

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28.03.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **03.04.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/0108364**
(33) Země priority: **GB**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.12.2004**
(Věstník č. 12/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2002/003573**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/080965**

(21) Číslo dokumentu:

2003-2698

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :
A 61 K 39/295
A 61 K 39/385
A 61 P 31/04
A 61 P 31/12

- (71) Přihlašovatel:
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.,
Rixensart, BE
- (72) Původce:
Boutriau Dominique, Rixensart, BE
Capiou Carine, Rixensart, BE
Desmons Pierre Michel, Rixensart, BE
Lemoine Dominique, Rixensart, BE
Poolman Jan, Rixensart, BE
- (74) Zástupce:
JUDr. Zdeňka Korejzová, Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:
Vakcinační prostředek

- (57) Anotace:
Popisují se nové, výhodné kombinované vakcinační prostředky, založené na DTP a současně aplikovatelné kombinované vakcinační sady. Dále se popisují způsoby aplikace těchto vakcinačních prostředků a vakcinačních sad.

CZ 2003 - 2698 A3

2007-2698

Vakcinační prostředek

Oblast techniky

Popisuje se nová kombinace vakcinačních prostředků, která poskytuje ochranu proti více patogenům.

Dosavadní stav techniky

Kombinační vakcíny (poskytují ochranu proti více patogenům) jsou velmi žádané za účelem minimalizovat počet imunizací nutných k zaručení ochrany proti více patogenům, snížení nákladů aplikace a zvýšení akceptace a míry pokrytí. Dobře popsany jev antigenní kompetice (nebo interference) komplikuje vývoj vakcinačních prostředků obsahujících více složek. Antigenní interference popisuje pozorování, že aplikace více antigenů často vede ke slabší odezvě na určité antigeny vztaženo k imunitní odezvě pozorované při individuální aplikaci antigenů.

Jsou známé kombinované vakcinační prostředky, které mohou chránit před infekcí organizmy *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* a je možné i viru hepatitidy B a/nebo *Haemophilus influenzae* typ b (popisuje se například v publikaci WO 93/24148 a WO 97/00697).

Podstata vynálezu

Vynález popisuje výrobu nejvíce ambiciózního multivalentního vakcinačního prostředku, který může svou aplikací předcházet nebo léčit infekci způsobenou organizmy *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B a *N. meningitidis* a s výhodou *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, virus hepatitidy A a/nebo virus Polio, kde jednotlivé složky vakcinačního prostředku v podstatě neinterferují

s imunologickou činností libovolné složky vakcinačního prostředku.

První předmětnou věcí vynález je multivalentní imunogenní prostředek pro ochranu hostitele proti onemocnění způsobené mikroorganismy *Bordetella pertusis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus Polio a *N. meningitidis*, který zahrnuje

- a) buď mrtvé celé buňky organismu *Bordetella pertussis* (Pw) nebo dvě nebo více nebuněčné složky (Pa) (výhodnější jsou nebuněčné složky),
- b) tetanotoxoid (TT nebo T),
- c) toxoid diftérie (DT nebo D),
- d) povrchový antigen viru hepatitidy B (HepB nebo HB),
- e) deaktivovaný virus polio (IPV) a
- f) jeden z konjugátů nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu bakterie vybrané ze skupiny *N. meningitidis* typ Y (MenY) a *N. meningitidis* typ C (Men C) a
- g) může také zahrnovat konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu organismu *H. influenzae* typ B (Hib).

Shora uvedený imunogenní prostředek může dále obsahovat jednu, dvě, tři, čtyři, pět nebo šest složek vybraných z následujícího seznamu: polysacharid organismu *N. meningitidis* typu A (MenA) (s výhodou konjugovaný), polysacharid organismu *N. meningitidis* typ W (MenW) (s výhodou konjugovaný), polysacharid Vi organismu *Salmonella typhi*, vesikuly vnější membrány organismu *N. meningitidis* (s výhodou serotyp B), jeden nebo více proteinů vnější membrány (exponované na povrchu) organismu *N. meningitidis* a usmrcený, atenuovaný virus hepatitidy A (HepA, výhodný je produkt známý jako „Havrix™“ (od firmy SmithKline Beecham Biologicals) bez

podstatných problémů interference v případě libovolného z antigenů prostředku.

Druhou předmětnou věcí vynálezu jsou různé výhodné sady obsahující dvě nebo tři multivalentní imunogenní prostředky, přičemž uvedené sady jsou schopné zajistit ochranu hostitele proti onemocnění způsobenému organizmy *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus polio a *Streptococcus pneumoniae* a možná je také ochrana proti organizmům *N. meningitidis* a *Haemophilus influenzae*.

V prvním provedení druhé předmětné věci vynálezu se popisuje sada dvou multivalentních imunogenních prostředků, které poskytují ochranu hostiteli proti onemocnění způsobenému organizmy *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus polio a *Streptococcus pneumoniae* a také je možná ochrana proti organizmům *N. meningitidis* a *Haemophilus influenzae*.

Tato sada zahrnuje první nádobu obsahující

- a) buď mrtvé celé buňky organismu *Bordetella pertussis* (Pw) nebo dvě nebo více nebuněčných složek (Pa) (výhodnější jsou nebuněčné složky),
- b) tetanotoxoid (TT nebo T),
- c) toxoid diftérie (DT nebo D),
- d) povrchový antigen viru hepatitidy B (HepB nebo HB),
- e) deaktivovaný virus polio (IPV) a

a druhou nádobu obsahující

- 2a) jeden nebo více konjugátů nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu organismu *Streptococcus pneumoniae* (kde kapsulární polysacharid je s výhodou z serotypu pneumokoků vybraného ze skupiny obsahující 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F a 33F).

V dalším výhodném provedení podle vynálezu první nádoba dále obsahuje

f) jeden z konjugátů nebo oba konjugáty nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu bakterie vybrané ze skupiny *N. meningitidis* typ Y (MenY) a *N. meningitidis* typ C (Men C) a

g) konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu organismu *H. influenzae* typ B (Hib).

nebo druhá nádoba dále obsahuje

2b) jeden z konjugátů nebo oba konjugáty nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu bakterie vybrané ze skupiny *N. meningitidis* typ Y (MenY) a *N. meningitidis* typ C (Men C) a

2c) konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu organismu *H. influenzae* typ B (Hib)

nebo první nádoba dále obsahuje

f) jeden z konjugátů nebo oba konjugáty nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu bakterie vybrané ze skupiny *N. meningitidis* typ Y (MenY) a *N. meningitidis* typ C (Men C) a

a druhá nádoba navíc obsahuje

2b) konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu organismu *H. influenzae* typ B (Hib)

nebo první nádoba dále obsahuje

f) konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu organismu *H. influenzae* typ B (Hib)

a druhá nádoba dále obsahuje

2b) jeden z konjugátů nebo oba konjugáty nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu bakterie vybrané ze skupiny *N. meningitidis* typ Y (MenY) a *N. meningitidis* typ C (Men C).

V druhém provedení druhé předmětné věci vynálezu se popisuje sada obsahující multivalentní imunogenní vakcinační prostředky pro poskytnutí ochrany hostiteli proti onemocnění

způsobenému mikroorganizmy *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus polio, *N. meningitidis* a *Haemophilus influenzae*.

Tato sada zahrnuje první nádobu obsahující

- a) buď mrtvé celé buňky organismu *Bordetella pertussis* (Pw) nebo dvě nebo více nebuněčných složek *pertussis* (Pa) (výhodnější jsou nebuněčné složky),
- b) tetanotoxoid (TT nebo T),
- c) toxoid diftérie (DT nebo D),
- d) povrchový antigen viru hepatitidy B (HepB nebo HB),
- e) deaktivovaný virus polio (IPV) a

a druhá nádoba obsahuje

- 2a) jeden z konjugátů nebo oba konjugáty nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu bakterie vybrané ze skupiny *N. meningitidis* typ Y (MenY) a *N. meningitidis* typ C (Men C) a
- 2b) konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu organismu *H. influenzae* typ B (Hib).

Ve třetím provedení druhé předmětné věci vynálezu se popisuje sada obsahující tři multivalentní imunogenní prostředky, které poskytují ochranu hostiteli proti onemocnění způsobenému organismy *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus Polio a *N. meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae*.

Tato sada zahrnuje první nádobu obsahující

- a) buď mrtvé celé buňky organismu *Bordetella pertussis* (Pw) nebo dvě nebo více nebuněčných složek (Pa) (výhodnější jsou nebuněčné složky),
- b) tetanotoxoid (TT nebo T),
- c) toxoid diftérie (DT nebo D),
- d) povrchový antigen viru hepatitidy B (HepB nebo HB),

e) deaktivovaný virus polio (IPV) a
a druhá nádoba obsahuje

2a) jeden nebo více konjugátů nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu organismu *Streptococcus pneumoniae* (kde kapsulární polysacharid je s výhodou z pneumokokového serotypu vybraného ze skupiny obsahující 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F a 33F),

a třetí nádoba obsahuje

3a) jeden z konjugátů nebo oba konjugáty nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu bakterie vybrané ze skupiny *N. meningitidis* typ Y (MenY) a *N. meningitidis* typ C (Men C) a

3b) konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu organismu *H. influenzae* typ B (Hib).

Shora v textu uvedené nádoby shora v textu popsaných sad mohou dále obsahovat jeden, dva, tři, čtyři, pět nebo sedm složek vybraných s následujícího seznamu: polysacharid organismu *N. meningitidis* typ A (MenA) (s výhodou konjugovaný), polysacharid organismu *N. meningitidis* typ W (MenW) (s výhodou konjugovaný), polysacharid Vi organismu *Salmonella typhi*, jeden nebo více proteinů vnější membrány (exponovaných na povrchu) organismu *N. meningitidis*, HepA (jak se popisuje shora v textu), a jeden nebo více proteinů (exponovaných na povrchu) organismu *S. pneumoniae* bez podstatných problémů interference v případě libovolného z antigenů prostředku.

Nádoby se v sadě mohou balit odděleně nebo s výhodou se balí společně. Je výhodné, aby sada obsahovala návod pro aplikaci vakcinačních prostředků ve dvou nebo více nádobách.

V případě, že nádoba v sadě obsahuje jistý polysacharidový konjugát, je výhodné, když stejný konjugát není přítomen v dalších nádobách v sadě.

Překvapivě se zjistilo, že sada připravená oběma shora popsanými způsoby s výhodou prezentuje různé antigeny imunitnímu systému hostitele optimálním způsobem. Tato sada slouží praktickým lékařům jako optimální způsob imunizace hostitele a vykazuje následující výhody (s výhodou 2 nebo 3 a nejuvhodnější je, když vykazuje všechny výhody): je účinná při ochraně proti všem antigenům, minimální reaktivnost, minimální negativní interference za strany nosiče, minimální interference adjuvans/antigen nebo minimální interference antigen/antigen. Takovým způsobem se těchto cílů dosáhne s minimálním počtem aplikací (dvě), což také zpravidla odpovídá počtu návštěv praktického lékaře.

Ačkoliv ve výhodném provedení vynálezu se vakcinační prostředky z první a druhé (a třetí, když se aplikuje) nádoby aplikují současně do různých míst (jak se popisuje dále v textu) v jiném provedení vynálezu se předpokládá, že obsahy první a druhé nádoby se mohou před aplikací smíchat (s výhodou v okamžiku potřeby) a vytvoří jediný vakcinační prostředek.

Antigeny podle vynálezu

Způsoby přípravy tetanotoxoidu (TT) jsou dobře známy v oboru. Například TT se s výhodou připravuje izolací toxinu z kultury bakterií *Clostridium tetani* a pak následuje chemická detoxikace. V jiném případě je možné izolovat rekombinantní nebo geneticky detoxikovaný analog toxinu (jak se popisuje například v patentovém dokumentu EP 209281). Termín „tetanotoxoid“ také zahrnuje imunogenní fragmenty proteínu plné délky (například fragment C, jak se popisuje v patentovém dokumentu EP 478602).

Způsob přípravy toxoidu diftérie (DT) je také dobře znám v oboru. DT se například s výhodou připravuje izolací toxinu z kultury bakterie *Corynebacterium diphtheriae*, pak následuje chemická detoxikace. V jiném případě je možné izolovat rekombinantní nebo geneticky detoxikovaný analog toxinu (například CRM197 nebo jiné mutanty, jak se popisuje například v patentových dokumentech USA č. 4 709 017, č. 5 843 711, č. 5 601 827 a č. 5 917 017).

Nebuněčné složky pertussis (Pa) jsou dobře známy v oboru. Příklady zahrnují toxoid pertussis (PT), vláknitý hemagglutinin (FHA), pertaktin (PRN) a aglutinogeny 2 a 3. Tyto antigeny jsou částečně čištěné nebo dosahují vysokého stupně čistoty. Ve vakcinačním prostředku se s výhodou používají 2, 3, 4 nebo všech 5 shora uvedených nebuněčných složek pertussis. Nejvýhodněji se používají PT, FHA a PRN. PT je možné připravit řadou způsobů, například izolací toxinu z kultury bakterií *B. pertussis* pak následuje chemická detoxikace nebo v jiném případě izolací geneticky detoxikovaného analogu PT (popisuje se například v patentovém dokumentu USA č. 5 085 862).

Způsoby přípravy mrtvých celých bakterií *Bordetella pertussis* (Pw) podle vynálezu se popisuje v patentovém dokumentu WO 93/24148, jsou to vhodné způsoby přípravy vakcinačního prostředků obsahujících DT-TT-Pw-HepB a DT-TT-Pa-HepB.

Deaktivovaný virus Polio (IPV) s výhodou obsahuje typ 1, 2 a 3 a tvoří standard v oboru vakcinace. Nejvýhodnější je vakcinační prostředek „Salk polio“.

V typickém případě vakcinační prostředek proti bakterii *Streptococcus pneumoniae* bude obsahovat polysacharidové antigeny (s výhodou konjugované), kde polysacharidy se získaly z alespoň čtyř serotypů pneumokoků vybraných ze skupiny obsahující 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A,

12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F a 33F. Je výhodné, když čtyři serotypy zahrnují 6B, 14, 19F a 23F. Výhodnější je, když prostředek zahrnuje alespoň 7 serotypů, například ty získané ze serotypů 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F a 23F. Výhodnější je, když prostředek obsahuje více než sedm serotypů, například alespoň 11 serotypů. Prostředek v jednom provedení vynálezu zahrnuje například 11 kapsulárních polysacharidů získaných ze serotypů 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F a 23F (jsou s výhodou konjugované). Ve výhodném provedení vynálezu vakcinační prostředek zahrnuje alespoň 13 polysacharidových antigenů (s výhodou konjugovaných), ačkoliv vynález uvažuje použití dalších polysacharidových antigenů, například 23 valentní (jako jsou serotypy 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 20, 22F, 23F a 33F).

V případě vakcinace starých lidí (například jako prevence zápalu plic) je výhodné zahrnout do 11 valentního antigenního vakcinačního prostředku popsaného shora v textu serotypy 8 a 12F (a nejvýhodnější jsou také serotypy 15 a 22) za vzniku 13/15 valentního vakcinačního prostředku, zatímco v případě kojenců a batolat (kde se uvažuje hlavně zánět středního ucha) je výhodné, když 13 valentní vakcinační prostředek zahrnuje serotypy 6A a 19A.

Konjugáty

Konjugáty bakteriálních kapsulárních polysacharidů mohou obsahovat libovolný nosičový peptid, polypeptid nebo protein obsahující alespoň jeden epitop T pomocných buněk. Je výhodné, když se užívaný nosičový protein(y) vybral ze skupiny zahrnující: tetanotoxoid, toxoid diftérie, CRM197, rekombinantní toxoid diftérie (jak se popisuje v libovolném patentovém dokumentu č. 4 709 017, WO 93/25 210 nebo WO 00/48 638), pneumolyzin (je výhodné, když je chemicky detoxifikovaný

nebo když jde o chemicky detoxifikovaný mutant) z mikroorganismu *S. pneumoniae*, OMPC z mikroorganismu *N. meningitidis* a protein D z mikroorganismu *H. influenzae* (popisuje se v publikaci EP 594610). Na základě známého účinku nosičové suprese, je výhodné, jestliže v každém z prostředků podle vynálezu obsažené polysacharidové antigeny („n“ antigenů) jsou konjugovány s více jak jedním nosičem. Tak (n-1) polysacharidů by mohlo být neseno (odděleně) jedním typem nosiče a 1 polysacharid může být na odlišném nosiči nebo (n-2) je na jednom a 2 jsou na odlišných nosičích atd.. Například vakcinační prostředek obsahující 4 bakteriální polysacharidové konjugáty, pak 1, 2 nebo všechny 4 polysacharidy mohou tvořit konjugát s odlišnými nosiči. Protein D se však s výhodou používá jako nosič v prostředcích podle vynálezu a může se používat pro různé (2, 3, 4 nebo více) polysacharidy obsažené v prostředku, aniž dochází k supresnímu účinku markerového nosiče. Nejvýhodnější je, když Hib je přítomen jako konjugát TT, pneumokokové polysacharidy jsou konjugáty proteinu D, DT nebo CRM197 a MenA, MenC, MenY a MenW tvoří konjugáty buď s TT nebo s PD. Protein D je také použitelný nosič a poskytuje další antigen, který může tvořit ochranu proti bakterii *H. influenzae*.

Polysacharid může být spojen s nosičovým proteinem libovolným známým způsobem (jak se popisuje v patentovém dokumentu USA č. 4 372 945 (Likhite) a č. 4 747 757 (Armor et al.,)). Je výhodné, když se provede konjugace CDAP (popisuje se v dokumentu WO 95/08348).

V případě CDAP se při syntéze konjugátů protein a polysacharid používá s výhodou činidlo pro zavedení kyanoskupiny tetrafluoroborát 1-kyanodimethylaminopyridinia (CDAP). Kyanylační reakce se může provést za relativně mírných podmínek, které brání hydrolýze polysacharidů citlivých vůči

alkalickému prostředí. Tato syntéza umožňuje přímé spojení s nosičovým proteinem.

Vlastnosti imunogenních prostředků podle vynálezu

Imunogenní prostředky podle vynálezu se s výhodou vytvořily jako vakcinační prostředky vhodné pro *in vivo* aplikaci hostiteli takovým způsobem, že jednotlivé složky prostředku se vytvořily tak, že imunogenost jednotlivých složek není v podstatě porušena dalšími jednotlivými složkami prostředku. Termín „není v podstatě poškozena“ znamená, že po imunizaci se získal titer protilátky (například IgG) proti každé složce, který dosahuje více než 60 %, s výhodou více než 70 %, výhodněji více než 80 %, stále výhodnější více než 90 % a nejuvhodněji více než 95 až 100 % titru získaného v případě, že se antigen aplikuje samostatně.

Je zajímavé, že při shora v textu popsané kombinaci sad je možné po imunizaci získat titry protilátek proti kapsulárnímu polysacharidu Hib nebo některým pneumokokovým polysacharidům, které dosahují nebo přesahují 100 % titru získaného, když se antigen aplikuje samostatně.

Vakcinační prostředky

Imunogenní prostředky podle vynálezu se s výhodou vytvořily jako vakcinační prostředky pro aplikaci hostiteli *in vivo*, tak, že zaručují titer protilátek vyšší než je kritérium serologické ochrany pro každou antigenní složku v případě přijatelného procenta lidských subjektů. To je důležitý test pro odhad účinnosti vakcinačního prostředku v populaci. Antigeny s asociovanými protilátkovými titry popsanými shora v textu, přičemž hostitel se považuje za serologicky adaptovaný proti antigenu, jsou dobře známy v oboru a takové titry jsou publikovány organizacemi, jako je WHO. Je výhodné, když více než 80 % statisticky významného vzorku subjektů je

serologicky adaptováno, výhodnější je více jak 90 %, stále výhodnější je více než 93 % a nejvýhodnější je 96 až 100 %.

Imunogenní prostředky podle vynálezu jsou s výhodou upraveny pomocí adjuvans. Vhodná adjuvans zahrnují sole hliníku, jako je hydroxid hlinitý ve formě gelu (alum) nebo fosforečnan hlinitý, ale také sole vápníku, železa nebo cínu nebo se může použít nerozpustná suspenze acylovaného tyrozinu nebo acylované cukry, kationicky nebo anionicky derivatizované polysacharidy nebo polyfosfazený.

Adjuvans se také může vybrat tak, aby s výhodou indukovalo odezvu typu Th1 a dosáhlo se buněčné imunitní odezvy.

Velké množství cytokinů typu Th1 vede k vyvolání buněčné imunitní odezvy vůči danému antigenu, zatímco velké množství cytokinů typu Th2 vede k vyvolání humorální buněčné odezvy vůči antigenu.

Vhodné adjuvantní systémy, které vyvolávají převážně odezvu Th1 zahrnují monofosforyllipid A nebo jeho derivát, zvláště 3-de-O-acylovaný monofosforyllipid A a kombinaci monofosforyllipidu A, zvláště 3-de-O-acylovaného monofosforyllipidu A (3D-MPL) spolu se solí hliníku. Zesílený systém zahrnuje kombinaci monofosforyllipidu A a derivátu saponinu, zvláště kombinaci QS21 a 3D-MPL, jak se popisuje v patentovém dokumentu WO 94/00153 nebo méně reaktivní prostředek, kde QS21 se deaktivuje cholesterolem, jak se popisuje v patentovém dokumentu WO 96/33 739. Zvláště silné adjuvans zahrnuje QS21, 3D-MPL a tokoferol v emulzi olej ve vodě, jak se popisuje v patentovém dokumentu WO 95/17 210. Vakcinační prostředek může dále obsahovat saponin, s výhodou QS21. Prostředek může dále obsahovat emulzi olej ve vodě a tokoferol (popisuje se v dokumentu 95/17 210). Oligonukleotidy obsahující nemetylovaný CpG (popisuje se v dokumentu WO 96/02

555) jsou výhodnými indukčními činidly odezvy TH1 a jsou vhodná pro použití podle vynálezu.

Sole hliníku jsou výhodná adjuvans, které je možné použít ve shora uvedených imunogenních prostředcích. Zvláště HepB by se měl s výhodou adsorbovat na fosforečnan hlinitý a pak se smíchá s jinými složkami. Také pertaktin se s výhodou absorbuje na hydroxid hlinitý a pak se smíchá s jinými složkami. Za účelem minimalizovat množství adjuvans (zvláště solí hliníku) v prostředcích podle vynálezu, je možné z konjugátů polysacharidů odstranit adjuvans.

Vynález dále popisuje způsob produkce vakcinačního prostředku, který zahrnuje krok smíchání složek vakcinačního prostředku s farmaceuticky přijatelným nosičem.

Zvláště výhodný prostředek DTPa podle vynálezu (pro nezávislé použití nebo jako obsah první nádoby jedné ze shora popsaných sad) obsahuje: TT, DT, Pa (s výhodou obsahuje PT, FHA a PRN, přičemž PRN je s výhodou adsorbovaný na hydroxidu hlinitém), HepB (s výhodou adsorbovaný na fosforečnanu hlinitém), IPV, MenC (s výhodou konjugovaný buď s proteinem D, TT, DT nebo CRM197) a MenY (s výhodou konjugovaný s proteinem D, TT, DT nebo CRM197). Prostředek může také obsahovat Hib (s výhodou konjugovaný s TT a/nebo neadsorbovaný na adjuvans). Vakcinační prostředek se může dodávat ve dvou zkumavkách, přičemž první obsahuje DTPa-IPV-HepB v kapalně formě a druhá obsahuje MenC (a může obsahovat MenY a/nebo Hib) v lyofilizované formě s výhodou v přítomnosti činidla působícího proti spékání, jako je sacharóza, laktóza nebo trehalóza. Obsah zkumavek se může před aplikací hostiteli smíchat do jedné nádoby a může se aplikovat jedinou injekcí. Tento prostředek se také může použít v sadě popsané shora v textu (obsahy první nádoby).

Pro účely sad obsahující nádobu obsahující Hib (s výhodou konjugovaný s TT a/nebo neadsorbovaný na adjuvans) a/nebo buď MenC nebo Men Y (s výhodou konjugovaný na buď proteinu D, TT, DT nebo CRM197 a/nebo neadsorbovaný na adjuvans) nebo oba antigeny se tento prostředek s výhodou uchovává v lyofilizované formě s výhodou v přítomnosti činidla působícího proti zpékání, jako je sacharóza, laktóza nebo trehalóza.

Pro účely prostředků DTPa podle vynálezu (pro nezávislé použití nebo jako obsah první nádoby jednoho ze shora popsaných sad) obsahující nádobu obsahující DTPa a Hib a/nebo buď MenC nebo MenY nebo oba, kde Hib a/nebo Men jsou konjugovány s TT, je výhodné ve vakcinačním prostředku uvést do rovnováhy obsah TT tak, že celkový obsah TT v jediné nádobě není vyšší než kritické prahové množství (jako je 40, 45, 50, 60, 70 nebo 80 μg TT), aby se redukovala, minimalizovala nebo aby se zabránilo imunitní interferenci TT nebo nosičové supresi polysacharidů konjugovaných s TT. Je výhodné, když prahová hodnota je 50 μg . Zjistilo se, že poměr polysacharidu:TT se může snížit ve shora v textu popsaných konjugátech na 1:0,5 až 1,5 (hmotnostní poměr) (s výhodou na 1:0,6 až 1,2, nejvýhodnější je poměr přibližně 1:1). Například ve vakcinačním prostředku DTPa-HB-IPV-Hib(TT)-MenC(TT) množství T v DTPa by se mělo s výhodou snížit po standardní typické množství (s výhodou přibližně jedna až tři čtvrtiny, nejvýhodnější je přibližně polovina běžného množství) na například 10 až 30 μg , s výhodou 20 až 25 μg TT. Například, jestliže množství TT konjugovaného s Hib je okolo 12 μg TT a množství konjugovaného s MenC je přibližně 5 μg TT a množství nekonjugovaného TT je 24 μg , pak celkové množství TT je přibližně 41 μg .

Zvláště výhodný prostředek obsahující Hib/pneumokokový polysacharid (vhodný pro nezávislé použití nebo jako obsah

druhé nádoby jedné ze shora v textu popsaných sad) obsahuje: Hib (výhodně konjugovaný s TT a/nebo neadsorbovaný na adjuvans) a více (například více než 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nebo 11) pneumokokových polysacharidových konjugátů (například ty kombinace popsané v odstavci "Vakcinační prostředek proti bakterii *Streptococcus pneumoniae* podle vynálezu", jak se popisuje shora v textu). Nejvýhodnější je, když prostředek zahrnuje 11 polysacharidů (1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F a 23F). Je výhodné, když pneumokokové polysacharidy jsou konjugovány s PD, DT, CRM197 nebo TT. Ve výhodném provedení vynálezu antigen polysacharidu Hib není adsorbovaný na adjuvans, zvláště na sole hliníku. Ačkoli pneumokokové polysacharidové antigeny se mohou upravit adjuvans (s výhodou se adsorbují na fosforečnan hlinitý), také se nemusí adsorbovat, zvláště sole hliníku. V určitém provedení vynálezu prostředek neobsahuje adjuvan sole hliníku. V prostředcích podle vynálezu mohou být zahrnuty další antigeny (například konjugát kapsulárního polysacharidu organismu *N. meningitidis* typ C (s výhodou konjugovaný na protein D, TT, DT nebo CRM197 a/nebo nemusí být na adjuvans adsorbovaný), avšak v jiném provedení vynálezu jsou Hib a pneumokokové polysacharidové konjugáty jedinými antigeny přítomnými ve vakcinačním prostředku. V dalším specifickém provedení shora v textu popsaných prostředků Hib a pneumokokové polysacharidy nejsou konjugovány se stejným nosičem (zvláště v případě, že nosičem je CRM197).

Vakcinační prostředek se může dodávat v jedné nádobě (jejíž obsah je buď v kapalné nebo lyofilizované formě) nebo ve dvou zkumavkách, přičemž první obsahuje Hib (s výhodou lyofilizovaný) a druhá obsahuje pneumokokové antigeny (s výhodou v kapalné formě). Lyofilizované prostředky jsou s výhodou v přítomnosti s činidlem působícím proti spékání, jako je sacharóza, laktóza nebo trehalóza. Obsahy zkumavek se mohou smíchat v okamžiku potřeby v jediné zkumavce a je možné

je aplikovat hostiteli jedinou injekcí. Za použití takového prostředku je možné po imunizaci získat titry protilátek proti kapsulárnímu polysacharidu Hib, které dosahují nebo často převyšují 100 % titru získaného, když se antigen aplikuje samotný. Ve výhodných provedeních vynálezu při aplikaci kombinace pneumokokových polysacharidových konjugátů nedochází ke vzniku (podstatných) nežádoucích účinků (co se týká účinnosti ochrany) ve srovnání s jejich individuální aplikací. Tuto skutečnost je možné hodnotit měřením geometrického průměru post-primárních koncentrací (GMC) protilátek proti polysacharidu jeden měsíc po poslední primární dávce (primární dávky odpovídají senzibilizaci, jsou obvykle tři a aplikují se během prvního roku života). GMC (vyjádřený v $\mu\text{g/ml}$) v případě vakcinačního prostředku podle vynálezu by měl být s výhodou vyšší než 55 % (výhodněji vyšší než 60, 70, 80 nebo 90 %) hodnoty GMC, které se dosáhne, když se pneumokokové polysacharidy aplikují bez konjugátu Hib. Jiným důkazem, že nedochází k nežádoucímu účinku je, jestliže procento subjektů s koncentracemi protilátek nižšími než $0,5 \mu\text{g/ml}$ se liší ne více než o 10 % (s výhodou méně než 9, 7, 5, 3 nebo 1 %), když se porovnává stav jeden měsíc po senzibilizaci s aplikací vakcinačního prostředku bez konjugátu Hib.

Ačkoli shora uvedené skutečnosti se týkají Hib, pneumokokových a meningokokových „polysacharidů“, předpokládá se, že vynález se může rozšířit na Hib a pneumokokové „polysacharidy s redukovanou velikostí“ a „oligosacharidy“ (polysacharidy s redukovanou velikostí za účelem zlepšení použití, které jsou stále schopny u hostitele vyvolat ochrannou imunitní odezvu), které jsou dobře známy v oboru (popisuje se například v patentovém dokumentu EP 497525). Je výhodné, když Men Y může být přítomen jako oligosacharidový konjugát s oligosacharidem, který tvoří 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 nebo 0,9 násobek molekulové hmotnosti přirozeného polysacharidu.

Vynález dále popisuje imunogenní prostředek nebo vakcinační prostředek vhodný pro použití jako léčebný prostředek.

Vynález dále popisuje použití imunogenních prostředků podle vynálezu při výrobě léčebného prostředku pro léčbu nebo prevenci onemocnění způsobeného infekcí mikroorganizmem *Bordetella pertusis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus Polio a *N. meningitidis* (a také je možná bakterie *H. influenzae*). Dále se popisuje použití imunogenních prostředků podle vynálezu při výrobě vakcinační sady pro léčbu nebo prevenci onemocnění způsobeného infekcí mikroorganizmem *Bordetella pertusis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus Polio, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* a *N. meningitidis*.

Navíc způsob imunizace lidského hostitele proti onemocnění způsobené mikroorganizmem *Bordetella pertusis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus Polio a *N. meningitidis* (a je možná také bakterie *H. influenzae*), přičemž způsob obsahuje aplikaci hostiteli imunologicky ochranné dávky imunogenního prostředku podle vynálezu.

Vynález dále popisuje způsob imunizace lidského hostitele proti onemocnění způsobeného mikroorganizmem *Bordetella pertusis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus Polio, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* a *N. meningitidis* pomocí sad podle vynálezu popsaných shora v textu, přičemž uvedené způsoby zahrnují program současné aplikaci, jak se definuje dále v textu.

Program současné aplikace

Takový imunizační program zahrnuje krok aplikace imunologicky ochranné dávky imunogenního prostředku z první zkumavky sady (například jeden ze sad podle vynálezu) do různých míst drenážovaných různými lymfatickými žlázami z místa, do kterého se aplikuje imunogenní prostředek druhé (nebo třetí) zkumavky uvedené sady. Je výhodné, aby různá místa byla na různých končetinách. Je výhodné, když k vzájemné aplikaci vakcinačních prostředků dojde během 24 hodin, výhodnější je, když se prostředky aplikují ve stejný den a nejvýhodnější je během jedné návštěvy praktického lékaře. Je výhodné, když se hostiteli jednou nebo vícekrát (nejlépe dvakrát) aplikují oba (nebo všechny) vakcinační prostředky stejným způsobem. Každá aplikace se provede v intervalu 2 až 12 týdnů (výhodný je přibližně jeden měsíc). Třetí imunizace se často provede v období dvou týdnů a 7 měsíců po druhé aplikaci. Vakcinační prostředek se může například aplikovat, jak se popisuje shora v textu podle normálního programu aplikace vakcinačních prostředků DTP (jako systém tří návštěv, každá návštěva je v intervalu jednoho měsíce, například 3., 4. a 5. měsíc života nebo 3., 5. a 11. nebo 3., 5. a 12. měsíc života). Takový program aplikace umožňuje optimalizovat imunitní odezvu proti antigenům umístěných v obou (nebo ve všech) zkumavkách sady.

Zesilující aplikace vakcinačních prostředků se může aplikovat stejným způsobem kdykoliv od druhého roku života do dospělosti. Ačkoli senzibilizace se s výhodou provádí aplikací do svalů, zesilující imunizace se s výhodou provádí sliznicí. Může se provádět v přítomnosti mukozálního adjuvans (s výhodou laureth 9 nebo tepelně labilního toxinu (LT) z mikroorganismu *E. coli* a jeho mutantů nebo fragmentů (například intranasální aplikaci vakcinačních prostředků je jednoduchá a funguje extrémně dobře, zvláště, když hostitel je senzibilizován parenterálně) a místo aplikace nemusí být drenážováno různými lymfatickými žlázami.

Vynález dále popisuje použití imunogenních prostředků podle vynálezu obsažených v nádobách při způsobu výroby vakcinačních sad podle vynálezu vhodných pro současnou aplikaci.

Sady obsahující TT ve dvou nebo více nádobách

Vynález dále popisuje vakcinační sady vhodné pro současnou aplikaci (jak se definuje shora v textu), kde obsah TT ve dvou nebo více nádobách je vyvážen, aby se s výhodou redukovala, minimalizovala imunitní interferenci TT nebo nosičové supresi polysacharidů konjugovaných s TT nebo aby se jim předešlo. TT je velmi dobrý nosič. Je však známo, že existuje omezení, jestliže se ve vakcinačním prostředku vyskytuje v nadbytku, zvláště, když je také přítomen volný TT. Jestliže je TT používán v nadbytku, pak všechny antigeny konjugované s TT vykazují snížené titry protilátek. V oboru proto existuje problém, jak používat TT v řadě různých oblastí (například volný antigen a jako nosič pro řadu polysacharidových antigenů) v kombinovaných vakcinách, aniž dojde k nežádoucím účinkům. Vynález popisuje optimální způsob řešení tohoto problému: použití programu současné aplikaci (jak se popisuje shora v textu), vakcinační prostředek v první nádobě obsahující TT v množství ne vyšším než je kritické mezní množství, kdy se objeví imunitní interference nebo nosičová suprese, se aplikuje s vakcinačním prostředkem ve druhé (a i ve třetí) nádobě obsahující TT v množství, které není vyšší než kritické prahové množství, kdy se objevuje imunitní interference nebo nosičová suprese tak, že celkové množství současně aplikovaného TT odpovídá shora v textu popsánému kritickému prahovému množství a imunitní interference (nebo nosičová suprese) se minimalizuje (to je méně, než když se složky aplikují jednou injekcí) a s výhodou se vůbec neobjeví. Kritické prahové množství je 40, 45, 50, 60, 70 nebo 80 μg TT a s výhodou se pohybuje okolo 50 μg TT. Maximální množství

celkového TT, které je možné aplikovat, dosahuje proto přibližně až množství odvozené od počtu nádob sady (dvě až tři) násobeno kritickou prahovou hodnotou.

Vynález dále popisuje sadu obsahující dvě (nebo tři) nádoby obsahující dva (nebo tři) imunogenní prostředky pro současnou aplikaci, přičemž každá obsahuje TT ve volné a/nebo v konjugované formě, kde množství TT v každé nádobě není vyšší než kritická prahová hodnota, aby se předešlo imunitní interferenci TT (nebo nosičová suprese) nebo aby se minimalizovala, ale celkové množství TT ve všech nádobách je vyšší než uvedená kritická prahová hodnota.

Je výhodné, aby alespoň jeden z kontejnerů zahrnoval volný (nekonjugovaný) TT, nejvýhodnější je v souvislosti s multivalentním vakcinačním prostředkem DTPa nebo DTPw. Ačkoli volný TT může být přítomen v normálním množství, což je přibližně 42 μg , vynálezu umožňuje, aby bylo přítomno nižší množství (10 až 30 μg nebo 10 až 20 μg , například 10, 15, 20, 25 nebo 30 μg), ale optimální titry protilátek proti TT se mohou stále uvolnit s minimální (nebo žádnou) imunitní interferencí nebo nosičovou supresí.

Je výhodné, když alespoň jedna (ale možná 2 nebo 3) z nádob zahrnuje alespoň jeden (ale může 2, 3, 4, 5, 6, 7 nebo více) z polysacharidů konjugovaných s TT. Jestliže je v jedné nádobě přítomen volný TT, je výhodné, aby alespoň v jedné z dalších nádob sady byl přítomen alespoň jeden polysacharid konjugovaný s TT. Polysacharidem může být libovolný popsán polysachrid, s výhodou jeden nebo více pneumokokových polysacharidů (jak se popisuje shora v textu) nebo MenC, MenY nebo Hib.

Je výhodné, když sadou je libovolná ze sad podle vynálezu popsáných shora v textu.

Je výhodné, když je v sadě přítomen jeden, dva, tři nebo všechny konjugáty polysacharid-TT, přičemž hmotnostní poměr polysacharid: TT je redukován (ve srovnání se standardními konjugáty na 1:0,5 až 1,5 (s výhodou 1:0,6 až 1,2, nejvýhodnější je poměr 1:1) tak, že konjugáty jsou stále imunologicky funkční, ale imunitní interference TT nebo účinky nosičové suprese jsou minimalizovány nebo se jim předchází.

Dále se popisuje způsob imunizace lidského hostitele aplikací hostiteli imunologicky ochranné dávky imunogenního prostředku v první nádobě do prvního místa a aplikací hostiteli imunologicky ochranné dávky imunogenního prostředku z druhé nádoby do druhého místa (a je možná aplikace imunologicky ochranné dávky imunogenního prostředku z třetí nádoby hostiteli do třetího místa), kde první a druhé místo je drenážováno různými lymfatickými žlázami.

Současná aplikace by se měla provádět způsobem, jak se popisuje shora v textu. Je výhodné, když první a druhé (a třetí) místo reprezentuje u hostitele odlišné končetiny. Je výhodné, když k aplikaci imunogenních prostředků z první a druhé (a třetí) nádoby se provádí stejný den. Je výhodné, když se hostitel následně imunizuje stejným způsobem jednou nebo vícekrát, přičemž každá imunizace oddělena 2 až 12 týdny, výhodnější jsou dvě další vakcinace, přičemž každá je oddělena obdobím 1 až 2 měsíce.

Sady obsahující DT nebo CRM197 ve dvou nebo více nádobách

Vynález dále popisuje vakcinační sady pro současnou aplikaci (jak se definuje shora v textu), kde obsah DT (zahrnující DT a libovolné imunologicky shodné mutanty, jako je CRM197) ve dvou nebo více nádobách je s výhodou vyvážený, aby se zvýšily titry protilátek proti polysacharidům konjugovaným s DT (nebo CRM197), zatímco se minimalizuje reaktivita (to je nižší reaktivita ve srovnání s reaktivitou,

jestliže se složky nádob aplikují jedinou injekcí). DT a CRM197 jsou extrémně dobrými nosiči, avšak je známo, že DT se velkou měrou podílí na reaktivnosti vakcinačních prostředků, které je obsahují. Zjistilo se, že použitím sady, která se aplikuje podle programu současné aplikace (jak se definuje shora v textu), vakcinační prostředek v první nádobě obsahující DT (a/nebo CRM197) je s výhodou přítomný ve vysokém množství (40 až 150 μg , s výhodou 60 až 120 μg , výhodněji 70 až 100 μg , nejvýhodněji přibližně 95 μg), přičemž vakcinační prostředek v druhé (a i ve třetí) nádobě obsahující polysacharid konjugovaný s DT nebo CRM197 se aplikuje současně.

Výhody podle vynálezu jsou

- a) ačkoli obsah DT je v první nádobě vysoký, není dostatečně vysoký, aby vyvolal imunitní interferenci nebo nosičovou supresi,
- b) konjugát polysacharid-DT nebo polysacharid CRM-197 se oddělil od první nádoby tak, že zvýší reaktivita vakcinačního prostředku z první nádoby,
- c) titr protilátek proti polysacharidu konjugovaný s DT nebo CRM197 se nesnížil a může být zesílen (vyšší titry ve srovnání s konjugátem aplikovaným odděleně nebo ve srovnání s případem, kdy je v nádobě přítomno nižší množství DT).

Vynález dále popisuje sadu obsahující dvě (nebo tři) nádoby obsahující dva (nebo tři) imunogenní prostředky vhodné pro současnou aplikaci (jak se definuje shora v textu), kde první nádoba obsahuje obsah DT (DT plus CRM197), s výhodou volný nebo nekonjugovaný, který je přítomen ve vysokém množství (jak se definuje shora v textu) a druhá nádoba (a třetí) obsahuje jeden nebo více polysacharidů konjugovaných s DT a/nebo CRM197.

První nádoba by měla obsahovat volný (nekonjugovaný) DT, nejméně výhodněji v souvislosti s multivalentním vakcinačním prostředkem DTPa nebo DTPw.

Polysacharidem(y) konjugovaným s DT/CRM197 může být libovolný polysacharid popsáný v tomto patentovém dokumentu. S výhodou je možné vybrat jeden nebo více polysacharidů z následujícího seznamu: pneumokokové polysacharidy 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F nebo 33F, MenC, MenY nebo Hib. Je výhodné podle vynálezu, když se udržuje imunitní odezva (titry protilátek) proti jednomu nebo více uvedených polysacharidů ve srovnání s aplikací samotného konjugátu a výhodnější je, když se uvedená imunitní odezva zesílí.

Je výhodné, když sadou je libovolná ze sad podle vynálezu popsaná shora v textu.

Výhodně jeden, dva, tři nebo všechny konjugáty polysacharid-DT (nebo CRM197) přítomné v sadě jsou takové, že hmotnostní poměr polysacharid:DT/CRM197 je snížen (ve srovnání se standardními konjugáty) na 1:0,5 až 1,5 (s výhodou 1:0,6 až 1,2, nejméně výhodněji je poměr 1:1).

Dále vynález popisuje způsob imunizace lidského hostitele za použití shora uvedené sady, přičemž uvedená metoda zahrnuje aplikaci imunologické ochranné dávky imunogenního prostředku z první nádoby do prvního místa, aplikaci imunologické ochranné dávky imunogenního prostředku z druhé nádoby do druhého místa (a aplikaci imunologické ochranné dávky imunogenního prostředku z třetí nádoby do třetího místa), kde první a druhé (a třetí) místo je drenážováno odlišnými lymfatickými žlázami.

Současná aplikace by se měla provést způsobem popsaným shora v textu. Je výhodné, když první a druhé (a třetí) místo

reprezentují odlišné končetiny hostitele. Je výhodné, když se aplikace imunogenních prostředků z první a druhé (a třetí) nádoby provádí stejný den. Je výhodné, když se hostitel následně imunizuje stejným způsobem jednou nebo vícekrát, přičemž každá imunizace je od sebe oddělena 2 až 12 týdny, výhodnější jsou dvě další vakcinace, přičemž každá je oddělena obdobím 1 až 2 měsíce.

Vakcinační prostředky podle vynálezu se mohou použít k ochraně nebo k léčbě savců náchylných k infekci aplikací uvedeného vakcinačního prostředku systémovým způsobem nebo mukozální cestou. Tyto aplikace mohou zahrnovat intramuskulární, intraperitoneální, intradermální nebo subkutánní injekci nebo aplikaci prostřednictvím orálního/zažívacího traktu, respiračního (například intranasálního) traktu a močopohlavního systému.

Množství antigenu v každé dávce vakcinačního prostředku se vybralo jako množství, které vyvolává imunologicky ochranou odezvu bez podstatných nežádoucích vedlejších účinků typického vakcinačního prostředku. Takové množství bude kolísat v závislosti na výběru používaného specifického imunogenu a na způsobu jeho prezentace. V obecném případě se očekávalo, že každá dávka bude obsahovat 0,1 až 100 μg polysacharidu, s výhodou 0,1 až 50 μg , s výhodou 0,1 až 10 μg , přičemž rozmezí 1 až 5 μg je nejvýhodnější rozmezí.

Obsah proteinových antigenů ve vakcinačním prostředku bude v typickém případě v rozmezí 1 až 100 μg , s výhodou v rozmezí 5 až 50 μg , nejvíce typické je rozmezí 5 až 25 μg .

Po senzibilizaci se subjektům aplikuje jedna nebo více posilujících dávek do adekvátního místa.

Vakcinační prostředek se popisuje v publikaci Vaccine Design („The subunit and adjuvant approach“ (ads. Powell M.F.

and Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). Encapsulation within liposomes described by Fullerton, patentový dokument USA č. 4 235 877).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Příprava vakcinačního prostředku obsahujícího DT-TT-Pa-IPV-HepB (DTPaIPVHepB)

Příprava se provedla způsobem popsáním v patentovém dokumentu WO 93/24 148. Vakcinační prostředek je běžně dostupný pod názvem Infanrix-PeNTA™ (SmithKline Beecham Biologicals).

Příklad 2: Příprava vakcinačního prostředku obsahujícího MenC nebo MenC-MenY

MenC: Kapsulární polysacharid mikroorganismu *N. meningitidis* typu C se konjugoval s proteinem D nebo TT (za použití postupu CDAP). V lidská dávka konjugátu o objemu 0,5 ml obsahuje 5 µg polysacharidu. pH se upravilo na hodnotu 6,1 a provedla se lyofilizace v přítomnosti sacharózy.

MenCMenY: Kapsulární polysacharid mikroorganismu *N. meningitidis* typu C konjugovaný s proteinem D nebo TT (za použití postupu CDAP) a kapsulární polysacharid mikroorganismu *N. meningitidis* typu Y konjugovaný s proteinem D nebo TT se smíchaly v množství 5 µg polysacharidu v každém konjugátu na jednu lidskou dávku o objemu 0,5 ml. pH se upravilo na hodnotu 6,1 a provedla se lyofilizace v přítomnosti sacharózy.

Příklad 3: Příprava vakcinačního prostředku obsahujícího DT-TT-Pa-IPV-HepB-MenC-MenY (DTPaIPVHepB/MenCMenY) nebo DT-TT-Pa-IPV-HepB-MenC (DtPaIPVHepB/MenC)

Vakcinační prostředky popsané v příkladu 1 a 2 se smíchaly v okamžik potřeby (ve stejný den).

Příklad 4: Příprava vakcinačního prostředku obsahujícího 11 valentní pneumokokový konjugát s Hib (Hib/Strep11V)

Kapsulární polysacharid mikroorganismu *H. influenzae* typ B konjugovaný s TT (konjugát v jedné dávce obsahuje 10 µg polysacharidu) se lyofilizoval při hodnotě pH 6,1 v přítomnosti laktózy (Hiberix™ (SmithKline Beecham Biologicals) a rozpustil se v okamžiku potřeby v kapalném roztoku 11 valentního pneumokokového kapsulárního polysacharidu (serotypy 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F a 23F) konjugovaného s PD (1 µg polysacharidu v každém konjugátu v jedné dávce). Pneumokokový vakcinační prostředek se dříve adsorboval na 0,5 mg Al³⁺ (jako AlPO₄).

Příklad 5: Klinické studie

Studie provedené s vakcinačním prostředkem popsáným v příkladu 4

Vakcinační prostředek podle nároku 4 a kontrolní vakcinační prostředek se aplikoval ve třech dávkách (ve 3, 4, 5 měsících života) německým kojencům.

Výsledky imunitní odezvy (měřeno 1 měsíc po poslední senzibilizaci) byly následující.

Protilátky proti pneumokokovému IgG:GMC (µg/ml) (testem ELISA)

| PS | | skupina A | | | skupina D | | |
|------------|-----------|-----------|-------|------|-----------|-------|------|
| protilátka | timin (g) | N | S+(%) | GMC | N | S+(%) | GMC |
| anti-1 | PIII | 30 | 100 | 1,23 | 33 | 100 | 0,99 |
| anti-3 | PIII | 30 | 100 | 2,04 | 33 | 97,0 | 1,20 |

| | | | | | | | |
|----------|------|----|------|------|----|-----|------|
| anti-4 | PIII | 30 | 100 | 0,98 | 33 | 100 | 1,03 |
| anti-5 | PIII | 30 | 100 | 1,33 | 33 | 100 | 1,34 |
| anti-6B | PIII | 30 | 100 | 0,54 | 33 | 100 | 0,62 |
| anti-7F | PIII | 30 | 100 | 1,60 | 33 | 100 | 1,33 |
| anti-9V | PIII | 30 | 100 | 1,61 | 33 | 100 | 1,21 |
| anti-14 | PIII | 30 | 100 | 2,27 | 33 | 100 | 2,32 |
| anti-18C | PIII | 30 | 100 | 1,06 | 33 | 100 | 1,04 |
| anti-19F | PIII | 30 | 100 | 2,05 | 33 | 100 | 1,92 |
| anti-23F | PIII | 30 | 96,7 | 0,75 | 33 | 100 | 0,76 |

skupina A = 11Pn-PD+Infanrix-HeXa™ (Infanrix-Penta plus
přidaný Hib konjugát-DTPa-HB-IPV-Hib)

skupina D = 11Pn-PD/Hib+Infanrix-PeNTa™ (DTPa-HB-IPV)

a indikuje spíše současnou (do různých končetin) než
kombinovanou aplikaci.

Procento subjektů s koncentrací protilátek, která není nižší
než 0,5 µg/ml

| skupina | PS | 1 | 3 | 4 | 5 | 6B | 7F | 7V | 14 | 18C | 19F | 23F |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| D | 84,8 | 87,9 | 87,9 | 90,9 | 51,5 | 90,9 | 93,9 | 97,0 | 81,8 | 97,0 | 72,7 | |
| A | 86,7 | 96,7 | 76,7 | 90,0 | 50,0 | 93,3 | 90,0 | 90,0 | 80,0 | 96,7 | 66,7 | |

protilátky proti PRP:GMC (µg/ml) (pomocí testu ELISA)

| | |
|--|--------------------|
| | skupina D (N = 34) |
|--|--------------------|

| | | n | $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ (%) | GMC ($\mu\text{g/ml}$) |
|----------|------|----|-----------------------------|--------------------------|
| anti-PRP | PIII | 33 | 100 | 10,75 |

100 % subjektů vykazovalo koncentrace protilátek proti PRP (Hib polysacharid) ne nižší než 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

Přípravek Hiberix (neadsorbovaný konjugát Hib-TT) vykazuje hodnotu GMC po podobném aplikačním programu přibližně 6 $\mu\text{g/ml}$.

Imunitní odezva (vyjádřená jako protilátky stanovené testem ELISA) u kojenců, kterým se aplikoval vakcinační prostředek 11Pn-PD/Hib je podobná odezvě pozorované v případě jedinců, kterým se aplikoval vakcinační prostředek obsahující 11Pn-PD. To platí pro všechny serotypy s výjimkou serotypu 1, 3 a 9V, v případě kterých se pozoroval trend nižších geometrických průměrů koncentrací pro vakcinační prostředek 11Pn-PD/Hib. Avšak tyto rozdíly nebyly podstatné, jak se zobrazilo přesahem 95 % intervalů spolehlivosti.

Vakcinační prostředek 11Pn-PD/Hib vyvolal funkční protilátky proti všem 11 serotypům.

Kombinování vakcinačního prostředku Hib s pneumokokovou konjugační vakcínou podstatně neinterferoval s pneumokokovou imunitní odezvou a překvapivě zesiluje odezvu proti PRP ve srovnání s oběma registrovanými vakcinačními prostředky Infanrix-HeXa a Hiberix.

Studie provedené s vakcinačními prostředky popsány v příkladu 3 nebo současná aplikace vakcinačních prostředků popsány v příkladu 3 a 4

Studie 1:

Může se hodnotit bezpečnost a imunogenost přípravku Infanrix-PeNTa smíchaného s vakcinačním prostředkem, který

obsahuje konjugát MenC podávaný s vakcinačním prostředkem obsahujícím Hib nebo současně s 11 valentním pneumokokovým vakcinačním prostředkem smíchaným s přípravkem Hiberix. V případě konjugátu MenC se hodnotí oba nosiče PD a TT. Vakcinační prostředky se mohou aplikovat kojencům ve třech dávkách. Současné injekce se mohou aplikovat do různých končetin při jedné návštěvě praktického lékaře.

Studie 2:

Může se hodnotit bezpečnost a imunogennost přípravku Infanrix-PeNTa smíchaného s vakcinačním prostředkem, který obsahuje konjugát MenC-MenY podávaný s vakcinačním prostředkem obsahujícím Hib nebo současně s 11 valentním pneumokokovým vakcinačním prostředkem smíchaným s přípravkem Hiberix. V případě konjugátů MenC a MenY se hodnotí oba nosiče PD a TT. Vakcinační prostředky se mohou aplikovat kojencům ve třech dávkách. Současné injekce se mohou aplikovat do různých končetin při jedné návštěvě praktického lékaře.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Vakcinační sada pro současnou aplikaci obsahující dva multivalentní imunogenní prostředky pro dosažení ochrany u hostitele proti onemocnění způsobeném mikroorganizmy *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus Polio a *Streptococcus pneumoniae*, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená sada zahrnuje první nádobu obsahující:
- a) nebuněčné složky pertussis obsahující toxoid pertussis a FHA
 - b) tetanotoxoid (TT),
 - c) toxoid diftérie (DT),
 - d) povrchový antigen viru hepatitidy B a
 - e) deaktivovaný virus polio
- a druhou nádobu obsahující:
- (2a) jeden nebo více konjugátů nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu z mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*.
2. Vakcinační sada podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jeden nebo více konjugátů nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu z mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* se získal z jednoho nebo více pneumokokových serotypů vybraných ze skupiny zahrnující 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F a 33F.

3. Vakcinační sada podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že povrchový antigen hepatitidy B je adsorbovaný na fosforečnanu hlinitém.
4. Vakcinační sada podle libovolného z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že první nádoba navíc obsahuje
- f) buď jeden nebo druhý konjugát nebo oba konjugáty nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu bakterie vybrané ze skupiny zahrnující *N. meningitidis* typ Y (MenY) a *N. meningitidis* typ C (MenC) a
 - g) konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu mikroorganismu *H. influenzae* typB (Hib).
5. Vakcinační sada podle libovolného z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že druhá nádoba navíc obsahuje
- 2b) buď jeden nebo druhý konjugát nebo oba konjugáty nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu bakterie vybrané ze skupiny zahrnující *N. meningitidis* typ Y (MenY) a *N. meningitidis* typ C (MenC) a
 - 2c) konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu mikroorganismu *H. influenzae* typB (Hib).
6. Vakcinační sada podle libovolného z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že první nádoba navíc obsahuje
- f) buď jeden nebo druhý konjugátů nebo oba konjugáty nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu bakterie vybrané ze skupiny zahrnující

N. meningitidis typ Y (MenY) a *N. meningitidis* typ C (MenC)

a druhá nádoba navíc obsahuje

2b) konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu mikroorganismu *H. influenzae* typB (Hib).

7. Vakcinační sada podle libovolného z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e první nádoba navíc obsahuje

f) konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu mikroorganismu *H. influenzae* typB (Hib).

a druhá nádoba navíc obsahuje

2b) buď jeden nebo druhý konjugát nebo oba konjugáty nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu bakterie vybrané ze skupiny zahrnující *N. meningitidis* typ Y (MenY) a *N. meningitidis* typ C (MenC).

8. Vakcinační sada podle libovolného z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e navíc zahrnuje třetí nádobu obsahující

3a) buď jeden nebo druhý konjugát nebo oba konjugáty nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu bakterie vybrané ze skupiny zahrnující *N. meningitidis* typ Y (MenY) a *N. meningitidis* typ C (MenC)

3b) konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu mikroorganismu *H. influenzae* typB (Hib).

9. Vakcinační sada podle libovolného z nároků 1 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dva nebo více nádob obsahuje TT, přičemž množství TT v každém z uvedených dvou

nebo více nádob není vyšší než je kritická prahová hodnota 50 µg TT, aby se předešlo nebo aby se minimalizovala imunitní interference TT nebo nosičová suprese, ale celkové množství TT ve všech nádobách vakcinační sady není vyšší než uvedená kritická prahová hodnota.

10. Vakcinační sada podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e 1, 2 nebo 3 nádoby zahrnují jeden nebo více polysacharidů nebo oligosacharidů konjugovaných s TT, které se vybraly ze seznamu obsahující pneumokokový polysacharid nebo oligosacharid, MenC, MenY a Hib.
11. Vakcinační sada podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jeden nebo více polysacharidů nebo oligosacharidů konjugovaných s TT vykazuje hmotnostní poměr polysacharid nebo oligosacharid ku TT jako 1 ku 0,5 až 1,5.
12. Vakcinační sada podle libovolného z nároků 1 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e první nádoba vykazuje obsah DT 60 až 120 µg a druhá nebo třetí nádoba obsahuje jeden nebo více polysacharidů nebo oligosacharidů konjugovaných s DT a/nebo CRM197.
13. Vakcinační sada podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e první nádoba vykazuje obsah DT 70 až 100 µg.
14. Vakcinační sada podle nároku 12 nebo 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jeden nebo více polysacharidů nebo oligosacharidů konjugovaných s DT a/nebo CRM197 se vybralo ze seznamu obsahujícího pneumokokové polysacharidy nebo oligosacharidy 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F a 33F, meningokokové polysacharidy nebo oligosacharidy MenC a MenY a Hib z mikroorganismu *H. influenzae* typ b.

15. Vakcinační sada podle libovolného z nároků 12 až 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e druhá nádoba obsahuje sedm pneumokokových polysacharidů nebo oligosacharidů získaných ze serotypů 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F a 23F, které jsou konjugovány s CRM197.
16. Vakcinační sada podle libovolného z nároků 12 až 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jeden nebo více polysacharidů nebo oligosacharidů konjugovaných s DT, a/nebo CRM197 vykazuje hmotnostní poměr polysacharid nebo oligosacharid ku DT nebo CRM197 jako 1 ku 0,5 až 1,5.
17. Multivalentní imunogenní prostředek pro dosažení ochrany u hostitele proti onemocnění způsobenému mikroorganizmy *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus Polio a *N. meningitidis*, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:
- a) nebuněčné složky pertussis obsahující toxoid pertussis a FHA
 - b) tetanotoxoid (TT),
 - c) toxoid diftérie (DT),
 - d) povrchový antigen viru hepatitidy B a
 - e) deaktivovaný virus polio a
 - f) jeden nebo druhý konjugát nebo oba konjugáty nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu z bakterie vybrané ze skupiny zahrnující *N. meningitidis* typ Y a *N. meningitidis* typ C.
18. Imunogenní prostředek podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje jeden nebo více konjugátů nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu bakterie vybrané ze skupiny *H. influenzae* typ b, *N. meningitidis* typ A a *N. meningitidis* typ W.

19. Imunogenní prostředek podle nároku 17 nebo 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje usmrcený, atenuovaný virus hepatitidy A.
20. Imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 17 až 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e používaný nosičový protein(y) se vybral ze skupiny obsahující: tetanotoxoid, toxoid diftérie, CRM197, rekombinantní toxin diftérie, OMPC z *N. meningitidis*, pneumolysin z *S. pneumoniae* a protein D z *H. influenzae*.
21. Imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 17 až 20 vytvořený jako vakcinační prostředek pro aplikaci hostiteli *in vivo*, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jednotlivé složky prostředku se vytvořily tak, že imunogennost jednotlivých složek není porušena jednotlivými složkami prostředku.
22. Imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 17 až 20 vytvořený jako vakcinační prostředek pro aplikaci hostiteli *in vivo*, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zajišťuje titr protilátek převyšující kritérium serologické ochrany pro každou antigenní složku v případě přijatelného procenta lidských subjektů.
23. Imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 17 až 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje adjuvans.
24. Imunogenní prostředek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e adjuvans jsou sole hliníku.
25. Použití imunogenního prostředku podle libovolného z nároků 17 až 24 při výrobě léčebného prostředku pro léčbu nebo prevenci onemocnění způsobeného infekcí mikroorganismu *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium*

diphtheriae, virus hepatitidy B, virus Polio a *N. meningitidis*.

26. Způsob imunizace lidského hostitele proti onemocnění způsobenému mikroorganizmem *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus Polio a *N. meningitidis*, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci hostiteli imunologicky ochranné dávky imunogenního prostředku podle libovolného z nároků 17 až 24.
27. Způsob přípravy multivalentního imunogenního prostředku podle nároků 17 až 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje smíchání jednotlivých složek.
28. Multivalentní imunogenní prostředek umožňující ochranu hostitele proti onemocnění způsobenému mikroorganizmem *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae*, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje
- a) konjugát nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu mikroorganismu *H. influenzae* typB a
 - b) jeden nebo více konjugátů nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu bakterie z *Streptococcus pneumoniae*.
29. Imunogenní prostředek podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje dva nebo více konjugátů nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu nebo oligosacharidu z mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*.
30. Imunogenní prostředek podle nároku 29, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje více než 7 konjugátů nosičového proteinu a kapsulárního polysacharidu

nebo oligosacharidu z mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*.

31. Imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 28 až 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e kapsulární polysacharid(y) nebo oligosacharid(y) mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* je ze serotypu vybraného ze skupiny zahrnující 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 20, 22F, 23F a 33F.
32. Imunogenní prostředek podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje konjugáty nosičového proteinu a kapsulárních polysacharidů nebo oligosacharidů z mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae* serotypy 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F a 23F.
33. Imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 28 až 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje adjuvans.
34. Imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 28 až 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e kapsulární polysacharid nebo oligosacharid mikroorganismu *H. influenzae* typ B není adsorbován na adjuvans, kterým je sůl hliníku.
35. Imunogenní prostředek podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e kapsulární polysacharidy nebo oligosacharidy mikroorganismu *S. pneumoniae* jsou adsorbovány na adjuvans, kterým je sůl hliníku.
36. Imunogenní prostředek podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e kapsulární polysacharid nebo oligosacharid mikroorganismu *H. influenzae* typ B a kapsulární polysacharidy nebo

oligosacharidy *S. pneumoniae* nejsou adsorbovány na ajduvans, kterým je sůl hliníku.

37. Imunogenní prostředek podle nároku 28 až 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se nosný protein volí ze skupiny toxoid tetanu nebo záškrtu, CRM197, rekombinantní toxin záškrtu, OMPC z *N. meningitidis*, pneumolysin z *S. pneumoniae* a protein D z *H. influenzae*.

38. Imunogenní prostředek podle nároku 28 až 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kapsulární polysacharid nebo oligosacharid *H. influenzae* typ B a kapsulární polysacharid nebo oligosacharid *S. pneumoniae* nejsou konjugovány na stejný nosič.

39. Imunogenní prostředek podle nároku 38, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kapsulární polysacharid nebo oligosacharid *H. influenzae* typ B a kapsulární polysacharid nebo oligosacharid *S. pneumoniae* nejsou všechny konjugovány na CRM197.

40. Imunogenní prostředek podle nároku 37 nebo 38, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nosným proteinem pro kapsulární polysacharidy nebo oligosacharidy *H. influenzae* typ B je toxoid tetanu.

41. Imunogenní prostředek podle nároku 38, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nosným proteinem pro všechny polysacharidy nebo oligosacharidy *S. pneumoniae* je protein D.

42. Imunogenní prostředek podle nároku 28 až 41, zpracovaný jako vakcína pro podání in vivo,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že jednotlivé

složky prostředku se vytvořily tak, že imunogennost jednotlivých složek není porušena jinými jednotlivými složkami prostředku.

43. Imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 28 až 41 vytvořený jako vakcinační prostředek pro aplikaci hostiteli *in vivo*, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e umožňuje titr protilátek převyšující kritérium serologické ochrany pro každou antigenní složku v případě přijatelného procenta lidských subjektů.
44. Imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 28 až 43, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se používá v léčebných prostředcích.
45. Použití imunogenního prostředku podle libovolného z nároků 28 až 43 při výrobě léčebného prostředku pro léčbu nebo prevenci onemocnění způsobeného infekcí mikroorganizmem *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae*.
46. Způsob imunizace lidského hostitele proti onemocnění způsobenému mikroorganizmem *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae*, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci hostiteli imunologicky ochranné dávky imunogenního prostředku podle libovolného z nároků 28 až 43.
47. Způsob přípravy multivalentního imunogenního prostředku podle libovolného z nároků 28 až 43, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje smíchání jednotlivých složek.
48. Sada obsahující dva multivalentní imunogenní prostředky pro dosažení ochrany hostitele proti onemocnění způsobenému mikroorganizmem *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus hepatitidy B, virus Polio a *N. meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae*, v y z n a č u j í c í

s e t í m, ž e zahrnuje první nádobu obsahující imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 17 až 24 a druhou nádobu obsahující imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 28 až 43.

49. Způsob imunizace lidského hostitele proti onemocnění za použití sady podle libovolného z nároků 1 až 16 nebo 48, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci imunologicky ochranné dávky imunogenního prostředku z první nádoby hostiteli do prvního místa, aplikaci imunologicky ochranné dávky imunogenního prostředku z druhé nádoby hostiteli do druhého místa a kde je to relevantní, aplikaci imunologicky ochranné dávky imunogenního prostředku z třetí nádoby hostiteli do třetího místa, kde první, druhé a třetí místo je drenážováno odlišnými lymfatickými žlázami.
50. Způsob podle nároku 49, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e první, druhé a kde je to relevantní, třetí místo, reprezentují odlišné končetiny hostitele.
51. Způsob podle nároku 49 nebo 50, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e aplikace imunogenních prostředků z první, druhé a kde je to relevantní, ze třetí nádoby probíhá stejný den.
52. Způsob podle libovolného z nároku 49 až 51, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e hostitel se následně jednou nebo vícekrát vakcinoval stejným způsobem, přičemž každá dávka je oddělena 2 až 12 týdny.
53. Způsob podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e hostitel je následně vakcinován stejným způsobem ještě dvakrát a každá dávka je oddělena přibližně 1 až 2 měsíci.