

OZET**KAPSULER POLİSAKARİTLERİN
ÇÖZÜNÜRLEŞTİRİLMESİ VE KOMBİNASYON AŞILARI**

5

Bir bakteriyel kapsüler polisakkariti saflaştırmak ve bir taşıyıcı proteine konjuge etmek için bir proses olup, aşağıdaki adımları içerir: polisakkaritin saflaştırılması, (a) bir ya da daha fazla katyonik deterjan kullanılarak polisakkaritin çökeltilmesi, ardından (b) çökeltilen polisakkaritin bir alkol kullanılarak çözünürleştirilmesi, polisakkaridin bir taşıyıcı proteine konjugasyonu adımlarını içerir, burada taşıyıcı protein bir bakteriyel toksindir ya da toksittir ve burada konjugasyon bir bağlayıcı ile gerçekleştirilir, burada bakteriyel kapsüler polisakkarit *Neisseria meningitidis* serogrup A, W135 ya da Y'den ya da *Haemophilus influenzae*'den ya da *Streptococcus pneumoniae*'den gelir. Bir yönde konjugatlı sakkarit 0.5:1 ve 5:1 arasında bir sakkarit:protein oranına (ağırlık/ağırlık) sahiptir. Başka bir yönde, işlem sakkaridin bir siyanilatlama reaktifi ile aktive edilmesi adımı içerir.

20

25

İSTEMLER

1. Bir bakteriyel kapsüler polisakaritin saflaştırılmasına ve bir taşıyıcı proteine konjugatlanmasına yönelik bir proses olup, aşağıdaki adımları içerir:

5

polisakkaridin saflaştırılması, (a) bir ya da daha fazla katyonik deterjan kullanılarak polisakaritin çökeltilmesi, ardından (b) çökeltilen polisakaritin %75 ve %95 arasındaki bir nihai konsantrasyonda etanol kullanılarak çözünürleştirilmesi, polisakkaridin bir taşıyıcı proteine konjugasyonu, burada taşıyıcı protein bir bakteriyel toksindir ya da toksoittir ve burada konjugatlı sakkarit, 0.5:1 ve 5:1 arasında bir sakkarit:protein oranına (w/w) sahiptir.

10

15

burada bakteriyel kapsüler polisakkarit *Neisseria meningitidis* serogrup A, W135 ya da Y'den ya da *Haemophilus influenzae*'den ya da *Streptococcus pneumoniae*'den gelir ve burada bir ya da daha fazla katyonik deterjan setiltrimetilamonyum bromürü içerir.

20

2. Bir bakteriyel kapsüler polisakaritin saflaştırılmasına ve bir taşıyıcı proteine konjugatlanmasına yönelik bir proses olup, aşağıdaki adımları içerir:

25

polisakkaridin saflaştırılması, (a) bir ya da daha fazla katyonik deterjan kullanılarak polisakaritin çökeltilmesi, ardından (b)

5 çökeltilen polisakaritin %75 ve %95 arasındaki bir nihai konsantrasyonda etanol kullanılarak çözünürleştirilmesi, sakkaridin bir siyanilatlama reaktifi ile aktive edilmesi, ve polisakkaridin bir taşıyıcı proteine konjugasyonu, burada taşıyıcı protein bir bakteriyel toksindir ya da toksittir,

10 burada bakteriyel kapsüller polisakkarit Neisseria meningitidis serogrup A, W135 ya da Y'den ya da Haemophilus influenzae'den ya da Streptococcus pneumoniae'den gelir ve burada bir ya da daha fazla katyonik deterjan setiltrimetilamonyum bromürü içerir.

15 3. İstem 1'e ya da istem 2'ye göre proses olup, burada saflaştırma ayrıca kontaminantları ekarte etmek için adım (b)'de elde edilen polisakkariti muamele etme adımı (c)'yi içerir.

20 4. İstem 3'e göre proses olup, burada adım (c) bir ya da daha fazla filtrasyon adımı içerir.

5. İstem 4'e göre proses olup, burada adım (c) derinlik filtrasyonunu, aktive edilmiş karbon yoluyla filtrasyonu, ebat filtrasyonunu ve/veya ultrafiltrasyonu içerir.

25 6. Önceki istemlerden herhangi birine göre proses olup, burada adım (b)'de ya da adım (c)'de elde edilen polisakkarit ardından çökeltilir.

7. İstem 6'ya göre proses olup, burada çökelme kalsiyum ya da sodyum tuzlarının eklenmesiyle gerçekleşir.
8. Önceki istemlerden herhangi birine göre proses olup, burada taşıyıcı protein difteri toksoit ya da tetanoz toksoittir.
9. Önceki istemlerden herhangi birine göre proses olup, burada konjugasyonu sonrasında serbest ve konjugatlı sakkaritler ayrılır.
10. İstem 9'a göre proses olup, burada ayrışma hidrofobik kromatografiyi, teğetsel ultrafiltrasyonu ya da diyafiltrasyonu kullanılır.
15. 11. N.Meningitidis'in birden fazla serogrubundan sakkaritlerin bir karışımını yapma işlemi olup, önceki istemlerden herhangi birinin prosesini içerir ve ayrıca konjugatın karışımı sağlamak için başka biyolojik moleküllerle karıştırılması adımını içerir.
20. 12. İstem 11'e göre proses olup, burada N.Meningitidis suşları A, C, W135 ve/veya Y'den alınan sakkarit antijenleri karıştırılır.
25. 13. İstem 12'ye göre proses olup, burada karıştırma işlemi A ve C olmak üzere her iki serogruptan gelen kapsüller sakkaritleri içerir ve MenA sakkarit:MenC sakkarit oranı (w/w) 2:1'dir.
30. 14. İstem 12'ye göre proses olup, burada karıştırma işlemi, Y serogrubundan ve serogrup C ve W135'in birinden ya da her ikisinden gelen kapsüller sakkaritleri içeren bir bileşim sağlar ve burada MenY sakkaridi:MenW135 sakkaridi oranı (w/w) 1'den

daha fazladır ve/veya MenY sakkaridi:MenC sakkaridi oranı (w/w) 1'den daha düşüktür.

5 **15.**İstem 12'ye göre proses olup, burada karıştırma işlemi serogrup A, C, W135 ve Y'den elde edilen kapsüller sakkaritleri içeren bir bileşimi verir ve burada A:C:W135:Y serogrupları 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; ya da 2:2:2:1 oranlarına (w/w) sahiptir.

10

16.Bir aşığı formüle etmek için bir proses olup, önceki istemlerden herhangi birinin prosesini içerir ve ayrıca bir alüminyum fosfat ve/veya bir alüminyum hidroksit olan bir adjuvanla sakkarit antijen(ler)inin karıştırılmasını ihtiva eden aşı formülasyonu adım(lar)ını içerir.

15

24395

TARİFNAME**KAPSULER POLİSAKARİTLERİN****5 COZUNURLEŞTİRİLMESİ VE KOMBİNASYON AŞILARI****TEKNİK SAHA**

Bu buluş, özellikle meningokok enfeksiyonuna ve hastalığına karşı olmak üzere, aşilar sahasına yöneliktir.

10

GEÇMİŞ TEKNOLOJİ

Neisseria meningitidis, bir Gram negatif insan patojenidir. Farenkste kolonize olarak menenjitte ve zaman zaman menenjit olmadığında septisemiye neden olur. N.gonorrhoeae ile yakından ilişkili olmakla
15 birlikte meningokoku net bir şekilde ayırt eden özellik, tüm patojenik meningokoklarda bulunan bir polisakarit kapsülüdür.

Organizmanın kapsüler polisakaritine dayanarak on iki N.meningitidis serogrubu tanımlanmıştır (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y ve Z). A Grubu, alt Sahra Afrika'sında epidemik hastalıkta en sık şekilde
20 gösterilen patojendir. B ve C serogrupları, ABD'de ve çoğu gelişmiş ülkede vakaların büyük kısmından sorumludur. W135 ve Y serogrupları, ABD'de ve gelişmiş ülkelerde geri kalan vakalardan sorumludur.

N.meningitidis'ten kapsüler polisakaritler tipik olarak polisakarit
25 çökeltme (örn., bir katyonik deterjan kullanılarak), etanol ile parçalama, soğuk fenol ile özümleme (proteini çıkartmak için) ve

ultra-santrifüjleme (LPS'yi çıkartmak için) adımlarını içeren bir proses ile hazırlanır [örn., ref. 1].

A, C, Y ve W135 serogruplarından kapsüler polisakaritlerin bir tetravalent aşısı birçok yıldır bilinmektedir [2, 3] ve insan kullanımı için lisans almıştır. Ergenlerde ve yetişkinlerde etkili olmakla birlikte 5 bebeklerde zayıf bir immün tepkisi ve kısa süreli koruma sağlar ve kullanılamaz [örn., 4] . Bunun nedeni, polisakaritlerin boost edilemeyen zayıf bir immün tepkisi indükleyen, T hücresinden bağımsız antijenler olmasıdır. Bu aşısındaki polisakaritler konjüge 10 edilmez ve 1:1:1:1 oranında bulunur [5]. MENCEVAX ACWY™, liyofilize edilmiş formundan yeniden oluşturulduğunda saflaştırılmış her polisakaritten 50µg ihtiva eder.

Konjüge edilmiş C serogrubu oligosakaritler de insan kullanımı için onaylanmıştır [örn., Menjugate™; ref. 6]. Bununla birlikte A, W135 15 ve Y serogruplarına karşı konjüгат aşılarında ve bunların üretiminde geliştirme yapılmasına ihtiyaç vardır.

EP 0 072 513 B1, saflaştırılmış bakteriyel kapsüler antijenik polisakaritlerin hazırlanmasına yönelik bir proses, elde edilen ürünler ve bunların kullanımlarını tarif eder. Lei QP et al (2000) 20 (Developments in Biologicals 103, 259-264) meningokokkal polisakarit-difteri toksoit konjüгат aşılarında serbest polisakkaridin kantifikasyonunu tarif eder. WO 02/058737 A2 bir multivalent meningokokkal polisakarit-proteini konjüгат aşısını tarif eder. WO 96/40242 A1 bir polisakarit antijen-taşıyıcı protein konjüгатını ve 25 serbest taşıyıcı proteini içeren bir aşığı tarif eder.

BULUŞUN AÇIKLAMASI

Buluş, bir bakteriyel kapsüler polisakaritin saflaştırılmasına ve bir taşıyıcı proteine konjugatlanmasına yönelik bir proses sağlar, burada proses aşağıdaki adımları içerir:

polisakkaridin saflaştırılması, (a) bir ya da daha fazla katyonik deterjan kullanılarak polisakaritin çökeltilmesi, ardından (b) çökeltilen polisakaritin %75 ve %95 arasındaki bir nihai konsantrasyonda etanol kullanılarak çözünürleştirilmesi,

polisakkaridin bir taşıyıcı proteine konjugasyonu, burada taşıyıcı protein bir bakteriyel toksindir ya da toksodir ve burada konjugatlı sakkarit, 0.5:1 ve 5:1 arasında bir sakkarit:protein oranına (w/w) sahiptir.

burada bakteriyel kapsüler polisakkarit *Neisseria meningitidis* serogrup A, W135 ya da Y'den ya da *Haemophilus influenzae*'den ya da *Streptococcus pneumoniae*'den gelir ve burada bir ya da daha fazla katyonik deterjan setiltrimetilamonyum bromürü içerir.

Buluş, bir bakteriyel kapsüler polisakaritin saflaştırılmasına ve bir taşıyıcı proteine konjugatlanmasına yönelik bir proses sağlar, burada proses aşağıdaki adımları içerir:

polisakkaridin saflaştırılması, (a) bir ya da daha fazla katyonik deterjan kullanılarak polisakaritin çökeltilmesi, ardından (b) çökeltilen

polisakaritin %75 ve %95 arasındaki bir nihai konsantrasyonda etanol kullanılarak çözünürleştirilmesi,

sakkaridin bir siyanilatlama reaktifi ile aktive edilmesi, ve

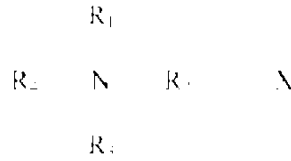
5

polisakkaridin bir taşıyıcı proteine konjugasyonu, burada taşıyıcı protein bir bakteriyel toksindir ya da toksittir,

10 burada bakteriyel kapsüler polisakkarit *Neisseria meningitidis* serogrup A, W135 ya da Y'den ya da *Haemophilus influenzae*'den ya da *Streptococcus pneumoniae*'den gelir ve burada bir ya da daha fazla katyonik deterjan setiltrimetilamonyum bromürü içerir.

Çökeltme ve etanol ile çözünürleştirme

15 Çözülebilir polisakaritlerin çökertilmesine yönelik birçok teknik bu konuda bilinmektedir. Tercih edilen yöntemlerde bir veya daha fazla katyonik deterjan kullanılır. Deterjanlar tercihen aşağıdaki genel formüle sahiptir:



20 burada: R_1 , R_2 ve R_3 , aynı veya farklıdır ve her biri, alkili veya arili belirtir; veya R_1 ve R_2 , bunların eklendiği nitrojen atomu ile birlikte, 5 veya 6 elemanlı, doymuş bir heterosiklik halka oluşturur ve R_3 , alkili veya arili belirtir; veya R_1 , R_2 ve R_3 , bunların eklendiği nitrojen atomu ile birlikte, nitrojen atomunda doymamış, 5 veya 6 elemanlı bir
25 heterosiklik halka oluşturur,
 R_4 , alkili veya arili belirtir ve

X^- , bir anyonu gösterir.

Yöntemde kullanılmak üzere özellikle tercih edilen deterjanlar, tetrabutilamonyum ve setiltrimetilamonyum tuzlarıdır (örn., bromid tuzları). Setiltrimetilamonyum bromid ('CTAB') özellikle tercih edilir
5 [8]. CTAB ayrıca heksadesiltrimetilamonyum bromid, setrimonyum bromid, Cetavlon ve Centimid olarak bilinir. Diğer deterjanlar arasında heksadimetrim bromid ve miristiltrimetilamonyum tuzları bulunur.

Kapsüller polisakaritler, kültür sırasında ortam içine salınır. Buna göre
10 çökeltme için başlangıç materyali tipik olarak santrifüjlenmiş bir bakteri kültüründen gelen süpernatant olacaktır veya konsantre edilmiş bir kültür olacaktır.

Çökeltme adımı, polisakaritler için seçici olabilir, ancak tipik olarak diğer bileşenleri (örn., proteinler, nükleik asit vb.) de birlikte
15 çökeltecektir.

Çökelen polisakarit, çözünürleştirme öncesinde santrifüj yoluyla toplanabilir.

Çökeltmeden sonra polisakarit (tipik olarak katyonik deterjan ile bir kompleks halinde) yeniden çözünürleştirilir. Kirleticileri (örn.,
20 proteinler, nükleik asit vb.) en aza indirmek için polisakarit için nispeten seçici olan bir solventin kullanılması tercih edilir. Bu bağlamda etanolün avantajlı olduğu keşfedilmiştir ve bu, CTAB-polisakarit kompleksi için yüksek oranda seçicidir. Başka alt alkoller (örn., metanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-
25 metil-propan-1-ol, 2-metil-propan-2-ol, dioller vb.) kullanılabilir.

Etanol tercihen çökelen polisakarite, %50 ile %95 arasında (örn., yaklaşık %55, %60, %65, %70, %75, %80, %85 veya yaklaşık %90) ve tercihen %75 ile %95 arasında nihai etanol konsantrasyonu (toplam

etanol ve su içeriği bazında) verecek şekilde ilave edilir. Optimum nihai etanol konsantrasyonu, polisakaritin elde edildiği bakterinin serogrubuna bağlı olabilir.

Etanol, çökelen polisakarite saf formda ilave edilebilir veya
5 karışabilen bir solvent (örn., su) ile seyreltilmiş bir formda ilave edilebilir. Tercih edilen solvent karışımları, etanol:su karışımları olup tercih edilen oran yaklaşık 70:30 ile yaklaşık 95:5 arasındadır (örn., 75:25, 80:20, 85:15, 90:10).

Kapsüller polisakaritlerin hazırlanmasına yönelik geleneksel prosesler
10 ile karşılaştırıldığında iki adımlı çökeltme ve ardından etanol ile özümleme prosesi, daha hızlı ve basittir.

9. referansta tarif edilen prosesin aksine bu proseste, anyonik deterjan yerine katyonik deterjan kullanılır. 10. referansın prosesinin aksine polisakarit, kalsiyum veya magnezyum tuzları kullanılarak katyon
15 alışverişinden çok etanol kullanılarak yeniden çözünürleştirilir. 11. referansın prosesinin aksine çökeltme, eylemsiz, gözenekli bir destek gerektirmez. Ek olarak önceki tekniğe ait proseslerin aksine alkol, polisakariti çökeltmek için değil bunu yeniden çözünürleştirmek için kullanılır.

20 Bakteriyel kapsüller polisakarit genellikle Neisseria'dan gelecektir. Tercihen bu, A, B, C, W135 ve Y serogrupları dahil N.meningitidis'ten gelir. Tercih edilen serogruplar, A, W135 ve Y'dir. Proses ayrıca Haemophilus influenzae'den (özellikle tip B veya 'Hib') ve Streptococcus pneumoniae'den (pnömokok) kapsüller polisakarit
25 hazırlanması için uygundur.

Çözünürleştirilmiş polisakaritin ileri işleme

Yeniden çözünürleştirme sonrasında polisakarit ayrıca kirleticileri çıkartmak üzere işleme tabi tutulabilir. Bu, çok küçük kirlenmenin bile kabul edilebilir olmadığı (örn., insan aşısı üretimine yönelik) durumlarda özellikle önemlidir. Bu tipik olarak bir veya daha fazla 5 filtreleme adımı içerecektir.

Derinlik filtrelemesi kullanılabilir. Bu, berraklaştırma için özellikle faydalıdır.

Aktifleştirilmiş karbon içinden filtreleme kullanılabilir. Bu, 10 pigmentlerin ve eser organik bileşiklerin çıkarılması için faydalıdır. Bu örneğin, $OD_{275nm} < 0.2$ olana kadar tekrar edilebilir.

Ebatlı filtreleme veya ultrafiltreleme kullanılabilir.

Kirleticileri çıkartmak için filtre edildikten sonra polisakarit, ileri işleme ve/veya proses için çökeltiler. Bu elverişli şekilde katyon alışverişi yoluyla (örn., kalsiyum veya sodyum tuzları ilave edilerek) 15 sağlanabilir.

Polisakarit, kimyasal olarak modifiye edilebilir. Örneğin bir veya daha fazla hidroksil grubunu bloklama grupları ile değiştirmek üzere modifiye edilebilir. Bu özellikle MenA için faydalıdır [12]. B 20 serogrubundan gelen polisakaritler, N-propiyonile edilebilir [13].

(İsteğe bağlı olarak modifiye edilmiş) polisakarit tipik olarak oligosakaritler oluşturmak üzere hidrolize edilecektir. Bu tercihen oligosakaritte 30'un altında (örn. 10 ile 20 arasında, tercihen A serogrubu için 10 civarında; W135 ve Y serogrupları için 15 ile 25 25 arasında, tercihen 15-20 civarında; vb.) nihai ortalama polimerizasyon derecesi (DP) vermek için yapılır. Oligosakaritler, aşılarda kullanılmak üzere polisakaritlere tercih edilir. DP, iyon alışverişli

kromatografi veya kolorimetrik deneyler ile elverişli şekilde ölçülebilir [14].

Hidroliz yapılırsa hidrolizat genel olarak kısa oligosakaritlerin çıkarılması amacıyla ebatlanacaktır. Bu, ultrafiltreleme, ardından iyon alışverişli kromatografi gibi çeşitli yollarla yapılabilir. Polimerizasyon derecesi yaklaşık 6'dan az veya buna eşit olan oligosakaritler tercihen A serogrubu için çıkarılır ve yaklaşık 4'ün altında olanlar tercihen W135 ve Y serogrupları için çıkarılır.

İmmünojenikliği güçlendirmek için buluşa ait polisakaritler veya oligosakaritler tercihen bir taşıyıcıya konjüğe edilir (Şekil 18). Taşıyıcı proteinlere konjügasyon, pediatrik aşılar için özellikle faydalıdır [örn., ref. 15] ve iyi bilinen bir tekniktir [örn., ref. 16 ila 24, vb.de ele alınmıştır.].

Tercih edilen taşıyıcı proteinleri, bakteriyel toksinler veya toksoidler, örneğin difteri veya tetanos toksoidleridir. CRM₁₉₇ difteri toksoidi [25,26,27] özellikle tercih edilir. Diğer uygun taşıyıcı proteinler arasında N.meningitidis dış membran protein kompleksi [28], sentetik peptitler [29, 30], ısı şoku proteinleri [31, 32], pertussis proteinleri [33, 34], sitokinler [35], lenfokinler [35], hormonlar [35], büyüme faktörleri [35], patojenden türetilmiş çeşitli antijenlerden gelen çoklu insan CD4⁺ T hücresi epitoplari içeren suni proteinler [36], H.influenzae'den protein D [37], C.difficile'den toksin A veya B [38] vb. bulunur. Taşıyıcı proteinlerin karışımları da kullanılabilir.

Sakarit:protein oranı (w/w) 0.5:1 (yani fazla protein) ile 5:1 (yani fazla sakarit) arasında olan konjüгатlar tercih edilir ve oranları 1:1.25 ile 1:2.5 arasında olanlar daha fazla tercih edilir.

Tek bir taşıyıcı protein, birçok farklı sakariti taşıyabilir [39]. Konjüгатlar, serbest taşıyıcı protein ile birlikte kullanılabilir [40].

Uygun bir konjügasyon reaksiyonu, gerekli olduğunda uygun bir bağlayıcı ile kullanılabilir.

Sakarit tipik olarak konjügasyondan önce aktifleştirilecek veya fonksiyonelleştirilecektir. Aktivasyon örneğın CDAP (örn., 1-siyano-4-dimetilamino piridinyum tetrafloroborat) [41, 42, vb.]) gibi siyanile edici reaktif maddeler içerebilir. Diğer uygun tekniklerde karbodiimidler, hidrazidler, aktif esterler, norboran, p-nitrobenzoik asit, N-hidroksisukinimid, S-NHS, EDC, TSTU kullanılır (ayrıca 22. referansın girişine bakınız).

10 Bir bağlayıcı grubu aracılığıyla bağlamalar, bilinen bir prosedür, örneğın 43 ve 44. referanslarda tarif edilen prosedürler kullanılarak yapılabilir. Bir tip bağlama, polisakaritin indirgeyici aminasyonunu, elde edilen amino grubu ile bir adipik asit bağlayıcı grubun bir ucunun birleştirilmesini ve sonra bir proteinin, adipik asit bağlayıcı grubun 15 diğer ucuna birleştirilmesini içerir [20, 45, 46]. Diğer bağlayıcılar arasında B-propiyonamido [47], nitrofenil-etilamin [48], haloasil halidler [49], glikosidik bağlar [50], 6-aminokaproik asit [51], ADH [52], C₄ ila C₁₂ yarımları [53] vb. bulunur. Bir bağlayıcı kullanılmasına alternatif olarak direkt bağlama kullanılabilir. Proteine 20 direkt bağlamalar, polisakaritin oksidasyonunu, ardından örneğın 54 ve 55. referanslarda tarif edildiğı gibi protein ile indirgeyici aminasyonu içerebilir.

Amino gruplarının sakarit içine (örn., terminal =o gruplarının -NH₂ ile değıştirilmesi suretiyle) sokulmasını, ardından bir adipik diester (örn., 25 adipik asit N-hidroksisukinimido diester) ile türevlendirmeyi ve taşıyıcı protein ile reaksiyonu içeren bir proses tercih edilir.

Konjügasyondan sonra serbest ve konjüğe edilmiş sakaritler ayrılabilir. Uygun birçok yöntem vardır, örneğın hidrofobik

kromatografi, tanjant ultra-filtreleme, diya-filtreleme, vb. [bakınız ayrıca 56 ve 57. referanslar, vb.].

Sakaritleri içeren karışımlar ve kompozisyonlar

- 5 Buluşa ait konjüгатlar, başka biyolojik moleküller ile karıştırılabilir. Birden fazla N.meningitidis serogrubundan gelen sakaritlerin karışımları, örn. A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W135, A+C+Y, C+W135+Y, A+C+W135+Y, vb. serogrublarından gelen sakaritler içeren kompozisyonlar tercih edilir.
- 10 Tek tek sakarit antijenlerinin koruyucu etkinliğinin bunların birleştirilmesi suretiyle ortadan kaldırılmaması tercih edilir, bununla birlikte gerçek immünojeniklik (örn., ELISA titerleri) azalabilir. C serogrubundan gelen bir sakarit kullanıldığında bu tercihen ~12 ila ~22 tekrar ünitesine sahiptir.
- 15 Farklı N.meningitidis serogrublarından gelen sakaritler, aynı veya farklı taşıyıcı proteinlere konjüğe edilebilir. Bir karışımın, A ve C serogrublarının her ikisinden gelen kapsüller sakaritler içerdiği durumda MenA sakarit:MenC sakarit oranının (w/w) 1'den fazla (örn., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 veya daha yüksek)
- 20 olması tercih edilir. Sürpriz şekilde MenA bileşeni, MenC bileşenine göre fazla (kütle/doz) bulunduğunda bunun immünojenikliğinin geliştiği gözlemlendi. Bir karışım, W 135 serogrubundan ve A, C ve Y serogrublarının en az birinden kapsüller sakaritler (örn., oligosakaritler) içerdiğinde sürpriz
- 25 şekilde MenW135 sakaritinin immünojenikliğinin, diğer serogrup(lar)dan sakarit(ler) ile kombinasyon halinde uygulandığında, bunun tek başına (aynı dozajda, vb.) uygulanmasına göre daha yüksek olduğu keşfedildi [bakınız ref. 58]. Böylelikle MenW135 antijeninin

bir immün tepkisi uyandırma kapasitesi, diğer serogruplardan gelen antijenler ile birleştirilmeden verildiğinde aynı antijenin denk miktarı ile uyandırılan immün tepkisinden daha yüksektir. Bu güçlendirilmiş immünojeniklik, MenW135 antijeninin kontrol hayvanlarına ve karışımın test hayvanlarına uygulanması ve bu ikisine karşı olan antikör titerlerinin bakterisidal titerler, radyo-immünodeney ve ELISA'lar vb. gibi standart deneyler kullanılarak karşılaştırılması suretiyle belirlenebilir. W135 serogrubundan gelen sakaritlerin diğer serogruplar ile sinerjistik kombinasyonlarını içeren aşılar immünolojik açıdan avantajlıdır. Bunlar, güçlendirilmiş anti-W135 tepkileri ve/veya daha düşük W135 dozları sağlar.

Bir karışımın, Y serogrubundan ve C ve W135 serogruplarından birinden veya her ikisinden kapsüller sakaritler içermesi durumunda MenY sakarit:MenW135 sakarit oranının (w/w) 1'den yüksek (örn., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 veya daha yüksek) olması ve/veya MenY sakarit:MenC sakarit oranının (w/w) 1'den az (örn., 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 veya daha düşük) olması tercih edilir.

A:C:W135:Y serogruplarından gelen sakaritler için tercih edilen oranlar (w/w) şöyledir: 1:1:1:1; 1:1:1:2; 2:1:1:1; 4:2:1:1; 8:4:2:1; 4:2:1:2; 8:4:1:2; 4:2:2:1; 2:2:1:1; 4:4:2:1; 2:2:1:2; 4:4:1:2; ve 2:2:2:1.

Karışımlar ayrıca proteinler içerebilir. N.meningitidis B serogrubundan [örn., referanslar 59 ila 64] veya OMV preparasyonlarından [örn., 65 ila 68. referanslar, vb.] gelen proteinlerin dahil edilmesi tercih edilir.

Meningokok olmayan ve neisserial olmayan antijenler, tercihen meningokok bileşenlere karşı immün tepkisini azaltmayanlar da dahil edilebilir. Örneğin 69. Referans, N.meningitidis B ve C serogruplarından gelen oligosakaritlerin Hib sakariti ile

kombinasyonlarını açıklar. Pnömonokok, hepatit A virüsü, hepatit B virüsü, B.pertussis, difteri, tetanos, Helicobacter pylori, polio ve/veya H.influenzae'dan alınan antiijenler tercih edilir. Özellikle tercih edilen neisserial olmayan antiijenler arasında şunlar bulunur:

- 5 -Helicobacter pylori'den antiijenler örneğın CagA [70 ıla 73], VacA [74, 75], NAP [76, 77, 78], HopX [örn., 79], HopY [örn., 79] ve/veya üreaz.
- Streptococcus pneumoniae'den bir sakarit antiijeni [örn., 80, 81, 82].
- hepatit A virüsünden, örneğın eylemsizleştirilmiş virüsten bir antiijen
10 [örn., 83, 84].
- hepatit B virüsünden bir antiijen, örneğın yüzey ve/veya göbek antiijenleri [örn., 84, 85], yüzey antiijeni tercihen bir alüminyum fosfat üzerine adsorbe edilir [86].
- Haemophilus influenzae B'den bir sakarit antiijeni [örn., 87], tercihen
15 adsorbe edilmemiştir veya bir alüminyum fosfat üzerine adsorbe edilmiştir [88].
- hepatit C virüsünden bir antiijen [örn., 89].
- N.gonorrhoeae'den bir antiijen [örn., 59 ıla 62].
- Chlamydia pneumoniae'den bir antiijen [örn., 90 ıla 96. referanslar].
- 20 -Chlamydia trachomatis'ten bir antiijen [örn., 97].
- Porphyromonas gingivalis'ten bir antiijen [örn., 98].
- polio antiijen(ler)i [örn., 99, 100] örneğın IPV.
- kuduz antiijen(ler)i [örn., 101] örneğın liyofilize edilmiş, eylemsizleştirilmiş virüs [örn., 102, RabAvert™].
- 25 -kızamık, kabakulak ve/veya kızamıkçık antiijenleri [örn., 103. referansın 9, 10 ve 11. bölümleri].
- influenza antiijen(ler)i [örn., 103. referansın 19. bölümü], örneğın hemaglutinin ve/veya nöraminidaz yüzey proteinleri.

- Moraxella catarrhalis'ten bir antijen [örn., 104].
 - Streptococcus agalactiae'den (B grubu streptokok) bir antijen [örn., 105, 106].
 - Streptococcus pyogenes'ten (A grubu streptokok) bir antijen [örn., 5 106, 107, 108].
 - Staphilococcus aureus'tan bir antijen [örn., 109].
 - bir paramiksovirüsten, örneğin respiratuar sinsitiyal virüsten (RSV [110, 111]) ve/veya parainfluenza virüsünden (PIV3 [112]) antijen(ler).
 - 10 -Bacillus anthracis'ten bir antijen [örn., 113, 114, 115].
 - flaviviridae familyasındaki (genus flavivirus) bir virüsten, örneğin sarı humma virüsü, Japon ansefalit virüsü, Dengue virüslerinin dört serotipi, kene ile taşınan ansefalit virüsü, Batı Nil virüsünden bir antijen.
 - 15 -bir pestivirüs antijeni, örneğin klasik domuz ateşi virüsü, sığır viral diyare virüsü ve/veya border hastalığı virüsünden.
 - bir parvovirüs antijeni, örn., parvovirüs B19'dan.
 - bir tetanos toksoidi [örn., ref. 116].
 - B.pertussis'den pertussis holotoksin (PT) ve filamentöz hemaglutinin (FHA), isteğe bağlı olarak ayrıca pertaktin ve/veya aglutinojenler 2 ve 3 ile kombinasyon halinde [örn., 117 ve 118. referanslar].
 - 20 -hücrel pertussis antijeni.
- Karışım, gerekli durumlarda detoksifiye edilebilen bu diğer antijenlerden bir veya daha fazlasını içerebilir (örn., pertussis toksinin detoksifikasyonu kimyasal ve/veya genetik vasıtalarla yapılır).
- Karışım içine bir difteri antijeninin dahil edildiği durumlarda ayrıca tetanos antijeni ve pertussis antijenlerinin de dahil edilmesi tercih

edilir. Benzer şekilde bir tetanos antijeninin dahil edildiği durumlarda ayrıca difteri ve pertussis antijenlerinin de dahil edilmesi tercih edilir. Benzer şekilde bir pertussis antijeninin dahil edildiği durumlarda ayrıca difteri ve tetanos antijenlerinin de dahil edilmesi tercih edilir.

- 5 Karışım içindeki antijenler tipik olarak her biri en az 1µg/ml konsantrasyonda bulunacaktır. Genel olarak belirli bir antijenin konsantrasyonu, bu antijene karşı bir immün tepkisi uyandırmak için yeterli olacaktır.

- 10 Karışım içinde protein antijenlerinin kullanılmasına alternatif olarak antijeni şifreleyen nükleik asit kullanılabilir. Karışımın protein bileşenleri bu şekilde proteini şifreleyen nükleik asit (tercihen örn. bir plazmid formunda DNA) ile değiştirilebilir.

Multivalent sakarit aşılıarı

- 15 Buluş ayrıca N.meningitidis A, C, W135 ve Y serogruplarından en az ikisinden (yani 2, 3 veya 4'ünden) gelen kapsüller sakaritler içeren aşılıarı ve immünojenik kompozisyonlar sunar, burada adı geçen kapsüller sakaritler, taşıyıcı protein(ler)e konjüge edilir ve/veya oligosakaritlerdir. Aşının A, C, W135 ve Y serogruplarından gelen,
- 20 konjüge edilmiş sadece iki oligosakarite veya polisakarite sahip olması durumunda bunlar tercihen A ve C serogruplarından değildir (bakınız 6, 119 ve 120. referanslar). Tercih edilen kompozisyonlar, C ve Y serogruplarından sakaritler içerir. Tercih edilen diğer kompozisyonlar, C, W 135 ve Y serogruplarından sakaritler içerir.
- 25 Burada bir A serogrubu oligosakarit konjüгатı ve bir C serogrubu oligosakarit konjüгатı içeren ve ayrıca (i) bir alüminyum fosfat veya bir alüminyum hidroksid adjuvan ve (ii) bir tampon içeren bir immünojenik kompozisyon açıklanır. Kompozisyon, bir alüminyum

fosfat adjuvan içerdiğinde tampon tercihen bir fosfat tamponudur ve bir alüminyum hidroksid adjuvan içerdiğinde tampon tercihen bir histidin tamponudur.

Aşı, A sero grubundan kapsüller sakarit içerdiğinde A sero grubu sakaritin, hidrolizi en aza indirmek amacıyla kullanımdan kısa bir süre önce başka sakarit(ler) ile birleştirilmesi tercih edilir (bakınız Hib sakaritleri). Bu, A sero grubu bileşenin liyofilize edilmiş formda ve diğer sero grup bileşen(ler)inin sıvı formda olması ile elverişli şekilde sağlanabilir, buradaki sıvı bileşen, kullanıma hazır olduğunda liyofilize edilmiş bileşeni yeniden oluşturmak için kullanılır. Sıvı bileşen tercihen bir alüminyum tuzu adjuvan içerir, bu durumda liyofilize edilmiş A sero grubu bileşeni, bir alüminyum tuzu adjuvanı içerebilir veya içermeyebilir.

Bu yüzden burada şunları içeren bir kit açıklanır: (a) liyofilize edilmiş formda, N.meningitidis A sero grubundan kapsüller sakarit; ve (b) sıvı formda bir veya daha fazla (örn., 1, 2, 3) N.meningitidis C, W135 ve Y sero grubundan kapsüller sakarit(ler). Sakaritler tercihen taşıyıcı protein(ler)e konjüge edilir ve/veya oligosakaritlerdir. Kit, iki şişe formunda olabilir.

Ayrıca burada açıklanan bir aşı kompozisyonunun hazırlanmasına yönelik, liyofilize edilmiş, N.meningitidis A sero grubundan bir kapsüller sakaridin bir veya daha fazla (örn., 1, 2, 3) N.meningitidis C, W135 ve Y sero grubundan kapsüller sakarit(ler) ile karıştırılmasını içeren, burada adı geçen bir veya daha fazla sakaritin sıvı formda olduğu bir yöntem açıklanır.

Ayrıca burada şunları içeren bir kit açıklanır: (a) liyofilize edilmiş formda, N.meningitidis A sero grubundan konjüge edilmiş kapsüller oligosakarit; ve (b) sıvı formda bir veya daha fazla başka antijen.

Başka antijen, N.meningitidis C serogrubundan konjüge edilmiş kapsüler oligosakarit olabilir veya olmayabilir.

İmmünojenik kompozisyonlar ve aşılar

- 5 Buluşa ait konjüгатlar, immünojenik kompozisyonlara ve aşılara dahil edilmeye özellikle uygundur. Bu nedenle buluşa ait bir proses, polisakaritin, oligosakaritin veya konjüгатın bir immünojenik kompozisyon veya aşı halinde formüle edilmesi adımını içerebilir. Buluş, bu şekilde elde edilebilen bir kompozisyon veya aşı sunar.
- 10 Buluşa ait immünojenik kompozisyonlar ve aşılar, meningokok sakaritlerine ilaveten tipik olarak 'farmasötik açıdan kabul edilebilir taşıyıcılar' içerecektir, bunlar arasında kompozisyonu alan kişi için zararlı antikorların üretilmesini kendi başına indüklemeyen taşıyıcılar bulunur. Uygun taşıyıcılar tipik olarak büyük, yavaş metabolize edilen
- 15 makromoleküller örneğin proteinler, polisakaritler, polilaktik asitler, poliglikolik asitler, polimerik amino asitler, amino asit kopolimerleri, trehaloz [121], lipit agregatlarıdır (örneğin yağ damlaları veya lipozomlar) ve eylemsiz virüs partikülleridir. Bu gibi taşıyıcılar, bu konuda sıradan bilgiye sahip kişilerce iyi bilinir. Aşılar ayrıca
- 20 seyrelticiler, örneğin su, tuz, gliserol, vb. ihtiva edebilir. Ek olarak nemlendirici veya emülsife edici ajanlar, pH tamponlama maddeleri ve benzeri gibi yardımcı maddeler de bulunabilir. Farmasötik açıdan kabul edilebilir eksipiyanların kapsamlı bir tartışması 122. referansta mevcuttur.
- 25 Aşı olarak kullanılan immünojenik kompozisyonlar, immünolojik açıdan etkili miktarda bir sakarit antijeninin yanı sıra gerektiğinde yukarıda bahsedilen diğer bileşenleri içerir. 'İmmünolojik açıdan etkili miktarlar' ile bir kişiye tek bir dozda veya bir serinin parçası halinde

bu miktarın uygulanmasının, tedavi veya önleme için etkili olması kast edilir. Bu miktar, tedavi edilecek kişinin sağlığına ve fiziksel durumuna, tedavi edilecek kişinin (örn., insan olmayan primat, primat, vb.) yaşına, taksonomik grubuna, kişinin immün sisteminin antikorları sentezleme kapasitesine, arzu edilen koruma derecesine, aşının formülasyonuna, tedavi eden doktorun tıbbi duruma dair değerlendirmesine ve diğer alakalı faktörlere bağlı olarak değişir. Miktarın, rutin denemeler ile belirlenebilecek nispeten geniş bir aralık içine girmesi beklenir. Dozaj tedavisi, tek dozlu bir program veya çok dozlu bir program (örn., booster dozları içeren) olabilir. Aşı, başka immüno-regülatör ajanlar ile birlikte uygulanabilir.

Aşı, başka immüno-regülatör ajanlar ile birlikte uygulanabilir.

Aşı bir adjuvan içerebilir. Kompozisyonun etkinliğini güçlendirmek için tercih edilen adjuvanlar arasında bunlarla sınırlı olmamakla birlikte aşağıdakiler bulunur: (1) alüminyum tuzları (alum), örneğin alüminyum hidroksidler (oksihidroksidler dahil), alüminyum fosfatlar (hidroksifosfatlar dahil), alüminyum sülfat, vb. [123. referansta 8 ve 9. Bölümler]; (2) su içinde yağ emülsiyonu formülasyonları (başka spesifik immüno-uyarıcı ajanlar örneğin muramil peptitler [Muramil peptitler arasında N-asetil-muramil-L-treonil-D-izoglutamin (thr-MDP), N-asetil-normuramil-L-alanil-D-izoglutamin (nor-MDP), N-asetilmuramil-L-alanil-D-izoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glisero-3-hidroksifosforiloksi)-etilamin MTP-PE), vb. bulunur] veya bakteriyel hücre çeperi bileşenleri ile veya olmadan), örneğin (a) MF59™ [123. referansta 10. Bölüm; 124, 125], %5 Skualen, %0.5 Tween 80 ve %0.5 Span 85 ihtiva eder (isteğe bağlı olarak MTP-PE ihtiva eder), bir mikro-akışkanlaştırıcı kullanılarak mikron altı partiküller halinde formüle edilir, (b) SAF; %10 Skualen, %0.4 Tween

80, %5 pluronik bloke edilmiş polimer L121 ve thr-MDP ihtiva eder; bir mikron altı emülsiyon halinde mikro-akışkanlaştırılmış veya daha büyük partikül ebatlı bir emülsiyon üretmek üzere vortekslenmiştir ve (c) Rib™ adjuvan sistemi (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT); %2 Skualen, %0.2 Tween 80 ve monofosforilipit A (MPL), trehaloz dimikolat (TDM) ve hücre çeperi iskeletinden (CWS) oluşan gruptan seçilen bir veya daha fazla bakteriyel hücre çeperi bileşeni, tercihen MPL + CWS (Detox™) ihtiva eder; (3) saponin adjuvanlar [123. referansın 22. bölümü], örneğin QS21 veya Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), ya basit formda ya da bunlardan üretilmiş partiküller formunda, örneğin ISCOM'ler (immüno-uyarıcı kompleksler; 123. referansın 23. bölümü), bu ISCOMS, ilave deterjan içermeyebilir, örn., ref. 126; (4) Komple Freund Adjuvanı (CFA) ve Eksik Freund Adjuvanı (IFA); (5) sitokinler örneğin interlökinler (örn., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [127], vb.), interferonlar (örn., gamma interferon), makrofaj koloni uyarma faktörü (M-CSF), tümör nekroz faktörü (TNF), vb.; (6) monofosforil lipit A (MPL) veya 3-O-deasile edilmiş MPL (3dMPL) örn., 128 ve 129. referanslar, isteğe bağlı olarak pnömokok sakaritleri ile kullanıldığında önemli ölçüde alum içermez, örn., ref. 130; (7) 3dMPL'nin örneğin QS21 ve/veya su içinde yağ emülsiyonları ile kombinasyonları, örn. 131, 132 ve 133. referanslar; (8) CpG motifleri içeren oligonükleotitler (Roman ve arkadaşları, Nat. Med., 1997, 3, 849-854; Weiner ve arkadaşları, PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis ve arkadaşları, J. Immunol., 1998, 160, 870-876; Chu ve arkadaşları, J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631; Lipford ve arkadaşları, Eur. J. Immunol, 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu ve arkadaşları, Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Krieg ve arkadaşları,

Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman ve arkadaşları, PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballas ve arkadaşları, J. Immunol., 1996, 157, 1840-1845; Cowdery ve arkadaşları, J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575; Halpern ve arkadaşları, Cell.Immunol, 1996, 167, 72-78;

5 Yamamoto ve arkadaşları, Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey ve arkadaşları, J. Immunol., 1996, 157, 2116-2122; Messina ve arkadaşları, J. Immunol., 1991, 147, 1759-1764; Yi ve arkadaşları, J. Immunol., 1996, 157, 4918-4925; Yi ve arkadaşları, J. Immunol., 1996, 157, 5394-5402; Yi ve arkadaşları, J. Immunol., 1998, 160, 4755-4761; ve Yi ve arkadaşları, J. Immunol., 1998, 160, 5898-5906;

10 Uluslararası patent başvuruları WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 ve WO98/52581) yani en az bir CG dinükleotiti ihtiva eder ve isteğe bağlı olarak sitosin yerine 5-metilsitosin kullanılır; (8) bir polioksietilen eter veya bir polioksietilen ester örn., ref. 134; (9) bir oktoksinol [135] veya bir polioksietilen alkil eter ile kombinasyon halinde bir polioksietilen sorbitan ester surfektan veya en az bir ilave iyonik olmayan surfektan örneğin bir oktoksinol ile kombinasyon halinde ester surfektan [136]; (10) bir saponin ve bir immüno-uyarıcı

15 oligonükleotit (örn., bir CpG oligonükleotiti) [137]; (11) bir immüno-uyarıcı ve bir metal tuzu partikülü, örn., ref. 138; (12) bir saponin ve bir su içinde yağ emülsiyonu, örn. ref. 139; (13) bir saponin (örn., QS21) + 3dMPL + IL-12 (isteğe bağlı olarak + bir sterol) örn., ref. 140; (14) E. coli ısıya yatkın enterotoksin ("LT") veya bunun detoksifiye mutantları örneğin K63 veya R72 mutantları [örn., 141. referansın 5. Bölümü]; (15) kolera toksin ("CT") veya bunun detoksifiye mutantları [örn., 141. referansın 5. Bölümü]; (16) lipozomlar [123. referansın 13 ve 14. bölümleri]; (17) çitosan [örn.,

25

ref. 142]; (18) iki iplikçikli RNA; (19) mikropartiküller (yani ~100nm
 5 ila ~150µm çapında, daha fazla tercihen ~200nm ila ~30µm çapında
 ve en fazla tercihen ~500nm ila ~10µm çapında partiküller), biyo-
 degrade olabilen ve toksik olmayan materyallerden oluşturulmuş
 (örn., bir poli(α -hidroksi asit) örneğin poli(laktid-ko-glikolid), bir
 polihidroksibutirik asit, bir poliortoester, bir polianhidrid, bir
 polikaprolakton vb.), isteğe bağlı olarak (örn., SDS ile) negatif yüklü
 bir yüzeye veya (örn., bir katyonik deterjan, örneğin CTAB ile) pozitif
 10 yüklü bir yüzeye sahip olacak şekilde işleme tabi tutulmuştur; veya
 (20) kompozisyonun etkinliğini güçlendirmek için immüno-uyarıcı
 ajanlar olarak görev yapan diğer maddeler [örn., 123. referansın 7.
 bölümü].

Alüminyum tuzları (özellikle alüminyum fosfatlar ve/veya
 hidroksidler) ve MF59, mevcut buluşa ait sakarit antijenleri ile birlikte
 15 kullanılmak üzere tercih edilir. Bir alüminyum fosfat kullanıldığında
 bir veya daha fazla sakaritin alüminyum tuzu üzerine adsorbe edilmesi
 mümkündür, ancak sakaritlerin tuza adsorbe edilmesi tercih edilmez
 ve, çözelti içinde serbest fosfat iyonlarının dahil edilmesi (örn., bir
 fosfat tamponu kullanılarak) yoluyla sağlanır. Bir alüminyum
 20 hidroksid kullanıldığında sakaritlerin tuza adsorbe edilmesi tercih
 edilir. Adjuvan olarak alüminyum hidroksid kullanılması, A
 sero grubundan sakarit için özellikle avantajlıdır.

Buluşa ait kompozisyonlarda bazı antijenlerin bir alüminyum
 hidrokside adsorbe edilmesi, ancak diğer antijenlerin bir alüminyum
 25 fosfat ile birlikte bulunması mümkündür. Tetravalent N.meningitidis
 sero grubu kombinasyonları için örneğin aşağıdaki permütasyonlar
 mümkündür:

Serogrup	Alüminyum tuzu (H = bir hidroksid; P = bir fosfat)															
A	P	H	P	H	H	H	P	P	P	H	H	H	P	P	P	H
C	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
W135	P	H	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	P	P	H	P
Y	P	H	H	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P	P

Trivalent N.meningitidis serogrubu kombinasyonları için aşağıdaki permütasyonlar mümkündür:

Serogrup	Alüminyum tuzu (H = bir hidroksid; P = bir fosfat)								
C	P	H	H	H	P	P	P	H	
W135	P	H	H	P	H	P	H	P	
Y	P	H	P	H	H	H	P	P	

5

Formüle edildikten sonra buluşa ait kompozisyonlar süjeye direkt olarak uygulanabilir. Tedavi edilecek süjeler, hayvanlar olabilir; özellikle insan süjeler tedavi edilebilir. Aşılar çocukların ve ergenlerin 10 aşılınması için özellikle faydalıdır. Bunlar sistemik ve/veya mukozal yollarla verilebilir.

Tipik olarak immünojenik kompozisyonlar, sıvı çözeltiler veya süspansiyonlar şeklinde enjeksiyonluk ürünler olarak hazırlanır; enjeksiyon öncesinde sıvı araçlar içerisinde çözeltiye veya 15 süspansiyona uygun katı formlar da hazırlanabilir. Preparasyon ayrıca emülsife edilebilir veya adjuvan etkisini güçlendirmek için lipozomlar içinde kapsül haline getirilebilir. Kompozisyonların doğrudan verilmesi genellikle parenteral (örn., subkütan, intraperitonel, intravenöz veya intramüsküler yoldan enjeksiyon yoluyla veya bir 20 dokunun interstityal boşluğuna verilme suretiyle) yoldan olacaktır.

Kompozisyonlar ayrıca bir lezyon içine uygulanabilir. Diğer uygulama yolları arasında oral ve pulmoner uygulama, fitiller ve transdermal veya transkütan uygulamalar (örn., bakınız ref. 143), iğneler ve hipospreyler bulunur. Dozaj tedavisi, tek dozlu bir program veya çok dozlu bir program (örn., booster dozları içeren) olabilir.

Buluşa ait aşılar tercihen sterildir. Bunlar tercihen pirojensizdir. Bunlar tercihen örn., pH 6 ile pH 8 arasında, genellikle pH 7'de tamponlanır. Bir aşı bir alüminyum hidroksid tuzu içerdiğinde bir histidin tamponunun kullanılması tercih edilir [144].

10 Buluşa ait aşılar, düşük düzeylerde (örn., <0.01) bir deterjan (örn., bir Tween, örneğin Tween 80) içerebilir. Buluşa ait aşılar özellikle liyofilize edileceklerse örn., yaklaşık 15mg/ml'de bir şeker alkolü (örn., mannitol) veya trehaloz içerebilir.

Tek tek antiijenlerin optimum dozları deney yoluyla değerlendirilebilir.

15 Bununla birlikte genellikle buluşa ait sakarit antiijenleri, doz başına her sakaritten 0.1 ile 100µg arasında bir dozda uygulanacak olup tipik doz hacmi 0.5ml'dir. Doz tipik olarak doz başına sakarit başına 5 ile 20µg arasındadır. Bu değerler, sakarit olarak ölçülür.

20 Buluşa uygun aşılar ya profilaktik (yani enfeksiyonu önlemek için) veya terapötik (yani enfeksiyon sonrası hastalığı tedavi etmek için) olabilir, ancak tipik olarak profilaktik olacaktır.

Burada bir hastada bir immün tepkisinin yükseltilmesine yönelik, bir hastaya burada açıklanan bir aşının uygulanmasını içeren bir yöntem açıklanır. İmmün tepkisi tercihen meningokok hastalığına karşı koruyucudur ve bir humoral immün tepkisi ve/veya bir hücreli immün tepkisi içerebilir. Hasta tercihen bir çocuktur.

Yöntem, hali hazırda N. meningitidis'e karşı prime edilmiş bir hastada bir booster tepkisi oluşturabilir.

Buluş ayrıca buluşa ait bir konjüгатın, bir hayvanda bir immün tepkisinin yükseltilmesi amaçlı bir ilacın üretilmesinde kullanılmasını sunar. İlaç tercihen bir immünojenik kompozisyonudur (örn., bir aşıdır). İlaç tercihen bir Neisseria'nın (örn. menenjit, septisemi, gonorrhoea vb.), H.influenzae'nin (örn. otitis media, bronşit, pnömoni, selülit, perikardit, menenjit vb.) veya pnömokokların (örn. menenjit, sepsis, pnömoni vb.) neden olduğu bir hastalığın önlenmesine ve/veya tedavisine yöneliktir. Bu şekilde bakteriyel menenjitin önlenmesi ve/veya tedavisi tercih edilir.

10 Aşılar, standart hayvan modellerinde test edilebilir (örn., bakınız ref. 145).

Buluş ayrıca çökeltilmiş bir bakteriyel kapsüler polisakaritin çözünürleştirilmesine yönelik bir proses sunar, burada solvent olarak etanol kullanılır.

15

Tanımlar

"İçerir" terimi, "kapsar"ın yanı sıra "..den oluşur" anlamına da gelir, örn. X "içeren" bir kompozisyon, sadece X'ten oluşabilir veya başka bir ilave örn., X + Y içerebilir.

20 Sayısal bir x değeri ile ilişkili olarak "yaklaşık" terimi örneğin, $x \pm \%10$ anlamına gelir.

ÇİZİMLERİN KISA TARİFİ

25 Şekil 1, değiştirilen etanol:su oranlarının polisakarit çözünürleşmesi üzerindeki etkisini gösterir.

Şekil 2 ila 4, farelerde oligosakarit antiijenlere karşı elde edilen IgG titerlerini gösterir: Şekil 2, A serogrubu oligosakarit kullanılarak elde edilen sonuçları gösterir; Şekil 3, Y

serogrubuna ait sonuçları gösterir; ve Şekil 4, W135 serogrubuna ait sonuçları gösterir.

Şekil 5, farelerde A ve C serogrupları için oligosakarit konjüгатlarının bir karışımı ile elde edilen, II sonrası IgG titerlerini gösterir: Şekil 5a, anti-A serogrubu tepkilerini gösterir; ve Şekil 5b, anti-C serogrubu tepkilerini gösterir.

Şekil 6 ila 8, farelerde C, W135 ve Y serogrupları için oligosakarit konjüгатlarının bir karışımı ile elde edilen IgG titerlerini gösterir: Şekil 6, anti-W135 serogrubu tepkilerini gösterir; Şekil 7, anti-Y serogrubu tepkilerini gösterir ve Şekil 8, anti-C serogrubu tepkilerini gösterir.

Şekil 9 ila 11, farelerde A, C, W135 ve Y serogrupları için oligosakarit konjüгатlarının bir karışımı ile elde edilen, II sonrası IgG titerlerini gösterir: Şekil 9, anti-W135 serogrubu tepkilerini gösterir; Şekil 10, anti-Y serogrubu tepkilerini gösterir ve Şekil 11, anti-A serogrubu tepkilerini gösterir.

Şekil 12, farklı hidroliz sürelerinde test MenA polisakarit örnekleri kullanılarak elde edilen bir kalibrasyon eğrisidir. Eğri, polimerizasyon derecesi karşılığı ile optik rotatör güç arasındaki lineer ilişkiyi gösterir.

Şekil 13, farklı hidroliz sürelerinde test MenY polisakarit örnekleri kullanılarak elde edilen bir kalibrasyon eğrisidir. Eğri, polimerizasyon derecesi log'u ile KD (dağılım katsayısı) arasındaki lineer ilişkiyi gösterir.

Şekil 14 ila 16, farelerde şu serogruplar için oligosakarit konjüгатları ile immünizasyon sonrasında elde edilen, IgG alt sınıfına göre ayrılmış II sonrası IgG titerlerini gösterir: (14) A; (15) C; (16) W135 ve (17) Y.

Şekil 17, farelerde oligosakarit konjüгатlarının bir tetravalent karışımı ile immünizasyon sonrasında elde edilen, IgG alt sınıfına göre ayrılmış II sonrası IgG titerlerini gösterir.

Şekil 18, bir oligosakarit konjüгатının preparasyonunu açıklar.

- 5 Şekil 19, bir kobay modelinde elde edilen (A) anti-MenA ve (B) anti-MenC GMT'yi (\pm %95 güven aralıkları) gösterir. Çubukların üzerindeki değerler, serum bakterisit deneyi (SBA) titerleri, yani %50 öldürme veren serum seyreltisi karşılığıdır.

10 **BULUŞU GERÇEKLEŞTİRME ŞEKİLLERİ**

A. Meningokok polisakaritlerin üretilmesi ve saflaştırılması

- A, W135 ve Y serogruplarına ait meningokoklar, ortam olarak 150 ml Franz A ihtiva eden 500 ml'lik şişeler içinde 12 saat süreyle $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de büyütüldü. Çalkalama, 35 mm'lik atmalı Çalkalayıcı kullanılarak 150 rpm'ye ayarlandı. 85 ml kültür daha sonra ortam olarak Watson ihtiva eden 20 Litrelik bir fermentör içinde inoküle edildi.

- 18.5 saat (W135 ve Y) veya 16.5 saat (A) sonra, $\text{OD}=10^7$ 'a ulaşıldığında 300 ml formalin ilave edilerek fermentasyon kesildi ve ardından 2 saat inkübasyon yapıldı ve fermentör 10°C 'ye soğutuldu. Süpernatant, santrifüj, ardından filtreleme (0.22 μm) ve 30 kDa'lık bir membran ile ultra-filtreleme yoluyla toplandı.

- Ham konsantre polisakarit daha sonra 100 mg/ml'lik bir su çözeltisi halinde CTAB ilave edilerek çökeltildi. İlave edilen hacimler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. Oda sıcaklığında 12 saat sonra CTAB kompleksleri, santrifüj yoluyla geri kazanıldı. CTAB kompleksi, %95'lik bir etanol çözeltisi oda sıcaklığında 16-20 saat süreyle

şiddetli karıştırma altında ilave edilerek özümlendi. İlave edilen etanol hacmi aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Serogrup	CTAB hacmi (ml)	%95 etanol hacmi (ıslak macun kg'si başına litre)
A	475	3.5 ila 6
W135	200	4 ila 6
Y	650	3.4

Elde edilen süspansiyonlar, CUNO 10 SP derinlik filtresinden filtre edildi. Filtrat, bir CUNO zetacarbon™ kartuşundan $OD_{275nm} < 0.2$ olana kadar yeniden sirküle edildi. Daha sonra Z karbon filtratı toplandı ve 0.22µm'lik bir filtreden filtre edildi. En sonunda polisakarit, etanol fazından, bir CaCl₂ 2M su çözeltisi (10-12 ml/l EtOH nihai çözelti) ilave edilerek çökeltildi. Daha sonra saflaştırılan polisakarit, santrifüj yoluyla toplandı, %95 etanol ile yıkandı ve vakum altında kurutuldu. Diğer deneylerde özümleme için kullanılan nihai etanol konsantrasyonu değiştirildi (Şekil 1). A serogrubu polisakarit için %80 ile 95 aralığında etanol en etkili iken özümleme verimliliği, daha düşük yüzdelerde azalıyordu. W135 serogrubu için %75 ile 90 arasında etanol ile iyi özümleme sağlanırken %95 daha az etkiliydi. Y serogrubu için %75 ile 85 arasında etanol ile en iyi sonuçlar alınırken daha yüksek yüzdeler (örn., %90, %95) daha az etkiliydi. Genel olarak burada belirtilenlerin altındaki etanol yüzdelerinin, proteinler gibi kirleticilerin birlikte özümlemesini artırma eğilimi gösterdiği kaydedildi. Bu paragrafta verilen etanol yüzdeleri, nihai konsantrasyon (etanol + su toplam hacminin yüzdesi olarak etanol) şeklinde ifade edilir ve yaklaşık %50 santrifüj yoluyla kazanılan CTAB-polisakarit macunları içindeki su içeriğine dayanır (yani ıslak

macun kg'si başına 500g H₂O). Bu değer, küçük ölçekli deneylerde ampirik olarak belirlendi.

B. A serogrubu polisakaritlerin konjügasyonu

5 a) Hidroliz

A serogrubu meningokok polisakarit, 50mM sodyum asetat tamponu, pH 4.7 içinde yaklaşık 3 saat süreyle 73°C'de hidrolize edildi. Toplam organik fosfor ile monoester fosfat arasındaki (w/w) oranı ile belirlendiğinde ortalama polimerizasyon derecesi (DP) 10 olan
10 oligosakaritler elde edilecek şekilde hidroliz kontrol edildi. (Toplam organik fosfor) / (fosfor monoester) DP oranı, Şekil 12'de gösterildiği gibi optik rotatör güç α ile ters orantılıdır. Bu ilişki, hidroliz derecesini direkt fosfor ölçümlerinden daha elverişli şekilde izlemek için kullanılabilir.

15 b) Ebatlandırma

Bu adım, hidroliz prosesi sırasında üretilen kısa oligosakaritleri çıkarır. Yukarıda elde edilen hidrolizat, 30kDa kesmeli bir membrandan (12 diya-filtreleme hacminde 5 mM asetat tamponu, pH 6.5) ultra-filtrelendi. Yüksek Mw'li türler ihtiva eden tutuntu atıldı;
20 geçen kısım, asetat tamponu 5 mM, pH 6.5 içinde dengelenmiş bir Q-Sefaroz Hızlı Akış kolonuna yüklendi. Kolon daha sonra 5 kolon hacminde (CV) dengeleme tamponu ile, ardından 10 CV 5 mM asetat tamponu/125 mM NaCl pH 6.5 ile yıkanarak DP_≤6 olan oligosakaritler çıkarıldı. Ebatlandırılan oligosakarit daha sonra 5 CV
25 5mM asetat tamponu/0.5 M NaCl pH 6.5 ile elüte edildi.

Elüte edilen oligosakarit popülasyonunun ortalama DP'si yaklaşık 15'tir.

c) Bir birincil amino grubunun indirgeyici terminalden sokulması

Amonyum tuzu (asetat veya klorid), ebatlandırılan oligosakarit çözeltilisine, 49-300 g/L arasında değişen bir nihai konsantrasyon için ilave edildi, sonra sodyum-siyano-borohidrid, 12-73 g/L arasında
5 değişen bir nihai konsantrasyon için ilave edildi. pH, 6-7.3 arasına ayarlandıktan sonra karışım, 37°C'de 5 gün süreyle inkübe edildi.

Amino-oligosakaritler daha sonra 1kDa veya 3kDa kesmeli bir membran ile 13 diya-filtreleme hacminde 0.5 M NaCl, ardından 7 diya-filtreleme hacminde 20mM NaCl kullanılarak tanjant akışı ile
10 saflaştırıldı. Saflaştırılan amino-oligosakarit çözeltilisi, 146. referansın prosedürüne göre fosfor içeriği (antijenin bir kimyasal aktivitesi) ve 147. referansın prosedürüne göre sokulan amino grupları miktarı için analiz edildi.

Daha sonra saflaştırılan oligosakaritler, suyu çıkartmak üzere döner buharlaştırıcı ile kurutuldu.
15

d) Aktif estere türevlendirme

Kurutulan amino-oligosakaritler, damıtılmış su içinde 40mM amino grubu konsantrasyonunda çözünürleştirildi, sonra 9 hacim DMSO
20 ilave edildi, ardından trietil-amin 200mM nihai konsantrasyonda ilave edildi. Elde edilen çözeltiliye adipik asit N-hidroksisukinimido diester, 480 mM nihai konsantrasyon için ilave edildi.

Reaksiyon, oda sıcaklığında 2 saat süreyle karıştırma altında tutuldu, sonra aktifleştirilmiş oligosakarit, aseton (%80 v/v nihai konsantrasyon) ile çökeltildi. Çökelti santrifüj yoluyla toplandı ve
25 birkaç kez aseton ile yıkanarak reaksiyona girmemiş adipik asit N-hidroksisukinimido diester ve yan ürünler çıkarıldı. Son olarak aktifleştirilmiş oligosakarit vakum altında kurutuldu.

Oligosakarit yapı içine sokulan aktif ester grupları miktarı, 148. referansta tarif edilen bir kolorimetrik yöntem ile belirlendi.

e) CRM₁₉₇ 'ye konjügasyon

- 5 Kurutulmuş aktifleştirilmiş oligosakarit, 0.01M fosfat tamponu pH 7.2 içinde 45 mg/ml'lik bir CRM₁₉₇ çözeltisine, 12:1'lik bir ester/protein (mol/mol) oranı için ilave edildi. Reaksiyon, oda sıcaklığında bir gece süreyle karıştırma altında tutuldu. Bu süreden sonra konjüгат, hidrofobik kromatografi veya tanjant akışlı ultra-filtreleme yoluyla
- 10 saflaştırıldı. Saflaştırılan MenA-CRM₁₉₇ konjüгатı steril filtre edildi ve -20°C veya -60°C'de aşı formülasyonuna kadar saklandı.

Konjüгат, şunlar açısından analiz edildi: protein içeriği (MicroBCA Protein Deneyi), MenA sakarit içeriği (kolorimetrik fosfor analizi), serbest sakarit içeriği, HPLC profili (TSK jel G4000SW 7.5mm

15 IDx30cm üzerinde) ve SDS-PAGE. Tipik preparasyonların karakteristikleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Parti Kodu	Sakarit (mg/ml)	protein (mg/ml)	Glikosilasyon	KD
210201/A	0,257	0,864	0,3	0,489
210201/BS	0,308	1,354	0,23	0,503
210201BL	0,28	1,482	0,19	0,501
35I230595	0,138	0,3	0,46	
010900	0,092	0,337	0,27	
DP29	0,105	0,245	0,43	
A1 (Ebatlanmamış)	0,08	0,291	0,27	
A2 (Ebatlanmış)	0,446	2,421	0,18	

C. W135 serogrubu polisakaritlerin konjügasyonu

a) Hidroliz

W grubu meningokok polisakarit, asetik 50mM sodyum asetat tamponu, pH 4.7 içinde yaklaşık 3 saat süreyle 80°C’de hidrolize edildi. Bu, sialik asit (SA) ile indirgenmiş terminal SA arasındaki oran ile belirlenen yaklaşık 15 ila 20’lik ortalama DP’ye sahip oligosakaritler ile sonuçlandı.

(Toplam SA) / (indirgenmiş terminal SA) DP oranı, Şekil 13’te gösterildiği gibi HPLC-SEC ile belirlenen KD ile ilişkilidir. Bu ilişki, hidroliz derecesini direkt SA ölçümlerinden daha elverişli şekilde izlemek için kullanılabilir.

b) Ebatlandırma

Hidrolizat, 30kDa kesmeli bir membrandan (12 ila 20 diya-filtreleme hacminde 5 mM asetat tamponu /15-30 mM NaCl pH 6.5) ultra-filtrelendi. Yüksek MW’li türler ihtiva eden tutuntu atılırken geçen kısım, 5 mM asetat tamponu/ 15 mM NaCl pH 6.5 içinde dengelenmiş bir Q-Sefaroz Hızlı Akış kolonuna yüklendi. Kolon daha sonra 10 CV dengeleme tamponu ile yıkanarak $DP \leq 3-4$ olan oligosakaritler çıkarıldı ve 3 CV 5 mM asetat tamponu/500 mM NaCl pH 6.5 ile elüte edildi.

c) Bir birincil amino grubunun indirgeyici terminalden sokulması

Amonyum klorid veya amonyum asetat, ebatlandırılan oligosakarit çözeltisine, 300 g/L’lik bir nihai konsantrasyona kadar ilave edildi, sonra sodyum-siyano-borohidrid, 49g/L veya 73 g/L’lik nihai konsantrasyona kadar ilave edildi. Karışım, 50°C’de 3 gün süreyle inkübe edildi.

Amino-oligosakaritler daha sonra A serogrubu için tarif edilen tanjant akışlı ultra-filtreleme yoluyla saflaştırıldı. Saflaştırılan materyal, sialik asit (149. referansa göre kolorimetrik yöntem) ve/veya galaktoz (HPLC) içeriği (MenW135 antijeninin kimyasal aktiviteleri) açısından analiz edildi. Daha sonra saflaştırılan oligosakaritler, suyu çıkartmak üzere döner buharlaştırıcı ile kurutuldu.

d) Aktif estere türevlendirme

Kurutulan amino-oligosakaritler, yukarıda A serogrubu için tarif edildiği gibi türevlendirildi.

e) CRM₁₉₇'ye konjügasyon

Konjügasyon, yukarıda A serogrubu için tarif edildiği gibi yapıldı, ancak konjüгатı saflaştırmak için 30 kDa'lık bir membran kullanıldı (50 diya-filtre hacminde 10 mM fosfat tamponu, pH 7.2). Saflaştırılan konjüгат steril filtre edildi ve -20°C veya -60°C'de aşı formülasyonuna kadar saklandı.

Konjüгат, yukarıda A serogrubu için tarif edilenlerle aynı parametreler açısından analiz edildi. MenW sakarit içeriği, kolorimetrik sialik asit belirlemesi ile deneye tabi tutuldu:

Parti kodu	sakarit (mg/ml)	protein (mg/ml)	Glikosilasyon	KD
parti 1	5,73	3,52	1,63	0,296
parti 2/4,5	3,51	2,88	1,22	0,308
parti 3S	2,49	2,25	1,11	0,380
parti 3Sd	2,03	2,24	0,91	0,394
parti 3L	2,32	2,3	1,01	0,391
parti 3Ld	1,94	2,29	0,85	0,383

Parti 3S/pr. Glic6	0,363	0,82	0,44	0,498
Parti 3S/pr. Glic9	0,424	0,739	0,57	0,447
Parti 3S/pr. Glic12	0,479	0,714	0,671	0,414

D. Y serogrubu polisakaritlerin konjüasyonu

a) Hidroliz

5 Y grubu meningokok polisakarit, yukarıda W135 serogrubu için tarif edildiği gibi hidrolize edildi. Bu, SA ile indirgenmiş terminal SA arasındaki oran ile belirlenen (elverişli şekilde yukarıdaki C(a) kapsamında tarif edildiği gibi dolaylı yoldan ölçüldü) yaklaşık 15 ila 20'lik ortalama DP'ye sahip oligosakaritler verdi.

10 **b) Ebatlandırma, c) Amino grubunun sokulması, d) Aktif estere türevlendirme ve e) Konjüasyon**

Bu adımlar, yukarıda W135 serogrubu için tarif edildiği gibi yapıldı. Saflaştırılan konjüat steril filtre edildi ve -20°C veya -60°C'de aşılı formülasyonuna kadar saklandı.

15 Konjüat, yukarıda W135 serogrubu için tarif edilenlerle aynı şekilde analiz edildi.

Parti Kodu	sakarit (mg/ml)	protein (mg/ml)	Glikosilasyon	KD
parti 1A	1,16	0,92	1,26	0,303
parti 1B	4,57	3,55	1,29	0,339
Parti 2/4,5	2,32	6,1	0,38	0,467
parti 2/6	1,75	5,73	0,3	0,498

E. Tek tek konjüatların immünojenliği

20 Dondurulmuş dökme konjüatları eritildi. Her biri karıştırma altında 20µg sakarit/ml, 5mM fosfat, 9 mg/ml NaCl, alüminyum fosfat (0.6mg/ml'lik bir Al³⁺ konsantrasyonu verecek şekilde), pH 7.2'lik bir

nihai konsantrasyona kadar seyreltildi. Karışımlar daha sonra 2-8°C'de bir gece süreyle karıştırılmadan tutuldu ve tekrar fare immünizasyonu için tuz ile 4µg sakarit/ml'ye kadar seyreltildi.

Bir ikinci aşı seti, her serogrup için aynı şekilde hazırlandı, ancak alüminyum fosfat ilavesi, aynı hacimde su ile değiştirildi.

Her immünizasyon grubu için on Balb/c faresine 0.5 ml aşı, 0 ve 4. haftalarda iki kez s.c. enjekte edildi. İmmünizasyondan önce, ikinci dozdan önceki gün ve ikinci dozdan 2 hafta sonra kan alındı. İmmünizasyonlar, (a) alum'lu veya alum'suz konjüгат aşısı, (b) tuz kontrolü ve (c) konjüge edilmemiş polisakarit kontrolü ile yapıldı.

Spesifik anti-polisakarit IgG antikorları, immünize edilmiş hayvanların serumlarında esasen 150. referansta tarif edildiği gibi belirlendi. Her ayrı fare serumu, bir titrasyon eğrisi ile iki kez analiz edildi ve her immünizasyon grubu için GMT hesaplandı. Titerler, Fare Elisa Uniteleri (MEU) cinsinden 'Titerun' yazılımı (FDA) kullanılarak hesaplandı. Anti-polisakarit titeri spesifikliğı, rakip olarak ilgili polisakarit ile rekabetçi ELISA ile belirlendi.

Şekil 2'de gösterildiği gibi MenA konjüгатı, hayvanlarda yüksek antikor titerlerine neden oldu. Beklendiği gibi konjüge edilmemiş polisakarit, immünojenik değildi. Adjuvan olarak bir alüminyum fosfat bulunan konjüгат formülasyonu, tek başına konjüгат ile elde edilen titere kıyasla daha yüksek düzeyde antikorlara neden oldu. MenY (Şekil 3) ve MenW135 (Şekil 4) için benzer sonuçlar görüldü.

II sonrası immün tepkilerinin IgG alt sınıfı, çeşitli gruplar için ölçüldü. Spesifik alt sınıflar, yukarıdaki E bölümünde toplam IgG titerinin belirlenmesi için kullanılanla aynı ELISA yöntemi kullanılarak, ancak ikincil antikor olarak alkalın fosfataz-anti fare -IgG1, -IgG2a, -IgG2b veya -IgG3 (Zymed) kullanılarak belirlendi. Titerler, 30 dakika

süreyle substrat geliştirildikten sonra 1:3200 oranında seyreltilmiş serum kullanılarak elde edilen OD_{405nm} olarak ifade edildi ve Şekil 14 (MenA), 15 (MenW135) ve 16'da (MenY) gösterilir. Tepkiler asıl olarak IgG1 alt sınıfından olup bu da farelerde T'ye bağımlı antiijenlerin baskın şekilde neden olduğu alt sınıftır. Polisakaritler içsel olarak immünolojik hafıza sağlayamayan T'den bağımsız antiijenler olduğundan bu veriler, konjügasyonun arzu edilen etkiye sahip olduğunu gösterir.

II sonrası serumlar da bir in vitro deney kullanılarak bakterilerin komplement aracılı lizisini ölçmek için bakterisit aktivite açısından test edildi. II sonrası serumlar, deneyde kullanılmadan önce 30 dakika süreyle 56°C'de eylemsizleştirildi ve %25 yavru tavşan komplementi, komplement kaynağı olarak kullanıldı. Bakterisidal titer, aşağıdaki suşlara karşı bakterilerin %50 oranında öldürülmesini sağlayan karşılıklı serum seyreltisi olarak ifade edildi: MenA G8238, A1, F6124; MenW135 5554(OAc+) ve 242317(OAc-); MenY 242975(OAc-) ve 240539(OAc+).

MenA'ya yönelik sonuçlar şöyleydi:

Taşıyıcı	Poli/oligo sakarit	Yaklaş. α DP	Alüminyum adjuvan	GMT	Bakterisidal aktivite
CRM ₁₉₇	O	15	-	461	F8238: 2048-4096; F6124: 2048-4096
CRM ₁₉₇	O	15	fosfat	920	F8238: 4096; F6124: 4096
-	P	-	fosfat	3	F8238: 8; F6124: 128
CRM ₁₉₇	O	15	-	290	F8238: 512-1024
-	P	-	-	2	F8238: <4

CRM ₁₉₇	O	15	-	155	F8238: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	15	-	393	F8238: 1024
CRM ₁₉₇	O	15	-	396	-
CRM ₁₉₇	O	15	fosfat	1396	F8238: 4096
CRM ₁₉₇	O	15	fosfat	1461	F8238: 2048-4096
CRM ₁₉₇	O	15	fosfat	1654	F8238: 2048
CRM ₁₉₇	O	29	fosfat	1053	F8238: 2048
CRM ₁₉₇	ebatlanmamış O	10	fosfat	1449	F8238: 2048
CRM ₁₉₇	O	15	fosfat	626	F8238: 2048-4096
CRM ₁₉₇	O	15	-	742	-
CRM ₁₉₇	O	15	-	2207	-
CRM ₁₉₇	O	29	-	1363	-
CRM ₁₉₇	ebatlanmamış O	10	-	615	-
CRM ₁₉₇	O	15	fosfat	1515	-
CRM ₁₉₇	O	15	fosfat	876	-
CRM ₁₉₇	O	15	fosfat	1232	-
CRM ₁₉₇	O	15	fosfat	852	-
CRM ₁₉₇	O	15	fosfat	863	F8238: 2048; A1: 2048; F6124: >2048
CRM ₁₉₇	O	27	fosfat	1733	F8238: 4096-8192; F6124: 4096-8192
CRM ₁₉₇	O	15	fosfat	172	F8238: 1024; A1: 1024-2048; F6124: 2048
CRM ₁₉₇	O	15	hidroksid	619	F8238: 1024; A1: 2048; F6124: 2048

MenW135'e yönelik sonuçlar şöyleydi:

Taşıyıcı	Poli/oligo sakarit	OAc	Alüminyum adjuvan	GMT	Bakterisidal aktivite
CRM ₁₉₇	O	+	-	14	5554: 256-512
CRM ₁₉₇	O	+	fosfat	23	5554: 256-512
-	P		-	-	5554: 4
CRM ₁₉₇	O	+	-	45	5554: 1024
CRM ₁₉₇	O	+	-	101	5554: 64-128
CRM ₁₉₇	O	+	-	80	5554: 256-512
CRM ₁₉₇	O	+	fosfat	221	5554: 1024-2048; 242317: 1024-2048
CRM ₁₉₇	O	-	-	52	5554: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	-	fosfat	329	5554: 1024-2048; 242317:1024-2048
CRM ₁₉₇	O	+	-	41	5554: 256-512
CRM ₁₉₇	O	+	fosfat	24	5554: 1024; 242317: 128-256
CRM ₁₉₇	O	-	-	116	5554: 256-512
CRM ₁₉₇	O	-	fosfat	185	5554: 1024; 242317: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	+	fosfat	565	5554: 2048
CRM ₁₉₇	O	+	fosfat	328	5554: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	+	fosfat	490	5554: 1024-2048
CRM ₁₉₇	O	+	hidroksid	189	5554: 512-1024; 242317: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	+	fosfat	80	5554: 512-1024; 242317: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	+	hidroksid	277	5554: 512-1024; 242317: 1024-2048

MenY'ye yönelik sonuçlar şöyleydi:

Taşıyıcı	Poli/oligo sakarit	α DP	Alüminyum adjuvan	GMT	Bakterisidal aktivite
CRM ₁₉₇	O	>15	-	751	242975: 8192
CRM ₁₉₇	O	>15	fosfat	1190	242975: 8192-16384; 240539: 8192-16384
CRM ₁₉₇	O	>15	-	284	242975: 2048-4096
CRM ₁₉₇	O	>15	fosfat	775	242975: 2048-4096
-	P	-	-	-	242975: 256
CRM ₁₉₇	O	>15	-	1618	242975: 4096-8192
CRM ₁₉₇	O	>15	-	2123	242975: 2048
CRM ₁₉₇	O	<10	-	253	242975: 512-1024
CRM ₁₉₇	O	<10	-	1060	242975: 256-512
CRM ₁₉₇	O	>15	hidroksid	1167	242975: 8192; 240539: 8192-16384
CRM ₁₉₇	O	>15	fosfat	665	242975: 8192; 240539: 8192-16384
CRM ₁₉₇	O	>15	fosfat	328	242975: 4096; 240539: 2048-4096
CRM ₁₉₇	O	>15	hidroksid	452	242975: 2048; 240539: 1024-2048

F. MenC konjüгатı ile kombinasyon halinde MenA konjüгатının

5 immünojenikliği

CRM-MenC konsantre dökme (Chiron Vaccines, İtalya'dan), CRM-MenA konsantre dökme (yukarıda tarif edildiği gibi elde edilir) ile karıştırıldı, seyreltildi ve karıştırıldı. Üç farklı preparasyon yapıldı. Her biri, MenA için 20 μ g sakarit/ml ihtiva ediyordu, ancak farklı miktarlarda MenC konjüгатı dahil edildi: (i) 20 μ g sakarit/ml (ii) 10 μ g sakarit/ml; (iii) 5 μ g sakarit/ml. Böylelikle MenA:MenC (w/w) oranları şöyleydi: (i) 1:1; (ii) 2:1; (iii) 4:1.

Her preparasyon ayrıca 5mM sodyum fosfat, 9 mg/ml NaCl, alüminyum fosfat (0.6mg/ml'lik bir Al^{3+} konsantrasyonu verecek şekilde), pH 7.2 ihtiva ediyordu. Her karışım daha sonra 2-8°C'de bir gece süreyle karıştırılmadan tutuldu ve tekrar 1:5 oranında fare
5 immünizasyonundan önce tuz ile seyreltildi.

Bir ikinci aşı seti, aynı şekilde hazırlandı, ancak alüminyum fosfat ilavesi, aynı hacimde su ile değiştirildi.

Altı aşının her biri için on Balb/c faresi yukarıda tarif edildiği gibi immünize edildi. Kontrol grupları tuz veya tek başına MenA konjüгатı
10 aldı.

MenA ve MenC için anti-polisakarit antikorları yukarıda tarif edildiği gibi belirlendi.

MenA+MenC konjüгатlarının karışımı ile elde edilen sonuçlar, A ve C bileşenleri arasındaki oranın (w/w) MenA immünojenliği için çok
15 önemli bir rol oynadığını gösterir.

MenA konjüгат kontrolü ile elde edilen spesifik anti-MenApS titeri, aynı dozajda MenA+MenC kombinasyonundan daha yüksekti (alum adjuvanlı veya alum adjuvansız) (Şekil 5a). Kombinasyon içinde daha düşük miktarda bir MenC konjüгатı kullanıldığında MenA konjüгат
20 bileşeni tarafından daha iyi bir anti-MenApS titeri sağlanır. Aynı zamanda anti-MenC titeri kabul edilebilir kalır (Şekil 5b).

Ayrıca bir kobay modeli kullanılarak deneyler yapıldı. Yukarıdaki ile aynı alüminyum fosfat adjuvan (amorf hidroksifosfat, PO_4/Al molar oranı 0.84 ile 0.92, 0.6mg Al^{3+} /ml arasında) kullanılarak üç farklı
25 preparasyon yapıldı:

Preparasyon	Men A*	Men C*	MenA : MenC oranı
A	20 µg/ml	20 µg/ml	1 : 1
B	40 µg/ml	20 µg/ml	2 : 1
C	20 µg/ml	10 µg/ml	1 : ½
* Sakarit olarak ifade edilir			

Bu preparasyonlar, tuz ile 1:2 oranında seyreltildi ve kobayları immünize etmek için kullanıldı. Her immünizasyon grubu için beş kobaya (Hartelley suşu, dişi, 450-500 gram) 0.5 ml aşı, 0 ve 28. günlerde iki kez s.c. enjekte edildi. Birinci immünizasyondan önce ve sonra 42. günde kan alındı. Serumlar ELISA analizinden ve serum bakterisit deneyinden (MenA suşu MK 83/94 veya MenC suşu C11'e karşı) önce -70°C'de saklandı. Sonuçlar, Şekil 19'da gösterilmiştir.

10 G. C, W135 ve Y serogrupları için kombinasyon aşısı

C, W135 ve Y serogruplarından polisakaritlerin konjüгатları, yukarıda tarif edildiği gibi karıştırılarak her konjüгат için 20µg sakarit/ml'lik nihai konsantrasyon elde edildi. Aşı, 5mM sodyum fosfat ve 9 mg/ml NaCl, pH 7.2'lik bir nihai konsantrasyon ihtiva ediyordu. Bir gece süreyle saklandıktan sonra karışım, immünizasyon için her konjüгат için 4µg sakarit/ml ihtiva edecek şekilde seyreltildi.

İmmünizasyonlar ve analiz önceki gibi gerçekleşti.

Sonuçlar, MenW135 konjüгатının immünojenikliğinin, MenC ve MenY konjüгатları ile kombinasyon halinde uygulandığında, tek başına MenW135 konjüгатı ile elde edilene kıyasla daha yüksek olduğunu gösterir (Şekil 6). MenY immünojenliği, kombinasyon için tekli konjüгат ile elde edilene denkti (Şekil 7) ve ayrıca MenC konjüгатının immünojenliğine denkti (Şekil 8).

H. A, C, W135 ve Y serogrupları için kombinasyon aşısı

A, C, W135 ve Y serogruplarından polisakaritlerin konjüгатları, yukarıda tarif edildiği gibi karıştırılarak A, W135 ve Y serogrubu konjüгатları için 20µg sakarit/ml'lik ve C serogrubu konjüгат için 5µg sakarit/ml'lik nihai konsantrasyon elde edildi. Aşı, 5mM sodyum fosfat, 9 mg/ml NaCl, alüminyum fosfat (0.6mg/ml'lik bir Al³⁺ konsantrasyonu verecek şekilde), pH 7.2 nihai konsantrasyon ihtiva ediyordu. Karışım daha sonra 2-8°C'de bir gece süreyle karıştırılmadan tutuldu ve tekrar tuz ile A, W135 ve Y konjüгатları için 4µg sakarit/ml ve C konjüгатı için 1µg sakarit/ml verecek şekilde seyreltildi. Bu seyreltilen karışım immünizasyon için kullanıldı.

İmmünizasyonlar ve analiz, C serogrubu hariç tek tek konjüгатlar içeren kontrollerle yukarıdaki gibi gerçekleşti.

Şekil 9, önceki gibi MenW135 konjüгатının immünojenikliğinin, MenA, MenC ve MenY konjüгатları ile kombinasyon halinde uygulandığında güçlendiğini gösterir. Şekil 10, MenY konjüгатının immünojenikliğinin, MenA, MenC ve MenW135 konjüгатları ile kombinasyon halinde verildiğinde anlamlı düzeyde farklı olmadığını gösterir. Şekil 11, MenA konjüгатının immünojenikliğinin, MenC konjüгатı düşük bir dozajda (¼) uygulandığında bile kombinasyon içinde çarpıcı düzeyde azaldığını gösterir. Bu antijenik rekabet, konjüगे edilmemiş tetravalent (ACWY) polisakarit aşısında görülmez [5].

I. Liyofilize edilmiş A serogrubu antijen

A serogrubu N.meningitidis kapsüler polisakariti hidrolize özellikle açıktır. MenA kapsüler oligosakariti konjüгатları bu nedenle uygulama anında yeniden oluşturulmaya hazır, liyofilize edilmiş formda hazırlandı. Liyofilize edilmiş form, bir ünite dozu halinde

yeniden oluşturma sonrasında aşağıdaki kompozisyonu veren bileşenlere sahip olacak şekilde hazırlandı:

Bileşen	Konsantrasyon
CRM-MenA	20µg sakarit/ml
Potasyum fosfat tamponu	5 mM
Mannitol	15 mg/ml

Bu kompozisyonda adjuvan bulunmaz. Yeniden oluşturma için iki adjuvan hazırlandı:

Bileşen	Konsantrasyon	Konsantrasyon
Alüminyum hidroksid	0.68 mg Al ³⁺ /ml	-
Alüminyum fosfat*	-	0.6mg Al ³⁺ /ml
Sodyum fosfat tamponu	-	10 mM
Histidin tamponu	10 mM	-
Sodyum klorid	9 mg/ml	9 mg/ml
Tween 80	%0.005	%0.005
PH	7.2±0.05	7.2±0.05
* amorf hidroksifosfat, PO ₄ /Al molar oranı 0.84 ile 0.92 arasında		

Enjeksiyonluk su ile yeniden oluşturulduğunda sakarit bileşeninin stabilitesi şu şekilde idi:

Süre (gün)	2-8°C'de saklama			36-38°C'de saklama		
	Toplam sakarit (µg/ml)	Serbest sakarit (µg/ml)	Serbest sakarit %	Toplam sakarit (µg/ml)	Serbest sakarit (µg/ml)	Serbest sakarit %
0	17.72	1.04	5.9	17.72	1.04	5.9
15	17.01	0.88	5.2	16.52	2.26	13.7
30	17.82	0.89	5.0	17.29	2.64	15.3

Aynı 4 haftalık zaman skalasında pH, hem 2-8°C’de hem de 36-38°C’de 7.2’de stabildi, protein içeriği yaklaşık 24.5µg/ml’de stabildi ve nem içeriği %2.5’in altındaydı.

Alüminyum fosfat adjuvan çözeltisi ile yeniden oluşturulduğunda 2-8°C’de saklandığında stabilite şu şekildeydi:

Süre (saat)	Toplam sakarit (µg/ml)	Serbest sakarit (µg/ml)	Serbest sakarit %
0	16.62	1.09	6.6
24	16.51	0.98	5.9
48	16.83	0.99	5.9

J. A, C, W135 ve Y serogrupları için kombinasyon aşısı (liyofilize edilmiş A serogrubu konjüгатı)

- 10 Ya bir alüminyum hidroksid adjuvan (2mg/ml) üzerine adsorbe edilmiş ya da bir alüminyum fosfat adjuvanı ile karıştırılmış (amorf hidroksifosfat, PO₄/Al molar oranı 0.84 ile 0.92 arasında, 0.6mg/ml Al³⁺, 10mM fosfat tamponu varlığında) bir trivalent MenC, W135 ve Y bileşenleri karışımı hazırlandı. İki trivalent karışımın
- 15 kompozisyonları şu şekildeydi:

Bileşen	Konsantrasyon	Konsantrasyon
Alüminyum hidroksid	0.68 mg Al ³⁺ /Ml	-
Alüminyum fosfat*	-	0.6mg Al ³⁺ /ml
CRM-MenC	20µg sakarit/ml	20µg sakarit/ml
CRM-MenY	20µg sakarit/ml	20µg sakarit/ml
CRM-MenW135	20µg sakarit/ml	20µg sakarit/ml
Sodyum fosfat tamponu	-	10 mM
Histidin tamponu	10 mM	-

Sodyum klorid	9 mg/ml	9 mg/ml
Tween 80	%0.005	%0.005
* amorf hidroksifosfat, PO ₄ /Al molar oranı 0.84 ile 0.92 arasında		

Hidroksid karışımı için sakarit bileşenlerinin stabilitesi şöyleydi:

Süre (gün)	2-8°C'de saklama		36-38°C'de saklama	
	Serbest sakarit (µg/ml)	Serbest sakarit %	Serbest sakarit (µg/ml)	Serbest sakarit %
MenC dökme				
0	<1.2	<6	<1.2	<6
15	<1.2	<6	<1.2	<6
30	<1.2	<6	<1.2	<6
MenC şişe				
0	<1.2	<6	<1.2	<6
15	<1.2	<6	<1.2	<6
30	<1.2	<6	1.3	6.6
MenW135 dökme				
0	2.5	12.5	2.5	12.5
15	2.3	11.4	3.4	16.8
30	2.3	11.5	3.5	17.3
MenW135 şişe				
0	2.1	10.6	2.1	10.6
15	2.3	11.7	2.7	13.3
30	20.	10.2	3.3	16.3
MenY dökme				
0	1.7	8.3	1.7	8.3
15	<1.3	<6.3	2.0	10.2
30	1.3	6.3	2.4	12.2
MenY şişe				
0	1.4	7.1	1.4	7.1

15	1.5	7.6	2.1	10.7
30	1.3	6.3	2.9	14.3

Aynı 4 haftalık zaman skalasında pH, hem 2-8°C’de hem de 36-38°C’de 7.15±0.05’te stabildi.

5

Fosfat karışımı için sakarit bileşenlerinin stabilitesi şöyleydi:

Süre (gün)	2-8°C’de saklama			36-38°C’de saklama		
	Toplam sakarit (µg/ml)	Serbest sakarit (µg/ml)	Serbest sakarit %	Toplam sakarit (µg/ml)	Serbest sakarit (µg/ml)	Serbest sakarit %
MenC dökme						
0	22.8	<1.0	<5	22.8	<1.0	<5
15	17.2	<1.0	<5	18.6	<1.0	<5
30	18.9	<1.0	<5	20.5	<1.0	<5
MenC şişe						
0	20.5	<1.0	<5	20.5	<1.0	<5
15	18.3	<1.0	<5	23.4	<1.0	<5
30	18.0	<1.0	<5	20.5	<1.0	<5
MenW135 dökme						
0	20.7	2.0	10.4	20.7	2.0	10.4
15	21.9	2.3	11.6	21.2	2.1	10.3
30	19.6	2.1	10.6	21.0	2.4	11.8
MenW135 şişe						
0	23.4	1.7	8.4	23.4	1.7	8.4
15	21.2	1.9	9.5	20.1	2.2	11.1
30	20.1	2.2	11.2	21.3	3.2	16.1
MenY dökme						
0	19.1	<1.1	<5.3	19.1	<1.1	<5.3

15	20.1	1.4	6.8	18.7	1.3	6.4
30	18.6	1.4	7.6	19.2	1.7	8.3
MenY şişe						
0	21.4	<1.1	<5.3	21.4	<1.1	<5.3
15	19.6	1.4	6.8	19.0	1.5	7.4
30	17.7	1.2	6.2	18.4	1.9	9.4

Aynı 4 haftalık zaman skalasında pH, hem 2-8°C’de hem de 36-38°C’de 7.05±0.05’te stabildi.

- 5 Trivalent sıvı kompozisyonlar seyreltildi ve 0.5ml, liyofilize edilmiş MenA konjüгатını yeniden oluşturmak için kullanıldı. Elde edilen tetravalent karışım, grup başına on Balb/c faresine (dişi, 6-8 haftalık) 0 ve 28. günlerde subkütan enjeksiyon yoluyla uygulandı. Karışım, doz başına her sakarit konjüгатından 2µg ihtiva ediyordu, bu da tekli insan dozunun (SHD) 1/5’ini temsil eder. Kontroller, tuz veya konjüगे edilmemiş homolog polisakaritler idi. İmmünizasyondan önce ve sonra 42. günde kan alındı ve serumlar -70°C’de saklandı. IgG, yukarıda tarif edildiği gibi belirlendi.

Kullanılan tüm konjüгатlar hayvanlarda güvenli ve immünojenikti.

- 15 GMT II sonrası ELISA titerleri (%95 güven aralıklı) şu şekildeydi:

Aşı	Adjuvan	A	Y	W135	C
MenA (liyofilize edilmiş ve yeniden süspanse edilmiş)	Alüminyum fosfat	172 (69-439)	-	-	-
	Alüminyum hidroksid	619 (419-906)	-	-	-
MenY	Alüminyum fosfat	-	328 (147-731)	-	-

	Alüminyum hidroksid	-	452 (344-593)	-	-
MenW	Alüminyum fosfat	-	-	80 (28-225)	-
	Alüminyum hidroksid	-	-	277 (185-411)	-
MenC	Alüminyum fosfat	-	-	-	317 (152-659)
	Alüminyum hidroksid	-	-	-	723 (615-851)
MenA (liyofilize edilmiş) + MenC,W135,Y	Alüminyum fosfat	32 (15-68)	397 (252-627)	99 (35-288)	114 (53-246)
	Alüminyum hidroksid	206 (112-372)	141 (97-205)	139 (76-251)	163 (122-218)

Şekil 17, şunlar için IgG alt sınıf analizinin sonuçlarını gösterir: (17A) MenA; (17B) MenC; (17C) MenW135; ve (17D) MenY. IgG1 açıkça en öne çıkan alt sınıftır.

5 Serum bakterisit titerleri şu şekildeydi:

Aşı	Adjuvan	Anti-MenA			Anti-MenY		Anti-MenW135		Anti-MenC
		F8238	A1	F6124	242975	240539	5554	242317	C11
MenA (liyofilize edilmiş)	Alüminyum fosfat	512-1024	1024-2048	2048	-	-	-	-	-
	Alüminyum hidroksid	1024-2048	1024-2048	2048	-	-	-	-	-
MenY	Alüminyum fosfat	-	-	-	4096	2048-4096	-	-	-
	Alüminyum hidroksid	-	-	-	2048	1024-2048	-	-	-
MenW	Alüminyum fosfat	-	-	-	-	-	512	512-1024	-
	Alüminyum hidroksid	-	-	-	-	-	1024	1024-2048	-
MenC	Alüminyum fosfat	-	-	-	-	-	-	-	2048-4096
	Alüminyum hidroksid	-	-	-	-	-	-	-	4096
MenA (liyofilize edilmiş) +	Alüminyum fosfat	128-256	1024	1024-2048	2048	-	256-512	1024	512
MenC,W135,Y	Alüminyum hidroksid	512	1024-2048	1024-2048	2048-4096	-	256-512	1024	512-1024

K. A, C, W135 ve Y serogrupları için kombinasyon aşısı (farklı dozajlar)

Fareler yukarıda tarif edildiği gibi immünize edildi, ancak aşı kompozisyonları, çeşitli oligosakarit konjüгатlarını farklı oranlarda ihtiva ediyordu. Dozlar değişken şekilde 0.5, 1, 2 veya 4 µg/dozdu.

Liyofilize edilmiş MenA oligo-konjüгатı tüm deneylerde kullanıldı.

ELISA titerleri aşağıdaki gibiydi:

Antijen miktarı (µg/doz)				Alüminyum adjuvan	GMT ELISA (%95 güven aralığı)			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
4	2	2	2	Fosfat	177 (107-291)	367 (263-510)	239 (135-424)	239 (184-311)
4	2	2	2	Hidroksid	390 (313-486)	494 (345-706)	338 (266-430)	158 (96-260)
2	2	2	2	Fosfat	132 (59-296)	582 (268-1155)	143 (75-272)	247 (152-400)
2	2	2	2	Hidroksid	337 (239-476)	569 (462-679)	171 (117-251)	100 (59-169)
4	2	1	1	Fosfat	137 (47-397)	192 (88-421)	18 (4-75)	315 (174-571)
4	2	1	0.5	Fosfat	152 (85-271)	207 (100-428)	51 (21-125)	220 (125-388)
4	2	1	2	Fosfat	113 (49-263)	230 (98-540)	23 (6-91)	267 (81-877)
4	2	0.5	1	Fosfat	267 (109-656)	504 (300-847)	46 (15-134)	583 (330-1030)
4	2	2	1	Fosfat	87 (49-155)	118 (51-278)	24 (8-72)	214 (140-326)
2	2	1	1	Fosfat	217 (132-355)	514 (332-796)	110 (66-183)	206 (141-300)
2	2	1	0.5	Fosfat	105 (40-279)	381 (180-808)	90 (34-236)	206 (96-445)
2	2	1	2	Fosfat	155 (71-339)	374 (196-713)	53 (28-100)	502 (335-752)
2	2	0.5	1	Fosfat	224 (125-400)	358 (223-577)	43 (14-128)	624 (426-914)
2	2	2	1	Fosfat	180 (113-288)	306 (190-492)	70 (34-146)	423 (258-696)

Serum bakterisit titerleri şu şekildeydi:

Antijen miktarı (µg/doz)				Alüminyum m adjuvan	Bakterisit antikor titeri			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
4	2	2	2	Fosfat	256-512	1024-2048	1024-2048	4096-8192
4	2	2	2	Hidroksid	1024-2048	256-512	1024-2048	1024-2048
2	2	2	2	Fosfat	512-1024	1024-2048	128-256	8192-16384
2	2	2	2	Hidroksid	256	1024-2048	256	512-1024
4	2	1	1	Fosfat	512-1024	2048	128	2048-4096
4	2	1	0.5	Fosfat	512-1024	1024-2048	128	2048-4096
4	2	1	2	Fosfat	512-1024	2048-4096	128	8192-16384
4	2	0.5	1	Fosfat	1024-2048	8192	256-512	8192-16384
4	2	2	1	Fosfat	-	2048-4096	128	4096-8192
2	2	1	1	Fosfat	1024-2048	1024-2048	256	4096-8192
2	2	1	0.5	Fosfat	1024-2048	2048-4096	256-512	2048-4096
2	2	1	2	Fosfat	512-1024	1024-2048	128	8192-16384
2	2	0.5	1	Fosfat	1024-2048	2048	256-512	4096-8192
2	2	2	1	Fosfat	128-256	512-1024	64-128	1024-2048

- 5 Bir ikinci deney seti, MenA ve MenC için 2 µg/ml sakarit dozajı, MenY için bu dozajın yarısı ve MenW135 için çeyrek dozaj kullanılarak yapıldı. ELISA titerleri aşağıdaki gibiydi:

Antijen miktarı (µg/doz)				Alüminyum adjuvan	GMT ELISA (%95 güven aralığı)			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
2	2	2	2	Fosfat	32 (15-68)	114 (53-246)	99 (35-288)	397 (252-627)
				Hidroksid	206 (112-372)	163 (122-218)	139 (76-251)	141 (97-205)
2	2	1	0. 5	Fosfat	96 (49-187)	238 (101-561)	42 (20-89)	315 (114-867)
				Hidroksid	293 (144-597)	267 (158-451)	83 (43-163)	244 (152-392)

Serum bakterisit titerleri şu şekildeydi:

5

10

Antijen miktarı (µg/doz)				Alüminyum adjuvan	A			C	W135		Y
A	C	W	Y		F8238	A1	F6124	C11	5554	242317	242975
2	2	2	2	Fosfat	128-256	1024	1024-2048	512	256-512	1024	2048
				Hidroksid	512	1024-2048	1024-2048	512-1024	256-512	1024	2048-4096
2	2	1	0.5	Fosfat	256	-	1024-2048	512	256-512	1024	2048-4096
				Hidroksid	128	-	512-1024	512-1024	512-1024	1024	1024

L. MenA, W135 ve Y oligosakarit konjüatları

Aşağıdaki tablo, buluşa ait kombinasyon kompozisyonlarının yapılması için uygun MenA, MenW135 ve MenY konjüatlarına ait verileri gösterir:

	A	W135	Y
Ebatlandırma sonrası DP	16,6	21,9	21,1
Sakarit/protein oranı	0,5	1,1	0,7
KD	0,44	0,36	0,41
Serbest sakarit	5%	10%	5%
Serbest protein	<%2	<%2	<%2

REFERANSLAR

- [1] Frash (1990) sayfa 123-145, *Advances in Biotechnological Processes* cilt 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- [2] Armand ve arkadaşları, (1982) *J. Biol. Stand.* 10:335-339.
- 5 [3] Cadoz ve arkadaşları (1985) *Vaccine* 3:340-342.
- [4] *MMWR* (1997) 46(RR-5) 1-10.
- [5] Baklaic ve arkadaşları (1983) *Infect. Immun.* 42:599-604.
- [6] Costantino ve arkadaşları, (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- [7] WO02/00249
- 10 [8] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.
- [9] WO98/32873.
- [10] ABD patenti 4,753,796.
- [11] Avrupa patenti 0072513 .
- [12] UK patent başvurusu 0207117.3.
- 15 [13] Pon ve arkadaşları, (1997) *J Exp Med* 185:1929-1938.
- [14] Ravenscroft ve arkadaşları, (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- [15] Ramsay ve arkadaşları, (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [16] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [17] Buttery & Mokson (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- 20 [18] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- [19] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [20] Avrupa patenti 0477508.
- [21] ABD patenti 5,306,492.
- 25 [22] WO98/42721.
- [23] Dick ve arkadaşları, *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse ve arkadaşları) Karger, Basel, 1989, Cilt 10, sayfa 48-114.

- [24] Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [25] Anonymous (Ocak 2002) Research Disclosure, 453077.
- [26] Anderson (1983) Infect Immun 39(1):233-238.
- 5 [27] Anderson ve arkadaşları, (1985) J Clin Invest 76(1):52-59.
- [28] EP-A-0372501.
- [29] EP-A-0378881.
- [30] EP-A-0427347.
- [31] WO93/17712
- 10 [32] WO94/03208.
- [33] WO98/58668.
- [34] EP-A-0471177.
- [35] WO91/01146
- [36] Falugi ve arkadaşları, (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
- 15 [37] WO00/56360.
- [38] WO00/61761.
- [39] WO99/42130
- [40] WO96/40242
- [41] Lees ve arkadaşları, (1996) Vaccine 14:190-198.
- 20 [42] WO95/08348.
- [43] ABD patenti 4,882,317
- [44] ABD patenti 4,695,624
- [45] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
- [46] EP-A-0208375
- 25 [47] WO00/10599
- [48] Gever ve arkadaşları, Med. Microbiol. Immunol, 165: 171-288 (1979).
- [49] ABD patenti 4,057,685.

- [50] ABD patentleri 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [51] ABD patenti 4,459,286.
- [52] ABD patenti 4,965,338
- [53] ABD patenti 4,663,160.
- 5 [54] ABD patenti 4,761,283
- [55] ABD patenti 4,356,170
- [56] Lei ve arkadaşları, (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
- [57] WO00/38711; ABD patenti 6,146,902.
- [58] McLeod Griffiss ve arkadaşları, (1981) *Infect. Immun.* 34:725-
- 10 732.
- [59] WO99/24578.
- [60] WO99/36544.
- [61] WO99/57280.
- [62] WO00/22430.
- 15 [63] Tettelin ve arkadaşları, (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [64] Pizza ve arkadaşları, (2000) *Science* 287:1816-1820.
- [65] WO01/52885 .
- [66] Bjune ve arkadaşları, (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- [67] Fukasawa ve arkadaşları, (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- 20 [68] Rosenquist ve arkadaşları, (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- [69] WO96/14086 .
- [70] Covacci & Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592.
- [71] WO93/18150 .
- [72] Covacci ve arkadaşları, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:
- 25 5791-5795.
- [73] Tummuru ve arkadaşları, (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809.
- [74] Marchetti ve arkadaşları, (1998) *Vaccine* 16:33-37.
- [75] Telford ve arkadaşları, (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.

- [76] Evans ve arkadaşları, (1995) *Gene* 153:123-127.
- [77] WO96/01272 & WO96/01273, özellikle SEK.KİM.NO:6.
- [78] WO97/25429.
- [79] WO98/04702.
- 5 [80] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [81] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [82] Jedrzejak (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [83] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [84] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- 10 [85] Gerlich ve arkadaşları, (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [86] WO93/24148 .
- [87] Costantino ve arkadaşları, (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [88] WO97/00697 .
- [89] Hsu ve arkadaşları, (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- 15 [90] WO02/02606 .
- [91] Kalman ve arkadaşları, (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- [92] Read ve arkadaşları, (2000) *Nucleik Acids Res* 28:1397-406.
- [93] Shirai ve arkadaşları, (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.
- 20 [94] WO99/27105
- [95] WO00/27994.
- [96] WO00/37494.
- [97] WO99/28475.
- [98] Ross ve arkadaşları, (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- 25 [99] Sutter ve arkadaşları, (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [100] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [101] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.

- [102] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Ocak 16;47(1):12, 19.
- [103] Aşılar (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [104] McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S101-107.
- [105] Schuchat (1999) Lancet 353(9146):51-6.
- 5 [106] WO02/34771
- [107] Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-43, viii.
- [108] Ferretti ve arkadaşları, (2001) PNAS USA 98: 4658-4663.
- [109] Kuroda ve arkadaşları, (2001) Lancet 357(9264):1225-1240; bakınız ayrıca sayfa 1218-1219.
- 10 [110] Anderson (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S59-65.
- [111] Kahn (2000) Curr Opin Pediatr 12:257-262.
- [112] Crowe (1995) Vaccine 13:415-421.
- [113] J Toxicol Clin Toxicol (2001) 39:85-100.
- [114] Demicheli ve arkadaşları, (1998) Vaccine 16:880-884.
- 15 [115] Stepanov ve arkadaşları, (1996) J Biotechnol 44:155-160.
- [116] Wassilak & Orenstein, Bölüm 4, Vaccines (eds. Plotkin & Mortimer), 1988.
- [117] Gustafsson ve arkadaşları, (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
- [118] Rappuoli ve arkadaşları, (1991) TIBTECH 9:232-238.
- 20 [119] WO97/28273.
- [120] Lieberman ve arkadaşları, (1996) JAMA 275:1499-1503.
- [121] WO00/56365 .
- [122] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th ed ISBN: 0683306472
- 25 [123] Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [124] WO90/14837.
- [125] ABD patenti 6,299,884.

- [126] WO00/07621.
[127] WO99/44636.
[128] GB-2220221.
[129] EP-A-0689454.
5 [130] WO00/56358.
[131] EP-A-0835318.
[132] EP-A-0735898.
[133] EP-A-0761231.
[134] WO99/52549.
10 [135] WO01/21207.
[136] WO01/21152.
[137] WO00/62800.
[138] WO00/23105.
[139] WO99/11241.
15 [140] WO98/57659.
[141] Del Giudice ve arkadaşları, (1998) *Molecular Aspects of Medicine*, cilt 19, sayı 1.
[142] WO99/27960.
[143] WO98/20734.
20 [144] UK patent başvurusu 0118249.2.
[145] WO01/30390.
[146] Chen ve arkadaşları, (1956) *Anal. Chem.* (1956) 28:1756-1758.
[147] Habeeb ve arkadaşları, (1966) *Anal. Biochem.* 14:328-336.
[148] Miron & Wilchek (1982) *Anal. Biochem.* 126:433-435.
25 [149] Svennerholm (1957) *Biochem. Biophys. Acta* 24:604-611.
[150] Carlone ve arkadaşları, (1992) *J.Clin. Microbiol.* 30:154-159.

TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- EP 0072513 B1 [0007]
- WO 02058737 A2 [0007]
- WO 9640242 A1 [0007]
- WO 9602555 A [0062]
- WO 9816247 A [0062]
- WO 9818810 A [0062]
- WO 9840100 A [0062]
- WO 9855495 A [0062]
- WO 9837919 A [0062]
- WO 9852581 A [0062]
- WO 0200249 A [0148]
- WO 9832873 A [0148]
- US 4753796 A [0148]
- EP 0072513 A [0148]
- GB 0207117 A [0148]
- EP 0477508 A [0148]
- US 5306492 A [0148]
- WO 9842721 A [0148]
- EP 0372501 A [0148]
- EP 0378881 A [0148]
- EP 0427347 A [0148]
- WO 9317712 A [0148]
- WO 9403208 A [0148]
- WO 9858668 A [0148]
- EP 0471177 A [0148]
- WO 9101146 A [0148]
- WO 0056360 A [0148]
- WO 0061761 A [0148]
- WO 9942130 A [0148]
- WO 9640242 A [0148]
- WO 9508348 A [0148]
- US 4882317 A [0148]
- US 4695624 A [0148]
- EP 0208375 A [0148]
- US 6146902 A [0148]
- WO 9924578 A [0148]
- WO 9936544 A [0148]
- WO 9957280 A [0148]
- WO 0022430 A [0148]
- WO 0152885 A [0148]
- WO 9614086 A [0148]
- WO 9318150 A [0148]
- WO 9601272 A [0148]
- WO 9601273 A [0148]
- WO 9725429 A [0148]
- WO 9804702 A [0148]
- WO 9324148 A [0148]
- WO 9700697 A [0148]
- WO 0202606 A [0148]
- WO 9927105 A [0148]
- WO 0027994 A [0148]
- WO 0037494 A [0148]
- WO 9928475 A [0148]
- WO 0234771 A [0148]
- WO 9728273 A [0148]
- WO 0056365 A [0148]
- WO 9014837 A [0148]
- US 6299884 B [0148]
- WO 0007621 A [0148]
- WO 9944636 A [0148]
- GB 2220221 A [0148]
- EP 0689454 A [0148]
- WO 0056358 A [0148]
- EP 0835318 A [0148]
- EP 0735898 A [0148]
- EP 0761231 A [0148]
- WO 9952549 A [0148]
- WO 0121207 A [0148]

- WO 0010599 A [0148]
- US 4057685 A [0148]
- US 4673574 A [0148]
- US 4761283 A [0148]
- US 4808700 A [0148]
- US 4459286 A [0148]
- US 4965338 A [0148]
- US 4663160 A [0148]
- US 4356170 A [0148]
- WO 0038711 A [0148]
- WO 0121152 A [0148]
- WO 0062800 A [0148]
- WO 0023105 A [0148]
- WO 9911241 A [0148]
- WO 9857659 A [0148]
- WO 9927960 A [0148]
- WO 9820734 A [0148]
- GB 0118249 A [0148]
- WO 0130390 A [0148]

Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

- **LEI QP et al.** Developments in Biologicals, 2000, vol. 103, 259-264 [0007]
- **ROMAN et al.** Nat. Med., 1997, vol. 3, 849-854 [0062]
- **WEINER et al.** PNAS USA, 1997, vol. 94, 10833-10837 [0062]
- **DAVIS et al.** J. Immunol, 1998, vol. 160, 870-876 [0062]
- **CHU et al.** J. Exp. Med., 1997, vol. 186, 1623-1631 [0062]
- **LIPFORD et al.** Eur. J. Immunol, 1997, vol. 27, 2340-2344 [0062]
- **MOLDOVEANU et al.** Vaccine, 1988, vol. 16, 1216-1224 [0062]
- **KRIEG et al.** Nature, 1995, vol. 374, 546-549 [0062]
- **KLINMAN et al.** PNAS USA, 1996, vol. 93, 2879-2883 [0062]
- **BALLAS et al.** J. Immunol, 1996, vol. 157, 1840-1845 [0062]
- **COWDERY et al.** J. Immunol, 1996, vol. 156, 4570-4575 [0062]
- **HALPERN et al.** Cell. Immunol., 1996, vol. 167, 72-78 [0062]
- **YAMAMOTO et al.** Jpn. J. Cancer Res., 1988, vol. 79, 866-873 [0062]
- **STACEY et al.** J. Immunol., 1996, vol. 157, 2116-2122 [0062]
- **MESSINA et al.** J. Immunol, 1991, vol. 147, 1759-1764 [0062]
- **YI et al.** J. Immunol., 1996, vol. 157, 4918-4925 [0062]
- **YI et al.** J. Immunol., 1996, vol. 157, 4918-4925 [0062]
- **GOLDBLATT.** J. Med. Microbiol., 1998, vol. 47, 563-567 [0148]
- **DICK et al.** Conjugate Vaccines. 1989, vol. 10, 48-114 [0148]
- **HERMANSON.** Bioconjugate Techniques. Academic Press, 1996 [0148]
- **ANONYMOUS.** Research Disclosure, January 2002, 453077 [0148]
- **ANDERSON.** Infect Immun, 1983, vol. 39 (1), 233-238 [0148]
- **ANDERSON et al.** J Clin Invest, 1985, vol. 76 (1), 52-59 [0148]
- **FALUGI et al.** Eur J Immunol, 2001, vol. 31, 3816-3824 [0148]
- **LEES et al.** Vaccine, 1996, vol. 14, 190-198 [0148]
- Mol. Immunol., 1985, vol. 22, 907-919 [0148]
- **GEVER et al.** Med. Microbiol. Immunol, 1979, vol. 165, 171-288 [0148]
- **LEI et al.** Dev Biol (Basel), 2000, vol. 103, 259-264 [0148]
- **MCLEOD GRIFFISS et al.** Infect. Immun., 1981, vol. 34, 725-732 [0148]
- **TETTELIN et al.** Science, 2000, vol. 287, 1809-1815 [0148]
- **PIZZA et al.** Science, 2000, vol. 287, 1816-1820 [0148]
- **BJUNE et al.** Lancet, 1991, vol. 338 (8775), 1093-1096 [0148]
- **FUKASAWA et al.** Vaccine, 1999,

- 5394-5402 [0062]
- **YI et al.** J. Immunol., 1998, vol. 160, 4755-4761 [0062]
 - **YI et al.** J. Immunol., 1998, vol. 160, 5898-5906 [0062]
 - **FRASH.** Advances in Biotechnological Processes. 1990, vol. 13, 123-145 [0148]
 - **ARMAND et al.** J. Biol. Stand., 1982, vol. 10, 335-339 [0148]
 - **CADOZ et al.** Vaccine, 1985, vol. 3, 340-342 [0148]
 - MMWR, 1997, vol. 46 (RR-5), 1-10 [0148]
 - **BAKLAIC et al.** Infect. Immun., 1983, vol. 42, 599-604 [0148]
 - **COSTANTINO et al.** Vaccine, 1992, vol. 10, 691-698 [0148]
 - **INZANA.** Infect. Immun., 1987, vol. 55, 1573-1579 [0148]
 - **PON et al.** J Exp Med, 1997, vol. 185, 1929-1938 [0148]
 - **RAVENSROFT et al.** Vaccine, 1999, vol. 17, 2802-2816 [0148]
 - **RAMSAY et al.** Lancet, 2001, vol. 357 (9251), 195-196 [0148]
 - **LINDBERG.** Vaccine, 1999, vol. 17 (2), 28-36 [0148]
 - **BUTTERY ; MOXON.** J R Coll Physicians Lond, 2000, vol. 34, 163-168 [0148]
 - **AHMAD ; CHAPNICK.** Infect Dis Clin North Am, 1999, vol. 13, 113-133 [0148]
 - **KALMAN et al.** Nature Genetics, 1999, vol. 21, 385-389 [0148]
 - **READ et al.** Nucleic Acids Res, 2000, vol. 28, 1397-406 [0148]
 - **SHIRAI et al.** J. Infect. Dis., 2000, vol. 181 (3), S524-S527 [0148]
 - **ROSS et al.** Vaccine, 2001, vol. 19, 4135-4142 [0148]
 - **SUTTER et al.** Pediatr Clin North Am, 2000, vol. 47, 287-308 [0148]
 - **ZIMMERMAN ; SPANN.** Am Fam Physician, 1999, vol. 59, 113-118, 125-126 [0148]
 - **DREESEN.** Vaccine, 1997, vol. 15, vol. 17, 2951-2958 [0148]
 - **ROSENQVIST et al.** Dev. Biol. Stand., 1998, vol. 92, 323-333 [0148]
 - **COVACCI ; RAPPUOLI.** J. Exp. Med., 2000, vol. 19, 587-592 [0148]
 - **COVACCI et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, vol. 90, 5791-5795 [0148]
 - **TUMMURU et al.** Infect. Immun., 1994, vol. 61, 1799-1809 [0148]
 - **MARCHETTI et al.** Vaccine, 1998, vol. 16, 33-37 [0148]
 - **TELFORD et al.** J. Exp. Med., 1994, vol. 179, 1653-1658 [0148]
 - **EVANS et al.** Gene, 1995, vol. 153, 123-127 [0148]
 - **WATSON.** Pediatr Infect Dis J, 2000, vol. 19, 331-332 [0148]
 - **RUBIN.** Pediatr Clin North Am, 2000, vol. 47, 269-285 [0148]
 - **JEDRZEJAS.** Microbiol Mol Biol Rev, 2001, vol. 65, 187-207 [0148]
 - **BELL.** Pediatr Infect Dis J, 2000, vol. 19, 1187-1188 [0148]
 - **IWARSON.** APMIS, 1995, vol. 103, 321-326 [0148]
 - **GERLICH et al.** Vaccine, 1990, vol. 8 (S63-68), 79-80 [0148]
 - **COSTANTINO et al.** Vaccine, 1999, vol. 17, 1251-1263 [0148]
 - **HSU et al.** Clin Liver Dis, 1999, vol. 3, 901-915 [0148]
 - **CROWE.** Vaccine, 1995, vol. 13, 415-421 [0148]
 - **J Toxicol Clin Toxicol,** 2001, vol. 39, 85-100 [0148]
 - **DEMICHELI et al.** Vaccine, 1998, vol. 16, 880-884 [0148]
 - **STEPANOV et al.** J Biotechnol, 1996, vol. 44, 155-160 [0148]
 - **WASSILAK ; ORENSTEIN.** Vaccines. 1988 [0148]
 - **GUSTAFSSON et al.** N. Engl. J. Med., 1996, vol. 334, 349-355 [0148]
 - **RAPPUOLI et al.** TIBTECH, 1991, vol. 9, 232-238 [0148]

S2-6 [0148]

- MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 16 January 1998, vol. 47 (1), 12, , 19 [0148]
- Vaccines. 1988 [0148]
- MCMICHAEL. Vaccine, 2000, vol. 19 (1), 101-107 [0148]
- SCHUCHAT. Lancet, 1999, vol. 353 (9146), 51-6 [0148]
- DALE. Infect Dis Clin North Am, 1999, vol. 13, 227-43 [0148]
- FERRETTI et al. PNAS USA, 2001, vol. 98, 4658-4663 [0148]
- KURODA et al. Lancet, 2001, vol. 357 (9264), 1225-1240 [0148]
- ANDERSON. Vaccine, 2000, vol. 19 (1), 59-65 [0148]
- KAHN. Curr Opin Pediatr, 2000, vol. 12, 257-262 [0148]
- LIEBERMAN et al. JAMA, 1996, vol. 275, 1499-1503 [0148]
- GENNARO. Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 2000 [0148]
- Vaccine Design... Plenum, 1995 [0148]
- DEL GIUDICE et al. Molecular Aspects of Medicine, 1998, vol. 19 (1 [0148]
- CHEN et al. Anal. Chem., 1956, vol. 28, 1756-1758 [0148]
- HABEEB et al. Anal. Biochem., 1966, vol. 14, 328-336 [0148]
- MIRON; WILCHEK. Anal. Biochem., 1982, vol. 126, 433-435 [0148]
- SVENNERHOLM. Biochem. Biophys. Acta, 1957, vol. 24, 604-611 [0148]
- CARLONE et al. J.Clin. Microbiol., 1992, vol. 30, 154-159 [0148]

ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI

ŞEKİL 1

A = Özümlemiş materyal %'si

5

ŞEKİL 2

B = I sonrası

C = II sonrası

D = MenA konjüгатı, ebatlandırılmış

10 E = MenA konjüгатı, ebatlandırılmış/AlPO₄

F = MenA konjüгатı pS/AlPO₄

G = Tuz/AlPO₄

ŞEKİL 3

15 H = MenY konjüгатı, ebatlandırılmış

I = MenY konjüгатı, ebatlandırılmış/AlPO₄

J = MenY konjüгатı pS/AlPO₄

ŞEKİL 4

20 K = MenW135 konjüгатı, ebatlandırılmış

L = MenW135 konjüгатı, ebatlandırılmış/AlPO₄

M = MenW135 konjüгатı pS/AlPO₄

ŞEKİL 5a

25 N = MenA-CRM konj. (2ug/doz)

O = MenA-CRM (2ug/doz)+ MenC-CRM (2ug/doz)

P = MenA-CRM (2ug/doz)+ MenC-CRM (1ug/doz)

R = MenA-CRM (2ug/doz)+ MenC-CRM (0.5ug/doz)

S = MenA-CRM (2ug/doz)/AlPO₄

T = MenA-CRM (2ug/doz)+ MenC-CRM (2ug/doz)/AlPO₄

U = MenA-CRM (2ug/doz)+ MenC-CRM (1ug/doz)/AlPO₄

V = MenA-CRM (2ug/doz)+ MenC-CRM (0.5ug/doz)/AlPO₄

5 **ŞEKİL 5b**

Y = MenA-CRM konj. (2ug/doz)/Al(OH)₃

ŞEKİL 6

Z = MenW konjüгатı

10 A1 = MenW konjüгатı+ MenC konjüгатı+ MenY konjüгатı

B1 = MenW pS/AlPO₄

ŞEKİL 7

C1 = MenY konjüгатı

15 D1 = MenY konjüгатı+ MenC konjüгатı+ MenW konjüгатı

E1 = MenY pS/AlPO₄

F1 = Tuz

ŞEKİL 9

20 G1 = MenW konjüгатı /AlPO₄

ŞEKİL 17A

H1 = Fosfat

I1 = Hidroksid

25

ŞEKİL 18

J1 = Polisakkarit

K1 = Hidroliz

L1 = İyon alışverişi "Ebatlandırma"

M1 = İndirgeyici aminasyon

N1 = Aktivasyon

O1 = Birleştirme

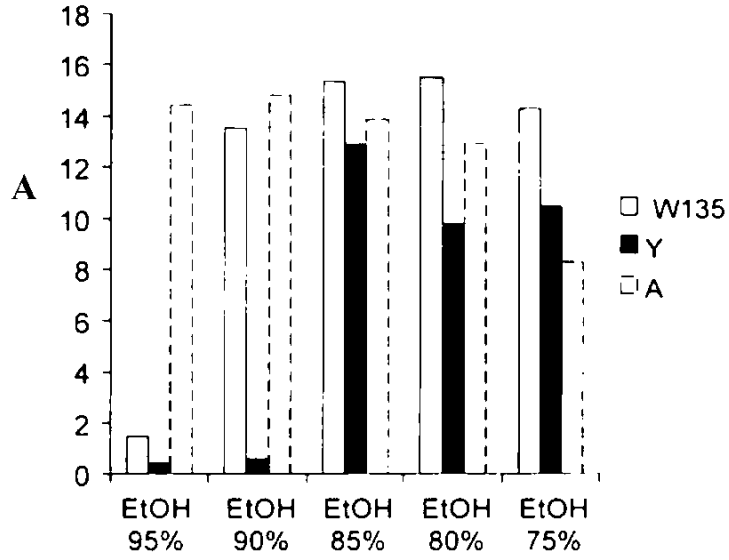
5

10

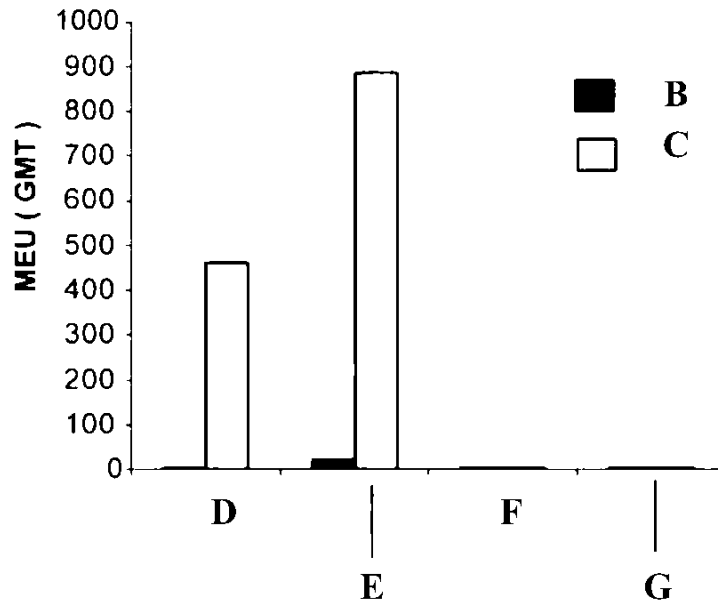
15

20

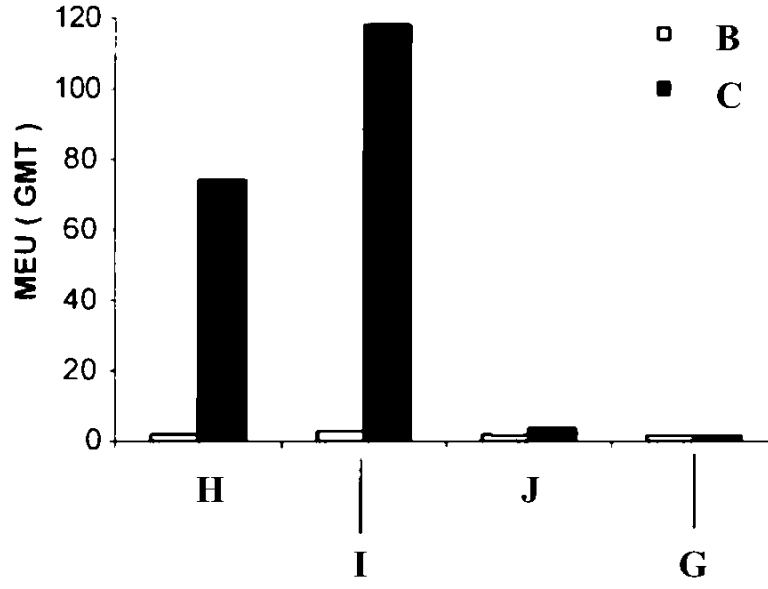
ŞEKİL 1



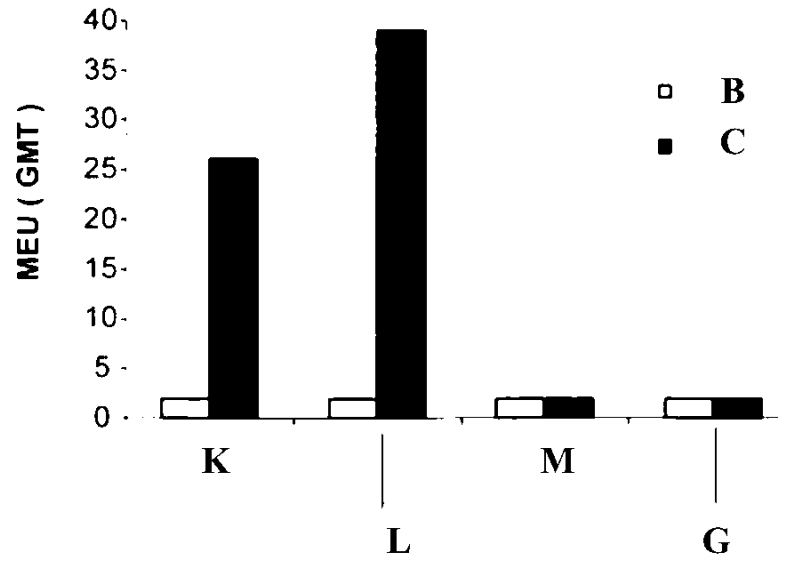
ŞEKİL 2



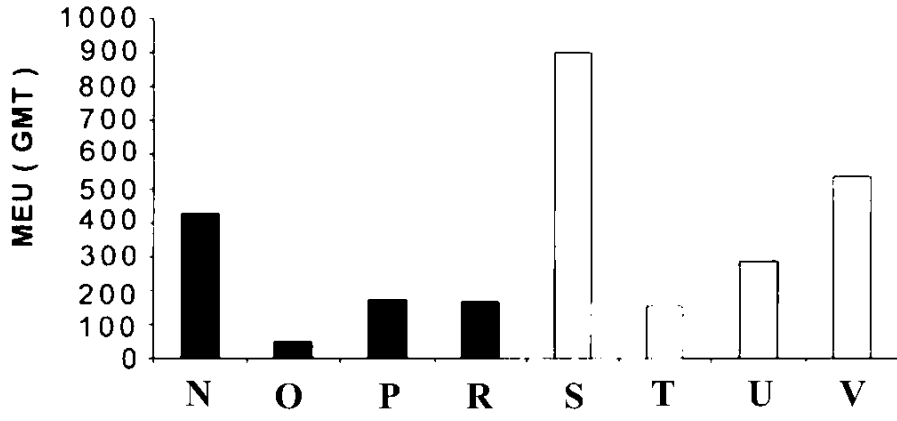
ŞEKİL 3



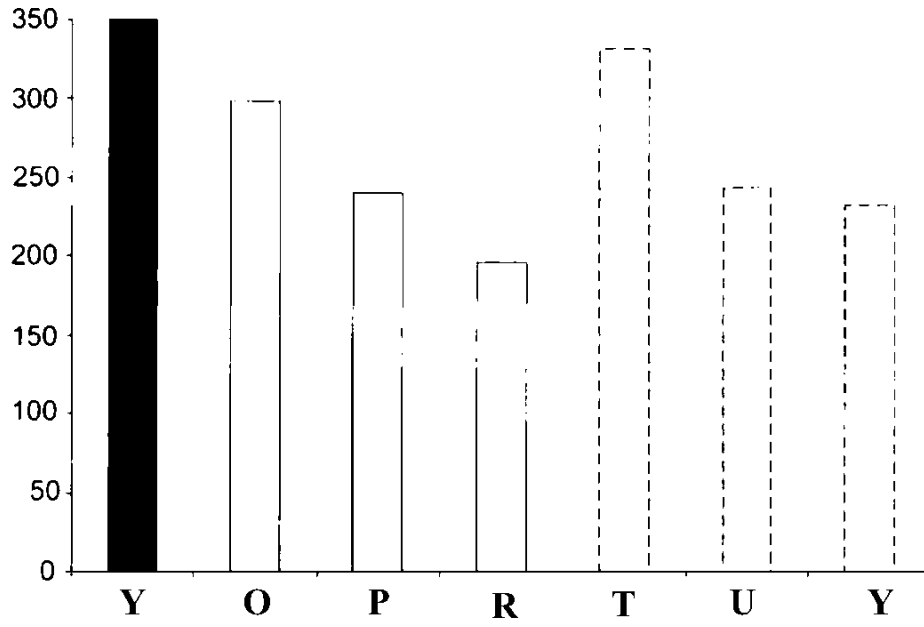
ŞEKİL 4



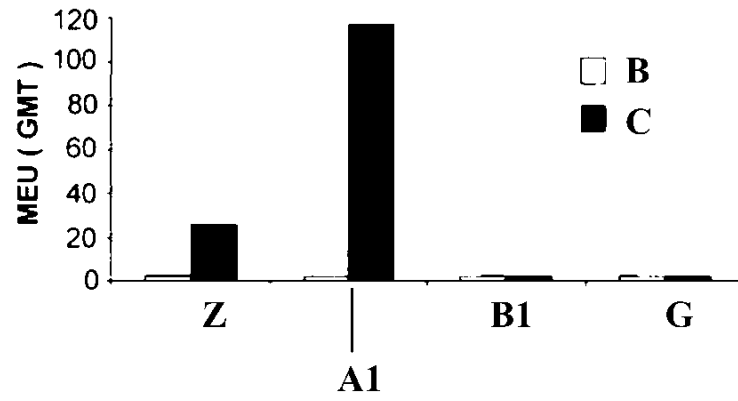
ŞEKİL 5a



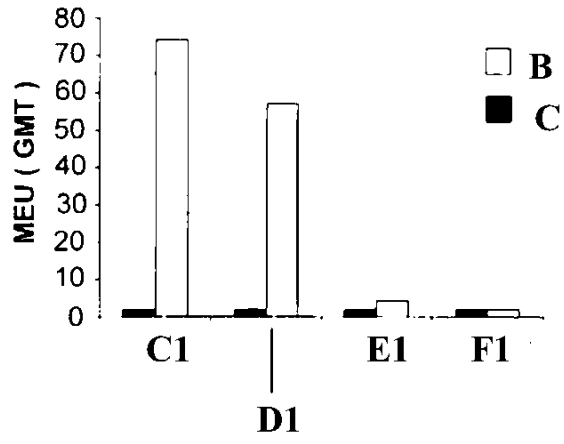
ŞEKİL 5b



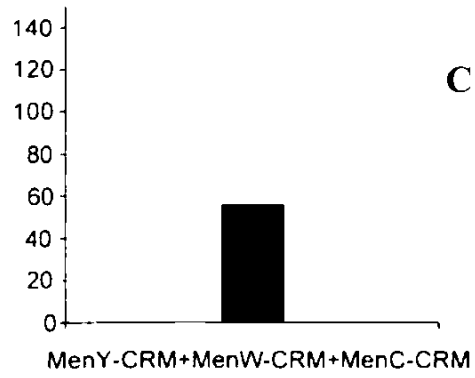
ŞEKİL 6



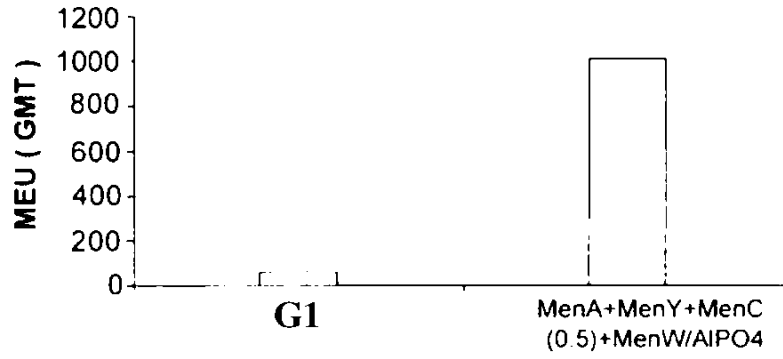
ŞEKİL 7



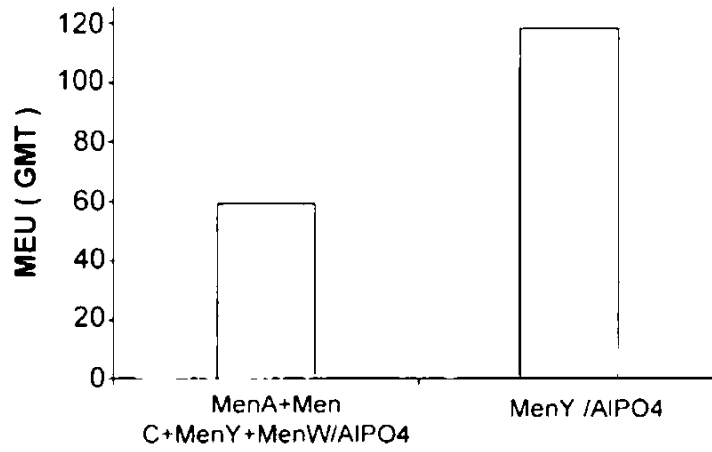
ŞEKİL 8



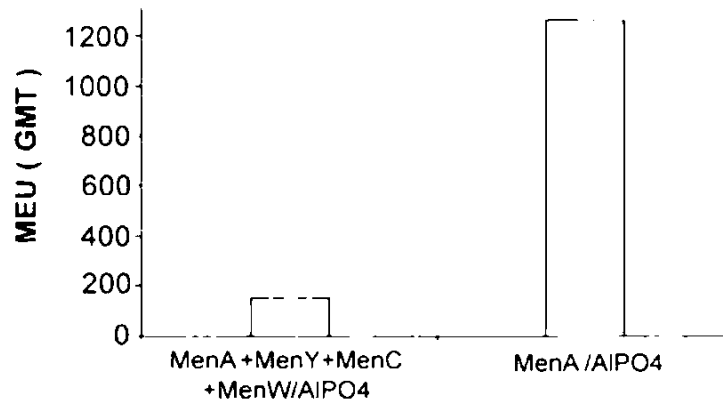
ŞEKİL 9



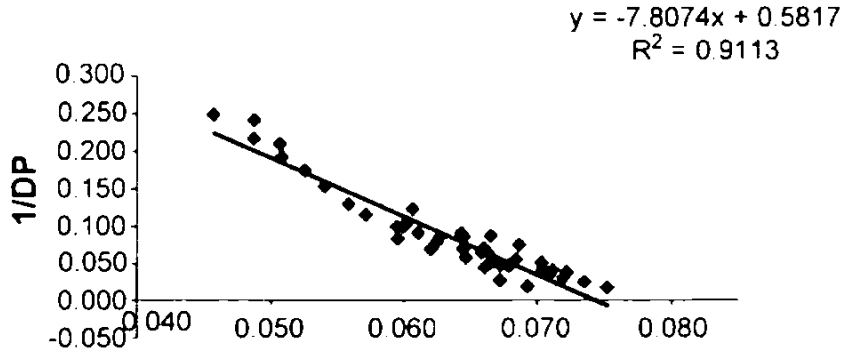
ŞEKİL 10



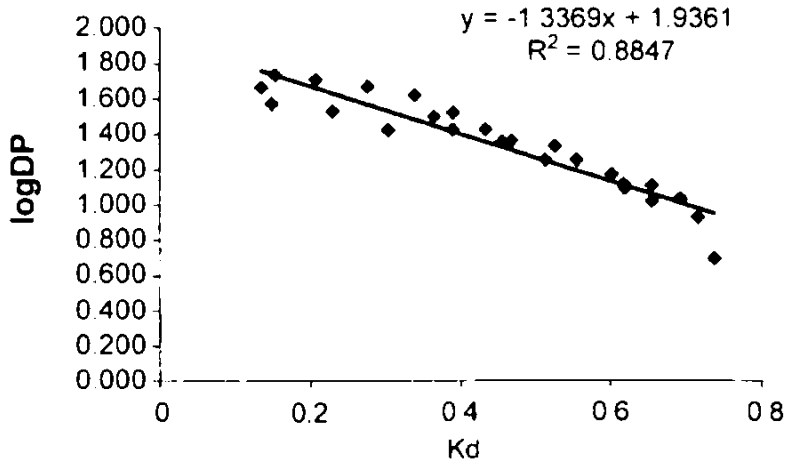
ŞEKİL 11



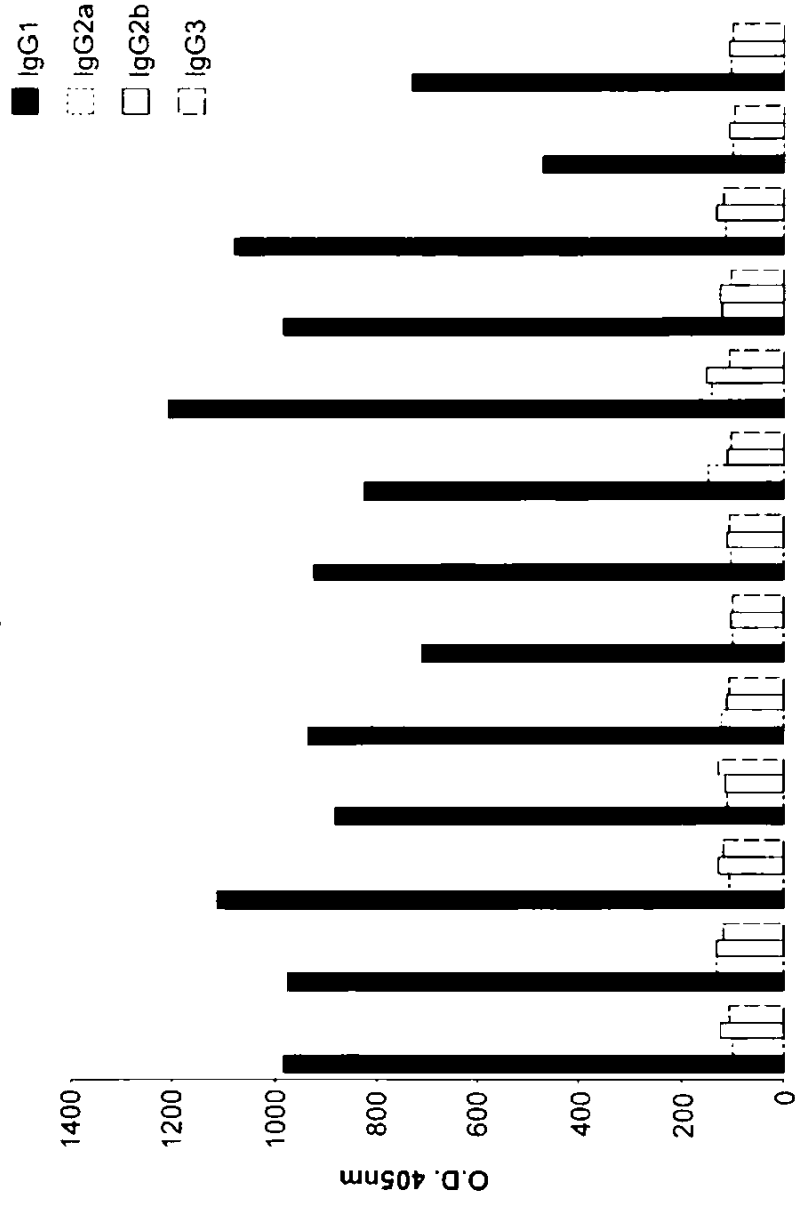
ŞEKİL 12



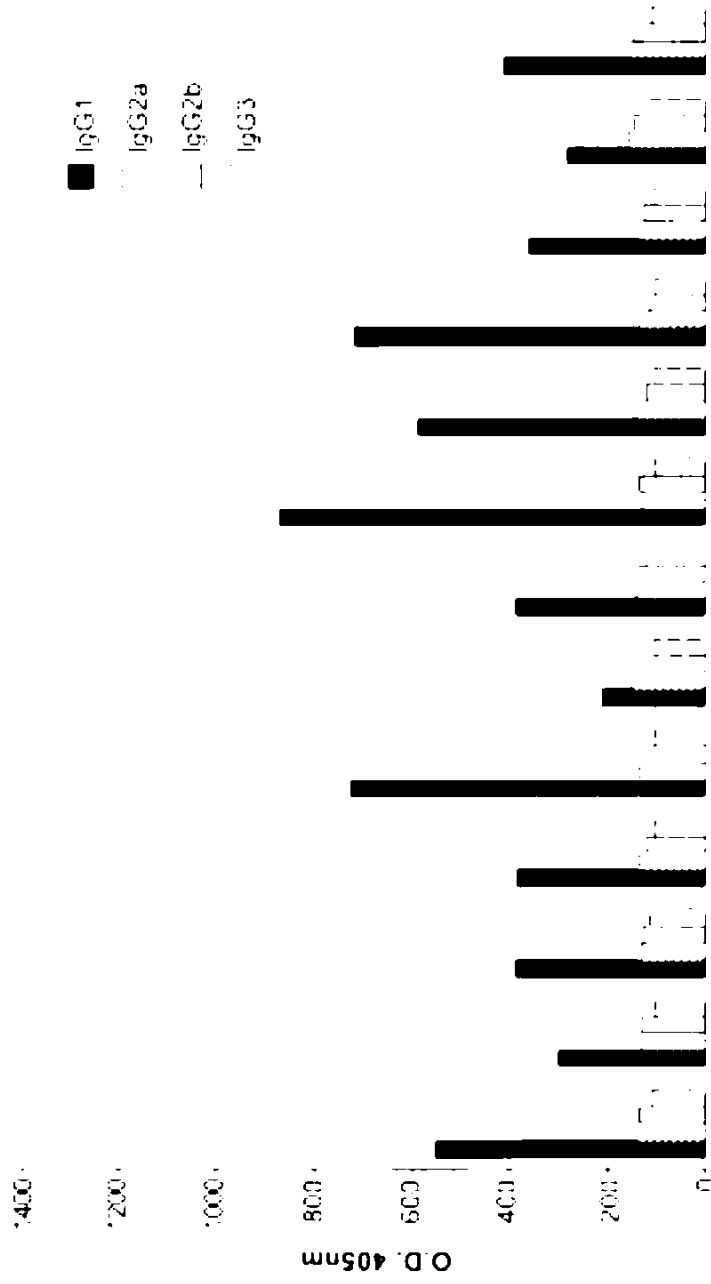
ŞEKİL 13



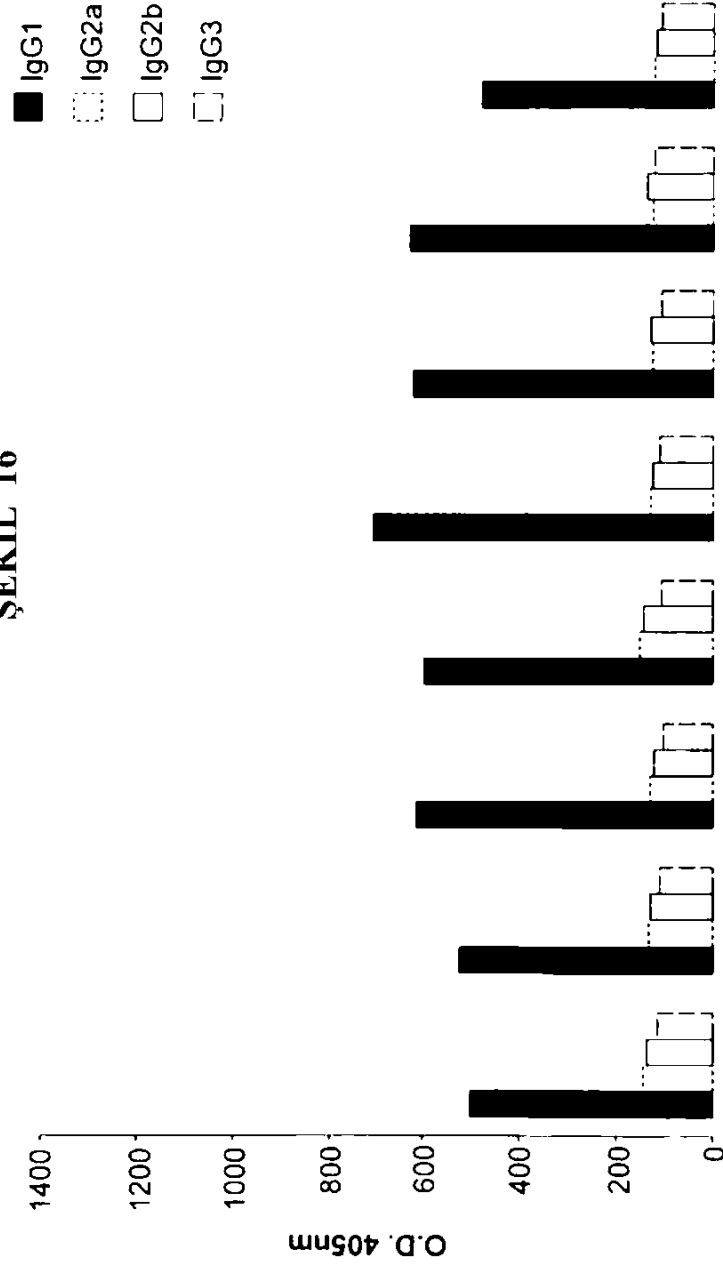
ŞEKİL 14



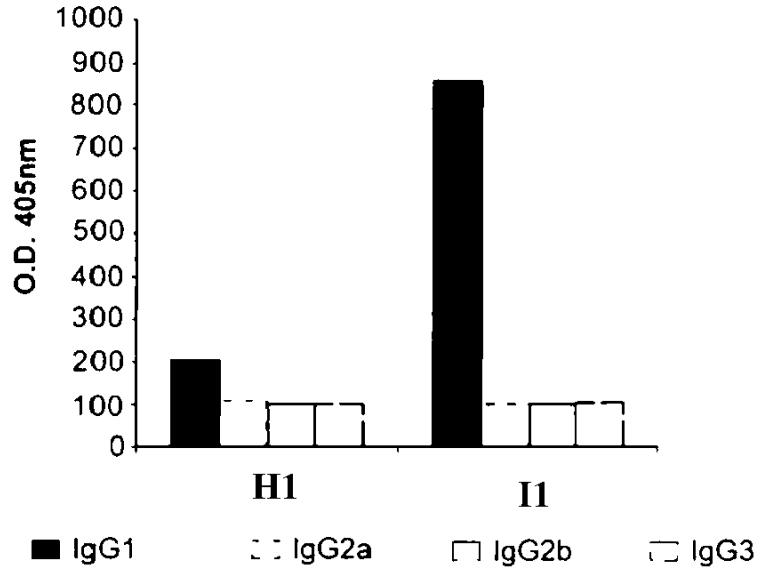
ŞEKİL 15



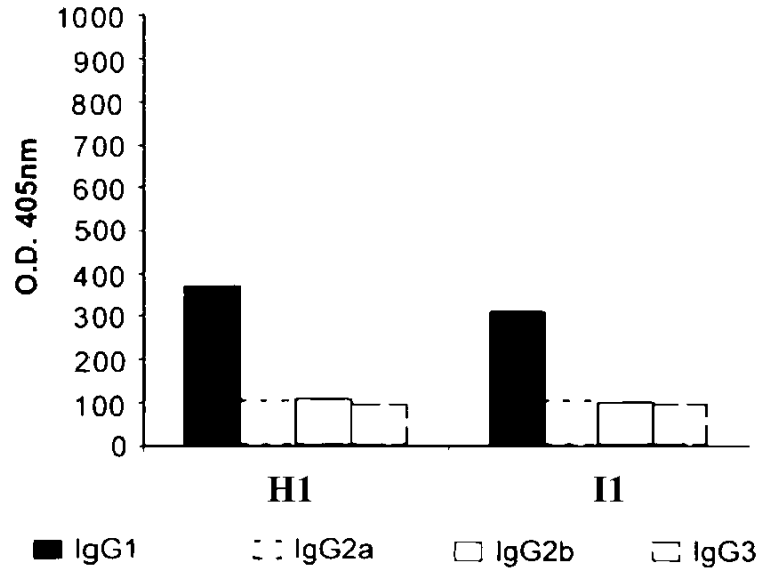
ŞEKİL 16



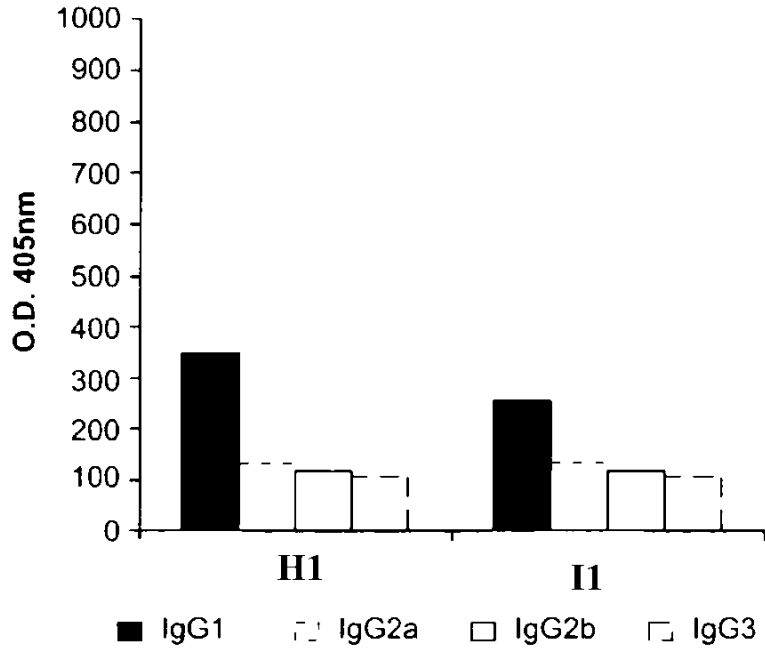
ŞEKİL 17A



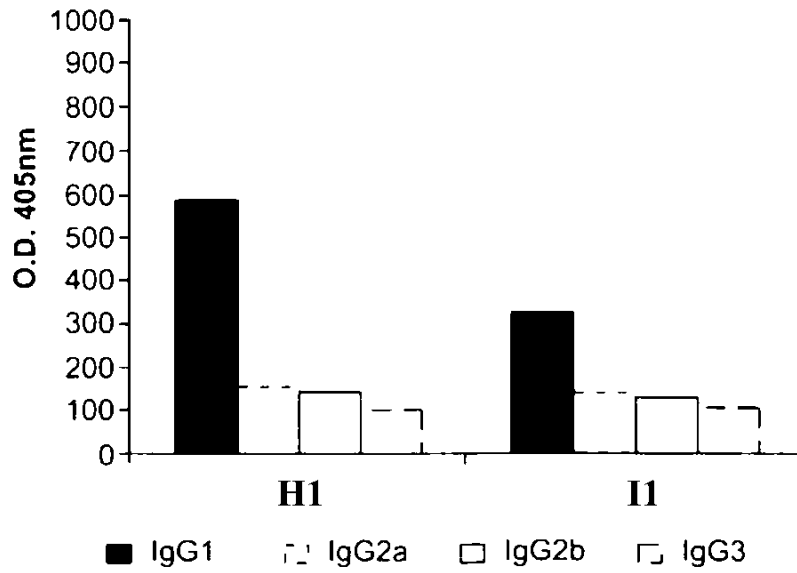
ŞEKİL 17B



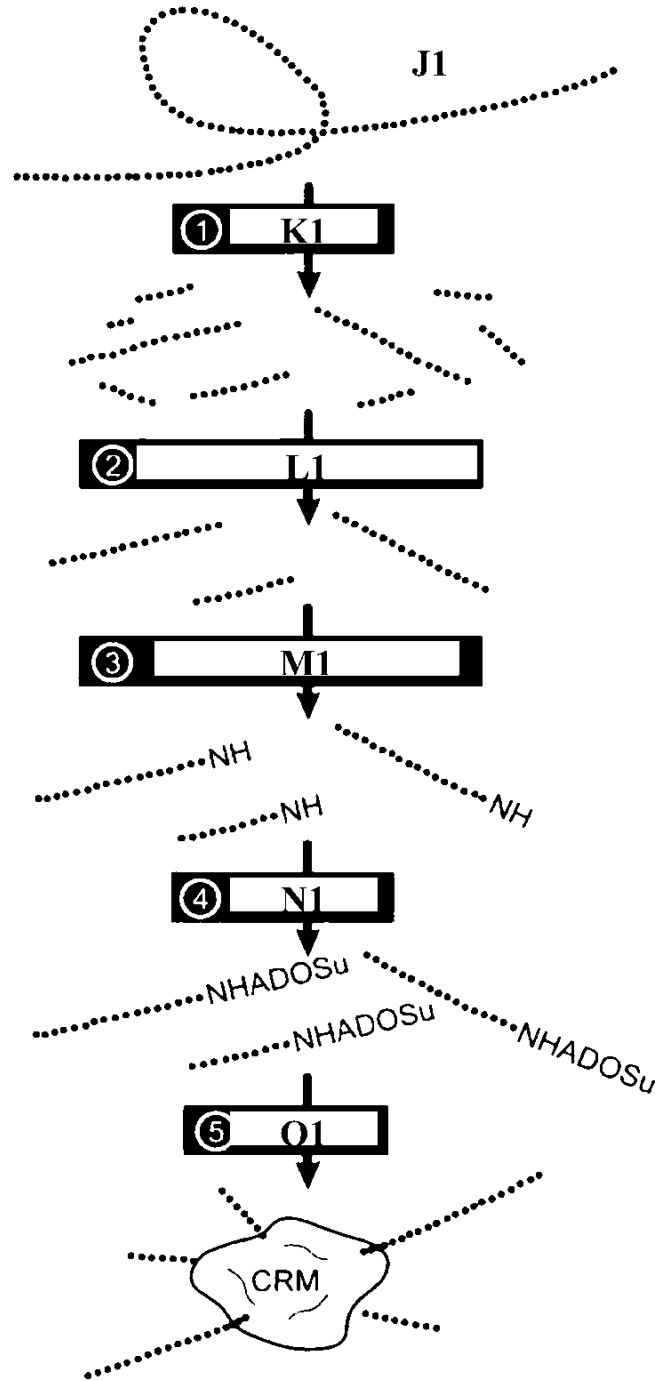
ŞEKİL 17C



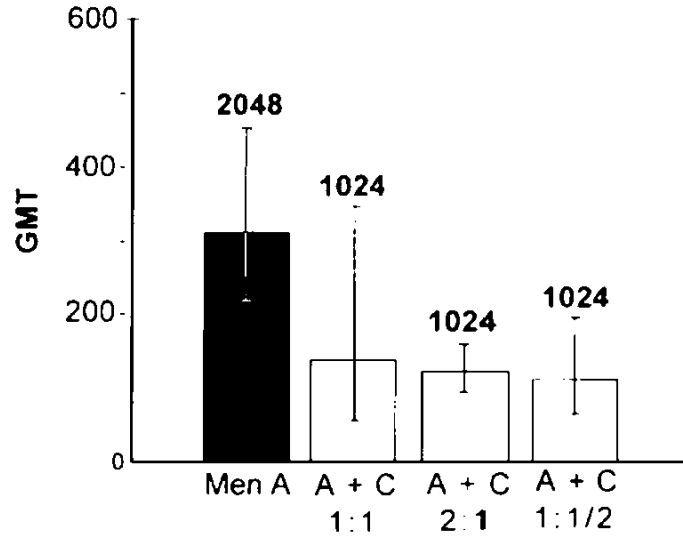
ŞEKİL 17D



ŞEKİL 18



ŞEKİL 19A



ŞEKİL 19B

