



HU000230490B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **230 490**(13) **B1****MAGYARORSZÁG**  
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

## SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 02999**(22) A bejelentés napja: **2002. 01. 22.**(40) A közzététel napja: **2003. 12. 29.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2016. 08. 29.**(51) Int. Cl.: **A61K 390/95** (2006.01)**A61K 47/48** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

**PCT/US 02/01963**

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

**WO 02058737**

(30) Elsőbbségi adatok:

**60/263,435****2001. 01. 23.****US**

(72) Feltaláló(k):

**Ryall, Robert P., Stroudsburg, Pennsylvania (US)**

(73) Jogosult(ak):

**Sanofi Pasteur Inc., Swiftwater, Pennsylvania  
(US)**

(74) Képvisező:

**Danubia Szabadalmi és Jogi Iroda Kft.,  
Budapest**(54) **Multivalens, meningokokkusz-eredetű poliszaccharid és fehérje konjugátumát tartalmazó vakcina**

(57) Kivonat

A találmány tárgya Neisseria meningitidis által okozott meningokokkusz betegség ellen széleskörű védelmet biztosító, kombinált vakcina. A vakcina négy, egymástól elkülönült poliszaccharid-fehérje konjugátumból áll, amelyeket egyetlen vakcinadózisba formuláltunk. A Neisseria meningitidis A, C, W-135 és Y szerocsoportjából származó, tisztított, kapszuláris poliszaccharidokat kémiai úton aktiváltak és szelektíven, kémiai kötéssel, hordozófehérjéhez kötöttek, így olyan poliszaccharid-fehérje konjugátumokat képeztek, amelyek gyermekekben és felnőttekben a különféle N. meningitidis törzsekkel szemben hosszútávú immunitást képesek kiváltani.

## MULTIVALENS, MENINGOKOKKUSZ-EREDETŰ POLISZACCHARID ÉS FEHÉRJE KONJUGÁTUMÁT TARTALMAZÓ VAKCINA

A találmány általánosságban a gyógyászat, konkrétan a mikrobiológia, immunológia, vakcinák és a  
5 bakteriális patogének okozta fertőzés immunizálással történő megelőzésének terére tartozik.

A *Neisseria meningitidis* a bakteriális meningitis és szepszis elsősorú okozója a világszerte. Az utóbbi  
harmánc évben az endemikus meningokokkusz betegség előfordulása, 100.000 személyre vonatkoztatva, a fej-  
lett világban 1-5, míg a fejlődő világban 10-25 eset [Reido és mtsai., *Ped. Infect. Dis. J.* 14, 643-657 (1995)].  
Járvány esetén, a meningokokkusz betegség előfordulása – 1.000.000 főre vonatkoztatva, elérheti az ezret. Az  
10 Egyesült Államokban évente mintegy 2.600, a fejlődő országokban átlagosan 330.000 bakteriális meningitiszes  
eset fordul elő. A halálozási arány 10 és 20% közötti.

A patogén meningokokkuszokat, a mikroorganizmus külső membránfelszínéhez kapcsolódott  
poliszaccharid-kapszula burkolja. Harminc különféle meningokokkusz szerocsoportot azonosítottak a  
kapszuláris poliszaccharid immunológiai specificitásának alapján [Frasch és mtsai., *Rev. Infect. Dis.* 7, 504-510  
15 (1985)]. E harminc szerocsoportból öt – az A, B, C, W135 és Y, okozza a meningokokkusz betegségek legna-  
gyobb részét. Az „A” szerocsoport tehető felelőssé a legtöbb járványos megbetegedésért. A „B”, „C” és „Y”  
okozza az endemikus betegségek és a lokalizált kitörések túlnyomó részét.

Az emberi orr-garatüreg nyálkahártyája a *Neisseria meningitidis* egyetlen ismert természetes rezervoárja.  
A kolonizáció a nyálkahártya-sejt és az orr-garatüreg szubepitéliális szövetének külső felszínén történik. A  
20 meningokokkuszok hordozása eltarthat hónapokig. A meningokokkuszok közvetlen érintkezéssel vagy csepp-  
fertőzés útján terjednek. A meningokokkuszok behatolása úgy történik, hogy a nyálkahártya epitéliumán  
endocitózis eredményeként bekövetkező fagocitózissal jutnak át. A gazda, behatoló meningokokkuszok ellen  
védekezése a komplement által közvetített bakteriolízistől függ. A komplement által közvetített bakteriolízist  
felelős, szérum-antitestek a külső kapszuláris poliszaccharid nagy része ellen irányulnak.

A kapszuláris poliszaccharid ellen immunválaszt kiváltani képes, meningokokkusz-eredetű  
poliszaccharidokon alapuló vakcinák már ismertek. Ezen antitestek képesek a meningokokkuszok specifikus  
szeroosztályjait elleni, komplement által közvetített bakteriolízist kiváltani. A meningokokkusz-eredetű  
poliszaccharidokat tartalmazó vakcinákról már kimutatták, hogy bár gyermekekben és felnőttekben hatékonyak  
[Peltola és mtsai., *New Eng. J. Med.* 297, 686-691 (1997); Artenstein és mtsai., *New Eng. J. Med.* 282, 417-420  
30 (1997)], a hatékonyság az újszülöttekben és fiatal gyermekekben korlátozott [Reingold és mtsai., *Lancet* 2, 114-  
118 (1985)]. Fiatalokból álló populációnak, egymást követő dózisokban beadott poliszaccharid gyenge rásegítő  
választ, vagy semmilyen választ sem váltott ki [Goldschneider és mtsai., *J. Infect. Dis.* 128, 769-776 (1973); Gold  
és mtsai., *J. Infect. Dis.* 136, S31-S35 (1977)]. A meningokokkusz-eredetű poliszaccharidot tartalmazó vakcinák  
által kiváltott védelem időtartama nem hosszú, és a becslések szerint felnőttekben és 4 évnél idősebb gyermekek-  
35 ben 3-5 év [Brandt és Artenstein, *J. Infect. Dis.* 131, S69-S72 (1975); Käyhty és mtsai., *J. Infect. Dis.* 142, 861-868  
(1980); Ceeseey és mtsai., *J. Infect. Dis.* 167, 1212-1216 (1993)]. Az 1 és 4 év közötti korú gyermekekben a védett-  
ség időtartama kevesebb, mint 3 év [Reingold és mtsai., *Lancet* 2, 114-118 (1985)].

Poliszaccharidok nem képesek kötődni a fő hisztokompatibilitási komplex molekuláihoz - amely folya-  
mat előfeltétele az antigén-bemutatásnak és a T-helper limfociták serkentésének – azaz a poliszaccharidok T-  
40 sejtektől nem függő antigének. Poliszaccharidok a T-helper limfociták segítségével képesek serkenteni a B-

limfocitákat. A T-sejtektől függetlenül történő, B-limfociták serkentése eredményeként, az ezen antigénekkal végzett immunizálási követően hiányozni fog az immunrendszer „emlékezésének” indukálása. A poliszaccharid antigének képesek igen hatékony, T-sejtektől független válaszokat kiváltani felnőttekben, de e T-sejtektől független válaszok gyengék a esetemők és fiatal gyermekek éretlen immunrendszerében.

5 Ha a poliszaccharidokat kovalensen kapcsoljuk fehérjemolekulákhoz („hordozók” vagy „hordozófehérjék”), akkor T-sejtektől független, poliszaccharid antigének átalakíthatók T-sejtektől függő antigénekké. A konjugátumot tartalmazó vakcina poliszaccharid-komponensét megkötő B-sejt aktiválható a konjugált hordozófehérje valamely részét képező peptidre specifikus T-helper sejttel. A hordozófehérjére adott T-helper sejtek általi válasz a poliszaccharid elleni antitest-termelés fokozására szolgál.

10 A „B” poliszaccharid-szerocsoportról kimutatták, hogy az emberi populációban gyengén immunogén [Wyle és mtsai., *J. Infect. Dis.* 126, 514-522 (1972)]. E szerocsoport poliszaccharidjének fehérjékkel történő kémiai összekapcsolása nem eredményezte az immunválasz lényeges mértékű változását laboratóriumi állatokban [Jennings és Lugowski, *J. Immunol.* 127, 1011-1018 (1981)]. Az e szerocsoportra adott gyenge immunválaszt feltételezhetően az okozza, hogy a „B” poliszaccharid szerocsoport és a gazda poliszaccharid glikoproteinjei –  
15 például idegsejt-adhéziós molekulák - között szerkezeti hasonlóság figyelhető meg.

Meningokokkusz elleni, „C” poliszaccharid szerocsoporton alapuló konjugált vakcina az irodalomban már ismert. E monovalens vakcina erős, funkcionális antitest-választ vált ki a „C” szerocsoportba tartozó *N. meningitidis* törzseken lévő kapszuláris poliszaccharid ellen. Helyi vakcina csak a „C” szerocsoportba tartozó baktériumok által okozott betegség ellen képes védelmet nyújtani.

20 Campagne G és mtsai [*Pediatric Infectious Disease Journal* (2000); 19, 144-150] meningococcus A+C poliszaccharid és diftéria-toxoid konjugátumvakcinát (MenD) tárnak fel. A MenD-t stabilnak találták gyermekek körében Nigerben, és az immunizálás jelentősen nagyobb funkcionális antitest-aktivitáshoz vezetett, mint a megfelelő poliszaccharid-vakcina esetében.

Lei Q. P. és mtsai [*Developments in biologicals* (2000); 103, 259-264] tetraavalens konjugátumvakcinát  
25 tárnak fel, amely külön-külön diftéria-toxoidhoz konjugált, *Neisseria meningitidis* A-ből, C-ből, W135-ből és Y-ből előállított poliszaccharidokat tartalmaz. A szerzők dezoxikólsav/HCl alkalmazásával konjugált kicsapási eljárást írnak le, amellyel hatékonyan különítették el a szabad és a kötött poliszaccharidot a tetraavalens konjugátumvakcinában.

Lamb D. H. és mtsai [*Developments in biologicals* (2000); 103, 251-258] a Lei Q. P. és mtsai által ismertett meningococcus poliszaccharid és diftéria-toxoid alkotta konjugátumvakcina kapilláris-elektroforézis  
30 analízisének írnak le.

Perkins B. A. [*Journal of the American Medical Association* (2000); 283, 2842-2843] ismerteti a rendelkezésre álló meningococcus poliszaccharid-vakcinákat, továbbá a meningococcus konjugátumvakcinákat, amelyek már kifejlesztettek és amelyet még ki kell fejleszteni, köztük A-, C-, W135- és Y-konjugátumvakcinákat  
35 is.

A már meglévő, meningokokkusz-eredetű poliszaccharidon alapuló vakcinák használhatósága korlátozott a fiatal gyermekek körében és felnőttekben nem biztosít hosszú ideig tartó védelmet. Az egyetlen olyan meningokokkusz vakcina, amelyről kimutatták, hogy képes minden, meningokokkusz általi fertőzés veszélyének kitétt csoportban – így a gyermekek esetében is – hosszú ideig tartó védelmet kiváltani, az *N. meningitidis*  
40 egyetlen szerocsoportjából származó poliszaccharidon alapul, és más szerocsoport ellen nem biztosít védelmet.

Így, igény mutatkozik széleskörű, hosszú ideig tartó védelmet biztosító, meningokokkusz konjugált vakcinára a meningokokkusz betegség elleni védekezéshez a meningokokkusz általi fertőzés veszélyének kitett gyermekek és felnőttek számára. A találmány szerinti multivalens meningokokkusz-eredetű poliszaccharidokkal e probléma megoldható oly módon, hogy az *N. meningitidis* fő szerocsoportjaiból származó immunogén poliszaccharidokat, hordozófehérjékkel történő konjugátatással T-sejtektől függő antigénekké alakítjuk és ezeket vakcinakészítményekbe építjük be.

Az alábbiakban összefoglaljuk a találmány szerinti megoldást.

A találmány tárgya négy különálló fehérje-poliszaccharid konjugátum immunológiailag hatékony mennyiségét tartalmazó, multivalens meningococcus-vakcina, embert *N. meningitidis* általi fertőzés elleni védelemben történő alkalmazásra, amelyben a konjugátumok mindegyike különböző, hordozófehérjéhez konjugált kapszuláris poliszaccharidot tartalmaz, és ahol a kapszuláris poliszaccharidok *N. meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportjaiból előállítottak, és továbbá ahol a hordozófehérje vagy diftéria-toxoid vagy CRM197

A leírásban ismertetünk két vagy több poliszaccharid és valamilyen fehérje konjugátumát tartalmazó immunológiai készítményekt, amelyben a konjugátumok mindegyike *N. meningitidis*-eredetű kapszuláris poliszaccharid valamilyen hordozófehérjével képzett konjugátumát tartalmazza.

A leírásban ismertetünk továbbá két vagy több poliszaccharid és valamilyen fehérje konjugátumát tartalmazó immunológiai készítményt, amelyben a konjugátumok mindegyike *N. meningitidis* különböző szerocsoportjaiból származó kapszuláris poliszaccharid valamilyen hordozófehérjével képzett konjugátumát tartalmazza.

A találmány tárgyát patogén *Neisseria meningitidis* által okozott betegség kezelésére szolgáló, meningokokkusz-eredetű poliszaccharid és fehérje konjugátumát tartalmazó vakcinák képezik. A találmány tárgyát multivalens, meningokokkusz-vakcinák képezik, amelyek 2-4 elkülönült, fehérje-poliszaccharid konjugátumok immunológiailag hatásos mennyiségét tartalmazza, ahol a konjugátumok mindegyike különféle kapszuláris poliszaccharid és hordozófehérje konjugátumát tartalmazza, és ahol az egyes poliszaccharidokat az A, C, W-135 és Y szerocsoportokból származó kapszuláris poliszaccharidok közül választjuk ki, ahol a hordozófehérje vagy diftéria-toxoid vagy CRM197.

A leírásban ismertetünk továbbá multivalens, meningokokkusz-eredetű poliszaccharid-fehérje készítmény előállítására szolgáló eljárásokat, amely eljárások végrehajtása során patogén *Neisseria meningitidis*-ből két vagy több kapszuláris poliszaccharidot tisztítunk, a tisztított poliszaccharidokat egy vagy több hordozófehérjével konjugáltatjuk és a konjugátumokat kombinálva multivalens, meningokokkusz-eredetű poliszaccharid-fehérje készítményt készítünk.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás ember *N. meningitidis* általi fertőzésével szembeni védelemben történő alkalmazására szolgáló vakcina előállítására, *azzal jellemezve, hogy*

(i) hordozófehérje és *N. meningitidis* A szerocsoportjából származó kapszuláris poliszaccharid konjugátumát;

(ii) hordozófehérje és *N. meningitidis* C szerocsoportjából származó kapszuláris poliszaccharid konjugátumát;

(iii) hordozófehérje és *N. meningitidis* W-135 szerocsoportjából származó kapszuláris poliszaccharid konjugátumát; és

(iv) hordozófehérje és *N. meningitidis* Y szerocsoportjából származó kapszuláris poliszaccharid konjugátumát alkalmazzuk;

ahol az eljárás tartalmazza a konjugátumok külön-külön történő előállítását, és a konjugátumok kombinálását alkalmas hordozóval, hígítószerezrel vagy excipienssel keverékben, ahol a hordozófehérje vagy diftéria-toxoid vagy CRM197.

A leírásban ismertetünk továbbá eljárást *N. meningitidis*-eredetű kapszuláris poliszaccharid elleni immunválasz indukálására, amely eljárásban a találmány szerinti immunológiai készítmény immunológiailag hatásos mennyiségét embernek vagy állatnak adjuk be.

A leírásban ismertetünk továbbá eljárást *N. meningitidis* okozta fertőzésre fogékony ember vagy állat védelmére, amely eljárásban a találmány szerinti vakcina immunológiailag hatásos mennyiségét embernek vagy állatnak adjuk be.

Az alábbiakban részletesen leírjuk a találmány szerinti megoldást.

A leírásban ismertetünk két vagy több fehérje-poliszaccharid konjugátumot tartalmazó immunológiai készítményeket, amelyben a konjugátumok mindegyike kapszuláris poliszaccharid valamilyen hordozófehérjével képzett konjugátumát tartalmazza. Így például ismertetünk két vagy több kapszuláris poliszaccharid két vagy több hordozófehérjével képzett konjugátumát tartalmazó készítményeket is.

Kapszuláris poliszaccharidok elkülöníthetők a szakember számára ismeri standard eljárásokkal (ref.). A találmány szerint előnyösek a *N. meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportokból előállított kapszuláris poliszaccharidok.

A találmány előnyös megvalósítási módjában, e meningokokkusz szerocsoportokból készült konjugátumokat elkülönült folyamatokban állítjuk elő és ezeket egyetlen dózisformába formulázzuk. Például, az A, C, W-135 és Y szerocsoportokból tisztított kapszuláris poliszaccharidokat elkülönülten tisztítjuk.

A találmány előnyös megvalósítási módjában, a hordozófehérjéhez történő konjugáltatás előtt a tisztított poliszaccharidot depolimerizáljuk és aktiváljuk. A találmány előnyös megvalósítási módjában, az *N. meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportjaiból származó kapszuláris poliszaccharidokat gyenge oxidatív körülmények alkalmazásával részlegesen depolimerizáljuk.

A poliszaccharidok depolimerizációja vagy részleges depolimerizációja után következhet az aktiválási lépés. A leírás szerinti értelemben, az „aktiválás” a poliszaccharid olyan kémiai kezelését jelenti, amelyben a hordozófehérjével reagálni képes kémiai csoportok jönnek létre. A találmány előnyös megvalósítási módjában, az eljárás során fiziológiai sóoldatban (pH 5,0 ± 0,1) adipinsav-dihidraziddal körülbelül két órás kezelést végzünk 15-30°C-on. Az egyik aktiválási eljárás az US 6.965.714 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban van leírva.

Aktiválás után, a kapszuláris poliszaccharidokat egy vagy több hordozófehérjével konjugálthatjuk. A találmány előnyös megvalósítási módjában, az egyes kapszuláris poliszaccharidokat egyetlen fehérjetípussal külön-külön konjugáltatjuk. A találmány előnyös megvalósítási módjában, az *N. meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportjaiból származó kapszuláris poliszaccharidokat azonos fehérjetípussal, külön-külön konjugáltatjuk.

Hordozófehérjék lehetnek inaktívált, baktériumeredetű toxinok, például diftéria toxoid, CRM197, tetanusz toxoid, pertussis toxoid, *E. coli* LT, *E. coli* ST, és *Pseudomonas aeruginosa* exotoxinja. Baktériumokból származó külső membránfehérjék, például „C” külső membránkomplex (OMPC), porinok, transzferrint kötő fehérjék, pneumolizis, pneumokokkusz-eredetű „A” fehérje (PspA), vagy pneumokokkusz adhezin fehérjeje (PsaA), szintén alkalmazhatók. Hordozófehérjék más fehérjék, például ovaalbumin, kúrtöcsiga-eredetű hemocianin (KHL), borjúeredetű szérumalbumin (BSA) vagy a tuberkulin tisztított fehérjeszármazéka (PPD), is

lehetnek. Előnyös, ha a hordozófehérjék nem toxikus és nem reaktív, megfelelő mennyiségben és tisztaságban elérhető fehérjék. A hordozófehérjék standard konjugációs eljárásokban alkalmazhatók kell, hogy legyenek. A találmány előnyös megvalósítási módjában, *Corynebacteria diphtheriae* tenyészetekből tisztított, és kémiai úton, formaldehiddel detoxifikált diftéria toxint alkalmazunk hordozófehérjeként.

5 A kapszuláris poliszaccharid hordozófehérjéhez történt konjugáltatása után, a poliszaccharid-fehérje konjugátumot különféle eljárásokkal tisztíthatjuk (a poliszaccharid-fehérje konjugátum tekintetében feldúsíthatjuk). A tisztítási lépés egyik célja a poliszaccharid-fehérje konjugátumoktól elkülöníteni a nem kötött poliszaccharidot. Az egyik tisztítási eljárásban ammóniumsulfát jelenlétében ultraszűrést végzünk [US 6.146.902 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]. Esetleg, az el nem reagált fehérjétől és poliszaccharidtól a konjugátumokat bármely számú standard eljárással – ideértve, többek között, a méretkizárásos kromatográfiát, hidrofób-kölcsönhatási kromatográfiát vagy ammóniumsulfáttal végzett frakcionálást – választjuk el [lásd például, Anderson és mtsai., *J. Immunol.* 137, 1181-1186 (1986); Jennings és Lagowski, *J. Immunol.* 127, 1011-1018 (1981)].

15 A poliszaccharid és fehérje konjugáltatása után, a különféle poliszaccharid-fehérje konjugátumok kombinálásával elkészítjük a találmány szerinti immunológiai készítményeket. A leírásban ismertetett immunológiai készítmények két vagy, egy vagy több hordozófehérjéhez konjugált, kapszuláris poliszaccharidot tartalmaznak. A leírás szerint az *N. meningitidis* A és C szerocsoportjaiból származó, diftéria toxoidhoz külön-külön konjugált kapszuláris poliszaccharidokat tartalmazó, bivalens immunológiai készítményt állítunk elő. Előnyösebb, ha a találmány előnyös megvalósítási módjában az *N. meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportjaiból származó, diftéria toxoidhoz külön-külön konjugált kapszuláris poliszaccharidokat tartalmazó, tetravalens immunológiai készítményt állítunk elő.

Hordozófehérjék előállítása és alkalmazása, és különféle lehetséges konjugálási eljárások ismertek a szakember számára. A találmány szerinti kitanítások és az általános irodalomban leírtak ismeretében a találmány szerinti konjugátumokat ilyen szakember elő tudja állítani. Útmutatások elérhetők az alábbi amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok bármelyikéből vagy mindegyikéből: US 4.356.170 sz., US 4.619.828 sz., US 5.153.312 sz., US 5.422.427 sz., és US 5.445.817 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok.

25 A találmány szerinti immunológiai készítményeket úgy készítjük el, hogy különféle meningokokkuszszerotípusokból külön-külön poliszaccharid-fehérje konjugátumokat állítunk elő és a konjugátumokat kombináljuk. A találmány szerinti immunológiai készítményeket vakcinaként alkalmazzuk. A találmány szerinti vakcinák formulázása történhet a technikában ismertek alkalmazásával. A találmány szerinti vakcinakészítmények tartalmazhatnak egy vagy több adjuvánt is. Adjuvánsok közé tartoznak például - minden korlátozás nélkül - az alábbiak: alumínium adjuvánsok, Freund-féle adjuváns, BAY, DC-choi, pepp, monofoszfóril lipid A, CpG, QS-21, koleratoxin és formil-metionil peptid [Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach, szerk.: Powell és Newman, kiad.: Plenum Press, NY (1995)]. Az adjuváns előnyösen alumínium adjuváns, például alumínium-hidroxid vagy alumíniumfoszfát.

35 Ahogyan a fentiekben bemutattuk, a találmány szerinti vakcinák T-sejttől függőhöz hasonló immunválaszt váltanak ki különféle állatmodellekben, míg a poliszaccharid-vakcina T-sejttől függetlenhez hasonló immunválaszt vált ki. Így a leírásban ismertetett készítmények olyan kutatási célokra is alkalmasak, amelyek az *N. meningitidis* antigénekre adotti, T-sejttől függőhöz hasonló immunválaszokban résztvevő biológiai útvonalak és folyamatok tanulmányozására irányulnak.

40

A találmány szerinti vakcina embernek vagy állatnak beadandó mennyiségét és beadási rendjét a gyógyszerészeti és állatgyógyászati technikákban jártas szakember, az alábbi faktorok figyelembe vételével, standard eljárások alkalmazásával meg tudja határozni: ilyen faktor a konkrét antigén, az adjuváns (ha jelen van), a faj, annak kora, neme, tömege, és a konkrét állat vagy páciens állapota, és a beadás módja. A találmányban, a poliszaccharid-hordozófehérje, *N. meningitidis* elleni vakcinálásra hatékony dózis biztosítására alkalmas mennyisége testtömeg-kilogrammonként körülbelül 0,02-5 µg között lehet. A találmány szerinti előnyös készítményben és eljárásban a dózis testtömeg-kilogrammonként körülbelül 0,1-3 µg közötti. Például, egy adott hatékony dózis a fertőzést követő időszak elteltével kevesebb antitestet igényel, mivel a baktériumoknak kevesebb idő áll rendelkezésükre a proliferációhoz. Hasonlóképpen, a hatékony dózis függ a diagnózis idején a páciensben mért baktérium mennyiségétől. Néhány nap alatt beadott, többszörös injekciók terápiás alkalmazásnak minősülnek.

A találmány szerinti tetraavalens konjugátumok beadhatók egyetlen dózisban vagy sorozatban (azaz, „rásegítőként” vagy „rásegítőkként”). Például, egy adott gyermek kaphat egyetlen dózist az élete korai szakaszában, majd rásegítő dózist adhatunk akár 10 év múlva, ahogyan ez jelenleg, a gyermekkori betegségek megelőzésére szolgáló vakcinák esetében javasolt.

A rásegítő dózis elsődlegesen aktivált („primed”) B-sejtekből antitesteket generál, azaz anamnesztikus választ vált ki. Vagyis, a multivalens vakcina, az engedélyezett poliszaccharid vakcinával összehasonlítva, magas primer (azaz, a vakcina egyetlen beadását követő) funkcionális antitest-választ vált ki a fiatalabb populációban, és képes anamnesztikus választ (azaz, a vakcina egyetlen beadását követő választ) is kiváltani, amely demonstrálja, hogy a találmány szerinti multivalens konjugátumvakcina által kiváltott védő immunválasz hosszú időtartamú.

A találmány szerinti készítmények lehetnek testnyíláson át, például szájon át, orron, análisán, vaginálisan, perorálisan történő bevitelre szolgáló, gyomorból, nyálkahártyán (például, nyelvvelati területről, alveolusokból, ínyen, szaglószervi vagy légzőszervi nyálkahártyán) át, stb. felszívódó folyadékkészítmények; beadhatók szuszpenziókként, szirupokként vagy elixíreként; és lehetnek parenterális, szubkután, intradermális, intramuszkuláris, intraperitoneális vagy intravénás úton beadható (például injektálva beadható) készítmények, például steril szuszpenziók vagy emulziók. Előnyösek az intravénás és parenterális beadási módok. Ilyen készítmények összekeverhetők alkalmas hordozóval, diluenssel, vagy adalékanyaggal, mint például steril vízzel, fiziológiai sóoldattal, glükózzal és hasonlókkal. A készítmények akár liofilizálhatók is lehetnek. A készítmények tartalmazhatnak kiegészítő anyagokat, például nevesítő vagy emulgeáló szereket, pH beállítására szolgáló puffereket, gélképző vagy viszkozitást fokozó adalékanyagokat, tartósítószeret, ízesítő szereket, színezékeket és hasonlókat, attól függően, hogy milyen készítményt kívánunk előállítani, és hogy azt miként kívánjuk beadni. Standard leírások [mint például a Remington's Pharmaceutical Science, 17. kiadás (1985)], kísérletezés nélkül alkalmazhatók a megfelelő készítmények előállításához.

A találmány szerinti, vakcinaként alkalmazott készítmények kényelmesen előállíthatók folyadékkészítményként, azaz izotóniás vizes oldatokként, szuszpenziókként, emulziókként vagy viszkozus készítményekként, amelyek pH-ját a kiválasztott értékre pufferral beállíthatjuk. Ha az emésztőrendszeren át történő felszívódást részesítjük előnyben, a találmány szerinti készítmények lehetnek „szilárd” formában, például lehetnek pirulák, kapszulák, tabletták, kapletták („caplet”) és hasonlók, ideértve az olyan „szilárd” készítményeket is, amelyek a fokozatos (időben eltolódó) felszabadulást teszik lehetővé és azokat is, amelyeknek folyadék tölteléke van (pél-

dául, zselatinnal burkolt folyadék, a zselatin a gyomorban feloldódik és a töltelék a bélrendszerbe juthat). Ha nazális vagy légzőszervi (nyálkahártyán át történő) beadásra van szükség, a készítmények lehetnek nyomóflakonos diszpenzerből, pumpás diszpenzerből vagy aeroszol diszpenzerből diszpergálható formában. Az aeroszolak kipermetezése szükséges túlnyomást általában szénhidrogénnel biztosítjuk. A pumpás diszpenzerek előnyösen meghatározott mennyiséget vagy egy adott konkrét szemcseméretet diszpergálnak.

Folyadékkészítményeket normális esetben könnyebben lehet elkészíteni, mint géleket, más viszkozus készítményeket vagy szilárd készítményeket. Ezenfelül, a folyadékkészítményeket valahogy kényelmesebben lehet – különösen injekcióval vagy orálisan – beadni állatoknak, gyermekeknek, különösen kisgyermekeknek, és másoknak, akiknek problémát okoz egy adott tablettá, pirula kapszula vagy hasonló lenyelése, vagy többszörös dózisok esetében. Másfelől viszont, a viszkozus készítményeket a megfelelő viszkozitási tartományon belül formulázva elérhetjük, hogy a készítmény és a nyálkahártya – például a gyomor belsejének vagy az orrnak a nyálkahártya-rétege - közötti érintkezés hosszabb ideig tartson.

Nyilvánvaló, hogy az alkalmas hordozók és más adalékanyagok kiválasztása függ a beadás pontos módjától és a konkrét dózisforma – például folyékony dózis (például, hogy vajon a készítményt oldattá, szuszpenzióvá, gélle vagy más folyékony formává formuláztuk), vagy szilárd dózis (például, hogy vajon a készítményt pirulává, tablettává, kaplettává, időben elhúzóde felszabadulást lehetővé tevő vagy folyadékkal töltött formává formuláztuk) – természetétől.

Az oldatok, szuszpenziók vagy gélek, az aktív összetevő mellett, normális esetben főként vizet (előnyösen tisztított vizet) tartalmaznak. Más összetevők, például a pH beállítására szolgáló anyagok (például, bázisok, mint például NaOH), emulgeálók vagy diszpergáló ágensek, pufferképző ágensek, tartósítószer, nedvesítőszer, zselésítő ágensek (például, metilcellulóz), színezékek és/vagy ízesítő anyagok kis mennyiségben szintén jelen lehetnek. A készítmények lehetnek izotóniásak, azaz az ozmotikus nyomásuk megegyezik a vér vagy könny ozmotikus nyomásával.

A találmány szerinti készítmények kívánatos izotóniáját beállíthatjuk nátriumtartarát, propilén-glikol vagy más szerves oldott anyagok alkalmazásával. Nátriumklorid előnyösen alkalmazható nátriumionokat tartalmazó pufferek esetében.

A készítmények viszkozitása a kiválasztott értéken tartható gyógyászatiilag elfogadható sűrűsítő szerek alkalmazásával. Előnyös a metilcellulóz, mivel könnyen és gazdaságosan elérhető és könnyű dolgozni vele. Más alkalmas sűrűsítő szerek például az alábbiak: xantán gumi, karboximetil-cellulóz, hidroxipropil-cellulóz, karbomer, és hasonlók. A sűrűsítő szer előnyös koncentrációja a kiválasztott ágenstől függ. Alkalmazzunk olyan mennyiséget, amellyel a kiválasztott viszkozitás elérhető. A viszkozus készítményeket normális esetben oldatokból állítjuk elő az ilyen sűrűsítő szerek hozzáadásával.

Gyógyászatiilag elfogadható tartósítószer alkalmazható a készítmény életidejének fokozására. E célra megfelelő lehet a benzil-alkohol, de különféle más tartósítószer, például parabéneket, úmurozált, klórbutanolt, vagy benzalkónium-kloridot is alkalmazhatunk. A tartósítószer megfelelő koncentrációja az össz tömeg 0,02-2%-a, bár a kiválasztott ágens függvényében bizonyos elfogadható mértékű variáció is elképzelhető.

A szakember felismeri, hogy a készítmények összetevőit úgy kell kiválasztani, hogy az *N. meningitidis*-ből származó polisaccharid-hordozófehérje konjugátumok szempontjából semlegesek legyenek.

A találmányt az alábbi, illusztratív, a találmányt semmiben sem korlátozó, és a találmány újszerű koncepciójának számos előnyös megvalósítási módját ismertető példákkal részletesebben leírjuk. A találmány más



példái, a találmány igényportokban meghatározott oltalmi körétől való eltérés nélkül világosak szakember számára.

## PÉLDÁK

### I. példa

5 A *Neisseria meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportjaiból származó, tisztított, kapszuláris poliszaccharid-porok előállítása

Különálló *Neisseria meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportok nedvesen fagyasztott tenyészeteit felolvasztottuk és folyékony Watson Scherp tápoldat segítségével visszanyertük és Mueller Hinton agartáploldatot tartalmazó Blake-féle üvegekbe oltottuk. A Blake-féle üvegeket 35-37°C-on, CO<sub>2</sub> atmoszférában,  
10 15-19 órán át inkubáltuk. Az inkubációs periódus után, a szaporulatot eltávolítottuk a Blake-féle üvegekből és Watson Scherp tápoldatot tartalmazó, 4 literes flaskákba oltottuk. A flaskákat 35-37°C-on, 3-7 órán át, horizontális rázógépből inkubáltuk. A 4 literes flaskák tartalmát Watson Scherp tápoldatot tartalmazó fermentortartályba transzferáltuk. A fermentortartályt 35-37°C-on, 7-12 órán át inkubáltuk, szabályozva az oldott oxigén koncentrációját, a pH-t, az adalékok és a habképzés elleni anyagok hozzáadását. Az inkubációs  
15 periódus után, a fermentortartály tartalmát 500 literes tartályba transzferáltuk, ehhez Cetavlon-t adtunk, és az anyagot 1 órán át kevertük. A Cetavlonnal kezelt szaporulatot lecentrifugáltuk körülbelül 15000-17000 g-vel körülbelül 30-70 liter/óra átfolyási arány mellett. A nyers poliszaccharidot a felülúszóból precipitáltattuk Cetavlonnal végzett második lecsapással. Cetavlon-t adtunk a felülúszóhoz és az anyagot legalább egy órán át kevertük szobahőmérsékleten. Az anyagot 1-5°C-on, 8-12 órán át tároltuk. A lecsapott poliszaccharidot körül-  
20 belül 45000-50000 g-vel, 300-400 ml/perc átfolyással végzett centrifugálással gyűjtöttük össze. Az összegyűjtött pasztát a további felhasználásig -60°C-on tároltuk.

### Tisztított poliszaccharidpor előállítása

Az inaktívált pasztát felolvasztottuk és aprítógépbe tettük. A pasztát 0,9 M kalciumkloriddal turmixoltuk homogén szuszpenzió előállítására. A szuszpenziót körülbelül 10000 g-vel 15 percig centrifugáltuk. A  
25 felülúszót gézlapon át egy konténerbe dekantálva jutottunk az első kivonathoz. Második térfogat 0,9 M kalciumkloridot adtunk a pasztához és homogén szuszpenzióvá turmixoltuk. A szuszpenziót a fentiek szerint lecentrifugáltuk, és a felülúszót kombináltuk az első kivonattal. Összesen négy extrakciót végeztünk, és a felülúszókat összeöntöttük. Az összeöntött kivonatokat spirálisan összebegeztett, 10-30 kDA MWCO ultraszűrőegységek alkalmazásával végzett ultraszűréssel betöményítettük.

30 A koncentrátumhoz magnéziumkloridot adtunk és a pH-t nátriumhidroxiddal 7,2-7,5-re állítottuk be. A koncentrátumhoz Dnáz-t és Rnáz-t adtunk, és 25-28°C-on, 4 órán át kevertük. A keverékhez etanolt adtunk 30-50%-os végkoncentrációban. A lecsapott nukleinsavakat és fehérjéket 10000 g-vel, 2 órán át végzett centrifugálással eltávolítottuk. A felülúszót kinyertük, és a poliszaccharidokat 80%-os végkoncentrációban hozzáadott etanollal lecsaptuk és 1-5°C-on, 12 órán át állni hagytuk. Az alkoholt leszívtuk, és a kicsapódott poliszaccharidot 10000 g-  
35 vel, 5 percig centrifugáltuk. A kicsapódott poliszaccharidot alkohollal mostuk. A poliszaccharidot acetonnal mostuk, 10000 g-vel 15-20 percig centrifugáltuk. A poliszaccharidot vákuumban szárítottuk. A kiindulási poliszaccharidport nátriumacetát oldatban feloldottuk. Ehhez magnéziumkloridot adtunk és pH-t nátriumhidroxiddal 7,2-7,5-re állítottuk be. A koncentrátumhoz Dnáz-t és Rnáz-t adtunk, és 25-28°C-on, 4 órán át kevertük a maradék nukleinsavak eltávolítása céljából. Az enzimekkel végzett inkubálás után, azonos térfogat nátriumacetát-fenol  
40 eldatot adtunk a poliszaccharid-enzim keverékhez, és horizontális rázógépre helyeztük 1-5°C-on, 30 percre. A

keveréket 10000 g-vel 15-20 percig centrifugáltuk. A felső vízes réteget kinyertük és tároltuk. A vízes réteghez azonos térfogat nátriumacetát-fenol oldatot adtunk, és a fentiek szerint extraháltuk. A poliszaccharid-oldatból a fehérje és endotoxin eltávolítása céljából összesen 4 extrakciót végeztünk. A kombinált vízes kivonatokat, injektlásra szolgáló vízzel tízszeresére hígítottuk, és tízszeres térfogat, injektlásra szolgáló vízzel szemben dializáltuk.

5 A dializált poliszaccharidhoz kalciumkloridot adtunk. A poliszaccharidot 80%-os végkoncentrációban hozzáadott etanollal lecsaptuk és 1-5°C-on, 12 órán át állni hagytuk. Az alkoholos felkúszót eltávolítottuk, és a poliszaccharidot 10000 g-vel 15-20 percig centrifugálásai összegyűjtöttük. A tisztított poliszaccharidot kétszer etanollal, egyszer pedig acetonnal mostuk. A mosott port vákuum alatt, deszikkátorban szárítottuk. A szárított port a konjugátumná alakításig -30°C-on tároltuk.

## 10 2. példa

A *Neisseria meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportjaiból származó, tisztított, kapszuláris poliszaccharidpor depolimerizációja

A készítmény előállításában az alábbi anyagokat alkalmaztuk: *Neisseria meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportjaiból származó, tisztított, kapszuláris poliszaccharidpor (az 1. példában leírtak szerint elkészítve),

15 steril 50 mM nátriumacetát puffer (pH 6,0), steril 1 N sósav, steril 1 N nátriumhidroxid, 30%-os hidrogénperoxid, és steril fiziológiai sóoldat (0,85% nátriumklorid).

Az egyes szerocsoportokból származó poliszaccharidot külön-külön végzett reakciókban depolimerizáltuk. Rozsdamentes acéلبól készült tartályba 60 g tisztított, kapszuláris poliszaccharidpori töltöttünk. A poliszaccharidhoz steril 50 mM nátriumacetát pufferrel 2,5 g/l koncentrációjú poliszaccharid-oldatot állítottunk

20 elő. A poliszaccharid-oldatot 1-5°C-on, 12-13 órán át keveredni hagytuk. A reakciós tartályt hőcserélő egységhez csatlakoztattuk. További 50 mM nátriumacetát puffer (pH 6,0) hozzáadásával a poliszaccharid-oldatot 1,25 g/l koncentrációra hígítottuk. A poliszaccharid-oldatot 55°C-ra ( $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ) melegítettük fel. A reakciókeverékhez 30%-os hidrogénperoxidot adtunk olyan mennyiségben, hogy a hidrogénperoxid a keverékben 1%-os végkoncentrációban legyen jelen.

A reakció lefutását a poliszaccharid mérete időbeli változásának vizsgálatával követtük nyomon. Minden 15-20 percben mintát vettünk a reakciókeverékből, és HPSEC oszlopra injektáltuk a poliszaccharid molekulaméretének megállapítására. Amikor a poliszaccharid molekulamérete elérte a megcélzott molekulaméretet, a hőcserélő

25 egységet kikapcsoltuk és a poliszaccharid-oldatot, jegesvízes fürdővel gyorsan 5°C-ra hűtöttük le. A depolimerizált poliszaccharid-oldatot 15 g/l koncentrációra töményítettük be oly módon, hogy a reakciótartályt regenerált cellulózból készült, 3000 MWCO szűrőbetéttel ellátott, ultraszűrő-egységgel kötöttük össze. A koncentrált, depolimerizált poliszaccharid-oldatot 10 térfogat steril fiziológiai sóoldattal (0,85% nátriumklorid) szemben dializáltuk. A depolimerizált poliszaccharidot a folyamat következő lépéséig 1-5°C-on tároltuk.

30

A depolimerizált poliszaccharid molekulaméretét „Ultrahydrogel™ 250” gelszűrő kromatográfiás oszlopon végzett kromatográfiával határoztuk meg. Az oszlopot dextránból készült molekulaméret-standardokkal kalibráltuk

35 és az átfolyó oldatot több szögű lézercfény-szórással vizsgáltuk. A poliszaccharid mennyiségét az „A” szerocsoport foszforartalmának Bartlet-féle [Bartlet, J. Biol. Chem. 234, 466-468 (1959)], és a C, W-135 és Y szerocsoportok sztiánsav-tartalmának Svennerholm-féle eljárással [Svennerholm, Biochim. Biophys. Acta 24, 604-611 (1955)] történt meghatározásával állapítottuk meg. Az O-acetilartalmat Hesterin szerinti [Hesterin, J. Biol. Chem. 180, 249 (1949)] eljárással mértük. A redukáló aktivitást Park és Johnson eljárással [Park és Johnson, J. Biol. Chem. 181, 149-151 (1949)] állapítottuk meg. A depolimerizált poliszaccharid szerkezeti integritását fehérje 1H és 13C

40

NMR-rel, a depolimerizált poliszaccharid tisztaságát pedig a LAL (endotoxin) tartalom és a visszamaradt peroxidtartalom mérésével határoztuk meg.

### 3. példa

A *Neisseria meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportjaiból származó, depolimerizált, kapszuláris poliszaccharidpor derivatizációja

A készítmény előállításában az alábbi anyagokat alkalmaztuk: *Neisseria meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportjaiból származó, hidrogénperoxiddal depolimerizált, kapszuláris poliszaccharid (a 2. példában leírtak szerint elkészítve), adipinsav-hidrazid, csak az „A” szerocsoport esetében 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)karbodiimid (EDAC), nátrium-cianoborohidrid, steril 1 N sósav, steril 1 N nátriumhidroxid, steril 1 N nátriumklorid, és steril fiziológiai sóoldat (0,85% nátriumklorid).

Az egyes szerocsoportokból származó poliszaccharidot külön-külön végzett reakciókban derivatizáltuk. Rozsdamentes acéliből készült tartályba 60 g tisztított, depolimerizált poliszaccharidport töltöttünk, és ehhez steril, 0,85%-os fiziológiai sóoldatot adtunk 6 g/l poliszaccharid koncentráció eléréséig. Ehhez az oldathoz koncentrált, steril, 0,85%-os fiziológiai sóoldatban oldott adipinsav-hidrazid adtunk 1 g/l végkoncentráció eléréséig. Csak az „A” szerocsoportnál adipinsav-hidrazid helyett steril, 0,85%-os fiziológiai sóoldatban oldott EDAC-ot adtunk az 1 g/l végkoncentráció eléréséig. A pH-t 5,0±0,1 értékre állítottuk be, és a pH-t steril 1 N sósav és steril 1 N nátriumhidroxid alkalmazásával, szobahőmérsékleten (15-30°C), 2 órán át fenntartottuk. A két óra elteltével, koncentrált, 0,85%-os fiziológiai sóoldatban oldott nátrium-cianoborohidridet adtunk a reakciókeverékhez 2 g/l végkoncentráció eléréséig. A reakciót szobahőmérsékleten (15-30°C), 44±4 órán át kevertettük, és eközben a pH-t 5,5±0,5 értéken tartottuk. A reakció után, a pH-t 6,0±0,1 értékre állítottuk be, és a derivatizált poliszaccharidot 12 g/l koncentrációra töményítettük be oly módon, hogy a reakciótartályt regenerált cellulózból készült, 3000 MWCO szűrőbetéttel ellátott, ultraszűrő-egységgel kötöttük össze. A koncentrált, derivatizált poliszaccharidot 30 térfogat 1 M nátriumkloriddal, majd 10 térfogat 0,15 M nátriumkloriddal szemben dializáltuk. A tartályt leválasztottuk az ultraszűrő-egységről és 1-5°C-on 7 napig tároltuk. A tartályt újra összekötöttük a regenerált cellulózból készült, 3000 MWCO szűrőbetéttel ellátott, ultraszűrő-egységgel, és diafiltráltuk 30 térfogat 1 M nátriumkloriddal, majd 10 térfogat 0,15 M nátriumkloriddal szemben.

A derivatizált poliszaccharid molekulaméretét, a poliszaccharid mennyiségét és O-acetiltartalmát a depolimerizált poliszaccharid előállításánál alkalmazott eljárásokkal mértük. A hidrazidtartalmat a Snyder és Sobocinski féle 2,4,6-trinitrobenzolszulfonsav eljárással [Snyder és Sobocinski, Anal. Biochem. 64, 282-288 (1975)] állapítottuk meg. A depolimerizált poliszaccharid szerkezeti integritását fehérje <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR-rel, a depolimerizált poliszaccharid tisztaságát pedig a nem kötött hidrazid, a LAL (endotoxin) tartalom és a visszamaradt cianoborohidrid-tartalom mérésével határoztuk meg.

### 4. példa

A hordozófehérje előállítása

A nyers diftériatoxid-fehérje előállítása

Liofilizált kiindulási tenyészeteket rekonstituáltunk és 16-18 órán át inkubáltunk. A tenyészetből vett mintát, tápoldatot tartalmazó 0,5 literes flaskába transzferáltunk, és a tenyésztő flaskát 34,5-36,5°C-on, rotációs rázógépből 7-9 órán át inkubáltuk. A tenyésztő flaskából vett mintát, tápoldatot tartalmazó 4 literes flaskába transzferáltunk, és a tenyésztő flaskát 34,5-36,5°C-on, rotációs rázógépből 14-22 órán át inkubáltuk. A 4 literes flaskából származó tenyészetet alkalmaztuk tápoldatot tartalmazó fermentor beoltására. A fermentort 34,5-

36,5°C-on, 70-144 órán át inkubáltuk. A fermentor tartalmát fenékszűrőn át egy gyűjtőtartályba szűrtük. Az  
összegyűjtött anyaghoz 37%-os formaldehidet adtunk 0,2%-os végkoncentráció eléréséig. A pH-t 7,4-7,6 érté-  
kre állítottuk be. Az összegyűjtött anyagot 0,2 mikronos szűrőbetéten, steril 20 literes üvegekbe szűrtük át. Az  
üvegeket 34,5-36,5°C-on 7 napig inkubáltuk. Minden egyes 20 literes üveghez 37%-os formaldehidet adtunk  
0,4%-os végkoncentráció eléréséig. A keverék pH-ját 7,4-7,6 értékre állítottuk be. Az üvegeket 34,5-36,5°C-on  
7 napig rázógépen inkubáltuk. Minden egyes 20 literes üveghez 37%-os formaldehidet adtunk 0,5%-os végkon-  
centráció eléréséig. A keverék pH-ját 7,4-7,6 értékre állítottuk be. Az üvegeket 34,5-36,5°C-on 8 hétig  
inkubáltuk. A nyers toxoidot detoxifikálásra nézve teszteltük. Az üvegeket a tesztelés időtartama alatt 1-5°C-on  
tároltuk.

#### 10 A nyers diftériatoxoid-fehérje tisztítása

A nyers toxoidot szobahőmérsékleten kiolvasztottuk, és a 20 literes üvegek tartalmát egy tisztítótartályba  
öntöttük össze. A toxoid pH-ját 7,2-7,4-re állítottuk be, a nyers toxoidhoz aktívszénen adtunk és 2 percig kever-  
tük. A szén-toxoid keveréket 1 órán át állni hagytuk, majd a tartály alján lévő szűrőtölteten át egy második tar-  
tályba szűrtük át. A szűrlethez szilárd ammóniumsulfátot adtunk 70%-os telítettség eléréséig. A pH-t 6,8-7,2-re  
15 állítottuk be, és az oldatot 16 órán át állni hagytuk. A kicsapódott fehérjét szűrővel gyűjtöttük össze és 70%-os  
telítettségű ammóniumsulfáttal (pH 7,0) mostuk. A csapadékot steril, desztillált vízben feloldottuk, és a fehér-  
jeoldatot rozsdamentes acélból készült gyűjtőtartályba szűrtük. A pH-t 6,8-7,2-re állítottuk be, és az oldathoz  
ammóniumsulfátot adtunk 40%-os telítettség eléréséig. A pH-t 7,0-7,2-re állítottuk be, és az oldatot 16 órán át  
állni hagytuk. A kicsapódott anyagot szűrővel eltávolítottuk és kidobtuk. A szűrlethez ammóniumsulfátot  
20 adtunk 60%-os telítettség eléréséig, és a pH-t 7,0-7,2-re állítottuk be. A keveréket 16 órán át állni hagytuk, és a  
kicsapódott fehérjét szűrővel összegyűjtöttük. A csapadékot steril, desztillált vízben feloldottuk, a nem oldódó  
fehérjéket szűrővel eltávolítottuk, és 0,85%-os fiziológiai sóoldattal szemben dializáltuk.

#### A tisztított diftériatoxoid-fehérje töményítése és steriire szűrése

A fehérjeoldatot 15 g/l koncentrációra betöményítettük és 10 térfogat 0,85%-os fiziológiai sóoldattal  
szemben, regenerált cellulózból készült, 10000 MWCO szűrőbetét alkalmazásával dializáltuk. A betöményített  
fehérjeoldatot 0,2 mikron membrán át végzett szűréssel sterilizáltuk. A fehérjeoldatot a konjugátummá alakítá-  
sig 1-5°C-on tároltuk.

A fehérjekoncentrációt a Lowry és munkatársai által kidolgozott eljárással [Lowry és mtsai., J. Biol.  
Chem. 193, 265-275 (1951)] határoztuk meg. A fehérje tisztaságát sterilitással, LAL (endotoxin) tartalom, és  
30 visszamaradt formaldehid mennyiségének mérésével állapítottuk meg.

#### 5. példa

#### A *Neisseria meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportjaiból származó poliszaccharid és diftériatoxoid- fehérje közötti, monovalens konjugátumok előállítása

A készítmény előállításában az alábbi anyagokat alkalmaztuk: *Neisseria meningitidis* A, C, W-135 és Y  
35 szerocsoportjaiból származó, adipinsavval derivatizált poliszaccharid (a 3. példában leírtak szerint elkészítve),  
steril diftériatoxoid-fehérje (a 4. példában leírtak szerint elkészítve), EDAC, ammónium szulfát, steril 1 N só-  
sav, steril 1 N nátriumhidroxid, steril 1 N nátriumklorid, és steril fiziológiai sóoldat (0,85%-os).

Az egyes szerocsoportokból származó poliszaccharidokat tartalmazó konjugátumokat külön-külön vég-  
zett reakciókban állítottuk elő. Rozsdamentes acélból készült tartályba töltöttük a tisztított, adipinsavval  
40 derivatizált poliszaccharidot és ehhez literenként 700-1000  $\mu$ mol hidrazint és 3,8-4,0 g diftériatoxoid-fehérjét

adtunk. A kiindulási anyagokat 0,85%-os fiziológiai sóoldattal hígítottuk a kijelölt koncentrációra és a pH 5,0±0,1-re állítottuk be. A poliszaccharid-fehérje keverékhez literenként 2,28-2,4 g EDAC-ot adtunk. A reakció pH-ját 15-30°C-on, pH 5,0±0,1 értéken tartottuk 2 órán át. A 2 óra elteltevel a pH-t steril 1 N nátriumhidroxiddal 7,0±0,1-re állítottuk be, és a reakcióelegyet 1-5°C-on 16-20 órán át tároltuk.

5 A reakciókeveréket 15-30°C-ra hagytuk felmelegedni és a tartályt regenerált cellulózból készült, 30000 MWCO szűrőbetéttel ellátott, ultraszűrő-egységgel kötöttük össze. Az elegyhez szilárd ammóniumszulfátot adtunk 60%-os telítettség (A, W-135 és Y szerocsoportok) és 50%-os telítettség (C szerocsoport) eléréséig. A konjugátumot tartalmazó reakciókeveréket 20 térfogat 60%-osan telített ammóniumszulfát oldattal (A, W-135 és Y szerocsoportok) és 50%-osan telített ammóniumszulfát oldattal (C szerocsoport), majd 20 térfogat 0,85%-  
10 os fiziológiai sóoldattal szemben diafiltráltuk. A diafiltrált konjugátumot először 1,2 mikron és 0,45 mikron porúsmeretű szűrőt tartalmazó szűrőegységen, majd 0,22 mikron szűrőn át szűrtük.

A poliszaccharid mennyiségét és O-acetiltartalmát a depolimerizált és derivatizált poliszaccharidnál leírtak szerint mértük. A fehérje mennyiségét a Lowry eljárással határoztuk meg. A konjugátum molekulaméretét „TSK6000PW” oszlopon végzett gélszűrési kromatográfiával állapítottuk meg. A kromatográfiában a holtter-  
15 fogat megállapítására DNS-t, a teljes térfogathoz ATP-t, referenciamarkerként borjúeredetű tiroglobulint alkalmaztunk. Ezenfelül, a TSK6000PW oszlopról eluált konjugátumot több szögű lézerefény-szórással mértük. A konjugátum antigén-jellemzőjét poliszaccharid-szerotípusra specifikus antitestekhez való kötődéssel, dupla szendvics ELISA-val mértük. A konjugátum tisztaságát a nem kötött (nem konjugált) poliszaccharid, hidrofób kölcsönhatási oszlopról történt elúciójával, a nem kötött fehérje kapilláris elektroforézisével, sterilitás, LAL  
20 (endotoxin) tartalom, maradvány EDAC-tartalom, és visszamaradt ammóniumion mennyiségének mérésével állapítottuk meg.

#### 6. példa

Multivalens A, C, W-135 és Y meningokokkusz szerocsoportokból származó poliszaccharid, diftériatoxoiddal képzett konjugátumát tartalmazó vakcina előállítása

25 A készítmény előállításában az alábbi anyagokat alkalmaztuk: A, C, W-135 és Y szerocsoportokból származó, poliszaccharid, diftériatoxoiddal képzett konjugátuma (az 5 példában leírtak szerint elkészítve), és steril, 100 mM nátriumfoszfáttal pufferelt, fiziológiai sóoldat (0,85% nátriumklorid).

Rozsdamentes acélból készült tartályban, fiziológiai sóoldathoz (0,85%) annyi 100-500 mM nátriumfoszfáttal pufferelt, fiziológiai sóoldatot adtunk, hogy a vakcinában a nátriumfoszfát végkoncentrációja 10 mM  
30 legyen. Két vagy négy, steril, monovalens, meningokokkusz-eredetű poliszaccharid-diftériatoxoid konjugátumot transzferáltunk a steril, 10 mM-os nátriumfoszfáttal pufferelt, fiziológiai sóoldatot tartalmazó tartályba olyan mennyiségben, hogy az egyes szerocsoportokból származó poliszaccharidok koncentrációja külön-külön 8 µg/ml legyen. A formulázott, tetra-  
35 valens konjugátumot összekevertük és 0,2 µm szűrőn át egy második tartályba szűrtük.

A multivalens készítményben lévő egyes szerocsoportokból származó poliszaccharidok mennyiségét komponens szaccharid analízissel, magas pH-n végzett anioncserélő kromatográfiával és pulzáló amperometriás detek-  
tálással határoztuk meg. A fehérje mennyiségét a Lowry eljárással határoztuk meg. A vakcina pH-ját pH-mérőhöz kapcsolt kombinációs elektróddal mértük. A konjugátum antigén-jellemzőjét poliszaccharid-szerotípusra specifi-  
40 kus antitestekhez való kötődéssel, dupla szendvics ELISA-val mértük. A multivalens konjugátumvakcina immunogenitását úgy mértük meg, hogy meghatároztuk, hogy vajon a vakcinában lévő egyes konjugátumok képe-

sek-e a poliszaccharid ellen primer és rásegítő IgG immunválaszt kiváltani állatmodellben. A multivalens konjugátumvakcina tisztaságát a nem kötött (nem konjugált) poliszaccharid, magas pH-n végzett anioncserélő kromatográfiával és pulzáló amperometriás detektálással végzett analízisével, a sterilitás, LAL (endotoxin) tartalom, pirogéntartalom és általános biztonság meghatározásával állapítottuk meg.

5 7. példa

Multivalens, meningokokkusz-eredetű poliszaccharid diftériatoxoiddal képzett konjugátumát tartalmazó, alumíniumhidroxiddal adjuvált vakcina előállítása

Alumíniumhidroxidhoz adszorbeált konjugátum előállítása

10 A készítmény előállításában az alábbi anyagokat alkalmaztuk: A, C, W-135 és Y szerocsoportokból származó, poliszaccharid, diftériatoxoiddal képzett konjugátuma (az 5 példában leírtak szerint elkészítve), és steril, fiziológiai sóoldat (0,85% nátriumklorid), és steril fiziológiai sóoldatban (0,85% nátriumklorid) oldott alumíniumhidroxid.

15 Az egyes steril, monovalens, meningokokkusz-eredetű poliszaccharid-diftériatoxid konjugátumokból fiziológiai sóoldatot tartalmazó tartályba olyan mennyiségeket adunk, hogy az egyes szerocsoportokból származó poliszaccharidok koncentrációja külön-külön 8 µg/ml legyen. A multivalens konjugátumvakcinához fiziológiai sóoldatban (0,85% nátriumklorid) oldott alumíniumhidroxidot adunk 0,44 mg alumíniumion/ml vakcina koncentráció eléréséig.

8. példa

Alumíniumfoszfáttal adjuvált konjugátum előállítása

20 A készítmény előállításában az alábbi anyagokat alkalmaztuk: A, C, W-135 és Y szerocsoportokból származó, poliszaccharid, diftériatoxoiddal képzett konjugátuma (az 5 példában leírtak szerint elkészítve), és steril, fiziológiai sóoldat (0,85% nátriumklorid), és steril fiziológiai sóoldatban (0,85% nátriumklorid) oldott alumíniumfoszfát.

25 Az egyes steril, monovalens, meningokokkusz-eredetű poliszaccharid-diftériatoxid konjugátumokból fiziológiai sóoldatot tartalmazó tartályba olyan mennyiségeket adunk, hogy az egyes szerocsoportokból származó poliszaccharidok koncentrációja külön-külön 8 µg/ml legyen. A multivalens konjugátumvakcinához fiziológiai sóoldatban (0,85% nátriumklorid) oldott alumíniumfoszfátot adunk 0,44 mg alumíniumion/ml vakcina koncentráció eléréséig.

9. példa

30 A tetraavalens konjugátumvakcina immunogenitása

A klinikai értékelés előtt megvizsgáltuk, hogy a tetraavalens vakcina képes-e immunválaszt kiváltani laboratóriumi kisállatokon. Egereket, patkányokat és nyulakat alkalmaztunk a konjugátumvakcina poliszaccharid-vaksinákhoz viszonyított immunogenitásának tanulmányozására. Ezen állatmodellek alkalmasak erre a vizsgálatra, mert ezekkel képesek vagyunk megkülönböztetni a konjugátumvakcinát a megfelelő poliszaccharid-  
35 vakcinától a vakcinákra adott immunválasz mintázata alapján. A konjugátumvakcina T-sejttől függő immunválaszt, ezzel szemben a poliszaccharid-vakcina T-sejttől független immunválaszt vált ki e modellekben.

40 Az egérrel folytatott immunogenitási kísérletekben, a konjugátumot fiziológiai sóoldattal (0,85% nátriumklorid) felhígítottuk az emberi dózis 1/16-ára. Az egereknek egy vagy két dózis – konjugátum vagy poliszaccharid - vakcinát adunk be, és a vakcinálás után két héttel vérmintát gyűjtöttünk. Az egyik egércsoportot nem immunizált kontrolcsoportnak jelöltük ki. Az egyes szerocsoportokból származó poliszaccharidok elleni

antitestet ELISA-eljárással vizsgáltuk. A széruminutákat olyan ELISA mikrotiter-lemezeken inkubáltuk, amelyek lyukaiat az egyes kapszuláris poliszaccharidokkal előzőleg bevontuk. A bevonásra, metilált emberi szérumalbumint alkalmaztunk. Inkubálás után a mikrotiter-lemezt pufferrel mostuk, és az antitest-poliszaccharid komplexhez a meningokokkusz-eredetű poliszaccharid elleni antitestet megkötni képes szekunder antitest-enzim konjugátumot adtunk. A mikrotiter-lemezt mostuk, és kémiai szubsztrátumot adtunk a meningokokkusz-eredetű poliszaccharid elleni antitest és szekunder antitest-enzim konjugátum komplexéhez. Az enzim a kémiai szubsztrátum egy részét hidrolizálta, minek eredményeként szín képződik. A képződött szín arányos a mikrotiter-lemez falához kötődött, meningokokkusz-eredetű poliszaccharid elleni antitest és szekunder antitest-enzim konjugátum komplex mennyiségével. A vakcina potenciáját az ugyanazon mikrotiter-lemezen mért, egyes szerocsoportokra vonatkozó referencia antiszérumokból, négy paraméteres illeszkedés alkalmazásával számított lineáris görbével történt összehasonlítással állapítottuk meg. Az egéredetű referencia-antiszérumot ugyanaból az egértörzsből generáltuk, amely törzset az egyes szerocsoportból készített konjugátumvakcina három dóziséval immunizáltuk. Az egéredetű referencia-antiszérummal meghatározott titerek 1,0 optikai denzitást eredményező, inverz hfgtáson alapultak.

Az 1. táblázatban összefoglaltuk az egyes szerocsoportok esetében a poliszaccharidok elleni IgG titereket. A Swiss-Webster egereket két dózisban vagy a tetraavalens konjugátumvakcinával – folyadék és alumínium formulációban – vagy pedig a megfelelő tetraavalens poliszaccharid-vakcinával immunizáltuk. Az IgG titerek 10 egerből vett, majd összeöntött szérumból származnak. Kétszer 10 egeret alkalmaztunk az egyes vakcinaformulációk elleni immunválasz mérésére. Mindkét egércsoportot az 1. napon vakcináltuk. A 15. napon (2 héttel a vakcinálás után) 10 egerből vérmintát vettünk, és a második 10 egeret a 15. napon második vakcinadózissal vakcináltuk. Két héttel később - a 29. napon – vérmintát gyűjtöttünk a második 10 egerből, és a nem immunizált kontrolcsoportból. Az összes antitestet egyidőben titráltuk, a 15. és 29. napon vett vérmintákat a nem immunizált kontrollokkal és az egéredetű referencia-antiszérummal egyidejűleg vizsgáltuk.

**I. táblázat**

Tetraavalens konjugátummal vagy poliszacchariddal vakcinált Swiss-Webster egerek, összeöntött szérumainak, poliszaccharid elleni IgG titerei

Vakcina-csoport	Dózis µg ps	Ember elleni A		Ember elleni C		Ember elleni W135		Ember elleni Y	
		D15	D29	D15	D29	D15	D29	D15	D29
konjugátum (adjuváns nélkül)	0,25	131	2640	250	1510	1350	6100	5660	4830
konjugátum (adjuváns nélkül)	0,50	171	6220	416	2050	849	26000	5980	112000
konjugátum (adjuváns nélkül)	1,0	249	4500	525	2740	1450	16600	11300	59100
konjugátum (alum. hidr.)	0,25	2920	4500	1010	2980	2300	33700	11600	124000
konjugátum (alum. hidr.)	0,50	5800	9550	2280	1010	4810	71900	26400	330000

konjugátum (alum. hídr.)	1,0	6210	9350	2630	12800	7870	94000	32700	302000
Poliszaccharid (adjuváns nélkül)	1,0	136	173	184	205	612	608	4470	3910
nem immunizált	nincs adat	-	110	-	145	-	623	-	777

A tetraavalens konjugátumvakcina, adjuvánsal és adjuváns nélkül is, képes poliszaccharid elleni, erős IgG immunválaszt kiváltani ebben az egérmodellben. Az alumíniumhidroxid adjuváns az a négy szerocsoportból származó poliszaccharid konjugátumok elleni elsődleges és rásegítő válasz fokozására szolgál. Ebben az egérmodellben, a tetraavalens poliszaccharid-vakcina, az immunizálatlan kontrollal összehasonlítva jelentéktelen immunválaszt vált ki az A, C és W135 szerocsoportok ellen, míg az Y szerocsoport elfogadható immunválaszt, de rásegítő választ nem, vált ki. Ebben a modellben, a tetraavalens poliszaccharid-vakcina nem tudott rásegítő választ kiváltani mind a négy szerocsoportból származó poliszaccharidok ellen. E modellel könnyen lehet különbséget tenni a poliszaccharid-vakcina és a konjugátumvakcina között, mivel az egyes szerocsoportokból származó konjugátumvakcinák nagyságrenddel nagyobb immunválaszt és rásegítő választ indukáltak.

A tetraavalens konjugátumvakcina nem adjuvált formáját fiatal felnőtteken és fiatal egészséges gyerekeken végzett klinikai vizsgálatban tanulmányoztuk a biztonságos alkalmazás és immunogenitás szempontjából. A felnőttekkel végzett vizsgálatban, alanyokat vakcináltunk egyetlen vakcinadózissal, amelyet úgy készítettünk, hogy tartalmazzon 4-4 µg-t a négy konjugátum vagy poliszaccharid mindegyikéből. A vakcinálást közvetlenül megelőzően és a vakcinálás után 28 nappal vérmintákat vettünk. Az egyes szerocsoportokat tartalmazó konjugátumok elleni antitesteket, a poliszaccharidok elleni IgG mennyiségi meghatározására szolgáló ELISA-val mértük. Az ELIA eljárás igen hasonló az egéredetű szérumban lévő IgG antitest mérésére alkalmazott eljáráshoz.

Röviden, a szérummintákat meningokokkusz-eredetű poliszacchariddal bevont (a poliszaccharidokat metilált emberi szérumalbuminnal kötöttük fel) ELISA mikrotiter-lemezen inkubáltuk. A kötött antitest mennyiségét peroxidázzal jelzett, egéredetű, emberi IgG-re specifikus, monoklonális antitesttel végzett reakcióval határoztuk meg. A reakció során alkalmazott peroxidáz-szubsztrátumból spektrofotometriával mérhető kromogén termék képződik. A képződött kromoför optikai denzitása összefüggésben van a szérumban lévő - a mikrotiter-lemezen lévő, meningokokkusz-eredetű poliszaccharidhoz kötött - IgG antitest mennyiségével. Az antitest mennyiségét 4-paraméteres logisztikus görbe eljárás alkalmazásával meghatározott értékű, emberi referenciaszérummal (CDC 1922) történt összehasonlítással állapítottuk meg. Ezenfelül, megvizsgáltuk azt is, hogy az antitestek képesek-e szerocsoportra specifikus baktériumokat lizálni. A szérummintákat először hővel inaktiváltuk a komplement inaktiválása céljából. A szérummintákból kétszeres hígítással, 96-lyukú mikrotiter-lemezen hígítási sorozatokat készítettünk. Szerocsoportra specifikus baktériumokat és újszülött nyúlból származó komplementet adunk a hígított szérumokhoz és az elegyeket inkubáltuk. Az inkubálás után, a szérum/komplement/baktérium keverékre agart tartalmazó tápoldatot rétegeztünk, az agart hagytuk megdermedni, és 12 órán át 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> atmoszférában inkubáltuk. A következő napon, a lyukakban lévő baktériumtelepeket megszámoztuk. A végpont-títert, a kontrol lyukak átlagához képest, 50%-osnál nagyobb pusztulást eredményező, reciprociális szérumhígításként határoztuk meg.

A 2. táblázatban bemutatjuk a dózisonként 4 µg poliszaccharidot tartalmazó, tetraavalens konjugátum-



vaksinával vakcinált felnőttekből származó szérumban, az egyes szerocsoportokból származó poliszaccharidok elleni átlagos IgG koncentrációit és az átlagos, szérumeredetű baktericid antitest (SBA) titer a vakcinálás előtt és után. Az engedélyezett poliszaccharid-vakcinákkal kiváltott immunválasszal összehasonlítva, a négy szerocsoport-konjugátum mindegyike elleni immunválasz, mind az IgG antitest-válasz és mind pedig a funkcionális baktericid antitestválasz tekintetében, kielégítő volt. A vakcinát e korcsoportban biztonságosnak találtuk és biztonsági profiljukat hasonlónak találtuk az engedélyezett poliszaccharid-vakcinához.

**2. táblázat**

Poliszaccharidok elleni IgG GMC (átlagos koncentráció a csoportban) és szérum baktericid antitest GMT-k (átlagos titer a csoportban) dózisonként 4 µg poliszaccharidot tartalmazó, tetraavalens, meningokokkusz-eredetű konjugátumvakcinával vakcinált fiatal, egészséges felnőttek esetében.

Immunválasz szerocsoport alapján	N <sub>poz</sub> /N <sub>pos</sub>	IgG GMC (µg/ml) [95% CI]		SBA GMT [95% CI]	
		Előtte	Utána	Előtte	Utána
A	28/28	3,3 [2,3-4,8]	38,4 [22,2-66,4]	487 [231-1027]	6720 [4666-15428]
C	28/28	0,4 [0,2-0,7]	5,5 [3,0-10,1]	16,4 [7,1-37,7]	1560 [800-4042]
W-135	28/28	0,6 [0,3-1,0]	5,8 [2,9-11,7]	10,0 [5,9-16,9]	609 [250-1481]
Y	28/28	1,3 [0,7-2,5]	6,8 [3,2-14,6]	19,0 [8,0-41,2]	390 [143-1061]

Fiatalabb korú csoportokban, 2 évesnél fiatalabb gyermekeknél, a poliszaccharid-vakcina elleni immunválasz gyenge és egy év után lecsökken. Tizenkét-tizenöt hónapos gyermekeket, dózisonként az egyes szerocsoportokból származó 4-4 µg poliszaccharidot tartalmazó, tetraavalens konjugátumvakcina egyetlen dózisével, majd az első dózis után két hónappal a tetraavalens konjugátumvakcina második dózisével oltottunk. Az első és második vakcinálás előtt, és a második vakcinálás után egy hónappal vérmintát vettünk. A négy szerocsoport-konjugátum elleni antitest-válaszokat a 3. táblázatban foglaltuk össze. Mindegyik szerocsoport esetében, a tetraavalens konjugátum második dózisa után ráségitő IgG antitest-választ és funkcionális baktericid antitestválaszt figyeztünk meg. A konjugátumvakcina által indukált IgG antitestek szintje összevethető az e korcsoportban az engedélyezett poliszacchariddal kiváltott szinttel; 6 hét után 3,64 µg/ml (2,96-4,49) IgG antitest-válasz a C szerocsoport poliszaccharidja ellen. Azonban, a konjugátumvakcina által indukált baktericid antitest-válasz sokkal magasabb volt, mint amit normális esetben az engedélyezett poliszaccharid-vakcina kiváltott e korcsoportban; 6 hét után az SBA titer 7,2 (5,0-10,4). Az ifjabb populációkban, az IgG antitestek és baktericid antitestek közötti fennálló disszonancia oka feltehetően az, hogy a poliszaccharid a fiatalabb populációkban inkább az alacsony aviditású antitestek keletkezését váltja ki, míg ezzel szemben a konjugátum feltehetően inkább a magas aviditású antitesteket tartják felelősnek a baktericid aktivitásért.

**3. táblázat**

Poliszaccharidok elleni IgG GMC (átlagos koncentráció a csoportban) és szérum baktericid antitest GMT-k (átlagos titer a csoportban) dózisonként 4 µg poliszaccharidot tartalmazó, tetraavalens, meningokokkusz-eredetű konjugátumvakcinával, két dózisban vakcinált egészséges, fiatal (1-2 éves korú) gyermekek esetében

Immunválasz szerocsoport alapján	N <sub>1</sub> / N <sub>2</sub> / N <sub>3</sub>	IgG GMC (µg/ml) [95% CI]				SBA GMT [95% CI]		
			1. dózis előtt	2. dózis előtt	3. dózis után	1. dózis előtt	2. dózis előtt	3. dózis után
A	8/8/8	0,2 [0,1-0,4]	2,1 [0,9-4,8]	4,4 [2,1-9,1]	8,7 [1,4-55,1]	1328 [179-9871]	3158 [1857-5371]	
C	8/8/8	0,2 [0,0-0,7]	1,0 [0,3-3,1]	1,5 [0,6-3,***6]	6,7 [2,0-23,0]	117 [37,7-365]	304 [128-721]	
W-135	8/8/8	0,1 [0,1-0,2]	0,6 [0,2-1,9]	1,5 [0,8-3,1]	6,2 [2,2-17,2]	22,6 [2,8-185]	430 [172-1076]	
Y	8/8/8	0,3 [0,2-0,4]	1,2 [0,5-2,8]	4,5 [2,7-7,6]	5,7 [3,7-8,8]	98,7 [20,4-478]	304 [101-920]	

Amellett, hogy az engedélyezett poliszaccharid-vakcinához képest a tetraavalens konjugátumvakcina képes magas funkcionális antitest-választ kiváltani fiatalokból álló populációkban, a tetraavalens konjugátumvakcina anamnesztikus választ képes kiváltani, demonstrálva ezzel azt, hogy a találmány szerinti tetraavalens konjugátumvakcinával kiváltott védelem hosszú ideig fennáll. A tetraavalens konjugátumvakcina kifejlesztésében, először bivalens AC konjugátumot tartalmazó készítményt vizsgáltunk. A vakcina az engedélyezett, monovalens C konjugátumhoz képest szélesebb védelmet biztosít, de nem véd a W-135 és Y szerocsoportok által okozott betegség ellen.

Klinikai kísérleteket végeztünk újszülött alanyokkal, hogy összehasonlítsuk a bivalens AC poliszaccharid-vakcinára adott immunválaszt a bivalens konjugátumvakcinára adottal. E vizsgálatok során, egy csecsemőből egy harmadik, kontroll csoportot állítottunk össze és őket *Haemophilus influenzae* b típusú konjugátummal kezeltük. Mindhárom vakcinázott csoport ugyanazt a gyermekgyógyászati vakcinákat kapta. A bivalens AC konjugátumcsoportnak konjugátumvakcinát adtunk be 3 dózisban (4 µg poliszaccharid/dózis), 6, 10 és 14 hetes korban. A bivalens AC poliszaccharid-csoport bivalens AC poliszaccharid-vakcinát kapott 2 dózisban (50 µg poliszaccharid/dózis), 10 és 14 hetes korban. A *Haemophilus influenzae* b típusú konjugátummal kezelt csoportnak konjugátumvakcinát adtunk be 3 dózisban, 6, 10 és 14 hetes korban. Vérmintákat gyűjtöttünk a 6. héten, vakcinálás előtt, 18 és 4 héttel a vakcinálás után. Amikor a gyermekek elérték a 11-12 hónapos kort, vérmintákat gyűjtöttünk, és a bivalens AC konjugátumot vagy a bivalens AC poliszaccharid-vakcinát kapott gyermekeket AC poliszaccharidot tartalmazó rásegítő dózist adtunk be. A rásegítő poliszaccharid-dózis beadásával értékeltük, hogy az alany képes volt-e vagy sem anamnesztikus választ kiváltani.

A kísérlet, a primer és poliszacchariddal végzett rásegítő immunválasz, eredményeit az IgG antitestekre vonatkozóan a 4. táblázat az SBA antitestre vonatkozókat pedig az 5. táblázat tartalmazza. A primer sorozatra adott IgG antitest-válasz nagyjából azonos volt a poliszaccharid- és a konjugátumvakcina tekintetében. Azonban, a konjugált készítménnyel vakcinált alanyokban a baktericid antitest-válasz sokkal magasabb volt, mint a poliszacchariddal vakcinált alanyoknál. Az egyéves alanyok esetében megfigyeltük, hogy újszülöttek poliszacchariddal történt vakcinálása igen kevés funkcionális baktericid antitest-termelést eredményezett. Újszülöttekben a poliszaccharid-vakcina ellen termelt antitestek alighanem alacsony aviditású antitestek, míg a konjugátumvakcina inkább magas aviditású antitestek megjelenését eredményezte, ez magyarázza a sokkal magasabb baktericid antitest-titert. Az első vakcinálási sorozatban konjugátumvakcinával kezelt személyekben rásegítő dózisként adott poliszaccharid-vakcina által kiváltott magas, funkcionális antitest-szint jelzi, hogy ezen alanyokban beindult az emlékező vagy T-sejttől függő antitest-válasz. Az első vakcinálási sorozatban poliszaccharid-vakcinával kezelt személyekben rásegítő dózisként adott poliszaccharid-vakcina mérsékelt vá-

laszt váltott ki, amely T-sejtől független választ jelez.

**4. táblázat**

Poliszaccharidok elleni IgG GMC (átlagos koncentráció a csoportban) újszülöttekben az A és C szerocsoportok ellen a primer immunizálási sorozat (6, 10 és 14 hetes kor), és a 11-12 hónapos korban, bivalens AC poliszacchariddal végzett rásegítő vakcinálás előtt és után

5

Immunválasz szerocsoport alapján	Primer vakcinálási GMC [95% CI]			PS rásegítő vakcinálási GMC [95% CI]		
		N	előtte		utána	N
„A” szerocsoport						
AC konjugátum	34	3,4 [2,2-5,4]	5,8 [4,3-8,0]	31	0,2 [0,1-0,3]	7,0 [4,0-12,0]
AC poliszaccharid	35	3,0 [1,7-5,3]	5,5 [4,1-7,3]	30	0,9 [0,5-1,4]	3,1 [2,0-4,7]
HIB konjugátum	36	3,2 [2,2-4,5]	0,6 [0,4-0,8]	nincs adat	nincs adat	nincs adat
„C” szerocsoport						
„A” szerocsoport	31	1,6 [0,9-2,8]	2,8 [2,0-3,9]	31	0,1 [0,1-0,2]	8,1 [4,5-14,5]
AC konjugátum	35	2,3 [1,4-3,9]	5,3 [3,8-7,4]	30	0,6 [0,3-1,0]	2,8 [1,7-4,7]
AC poliszaccharid	36	2,0 [1,2-3,5]	0,5 [0,3-0,7]	nincs adat	nincs adat	nincs adat

**5. táblázat**

SBA antitest GMT (átlagos titer a csoportban) újszülöttekben az A és C szerocsoportok elleni primer immunizálási sorozat (6, 10 és 14 hetes kor), és a 11-12 hónapos korban, bivalens AC poliszacchariddal végzett rásegítő vakcinálás előtt és után.

10

Immunválasz szerocsoport alapján	Primer vakcinálási GMT [95% CI]			PS rásegítő vakcinálási GMT [95% CI]		
		N	előtte		utána	N
„A” szerocsoport						
AC konjugátum	34	11,8 [7,2-19,3]	177 [101-312]	24	10,1 [5,6-18,0]	373 [162-853]
AC poliszaccharid	32	14,7 [8,5-25,4]	7,0 [4,7-10,5]	26	6,1 [3,9-9,5]	24,1 [11-53]
HIB konjugátum	35	11,2 [6,8-18,3]	6,7 [4,3-10,5]	nincs adat	nincs adat	nincs adat
„C” szerocsoport						
„A” szerocsoport	34	50,8 [24-107]	189 [128-278]	27	4,6 [3,6-5,6]	287 [96,2-858]
AC konjugátum	32	62,7 [29-131]	25,4 [14,4-44,6]	26	4,1 [3,9-4,3]	14,4 [7,9-26,1]
AC poliszaccharid	36	45,3 [21,9-133]	7,3 [4,7-11,3]	nincs adat	nincs adat	nincs adat

A találmány által, fiatalokból álló populációkban a meningokokkusz betegség ellen fokozott és az A, C, W-135 és Y szerocsoportok ellen széles körű védelmet biztosító előnyök mellett, a tetraavalens konjugátum a hordozófehérje elleni antitest-válasz indukálásával védelmet biztosíthat más patogénekkal szemben is. Ha a

tetravalens konjugátumvakcinát (diftériatoxid-konjugátum formájában) újszülötteknek adjuk be, ezen alanyok egyben megkapják a szokásos, diftériatoxidot tartalmazó gyermekgyógyászati immunizációkat is. Ezért, ezen alanyokban nincs egyértelmű fokozódás a diftériatoxid elleni antitestválaszban. Azonban, ha a diftériatoxid-konjugátumot olyan alanyoknak adtuk be, akik kísérőként nem kaptak diftériatoxidot tartalmazó vakcinákat, diftériatoxid elleni erős rásegítő választ tapasztaltunk. Ezen alanyok három dózisban, 2, 3 és 4 hónapos korban kaptak DTP-t. Ebben a kísérletben, az alanyok vagy bivalens AC konjugátumot, vagy pedig bivalens AC poliszaccharid-vakcinát kaptak egyetlen dózisban a 2. és 3. éves kor között. A vakcináláskor és a vakcinálás után 30 nappal vérmintát vettünk. A bivalens konjugátumban hordozófehérjeként diftériatoxidot alkalmaztunk.

A két vakcina csoportban tapasztalt, diftériatoxid elleni immunválaszt a 6. táblázatban mutatjuk be. A vártaknak megfelelően, a poliszaccharid nem serkenti a diftéria elleni immunválaszt, azonban diftéria elleni erős immunválaszt figyeltünk meg az AC konjugátummal kezelt alanyokban. Így, a meningokokkusz elleni konjugátumvakcina további előnye lehet az, hogy immunválaszt serkent a hordozófehérje ellen is, ezáltal - ha diftériatoxidot alkalmazunk hordozófehérjeként - védelmet biztosít a *Corynebacteria diphtheriae* által okozott betegség ellen.

#### 6. táblázat

Diftéria elleni antitest ELISA GMT (átlagos titer a csoportban, NE/ml egységben megadva), dózisonként 4 µg poliszaccharidot tartalmazó, bivalens AC diftériatoxid-konjugátumvakcinával vagy 50 µg poliszaccharidot tartalmazó, bivalens AC poliszaccharid-vakcinával vakcinázott fiatal, egészséges gyermekek-

ben

Vakcinacsoport által adott immunválasz	$N_{pre}/N_{post}$	Diftéria elleni antitest (ELISA – NE/ml) [95% CI]	
		előtte	utána
AC konjugátum	104/103	0,047 [0,036-0,060]	21,2 [11,6-38,6]
AC poliszaccharid	103/102	0,059 [0,045-0,076]	0,059 [0,045-0,077]

### Szabadalmi igénypontok

1. Négy különálló fehérje-poliszaccharid konjugátum immunológiailag hatékony mennyiségét tartalmazó, multivalens meningococcus-vakcina, ember *N. meningitidis* általi fertőzés elleni védelemben történő alkalmazásra, amelyben a konjugátumok mindegyike különböző, hordozófehérjéhez konjugált kapszuláris poliszaccharidot tartalmaz, és ahol a kapszuláris poliszaccharidok *N. meningitidis* A, C, W-135 és Y szerocsoportjaiból előállítottak, és továbbá ahol a hordozófehérje vagy diftéria-toxoid vagy CRM197.
2. Az 1. igénypont szerinti igényelt vakcina az ott meghatározott alkalmazásra, amelyben a kapszuláris poliszaccharidok mindegyike külön-külön ugyanahhoz a hordozófehérje-féleséghez konjugált.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti igényelt vakcina az ott meghatározott alkalmazásra, amely adjuvánst is tartalmaz.
4. A 3. igénypont szerinti vakcina az ott meghatározott alkalmazásra, amelyben az adjuváns alumínium-hidroxid.
5. A 3. igénypont szerinti vakcina az ott meghatározott alkalmazásra, amelyben az adjuváns alumínium-foszfát.
6. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti vakcina az ott meghatározott alkalmazásra, amely nem tartalmaz adjuvánst.
7. Eljárás ember *N. meningitidis* általi fertőzésével szembeni védelemben történő alkalmazásra szolgáló vakcina előállítására, azzal jellemezve, hogy
- (i) hordozófehérje és *N. meningitidis* A szerocsoportjából származó kapszuláris poliszaccharid konjugátumát;
  - (ii) hordozófehérje és *N. meningitidis* C szerocsoportjából származó kapszuláris poliszaccharid konjugátumát;
  - (iii) hordozófehérje és *N. meningitidis* W-135 szerocsoportjából származó kapszuláris poliszaccharid konjugátumát; és
  - (iv) hordozófehérje és *N. meningitidis* Y szerocsoportjából származó kapszuláris poliszaccharid konjugátumát alkalmazzuk;
- ahol az eljárás tartalmazza a konjugátumok külön-külön történő előállítását, és a konjugátumok kombinálását alkalmas hordozóval, hígítószerrel vagy excipiensek keverékben, ahol a hordozófehérje vagy diftéria-toxoid vagy CRM197.
8. A 7. igénypont szerinti eljárás, ahol mindegyik kapszuláris poliszaccharid külön-külön ugyanahhoz a hordozófehérje-féleséghez konjugált.
9. A 7. vagy 8. igénypont szerinti eljárás, amely tartalmazza továbbá adjuváns hozzáadását a vakcinához.
10. A 9. igénypont szerinti eljárás, amelyben az adjuváns alumínium-hidroxid.
11. A 9. igénypont szerinti eljárás, amelyben az adjuváns alumínium-foszfát.
12. A 7. vagy 8. igénypont szerinti eljárás, amelyben a vakcina nem tartalmaz adjuvánst.