: *J. Org. Chem.* 70, 7123 (2005).
 45. Grandjean C., Boutonnier A., Dassy B., Fournier J. M., Mulard L. A.: *Glycoconjugate J.* 26, 41 (2005).
 46. Grandjean C., Wade T. K., Ropartz D., Ernst L., Wade W. F.: *Pathog. Dis.* 67, 136 (2013).
 47. Tripathi, R. P., Dwivedi, P., Sharma, A., Kushwaha, D. and Tiwari, V. K.: *Click Chemistry in Glycoscience: New Developments and Strategies* (Witczak Z. J., Bielski R., eds.), kap. 12. Wiley, Weinheim 2013.
 48. Pozsgay V., Vieira N. E., Yergey A.: *Org. Lett.* 4, 3191 (2002).
 49. Farkaš P., Bystrický S.: *Chem. Pap.* 64, 683 (2010).
 50. Pozsgay V., Kubler-Kielb J.: *Carbohydrate-Based Vaccines* (Roy R., ed.), kap. 3. American Chemical Society, Oxford 2008.
 51. Sletten E. M., Bertozzi C. R.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 6974 (2009).
 52. Canalle L. A., Löwik D. W. P. M., van Hest J. C. M.: *Chem. Soc. Rev.* 39, 329 (2010).
 53. Avci F., Kasper D.: *Annu. Rev. Immunol.* 28, 29 (2010).
 54. Avci F. Y., Li X., Tsuji M., Kasper D. L.: *Nat. Med.* 17, 1602 (2011).

A. Fleischhackerová, P. Farkaš, and S. Bystrický
(*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava*): **Glycoconjugate Vaccines**

This paper provides an overview of carbohydrate-based glycoconjugate vaccines used in clinical practice. The structures of capsular polysaccharides mostly used in vaccine design and preparation of glycoconjugates are highlighted. Molecular mechanisms by which glycoconjugates are able to elicit T-cell-dependent immune response are mentioned.