

P03 01043

KIVONAT

Vakcina

A találmány tárgya olyan immunogén készítményre vonatkozik, amely legalább két *Streptococcus pneumoniae* fehérjét és adott esetben egy TH1-immunválaszt indukáló adjuvánst tartalmaz. A *Streptococcus pneumoniae* fehérjéket a polihisztidin triád fehérjecsalcából (PhtX), kolin-kötő fehérjecsalc (CbpX), csonka CbpX fehérje, LytX fehérjecsalc, csonka LytX fehérje, csonka CbpX-csonka LytX kiméra fehérjék, Ply jelölésű pneumolizin, pspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 és Sp133 közül választják.

A találmány tárgya továbbá az immunogén készítmények alkalmazása 55 év feletti idősokban pneumococcus okozta tüdőgyulladás, illetve csecsemőkben és kisgyerekekben pneumococcus okozta középfülgyulladás kezelésére vagy megelőzésére szolgáló gyógyszer előállítására.

Sándor + Sándor



S. J. G. & B.
Széchenyi Út 11. I. emelet
H-1062 Budapest, Tel. 461-1113
Telefax: 461-1140, Telex: 761-1133

P03 01043

Vakcina

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A találmány tárgya 2 vagy több *S. pneumoniae* fehérje kombinációjára, ezek előállítására és vakcinaként gyógyszerben történő alkalmazásukra vonatkozik. Az ilyen kombinációk különösen hasznosak a csecsemők és idősök streptococcusos fertőzéssel szembeni védekezésben.

A *Streptococcus pneumoniae* egy Gram-pozitív baktérium, amely a megbetegedések és elhalálozások nagy százalékáért felelős (különösen a fiataloknál és az öregeknél) és olyan invazív betegségeket okoz, mint a tüdőgyulladás, a bakterémia (baktérium jelenléte a vérben) és az agyhártyagyulladás, és kórokozó telepképzésével kapcsolatos betegségek, mint a heveny középfülgyulladás. A pneumococcus okozta tüdőgyulladás mértéke az Amerikai Egyesült Államokban a 60 év feletti személyeknél 100000 emberből 3-8 főre becsülhető. Az esetek 20 %-ában az antibiotikus kezelés ellenére a tüdőgyulladás bakterémiához és más megnyilvánuláshoz, például agyhártyagyulladáshoz vezet közel 30%-os elhalálozási aránnyal.

A pneumococcus baktériumot kémiaailag kötött poliszacharid tok zárja körül, amely szerotípus specifikitást biztosít. 90 pneumococcus szerotípus ismert és a tok alapvetően meghatározza a pneumococcusok virulenciáját, mivel a tok nem csak a komplementrendszerrel védi a baktérium belső felszínét, hanem önmaga is gyengén immunogén jellegű. A poliszacharidok T-sejt



választól független antigének és nem dolgozhatók fel vagy mutat-
hatók be az MHC molekulákon a T-sejtekkel való kölcsönhatáshoz.
A poliszacharidok azonban képesek az immunrendszert stimulálni
egy olyan alternatív mechanizmuson keresztül, amely részt vesz a
B-sejtek felszínén lévő receptorok keresztkötéseinek kialakítá-
sában.

Számos kísérletben kimutatták, hogy az invazív
pneumococcusok okozta betegséggel szembeni védelem leginkább a
tokkal szembeni antitest-specifitással van összefüggésben, és a
védelem szerotípus-specifikus.

A *Streptococcus pneumoniae* az invazív bakteriális betegség
és a középfülgyulladás kialakulásának leggyakoribb oka a csecse-
mőkben és fiatal gyerekekben. Hasonlóképpen az idősebbek gyenge
immunválaszt adnak a pneumococcus alapú vakcinákra (Roghmann és
mtsai., (1987), J. Gerontol. 42:265-270), ennél fogva megnő a
bakteriális eredetű tüdőgyulladás előfordulása ebben a populáci-
óban (Verghese és Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285).

A 23-elemű nem konjugált pneumococcus vakcina a klinikai ha-
tékonyág nagy ingadozását mutatja 0 %-tól 81 %-ig (Fedson és
mtsai., (1994) Arch Intern Med. 154:2531-2535). Úgy tűnik, hogy
a hatékonyság az immunizálandó kockázati csoporttal, például az
öregebb korosztállyal, a Hodgkin-kórban szenvedő betegekkel,
lépeltávolítás utáni állapotokkal, sarlósejtes betegségben szen-
vedőkkel és gamma-globulin-hiányos betegekkel (Fine és mtsai.,
(1994) Arch Intern Med. 154:2666-2677) és a betegség megnyilván-
ulásával van összefüggésben. A 23-elemű vakcina nem mutat vé-
delmet a pneumococcus okozta tüdőgyulladással (bizonyos magas
kockázatú csoportokban, például az öregebb korosztályban) és a



középfülgyulladásos betegségekkel szemben.

A csecsemőkben hiányzó immunogenitás leküzdésére tervezett stratégiák magukban foglalják a poliszacharid erősen immunogén fehérjékhez történő kapcsolását, amely bystander T-sejt támogatást biztosít és amely immunológiai jellegű emlékezést indukál azzal a poliszacharid antigénnel szemben is, amely az immunogén fehérjéhez kapcsolódik.

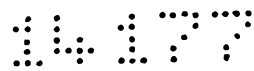
Azonban továbbra is szükség van javított pneumococcus vakcina készítményekre, különösen azokra, amelyek hatásosabbak a pneumococcus betegség (különösen a tüdőgyulladás) öregekben és fiatal gyerekekben történő megelőzésében vagy enyhítésében.

A találmány tárgya egy ilyen javított vakcina.

Az egyik megközelítésben a találmány tárgya egy olyan immunogén készítmény, amely legalább két *S. pneumoniae* fehérjét tartalmaz, amely fehérjéket a Poli-Hisztidin Triád család fehérjéi (PhtX), kolin-kötő fehérjecs család fehérjéi (CbpX), csonka CbpX fehérjék, LytX család fehérjéi, csonka LytX fehérjék, csonka CbpX-csonka LytX kiméra fehérjék, pneumolizin (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 és Sp133 közül választjuk. Egy másik előnyös kiviteli alakban a fehérje egyikét a kolin-kötő fehérjecs család fehérjéi (CbpX), vagy csonka CbpX, vagy csonka CbpX-csonka LytX kiméra fehérjék közül választjuk.

Ezzel kapcsolatos megközelítésben a találmány tárgya középfülgyulladás csecsemőkben vagy a tüdőgyulladás öregekben történő kezelésére vagy enyhítésére szolgáló vakcina. Adott esetben a vakcina egy olyan adjuvánst is tartalmaz, amely előnyösen TH1 immunválaszt indukál.

Egy még további megközelítésben a találmány tárgya eljárás a



találmány szerinti vakcina előállítására, amely eljárás a 2 különböző *S. pneumoniae* fehérje kiválasztásából és izolálásából, majd a fehérjék gyógyászatilag elfogadható hordozóval történő összekeveréséből áll.

A találmány tárgya javított vakcina pneumococcus fertőzés megelőzésére vagy enyhítésére idősokban (például tüdőgyulladás) és/vagy csecsemőkben (például középfülgyulladás), amely a pneumococcus fehérje alapú megközelítésére támaszkodik. Egy előnyös kiviteli alakban a vakcina az időskori pneumococcus fertőzés megelőzésére vagy enyhítésére alkalmas. Mivel a legtöbb felnőtt ember ki van téve a *Streptococcus pneumoniae*-nak, a vakcinát az alapul szolgáló immunválasz védő hatású szintre történő fokozására szánjuk felnőttekben és öregekben a találmányban azonosított legalább két pneumococcus fehérje beadásával. A pneumococcus fehérjéket *S. pneumoniae* poliszacharidok hiányában adjuk be.

A találmánnyal összefüggésben a beteget akkor tekintjük idősnek, ha a beteg életkora 55 év vagy több, előnyösen 60 év, előnyösebben 65 év. Tehát a találmány egyik kiviteli alakja egy olyan vakcina készítmény, amely pneumococcus fehérjéket tartalmaz időskori tüdőgyulladás megelőzésére.

Egy másik kiviteli alakban a találmány tárgya egy vakcina készítmény, amely csecsemőkben (jellemzően 0-2 éves korig) való alkalmazásra alkalmas és két vagy több találmány szerinti pneumococcus fehérjét tartalmaz.

A találmány szerinti pneumococcus fehérjék

A találmány szerinti *Streptococcus pneumoniae* fehérjék vagy a sejtfelületen jelennek meg legalább a pneumococcus életciklu-



sának egy részében, vagy olyan fehérjék, amelyeket a pneumococcus választ ki vagy szabadít fel. Előnyösen a találmány szerinti fehérjék kombinációját 2 különböző csoportból választjuk ki, például az LXXC (ahol X jelentése bármely aminosav (például a polihisztidin triád család (PhtX)) II-es típusú szignál szekvencia mintázattal rendelkező fehérjék, kolin-kötő fehérjék (CbpX), I-es típusú szignál szekvencia mintázattal rendelkező fehérjék (például Sp101), LPXTG mintázatú fehérjék (ahol X jelentése bármelyik aminosav, például Sp128, Sp130), toxinok (például Ply) stb. közül választjuk ki. A csoportok (vagy mintázatok) előnyös példái a következő fehérjék vagy ezek immunológiaiilag funkcionális ekvivalensei.

A találmány szerinti immunogén készítmény legalább két fehérjét tartalmaz a következők közül: polihisztidin triád fehérjecs család (PhtX), kolin-kötő fehérjecs család (CbpX), csonka CbpX fehérje, LytX fehérjecs család, csonka LytX fehérje, csonka CbpX-csonka LytX kiméra fehérjék (vagy fúziós fehérjék), pneumolizin (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 és Sp133. Azonban, ha a CbpX fehérjecs családhoz tartozó fehérje a PspC, akkor a második fehérje nem lehet a PspA vagy a PsaA. Előnyösen az immunogén készítmény két vagy több fehérjét tartalmaz a következők közül: polihisztidin triád fehérjecs család (PhtX), kolin-kötő fehérjecs család (CbpX), csonka CbpX fehérje, LytX fehérjecs család, csonka LytX fehérje, csonka CbpX-csonka LytX kiméra fehérjék (vagy fúziós fehérjék), pneumolizin (Ply), PspA, PsaA és Sp128. Előnyösebben az immunogén készítmény két vagy több fehérjét tartalmaz a következők közül: polihisztidin triád fehérjecs család (PhtX), kolin-kötő fehérjecs család (CbpX), csonka CbpX fehérje, LytX fehérjecs család,

lád, csonka LytX fehérje, csonka CbpX-csonka LytX kiméra fehérjék (vagy fúziós fehérjék), pneumolizin (Ply) és Sp128.

A Pht (polihisztidin triád) család a PhtA, PhtB, PhtD és PhtE fehérjéket tartalmazza. A családot a lipidációs szekvencia, prolin-gazdag régióval elválasztott két domén és számos hisztidin hármassal, amelyek valószínűleg a fém vagy nukleozid-kötésben vagy az enzim aktivitásban vesznek részt, dupla-spirális régiók (3-5), konzervált N-terminális és heterogén C-terminális jellemzi. Ezek a tulajdonságok a vizsgált pneumococcusok mindegyik törzsére jellemzőek. Homológ fehérjék találhatóak más *Streptococcus* és *Neisseria* fajokban is. A család előnyös tagjai a PhtA, PhtB és PhtD. Előnyösebben a PhtA vagy PhtD. Nyilvánvaló azonban, hogy a Pht A, B, D és E kifejezések olyan fehérjékre utalnak, amelyeket a későbbi hivatkozásokban ismertetett szekvenciákkal rendelkeznek, valamint ezek természetben hozzáférhető (és ember által előállított) variánsai, amelyek a hivatkozott fehérjékkel legalább 90 %-ig azonos szekvencia homológok. Előnyösen legalább 95 %-ig azonosak és legelőnyösebben 97 %-ig azonosak.

Ami a PhtX fehérjéket illeti a PhtA-t a WO 98/18930 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetik és Sp36-ként is utalnak rájuk. Amint azt korábban megjegyeztük ez a fehérje a polihisztidin triád családba tartozik és LXXC II-típusú szignál szekvencia mintázattal rendelkezik.

A PhtD-t a WO 00/37105 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat ismerteti és Sp036D-ként is utalnak rá. Amint azt korábban megjegyeztük, ez a fehérje szintén a polihisztidin triád családba tartozik és LXXC II-es típusú szignál szekvencia mintázattal

rendelkezik.

A PhtB-t a WO 00/37105 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat ismerteti és Sp036B-ként is utalnak rá. A PhtB család másik tagja a C3-lebontó polipeptid, amelyet a WO 00/17370 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat ismertet. Ez a fehérje szintén a polihisztidin triád családhhoz tartozik és LXXC II-es típusú szignál szekvencia mintázattal rendelkezik. Az előnyös immunológiaiailag funkcionális ekvivalense a WO 98/18930 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetett Sp42 fehérje. A csonka PhtB-t (körülbelül 79 kD) a WO 99/15675 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat ismerteti, amelyet szintén a PhtX család tagjának tekintünk.

A PhtE-t a WO 00/30299 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetik és BVH-3-ként utalnak rá.

Ami a kolin-kötő fehérjecsáládöt illeti a fehérjecsálád tagjait eredetileg olyan pneumococcus fehérjékként azonosították, amelyek kolin-affinitás kromatográfia segítségével tisztíthatók. A kolin-kötő fehérjék egyike sem kötődik kovalensen a sejtfal foszforilkolin vegyületekhez, a teichosavhoz és a membránkapcsolt lipoteichosavhoz. Ami a teljes fehérjecsáládöt illeti szerkezetileg általában számos régióval rendelkeznek, jöllehet a fehérjék pontos természete (aminosav szekvencia, hossz stb.) változhat. Általában a kolin-kötő fehérjék egy N-terminális régiót (N), konzervált ismétlődő régiókat (R1 és/vagy R2), prolin-gazdag régiót (P) és egy konzervált kolin-kötő régiót (C) tartalmaznak, amely kolin-kötő régió több ismétlődésből épül fel és körülbelül a fehérje felét jelenti. Amint azt a leírásban használjuk, a „kolin-kötő fehérjecsálád (Cbp)“ kifejezés jelentése a



WO 97/41151 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban azonosított kolin-kötő fehérjék, a PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD és CbpG. A CbpA-t a WO 97/41151 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetik. A CbpD-t és a CbpG-t a WO 00/29434 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetik. A PspC-t a WO 97/09994 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetik. A PbcA-t a WO 98/21337 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetik. Az SpSA a WO 98/39450 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetett kolin-kötő fehérje. A kolin-kötő fehérjéket előnyösen a CbpA, PbcA, SpsA és PspC közül választjuk.

Egy másik előnyös kiviteli példa a csonka CbpX, ahol a „CbpX” kifejezést az előzőekben megadtuk és a „csonka” kifejezés olyan CbpX fehérjékre utal, amelyeknél a kolin-kötő régió (C) 50 %-a vagy nagyobb része hiányzik. Előnyösen az ilyen fehérjéknél a teljes kolin-kötő régió hiányzik. Előnyösebben az ilyen csonka fehérjékből hiányzik (i) a kolin-kötő régió és (ii) a fehérje N-terminális felének egy része is, de legalább egy ismétlődő régió (R1 vagy R2) megmarad. Még előnyösebben a csonka fehérje a 2 ismétlődő régiót tartalmazza (R1 vagy R2). Az ilyen előnyös kiviteli alakokra példák a WO 99/51266 vagy WO 99/51188 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban bemutatott NR1xR2 és R1xR2 csonka fehérjék, azonban a hasonló kolin-kötő régió nélküli más kolin-kötő fehérjék is a találmány oltalmi körébe tartoznak.

A LytX család tagjai sejtlízissel összefüggő membránkapcsolt fehérjék. Általában az N terminális domén kolin-kötő domént vagy doméneket tartalmaz, azonban a LytX család nem rendelkezik az összes olyan tulajdonsággal, amely az előzőekben



említett CbpA fehérjecsaldában megtalálható, és így a találmány esetében a LytX család különbözik a CbpX családtól. A CbpX családdal ellentétben a C-terminális domén tartalmazza a LytX fehérjecsaldá katalitikus doménjét. A családhoz tartozik a LytA, B és C. A LytX családot illetően a LytA fehérjét Ronda és mtsai. Eur J Biochem, 164:621-624 (1987) ismertetik. A LytB-t a WO 98/18930 számú nemzetközi PCT iratban ismertetik és Sp46-ként is utalnak rá. A LytC-t is a WO 98/18930 számú nemzetközi PCT iratban ismertetik és Sp91-ként utalnak rá. Ennek a fehérjecsaldának az előnyös tagja a LytC fehérje.

További előnyös kiviteli alakok a LytX család csonka fehérjéi, ahol a „LytX” kifejezést az előzőekben adtuk meg és a „csonka fehérjék” kifejezés olyan fehérjékre utal, amelyeknek a kolin-kötő régiójából 50 % vagy több hiányzik. Előnyösen az ilyen fehérjékből a teljes kolin-kötő régió hiányzik. Az ilyen csonka fehérjékre példa található a találmány szerinti példákban.

A találmány szerinti még további előnyös kiviteli alakok magukban foglalják a csonka CbpX-csonka LytX kiméra fehérjét (vagy fúziós fehérjét). Előnyösen ide tartoznak CbpX NR1xR2 (vagy R1xR2) csonka fehérje és LytX C-terminális része (Cterm, azaz a kolin-kötő domének hiánya)(például a LytCCterm vagy Sp91Cterm). Előnyösebben a CbpX-et a CbpA, PbcA, SpsA és PspC közül választjuk. Még előnyösebben a CbpX a CbpA. Előnyösen LytX fehérje a LytC (amelyre Sp91-ként is utalnak).

A találmány szerinti másik kiviteli alak a PspA vagy a csonka PsaA, amelynek hiányzik a kolin-kötő doménje (C) és fúziós fehérjeként a LytX fehérjével expresszáljuk. Előnyösen a LytX

fehérje a LytC.

A pneumolizin különböző citolitikus és komplement aktiválási aktivitásokkal rendelkező többfunkciós toxin (Rubins és mtsai., *Am. Respi. Cit Care Med*, 153:1339-1346 (1996)). A toxint a pneumococcusok nem választják ki, hanem autolizin hatására a pneumococcusok lízise során szabadul fel. A hatásai közé tartozik például a gyulladáscitokinek humán monociták általi termelésének stimulálása, a humán légzőhámra lévő csillószőrök csapódásának gátlása és a neutrofilek baktericid hatásának és migrációjának csökkentése. A pneumolizin legnyilvánvalóbb hatását a vörösvérsejtek lízise során fejtik ki, amely magában foglalja a koleszterinhez történő kötődést. Mivel ez egy toxin, ezért szükség van a toxikus hatásának hatástalanítására (azaz amikor védőhatás elérésére alkalmas dózisban biztosítjuk ember számára, akkor nem toxikus), mielőtt *in vivo* beadnánk. A vad-típusú vagy természetes pneumolizin expressziója és klónozása jól ismert a szakterületen. Lásd például Walker és mtsai., (*Infect Immun*, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell és mtsai., (*Biochim Biophys Acta*, 1007:67-72 (1989)) és Mitchell és mtsai., (*NAR*, 18:4010 (1990)). A Ply toxikusságának hatástalanítása kémiai úton, például formalinos vagy glutáraldehides kezeléssel vagy a kettő kombinálásával végezhető. Az ilyen eljárások jól ismertek a szakterületen a különféle toxinok esetében. Másik lehetőségként a Ply toxikussága genetikailag is hatástalanítható. Következésképpen a találmány magában foglalja a pneumococcus fehérjék származékait, amelyek például mutáns fehérjék lehetnek. A leírásban a „mutáns” kifejezés jelentése egy olyan molekulára utal, amely deléció, addíció vagy egy vagy több aminosav he-

lyettesítésén esik át helyspecifikus mutációnál vagy bármely más hagyományos eljárásnál jól ismert technikák segítségével. Amint azt az előzőekben ismertettük, például a mutáns Ply fehérje úgy módosítható, hogy biológiailag inaktív legyen, miközben az immunogén epitópjai megmaradnak, lásd például WO 90/06951 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat, Berry és mtsai. (Infect Immun, 67:981-985 (1999)) és WO 99/03884 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat.

Amint azt a leírásban használjuk, nyilvánvaló, hogy a „Ply” kifejezés jelentése gyógyászati alkalmazásra alkalmas mutáns vagy toxikusságától mentesített pneumolizinre utal.

Ami a PsaA és PspA fehérjéket illeti, mindegyik ismert a szakterületen. Például a PsaA fehérjét és transzmembrán deléciós variánsait Berry és Paton (Infect Immun 1996 dec; 64(12):5255-62) ismertetik. A PspA fehérjét és transzmembrán deléciós variánsait például az US 5804193 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, a WO 92/14488 és WO 99/53940 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetik.

Az Sp128 és Sp130 fehérjéket a WO 00/76540 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetik.

Az Sp125 egy olyan pneumococcus felületi fehérjére példa, amely LPXTG (ahol X jelentése bármilyen aminosav) sejtfal horogonyzó mintázattal rendelkezik. Ezzel a mintázattal rendelkező bármely pneumococcus felületi fehérjéről azt találtuk, hogy használható a találmánnyal összefüggésben és így a találmány szerinti további fehérjének tekinthető. Magát az Sp125-t a WO 98/18930 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetik és ZmpB-ként - cink-metalloproteinázként is ismert.

Az Sp101-et a WO 98/06734 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetik (# y85993 referencia számon). A fehérjét az I-es típusú szignál szekvencia jellemzi.

Az Sp133-at a WO 98/06734 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetik (# y85992 referencia számon). Ezt a fehérjét is az I-es típusú szignál szekvencia jellemzi.

A találmány szerinti fehérjék előnyösen kombinálhatók is. Előnyös kombinációk, nem korlátozó jelleggel a PhtD+NR1xR2, PhtD+NR1xR2-Sp91Cterm kiméra vagy fúziós fehérjék, PhtD+Ply, PhtD+Sp128, PhtD+PsaA, PhtD+PspA, PhtA+NR1xR2, PhtA+NR1xR2-Sp91Cterm kiméra vagy fúziós fehérjék, PhtA+Ply, PhtA+Sp128, PhtA+PsaA, PhtA+PspA, NR1xR2+LytC, NR1xR2+PspA, NR1xR2+PsaA, NR1xR2+Sp128, R1xR2+LytC, R1xR2+PspA, R1xR2+PsaA, R1xR2+Sp128, R1xR2+PhtD, R1xR2+PhtA. Előnyösen az NR1xR2 (vagy R1xR2) régiók a CbpA-ból vagy a PspC-ből, előnyösebben a CbpA-ból származnak.

A pneumococcus fehérjék különösen előnyös kombinációja a Ply (vagy csonka változata vagy immunológiailag funkcionális ekvivalense)+PhtD (vagy csonka változata vagy immunológiailag funkcionális ekvivalense)+NR1xR2 (vagy R1xR2). Előnyösen az NR1xR2 (vagy R1xR2) régiók a CbpA-ból vagy a PspC-ből, előnyösebben a CbpA-ból származnak.

A találmány magában foglalja a találmány szerinti fehérjék „immunológiailag funkcionális ekvivalenseit” is. Az „immunológiailag funkcionális ekvivalens” kifejezést a fehérje találmány szerinti fehérjékből származó legalább egy védőhatást előidéző epitópot tartalmazó peptidjeként határozzuk meg. Ezek az epitópok jellemző módon a sejt felszínén jelennek meg, erősen konzerváltak és képesek baktériummal szembeni antitest válasz

indukálására a gazdaszervezetben vagy a toxikus hatások megakadályozásában. Előnyösen a funkcionális ekvivalens legalább 15 és előnyösen 30 vagy több szomszédos aminosavat tartalmaz a találmány szerinti fehérjéből, és ezek az immunológiailag funkcionális ekvivalensek alkalmazhatók azzal a feltétellel, hogy képesek lényegében az eredeti fehérjéhez hasonló immunválasz indukálására. A potenciális B-sejt epitópok helyzete a fehérje szekvenciájában könnyen meghatározható a sejtfelszínen megjelenő és antigén hatású peptidek azonosításával két módszer kombinációját alkalmazva: a két módszer a kétdimenziós struktúra meghatározása és az antigén jelleg indexének meghatározása. A kétdimenziós szerkezet meghatározása a PSIPRED program segítségével végezhető el (David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, Egyesült Királyság). Az antigén jelleg indexe a Jameson és Wolf (CABIOS 4:181-186(1988)) által ismertetett eljárás alapján számítható ki.

A találmány előnyökkel rendelkezik a *S. pneumoniae* poliszacharid vakcinákkal szemben, amennyiben a több *S. pneumoniae* fehérje (immunogén) készítmények nagyobb védőhatást biztosíthatnak az immunrendszer két ágában a számos szerotípussal szemben, továbbá gátolhatják a patogének megtapadását és telepkepzését, potenciálisan olyan antitesteket indukálhatnak, amelyek semlegesítik a patogén toxikus/enzimátikus hatásait.

A találmány tárgya továbbá kombinációs vakcinák, amelyek védelmet biztosítanak a különböző patogénekkal szemben. Számos gyermekgyógyászati vakcina ismert kombinációs vakcinaként, hogy csökkentsék a befecskendezések számát, amelyet egy gyereknek meg



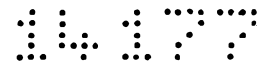
kell kapnia. Így a gyermekgyógyászati vakcinák esetében más patogénekből származó további antigének formulázhatók a találmány szerinti vakcinákkal. A találmány szerinti vakcinák, például a jól ismert, Diphtheria toxoidot (DT), tetanusz toxoidot (TT) és pertusszisz komponenseket [jellemzően fertőzőképtelenné tett Pertusszisz toxoid (PT) és rostos hemagglutinin (FHA) tetteszés szerint pertaktinnal (PRN) és agglutinin 1+2-vel együtt] tartalmazó „háromelemű” kombinációs vakcinával formulázható (vagy külön formulázható, de egy időben adható be), így például az INFANRIX-DTPaTM (SmithKlineBeecham Biologicals) kereskedelemben kapható vakcinával, amely DT, TT, PT, FHA és PRN antigéneket tartalmaz, vagy a TritanrixTM (SmithKlineBeecham Biologicals) kereskedelemben kapható vakcinával, amely a pertusszisz teljes sejtkomponenseit tartalmazza. A kombinált vakcina más antigént is tartalmazhat, így például Hepatitisz B felületi antigént (HbsAg), Polio vírus antigéneket (például inaktivált háromelemű polio vírus - IPV), *Moraxella catarrhalis* külsőmembrán fehérjét, nem tipizálható *Haemophilus influenzae* fehérjét, *N. meningitidis* B külső membrán fehérjét.

A kombinációs vakcinával formulázható (különösen a középfülgyulladás megelőzéséhez) előnyös *Moraxella catarrhalis* fehérje antigénekre példák a következők: OMP106 [WO 97/41731 (Antex) és WO 96/34960 (PMC) számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratok]; OMP21; LbpA és/vagy LbpB [WO 98/55606 (PMC) számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratok]; TbpA és/vagy TbpB [WO 97/13785 és WO 97/32980 (PMC) számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratok]; CopB [Helminen ME és mtsai., (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 és/vagy UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas) számú



nemzetközi PCT közrebocsátási irat]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824 nemzetközi bejelentési számú irat); PilQ (PCT/EP99/03823 nemzetközi bejelentési számú irat); OMP85 (PCT/EP00/01468 nemzetközi bejelentési számú irat); lipo06 (GB 9917977.2 nagy-britanniai szabadalmi leírás); lipo10 (GB 9918208.1 nagy-britanniai szabadalmi leírás); lipo11 (GB 9918302.2 nagy-britanniai szabadalmi leírás); lipo18 (GB 9918038.2 nagy-britanniai szabadalmi leírás); P6 (PCT/EP99/03038 nemzetközi bejelentési számú irat); D15 (PCT/EP99/03822 nemzetközi bejelentési számú irat); OmplA1 (PCT/EP99/06781 nemzetközi bejelentési számú irat); Hly3 (PCT/EP99/03257 nemzetközi bejelentési számú irat); és az OmpE. A kombinációs vakcinával együtt formulázható nem tipizálható *Haemophilus influenzae* antigénekre (különösen a középfülgyulladás megelőzésére) példák: Fimbrin fehérje [US 5766608 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás - Ohio State Research Foundation] és a belőlük származó peptideket tartalmazó fúziók [például az LB1(f) peptid fúziók; US 5843464 (OSU) számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás vagy a WO 99/64067 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat]; OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs) számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat]; P6 [EP 281673 (State University of New York) számú európai szabadalmi leírás]; TbpA és/vagy TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (WO 94/12641 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat); D-fehérje (EP 594610 számú európai szabadalmi leírás); P2 és P5 (WO 94/26304 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat).

Egy másik kiviteli alakban az előzőekben felsorolt különféle antigéneket a találmány szerinti immunogén készítmény olyan an-



7
tigénekként tartalmazza, amelyek abból a baktériumból készített külső membrán vezikulumok (hólyagok) felszínén vannak jelen, amelyekből az antigének származnak.

A további kombinációk magukban foglalják a találmány szerinti *S. pneumoniae* fehérjét vírus antigénekkal, például influenza vírusból származó antigénekkal (legyengített, hasított vagy alegység [például felületi glikoproteinek, neuraminidáz (NA) és hemagglutinin (HA). Lásd például Chaloupka I. és mtsai., Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15:121-127]), RSV-vel (például F és G antigének vagy F/G fúziók, lásd például Schmidt AC. és mtsai., J Virol, 2001 Május, 4594-4603), PIV3-mal (például HN és F-fehérjék, lásd Schmidt és mtsai., korábban), Varicella antigénekkal (például legyengített, I-V glikoproteinek stb.) és az MMR (kanyaró, mumpsz, rubeola) bármely (vagy összes) komponensével kombinálva.

A találmány szerinti poliszacharid antigének

A találmány magában foglal továbbá olyan kombinációs vakcinákat is, amelyek 2 vagy több *S. pneumoniae* fehérjét tartalmaznak *S. pneumoniae* poliszacharidoktól eltérő poliszacharidokkal kombinálva. Ilyen poliszacharidok izolálhatók például a *H. influenzae*-ből, így a B-típusú *H. influenzae*-ből (Hib), az *N. meningitidis* A, C, W, Y csoportokból, a *S. pneumoniae*-től eltérő más Streptococcusokból (például a Streptococcus B-csoport, *S. pyogenes* stb), Staphylococcusokból (például *S. aureus*, *S. epidermidis*), *E. coli*-ből, Enterococcusokból (például *E. faecalis* és *E. faecium*) stb. Előnyösek a B-típusú *H. influenzae*-ből (Hib) és/vagy az *N. meningitidis* A, C, W135 és/vagy Y csoportjából származó poliszacharidok.



Amint azt korábban említettük az oltáshoz használt poliszachariddal kapcsolatos probléma az, hogy a poliszacharidok önmagukban gyenge immunogének. Ezt a problémát leküzdve a poliszacharidok olyan fehérje hordozókhoz kapcsolhatók, amelyek bystander T-sejt immunválasz segítséget biztosítanak. Előnyös tehát, ha a találmányban alkalmazott poliszacharidokat egy ilyen fehérje hordozóhoz kapcsoljuk. A poliszacharid immunogének előállításához jelenleg általánosan használt fehérje hordozókra példák a diftéria és tetanusz toxoidok (DT, DT CRM197, más DT mutánsok, például a 148-as Glu helyzetben stb. [lásd például US 4709017 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, WO 93/25210, WO 95/33481 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat stb.] illetve TT(és TT C-fragmens)), Keyhole Limpet hemocianin (KLH), *N. meningitidis*-ből származó OMPC és a tuberkulin tisztított fehérje származéka (PPD).

A poliszacharid alapú immunogén készítmények (vagy vakcinák) esetében egy másik hordozó a *Haemophilus influenzae*-ből származó D-fehérje (EP 594610 számú európai megadott szabadalmi leírás) vagy ezek fragmensei. Az alkalmazásra alkalmas fragmensek magukban foglalják a T-helper epitópot tartalmazó fragmenseket. Közelebbről a D-fehérje fragmens előnyösen a fehérje N-terminálisának 1/3-át tartalmazza.

A poliszacharid bármely ismert eljárással kapcsolható a hordozó fehérjéhez (például Likhite, US 4372945 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás és Armor és mtsai., US 4474757 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás). Előnyösen CDAP konjugációt végzünk (WO 95/08348 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat). Az immunogén hatás fokozása érdekében



a poliszacharidok mérete változtatható (depolymerizálható), a hatása adjuvánssal javítható, liofilizálható, vagy különböző hordozó fehérjékhez kapcsolható.

A találmány szerinti TH1 adjuvánssok

A találmány szerinti vakcinák hatását előnyösen adjuvánssal javítjuk. Megfelelő adjuvánssok az alumínium sók, például alumínium-hidroxid gél (timsó) vagy alumínium-foszfát, de a kalcium, magnézium, vas vagy cink sója lehet, vagy az acilezett tirozin oldhatatlan szuszpenziója, vagy acilezett cukrok, kationosan vagy anionosan derivatizált poliszacharidok vagy polifoszfazének lehetnek.

Előnyös, ha az adjuvánst azok közül választjuk, amelyek előnyösen TH1-típusú választ indukálnak. A Th1-típusú citokinek magas szintje előnyben részesíti az adott antigénre adott sejt-közvetített immunválaszok indukálását, miközben a Th2-típusú citokinek magas szintje előnyben részesíti az antigénre adott humorális immunválaszok indukálását.

Fontos megjegyezni, hogy a Th1- és Th2-típusú immunválaszok közötti különbség nem abszolút. A valóságban egy egyén olyan immunválaszt támogat, amelyet túlnyomórészt Th1-válasz vagy túlnyomórészt Th2-válasz jellemez. Azonban gyakran elegendő megnézni a Mosmann és Coffman (Mosmann TR és Coffman RL (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7 145-173) által ismertetett egér CD4 +ve T-sejt klónok vonatkozásában a citokinek családjait. Hagyományosan a Th1-típusú immunválaszok az IFN- γ és IL-2 citokinek T-limfociták általi termelésével vannak kapcsolatban. Nem T-sejtek termelik a Th1-típusú

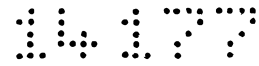


immunválaszok indukálásával gyakran közvetlenül kapcsolatban lévő más citokineket, például az IL-12-t. Ezzel szemben a Th2-típusú immunválaszok az IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 kiválasztásával vannak kapcsolatban. A túlnyomórészt Th1-immunválaszt elősegítő megfelelő adjuváns rendszerek a monofoszforil-lipid A vagy származéka, különösen a 3-de-O-acilezett monofoszforil lipid A (3D-MPL) (előállításához lásd a GB 2220211 számú nagy-britanniai szabadalmi leírást); és a monofoszforil lipid A, előnyösen a 3-de-O-acilezett monofoszforil lipid A alumínium sóval (például alumínium-foszfáttal vagy alumínium-hidroxiddal) vagy olaj-a-vízben emulzióval képezett készítménye. Az ilyen készítményekben az antigén és a 3D-MPL ugyanabban a szemcsés szerkezetben van jelen, lehetővé téve az antigén és immunstimuláló jelek hatékonyabb szállítását. A vizsgálatok kimutatták, hogy a 3D-MPL képes tovább fokozni a timsóhoz kötött antigén immunogén hatását (Thoelen és mtsai., Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454 számú megadott európai szabadalmi leírás).

Egy javított rendszer magában foglalja a monofoszforil lipid A és egy szaponin származék kombinációját, különösen a WO 94/00153 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban ismertetett QS21 és 3D-MPL kombinációját, vagy egy kevésbé reaktív készítményt, ahol a QS21-et koleszterinnel csillapítanak a WO 96/33739 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratnak megfelelően.

A különösen hatásos adjuváns készítmény QS21-et, 3D-MPL-t és tokoferolt tartalmaz olaj-a-vízben emulzióban, amelyet a WO 95/17210 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat ismertet és ez az előnyös készítmény.

A vakcina előnyösen egy szaponint, előnyösebben QS21-et is



tartalmaz. A készítmény egy olaj-a-vízben emulziót és tokoferolt is tartalmazhat (WO 95/17210 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat).

A találmány tárgya továbbá eljárás vakcina készítmény előállítására, amely a találmány szerinti fehérje gyógyászatiilag elfogadható hordozóval, például 3D-MPL-lel történő összekeveréséből áll.

A metilezetlen CpG-t tartalmazó oligonukleotidok is előnyös TH1 immunválaszt indukáló szerek és alkalmasak a találmány szerinti alkalmazáshoz.

A találmány további megközelítésében egy vakcinát biztosít a leírásban ismertetettek szerint gyógyszerben történő alkalmazásra. Az egyik kiviteli alakban eljárást biztosítunk időskori tüdőgyulladás megelőzésére vagy enyhítésére, amelynek során a találmány szerinti vakcina biztonságos és hatékony mennyiségét és adott esetben Th1 adjuvánst adunk be az említett idős betegbe.

További kiviteli alakban eljárást biztosítunk középfülgyulladás megelőzésére vagy enyhítésére csecsemőkben (24 hónapos korig) vagy kisgyerekekben (jellemzően 24 hónaptól 5 éves korig), amelynek során a *Streptococcus pneumoniae* találmány szerinti fehérjét és adott esetben Th1 adjuvánst tartalmazó vakcina biztonságos és hatásos mennyiségét adunk be az említett csecsemőbe vagy kisgyerekekbe.

A találmány szerinti vakcina készítmények

A találmány szerinti vakcina készítmények úgy alkalmazhatók, hogy az említett vakcinát szisztémásan vagy nyálkán keresztül adjuk be a fertőzésre hajlamos emlősök (előnyösen emberi betegek) védelmére vagy kezelésére. A beadás módja lehet intramusz-

kuláris, intraperitoneális, intradermális vagy szubkután injekció; vagy nyálkán keresztül történő beadás az orális/tápcsatornába, légutakba, húgy- és ivarszervi szakaszba. A tüdőgyulladás vagy középfülgyulladás kezelése esetében a vakcinának intranazális beadása az előnyös (mivel a pneumococcusok orr-garati szállítása hatékonyabban megelőzhető, ezáltal annak korai fázisában legyengítve a fertőzést). Jóllehet a találmány szerinti vakcina egyetlen dózisban is beadható, annak komponensei együtt is beadhatók egyszerre vagy különböző időpontokban (például ha a poliszacharidok vannak a vakcinában akkor ezek a vakcina bakteriális fehérje komponenseinek beadásától külön adhatók be egyidőben vagy a fehérje komponensek beadása után 1-2 héttel, hogy egymásra vonatkozóan az immunválaszok összehangolása optimális legyen). A beadás egyedi útvonalán felül a beadás két különböző útvonala is alkalmazható. Például a virális antigének intradermálisan (ID) adhatók be, míg a bakteriális fehérjék intramuszkulárisan (IM) vagy intranazálisan (IN) adhatók be. Ha poliszacharidokat is alkalmazunk, akkor azok IM (vagy ID) adhatók be és a bakteriális fehérjék IN (vagy ID) adhatók be. Továbbá a találmány szerinti vakcinák IM adhatók be az alapozó dózisos esetében és IN az emlékeztető (booster) dózisok esetében.

A vakcina dózisokban lévő konjugált antigén mennyiségét úgy választjuk meg, hogy immunrendszert védő választ indukáljon a vakcinákra jellemző, jelentős mértékű káros mellékhatások nélkül. Ez a mennyiség attól függően változhat, hogy milyen specifikus immunogént alkalmazunk és azt milyen úton mutatják be a megfelelő sejtek. A fehérje antigének mennyisége a vakcinában jellemzően 1-100 µg, előnyösen 5-50 µg, legelőnyösebben 5-25 µg.

Ha poliszacharidot is alkalmazunk, akkor általában az várható, hogy mindegyik dózis 0,1-100 µg, előnyösen 0,1-50 µg, előnyösebben 0,1-10 µg és legelőnyösebben 1-5 µg poliszacharidot tartalmaz.

A sajátos vakcina komponenseinek optimális mennyiségei szabványos kísérletekkel határozhatók meg, beleértve az alanyban indukálódó megfelelő immunválaszok megfigyelését. Kezdeti beoltást követően az alanyok kellő időközökben egy vagy több emlékeztető immunizálást kaphatnak. Jellemzően a vakcina antigént (fehérjéket), adjuvánst, és kötőanyagokat vagy gyógyászati lag elfogadható hordozót tartalmaz.

A vakcinák elkészítését általánosan a „Vakcina Tervezés” (Vaccine Design) című munkában ismertetik („The subunit and adjuvant approach” (szerk. Powell M.F. és Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). A liposzómákba történő kapszulázást Fullerton ismerteti az US 4235877 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban.

Jóllehet a találmány szerinti vakcinák bármely úton beadhatók, az ismertetett vakcinák bőrbe történő (ID) beadása a találmány egyik kiviteli alakját képezi. Az emberi bőr egy külső „szarus” hámréteget tartalmaz, amelyet stratum corneumnak hívnak és az epidermiszt borítja be. Az epidermisz alatt helyezkedik el az úgynevezett dermisz réteg, amely viszont a bőr alatti szövetet borítja. Kutatók kimutatták, hogy a vakcina bőrbe fecskendezése különösen a dermiszbe történő befecskendezése immunválaszt stimulál, amely számos további előnnyel lehet kapcsolatban. A leírásban ismertetett vakcinák intradermális (bőrbe adott) oltása a találmány előnyös tulajdonságát képezi.

Az intradermális befecskendezés hagyományos technikája a „Mantoux-próba”, amelyben a bőrt letisztítjuk, majd egyik kézzel megfeszítjük, és egy szűk nyílású (0,114-0,241 mm) tű hegye nyílásával felfelé a tűt 10-15° szögben beszúrjuk. Mihelyt beszúrunk a tűhegy nyílását, a fecskendőt beljebb toljuk és addig toljuk, míg az enyhe nyomás megemeli a tűt a bőr alatt. A folyadékot ezután nagyon lassan befecskendezzük, miáltal hólyag vagy dudor képződik a bőr felszínén, és ezt a tű lassú kihúzása követi.

Újabban olyan eszközöket ismertettek, amelyeket kifejezetten folyékony hatóanyag bőrbe vagy bőrön keresztül történő beadáshoz terveztek, ilyenek például a WO 99/34850 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban és az EP 1092444 számú európai szabadalmi leírásban ismertetett eszközök, továbbá a WO 01/13977 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratban; US 5480381, US 5599302, US 5334144, US 5993412, US 5649912, US 5569189, US 5704911, US 5383851, US 5893397, US 5466220, US 5339163, US 5312335, US 5503627, US 5064413, US 5520639, US 4596556, US 4790824, US 4941880, US 4940460 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban, a WO 97/37705 és WO 97/13537 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratokban ismertetett sugárban befecskendező eszközök. A vakcina készítmények intradermális beadásának másfajta módszerei lehetnek a fecskendők és tűk vagy a szilárd vakcinák ballisztikus szállításához tervezett eszközök (WO 99/27961 számú nemzetközi PCT közrebocsátási irat), vagy transzdermális tapaszok (WO 97/48440; WO 98/28037 számú nemzetközi PCT közrebocsátási iratok); vagy a bőr felületét bevonó módszerek (transzdermális vagy transzkután szállítás; WO 98/20734, WO

98/28037 számú nemzetközi közrebocsátási iratok).

Amikor a találmány szerinti vakcinákat a bőrbe vagy előnyösebben a dermiszbe adjuk be, a vakcina kis folyadékmennyiségben, közelebbről 0,05-0,2 ml mennyiségben van jelen.

A bőrben vagy a találmány szerinti intradermális vakcinákban lévő antigének mennyisége hasonló lehet az intramuszkuláris vakcinákban (lásd korábban) található hagyományos dózisokhoz. Ennek megfelelően az intradermális vakcinákban lévő fehérje antigének mennyisége 1-100 μg , előnyösen 5-50 μg lehet. Hasonlóképpen ha jelen van, a poliszacharid konjugátum antigén mennyisége a vakcinákban általában elvárható, hogy 0,1-100 μg , előnyösen 0,1-50 μg , előnyösen 0,1-10 μg és legelőnyösebben 1-5 μg poliszacharidot tartalmaz. Azonban a bőr vagy az intradermális vakcinák jellegzetessége, hogy a készítmények „alacsony dózisúak” lehetnek. Ennek megfelelően az „alacsony dózisú” vakcinákban lévő fehérje antigének előnyösen akár 0,1-10 $\mu\text{g}/\text{dózis}$, előnyösen 0,1-5 $\mu\text{g}/\text{dózis}$ mennyiségben vannak jelen; és ha jelen vannak a poliszacharid konjugátum antigének 0,01-1 $\mu\text{g}/\text{dózis}$, előnyösen 0,01-0,5 $\mu\text{g}/\text{dózis}$ mennyiségben vannak jelen.

Amint azt a leírásban használjuk az „intradermális szállítás” kifejezés azt jelenti, hogy a vakcinát a bőrben a dermisz rétegébe juttatjuk el. Azonban a vakcina nem szükségszerűen található meg kizárólag a dermiszben. A dermisz egy olyan réteg a bőrben, amely az emberi bőr felszínétől 1,0-2,0 mm távolságra helyezkedik el, de ez a távolság bizonyos mértékű változékonyságot mutat az egyének között és a test különböző részeiben. Általában elfogadható, hogy a dermiszt a bőr felszíne alatt 1,5 mm-re érjük el. A dermisz a stratum corneum és az epidermisz között

helyezkedik el, annak felszínén és alatta a szubkután réteg van. A szállítás módjától függően a vakcina végső soron kizárólag vagy elsődlegesen a dermiszben helyezkedik el, vagy a vakcina végső soron az epidermisz és a dermisz között oszlik szét.

A találmány egy másik megközelítésében a találmány szerinti vakcina egy vagy több *S. pneumoniae* fehérjét kódoló DNS-t tartalmazhat oly módon, hogy a fehérje *in situ* jöjjön létre. A DNS a szakember számára ismert, különféle szállítórendszer bármelyikében lehet jelen, beleértve a nukleinsav expressziós rendszereket, bakteriális és virális expressziós rendszereket. Számos génszállító rendszer ismert a szakterületen, például Rolland (Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198, 1998) által és az abban hivatkozott iratokban ismertetett rendszerek. A megfelelő nukleinsav expressziós rendszerek tartalmazzák a betegben történő expresszióhoz szükséges DNS szekvenciákat (például megfelelő promotert és terminációs jelet). Amikor az expressziós rendszer egy rekombináns élő mikroorganizmus, például vírus vagy baktérium, a kérdéses gén az élő rekombináns vírus vagy baktérium genomjába illeszthető be. Az élő vektorral történő beoltás és *in vivo* fertőzés az antigén *in vivo* expressziójához és immunválaszok indukálásához vezet. E célból alkalmazott vírusok és baktériumok például a himlővírusok (például tehénhimlő, baromfi-himlő, kanárihimlő), alfavírusok (Sindbis vírus, Semliki Forest Vírus, Venezuelai Ló Agyvelőgyulladás Vírus), adenovírusok, adeno-rokon vírusok, picornavírusok (poliovírus, rhinovírus), herpesz vírusok (Varicella-zoster vírus stb.), Lisztéria, Salmonella, Shigella, Neisseria, BCG. Ezek a vírusok és baktériumok virulensek vagy különféle módon legyengítettek lehetnek,

hogy élő vakcinákat nyerjünk. Az ilyen élő vakcinák is a találmány részét képezik.

A találmány további megközelítésében eljárást biztosítunk a leírásban ismertetett vakcina készítmények előállítására, ahol az eljárás a találmány szerinti fehérjék összekeveréséből áll.

Előnyösen az előzőekben ismertetett poliszacharidokat tartalmazó antigén készítmények (és vakcinák) az alkalmazásukig liofilizált alakban vannak, amikoris rögtönzött módon hígító-szerben vesszük fel. Előnyösebben 3D-MPL jelenlétében liofilizáljuk, majd rögtönzött módon sóoldatban vesszük fel.

A vakcinák liofilizálása jól ismert a szakterületen. Jellemzően a folyékony vakcinát fagyasztva szárítjuk összetapadást gátló anyag, például cukrok, így szacharóz vagy laktóz jelenlétében (10-200 mg/ml kezdeti koncentrációban vannak jelen). A liofilizálás jellemzően lépések sorozatán keresztül valósul meg, például 69°C-on kezdődik, 3 óra alatt fokozatosan -24°C-ra áll be a hőmérséklet, majd 18 óráig ezt a hőmérsékletet tartjuk, majd 1 óra alatt fokozatosan -16°C-ra állítjuk be a hőmérsékletet, majd 6 órát ezen a hőmérsékleten tartjuk, majd 3 óra alatt fokozatosan 34°C-ra állítjuk be a hőmérsékletet és végül 9 órát ezen a hőmérsékleten tartjuk.

A találmány szerinti immunogén készítmények és vakcinák különféle állatmodellekben vagy humán szérumokkal vizsgálhatók. Ennek bemutatására a következő állatmodellek alkalmazhatók a pneumococcus fertőzés megállapításához. C3H/HeJ egereket (6-8 hetes) szubkután immunizálhatók 50 µl CFA adjuvánssal javított 15 µg fehérjével, amelyet 3-4 héttel később IFA-val javított 15 µg fehérjével történő emlékeztető immunizálás követ. A sziszté-

más fertőzésekből származó passzív és aktív védelem bemutatása érdekében az egereknek immunszérumok vagy fehérjék adhatók be intraperitoneálisan a 8-10. héten 15-90 LD50 mennyiségű pneumococcusokkal történő intraperitoneális befecskendezéssel végzett fertőzés előtt. Továbbá a fehérjék egér nasopharynx telepképzési állatmodellben vizsgálhatók (Wu és mtsai., Microbiol Pathogenesis 1997;23:127-137).

Az egereken kívül újszülött patkányok is alkalmasak az *S. pneumoniae*-val történő telepképzési és fertőzési vizsgálatokhoz. A passzív védőhatás kialakulásának vizsgálata során az egér immunszérumok beadása (100 µl intraperitoneálisan vagy 10 µl intranazálisan) azelőtt végezhető el, mielőtt *S. pneumoniae*-t (10 µl 2-5 napos növendék patkányokba intranazálisan adnánk be fertőzés céljából. A telepképzés az orr kimosásából származó minták (10-40 µl-t becsepegtetve, 10 µl-t kinyerve) lemezre helyezésével határozható meg.

A kombinációs vakcina fehérje komponensei közötti előnyös kölcsönhatások a vakcinában lévő mindegyik fehérje dózisának beadásával határozható meg, amelyek kiegészítő védőhatásúak az egyelemű vakcinában. A kombinációs vakcina egyelemű vakcinához viszonyított jobb védőhatása a komponensek közötti előnyös kölcsönhatásoknak tulajdonítható.

A találmányt a következő példákban mutatjuk be. A példákat szabványos technikák segítségével hajtjuk végre, amelyek szakember számára jól ismertek és a mindennapi gyakorlatukhoz tartoznak, kivéve ahol azt másképp részleteiben ismertetjük. A példák a találmány bemutatását szolgálják és nem kívánjuk ezekre korlátozni a találmány oltalmi körét.

PÉLDÁK1. példa Az antigének összeállítása és expressziója

NR1xR2

A CbpA egy 75 kDa méretű, sejtfelületen felgyülemlő fehérje, amely számos doménből áll. Az N-terminális domén 2 erősen konzervált ismétlődő szakaszt (R1 és R2) tartalmaz, míg a C-terminális domén 10 egymás után közvetlenül ismétlődő 20 aminosav szekvencia hosszú szakaszt tartalmaz. Az NR1xR2 termeléséhez csonka CbpA-t állítunk elő, azaz a csonka CbpA nem tartalmazza a kolin-kötő domént.

Az NR1xR2 gént PCR segítségével amplifikáljuk az *S. pneumoniae* 4-es szerotípusú törzséből nyert DNS-ből (lásd például WO 97/41157, vagy WO 99/51266 számú nemzetközi PCT közrebozsátási iratok). A PCR-t Expand High Fidelity PCR System, vagy Hi-Fi (Roche) segítségével végezzük. Ez a rendszer Taq-polimerázt és hibajavító polimerázt tartalmazó keverékből áll. A 3'-5' exonukleáz hibajavító aktivitás miatt a Hi-Fi alkalmazása háromszoros pontosságú DNS szintézist eredményez a sima Taq polimerázhoz képest.

A PCR fragmenseket a pGEM-T Vector Systems-ből (Promega) szárazó pGEM-T vektorba klónozzuk. Ez a lépés szükséges ahhoz, hogy lehetővé tegyük a későbbi ligáláshoz a PCR fragmens restrikciós enzimmel történő emésztését. A pGEM-T vektor lineáris és 3'-T túlnyúló részeket tartalmaz. Ezek a túlnyúló részek teszik lehetővé a hőstabil polimerázok által létrehozott PCR termékek beillesztését, amely polimerázok templát-független módon egy dezociadenozint adnak az amplifikált fragmens 3'-végeihez.

A fragmenseket és vektorokat az enzimes emésztést (NdeI és

XbaI emésztések) követően Benore-Parsons és mtsai., (Nucleic Acids Research, 23, 4926-4927, 1995) által ismertetett cikknek megfelelően tisztítjuk. Az agaróz darabot 3-4 órát liofilizáljuk. Az etanol-TE 1:1 arányú oldatát adjuk a liofilizált gélhez. A mintát óvatosan 1 órát keverjük, majd az agarózt kisajtoljuk és centrifugálással teljesen eltávolítjuk. A DNS-t etanolos kicsapással visszanyerjük az eluensből.

Az NR1xR2-t kódoló DNS-t egy olyan vektorba klónozzuk, amely a λ -fágból származó hosszú L promotert tartalmaz. A kérdéses fehérje hővel indukálható, ha az AR 58 *E. coli* törzsben van jelen, vagy nalidixinsavval, ha az AR 120 *E. coli* törzsben van jelen.

A baktériumok előtenyésztését 30°C-on éjszakán át tartó inkubálással állítjuk elő. Az előtenyésztetet 40-szeresre hígítjuk 20 ml teljes mennyiségre és 30°C hőmérsékletre helyezzük, amíg az optikai sűrűsége eléri a 0,4-0,6 értéket. Ezt követően az expressziót hővel indukáljuk 42°C-on. Mintákat veszünk különböző időpontokban. 1 ml tenyésztetet 5 percig 7000 ford./percen centrifugálunk. A tenyésztet felülúszóját -20°C-on tartósítjuk és a pelletet (a teljes extraktumot) újraszuszpendáljuk 500 μ l mintapufferben (western blot vagy SDS-PAGE analízishez használt pufferben), vagy 500 μ l lízispufferben, majd 30 percig 37°C-on inkubáljuk (ELISA). A lízispuffer összetétele: 0,1% SDS, 0,1% dezoxikolát, 0,015M Na-citrát. A mintákat SDS-PAGE-n futtadjuk oly módon, hogy a mintákat 4-20%-os géltre (Novex, Invitrogen) visszük fel. A futtatást 200 V-on végezzük. Coomassie-kék festést alkalmazunk. A mintákat 4-20%-os géltre (Novex, Invitrogen) visszük fel Western blot futtatása céljából. A futtatást 200 V-



on végezzük. A gélt nitrocellulóz membránra visszük át és a foltokat nyúl α -NR1xR2 poliklonális antitestekkel (első antitest) és alkalikus foszfatázhoz kapcsolt α -nyúl-antitesttel (második antitest) jelenítjük meg.

Az SDS-PAGE vizsgálattal egy körülbelül 55 kDa-os sávot figyelünk meg. Az SDS-PAGE vizsgálat alapján a 28B2 klónt választjuk ki és fermentáljuk. A klónt szekvenáljuk és leellenőrizzük a szekvenciáját (a 39 (azaz a szignál szekvencia után)-446 aminosavak=406 aminosav).

Az NR1xR2 oldhatóságát is vizsgáljuk éjszakán át indukált baktériumok lízise és az azt követő centrifugálás után. SDS-PAGE vizsgálatot és ELISA-tesztet végzünk. Az NR1xR2-t úgy tűnik legfőképp (>95%) az oldható frakcióban nyerjük vissza.

R1xR2, PhtD, Sp91, (N)R1xR2-Sp91[C-terminális domén], és Ply

Ezeket a géneket az NR1xR2-höz hasonló módon klónozzuk, szekvenáljuk és expresszáljuk. Az R1xR2 a CbpA fehérje (4N szerotípusú *S. pneumoniae*) 177-443 aminosavait tartalmazza, a PhtD a 21 aminosavtól (azaz a szignál szekvencia után) az utolsó aminosavig (A 4N szerotípusú *S. pneumoniae* CbpA fehérje 839. aminosava) terjedő szekvenciát tartalmazza, az Sp91 a 20. aminosavtól (VAA) kezdődik és a végéig terjed. A fúziós fehérjék esetében az R1xR2-Sp91Cterm fúziós fehérje a CbpA 177-446 aminosavait és a 271 aminosavtól a transzlációs stop-kodonig terjedő szekvenciát tartalmazza; az NR1xR2-Sp91Cterm a CbpA 39-446 aminosavait és a 271 aminosavtól a transzlációs stop-kodonig terjedő szekvenciát tartalmazza. Mindkét fúziós fehérje esetében két további aminosav (GS) található az (N)R1xR2 és az Sp91Cterm szekvenciák között. Mindegyik összeállítás esetében a gén start



kodonjától 5' irányban ATG-kodont építünk be, hogy lehetővé tegyük a transzkripciót és a transzlációt, amely azt jelenti, hogy egy további N-terminális metionin van mindegyik előzőekben említett szekvencia elején.

2. példa - Szerológia

A klinikai vizsgálatokból származó szérumok alkalmazásával ELISA vizsgálatokat végzünk az antitest válaszok mérésére, amelyek az *S. pneumoniae* fehérjékkel szemben alakulnak ki.

2.1 Kísérleti eljárás

- Szérum minták
 - 2-4 hónapos, illetve 6-12 hónapos csecsemőktől levett párhuzamos szérumok (N=20 DTPa HBV vizsgálatok).
 - Körülbelül 20 éves felnőttek szérumai (N=50).
 - 65 vagy 65 év feletti felnőttek szérumai (N=140).
- ELISA vizsgálatok

Immunológiai lemezeket mindegyik fehérje 1 µg/ml-ével vonjuk be és 4°-on éjszakán át inkubáljuk. A szérumok kétszeres hígítási sorozatát (1/10-es hígítástól kiindulva) ezután 1 órát szobahőmérsékleten (RT) inkubáljuk rázatás közben. Immunológiai kimutatást végzünk 4000-szeresre hígított peroxidáz-kapcsolt anti-humán IgG monoklonális antitest (Strateck, HP6043) és 30 perces szobahőmérsékleten rázatás mellett történő inkubálás alkalmazásával. Megjelenítés után a SoftMaxPro segítségével kiszámítjuk az átlagos titereket. A 10 vagy ennél nagyobb titer értékekkel rendelkező szérumokat tekintjük pozitívnak. A geometriai átlag kiszámítása esetében tetszőlegesen az 5 titer értéket (a vágási érték fele) választjuk negatív szérumnak.

A µg/ml-ben kifejezett gG koncentrációkat a minta optikai



sűrűségeinek a poliklonális anti-humán IgG kecske antitestekkel lemezre rögzített és az előzőek szerinti peroxidáz-jelölt antitesttel feltárt színmentes IgG (Jackson) OD görbével történő összehasonlítása alapján állapítjuk meg.

2.2 Eredmények

2.2.1 A streptococcus fehérje szerológiája csecsemőkben

A 2-4 hónapos csecsemők szérumaiban mért legmagasabb antitest titereket és a pozitív szérumok arányát a PhtD, PsaA, Sp128, NR1xR2 fehérjéknél nyerjük és kisebb mértéket kapunk az Sp91 és Ply esetében. Nem mutattunk ki immunválaszt vagy csak alacsony immunválaszt mutattunk ki az Sp101 és Sp130 esetében. Az Sp46 és PhtA fehérjét nem vizsgáltuk (az anyagok hozzáférhetősége miatt).

Az antitest válaszok általában csökkentek az azonos alanyokból 6-12 hónapos korukban nyert szérumokban, ami azt sugallja, hogy a magas titerek főképp a passzívan szállított anyai antitestek következményei.

Azonban egyes csecsemőkben néhány fehérjére adott immunválasz növekszik a korrallal, ami valószínűleg a pneumococcusoknak való természetes kitettség következménye. Ezzel a szérumátalakítással leginkább összefüggő antigén egyértelműen a PsaA. Az alanytól függően a szérumok a PhtD, NR1xR2, Sp128, Sp91 és Ply fehérjékre adott antitest-szintek növekedését is mutatják. Az Sp101 és Sp130-ra adott humorális immunválaszban csak csekély eltérést figyeltünk meg (lásd 1 és 2. ábrák).

2.2.2 A streptococcus fehérje szerológiája fiatal felnőttekben

A titerek geometriai átlaga alapján a becslések szerint a PhtD, PhtA és NR1xR2 a leginkább immunogén fehérjék a fiatal

felnőttekben és ezeket követi az Sp128, Ply és Sp91. Mindegyik alany kimutatható antitesteket termelt e fehérjékre. Kisebb válaszokat mértünk az Sp46-nál és különösen az Sp130 és Sp101 esetében. A PsaA fehérjét nem vizsgáltuk (nem volt elég szérum hozzáférhető). (Lásd 3 és 4. ábrák).

2.2.3 A streptococcus fehérje szerológia idős felnőttekben

A streptococcus fehérjékre adott antitest szintek egyértelműen csökkentek az idősebb emberekben a fiatal felnőttekhez képest. Az idősebb emberekben a legjobb immugénnek a PhtD bizonyult és ezt követte az Sp128, NR1xR2, Sp91, Ply és PsaA. Csak csekély válaszokat mértünk az Sp101 és Sp130 esetében. Az Sp46 és PhtA fehérjéket nem vizsgáltuk (az anyag hozzáférhetősége miatt). (lásd 5 és 6. ábrák).

1. táblázat - Az IgG koncentrációk geometriai átlaga (GMC) $\mu\text{g/ml}$ -ben kifejezve az idős emberekben

Fehérje	gG (GMC, $\mu\text{g/ml}$)
PhtD	19
NR1xR2	3,5
Sp91	2,5
Ply	2,3

A leírásban hivatkozott összes publikációt, beleértve nem korlátozó jelleggel a szabadalmi leírásokat is, az azokra való hivatkozással építjük be a leírásba, mintha minden egyes beépítendő publikációt részletesen és egyenként jelölnénk a leírásban a publikáció teljes egészét megadva.

Ezzel a találmány szerinti előnyös kiviteli alakokat az előzőekben bemutattuk, de nyilvánvaló, hogy a találmány oltalmi körét nem kívánjuk a leírásban ismertetett pontos kitanításra

korlátozni és fenntartjuk annak jogát, hogy a következő igény-
pontok oltalmi köréből következő összes módosítás a találmány
részét képezze.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Immunogén készítmény, amely legalább két *S. pneumoniae* fehérjét tartalmaz, ahol a fehérjék egyikét a PhtX jelölésű polihisztidin triád fehérjecsalcából, míg a másik fehérjét a CbpX jelölésű kolin-kötő fehérjecsalcából, csonka CbpX fehérjék, LytX fehérjecsalcából, csonka LytX fehérjék, csonka CbpX-csonka LytX kiméra fehérjék, Ply jelölésű pneumolizin, pspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 és Sp133 közül választjuk.
2. Immunogén készítmény, amely legalább két *S. pneumoniae* fehérjét tartalmaz, ahol a fehérjék egyikét a CbpX jelölésű kolin-kötő fehérjecsalcából, csonka CbpX fehérjék és csonka CbpX-csonka LytX kiméra fehérjék közül, míg a másik fehérjét a PhtX jelölésű polihisztidin triád fehérjecsalcából, LytC, Ply jelölésű pneumolizin, PsaA és Sp128 közül választjuk.
3. Az 1-2. igénypontok bármelyike szerinti immunogén készítmény, ahol a PhtX fehérje a PhtA, PhtB vagy PhtD.
4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti immunogén készítmény, ahol a CbpX fehérje a CbpA vagy PspC.
5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti immunogén készítmény, amely egy adjuvánst is tartalmaz.
6. Vakcina, amely az 5. igénypont szerinti immunogén készítményt tartalmazza.
7. Eljárás immunválasz indukálására, azzal jellemezve, hogy egy emlőst az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti immunogén készítménnyel immunizálunk.
8. Eljárás *Streptococcus* fertőzés megelőzésére vagy enyhítésére 55 év feletti betegekben, azzal jellemezve, hogy a 6. igénypont

szerinti vakcina biztonságos és hatásos mennyiségét adjuk be a betegeknek.

9. A 6. igénypont szerinti vakcina alkalmazása a tüdőgyulladás 55 év feletti betegekben történő megelőzésére szolgáló gyógyszer előállításában.

10. Eljárás középfülgyulladás megelőzésére vagy enyhítésére csecsemőkben, azzal jellemezve, hogy a 6. igénypont szerinti vakcina biztonságos és hatásos mennyiségét adjuk be a betegeknek.

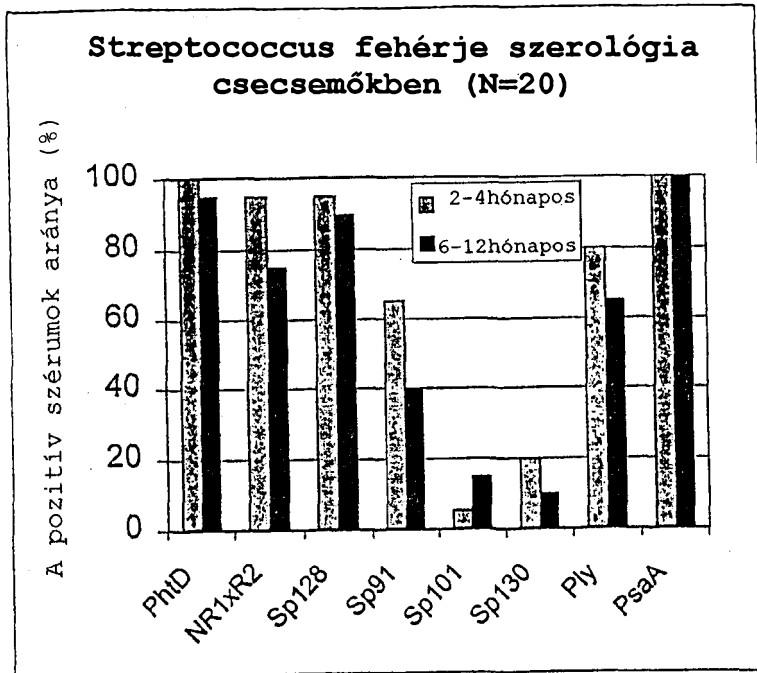
11. Eljárás a 6. igénypont szerinti vakcina előállítására, azzal jellemezve, hogy kiválasztunk és izolálunk két különböző S. pneumonia fehérjét; majd a fehérjéket összekeverjük egy gyógyászatiilag elfogadható hordozóval.

A meghatalmazott:

Derzsi Katalin
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K./Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrásy út 113
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

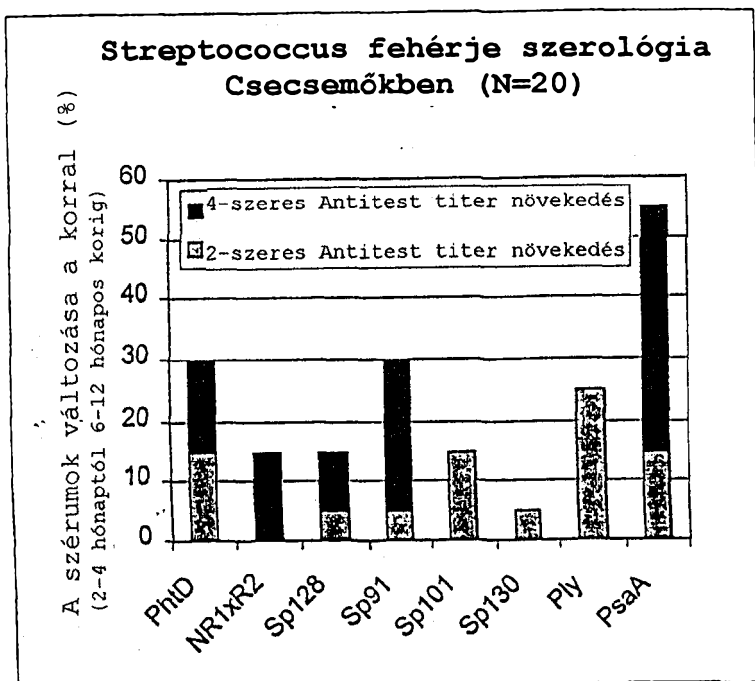
Derzsi

1. ábra, A pozitív szérumok aránya csecsemőkben (%)

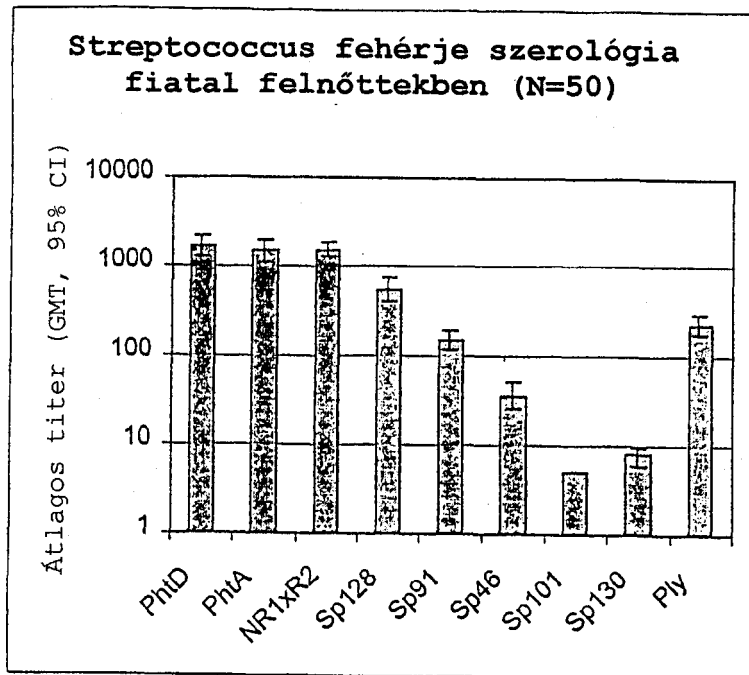


**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

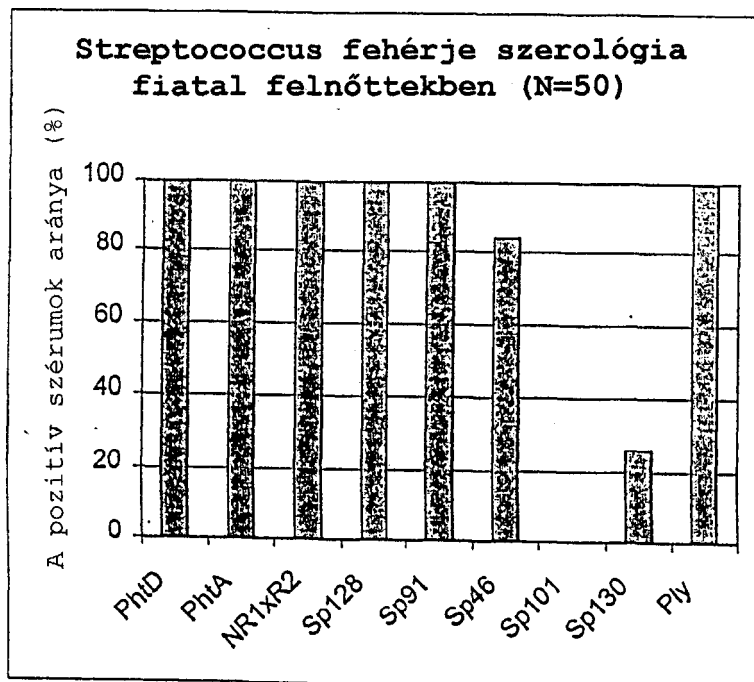
2. ábra, A szérumok változása a korról csecsemőkben



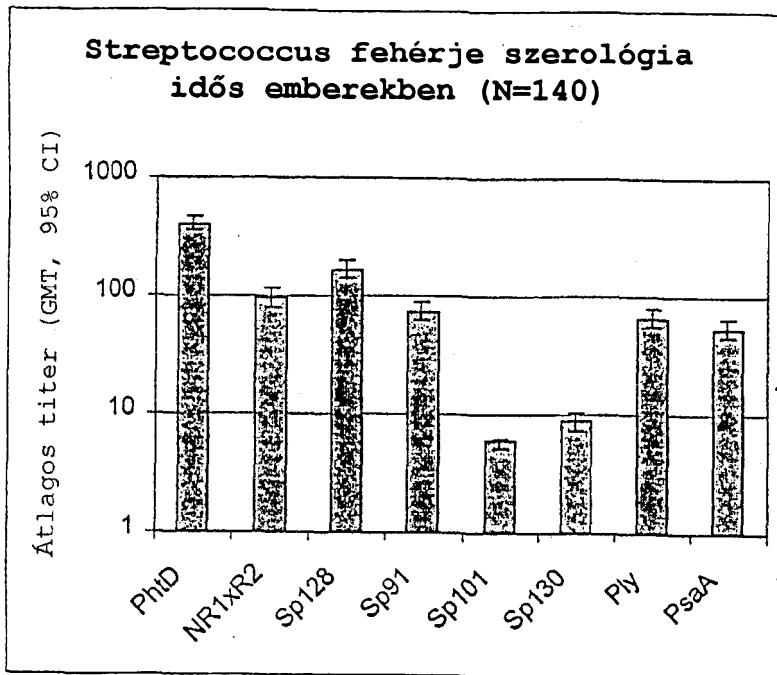
3. ábra, Átlagos titerek fiatal felnőttekben



4. ábra, A pozitív szérumok aránya fiatal felnőttekben (%)



5. ábra, Átlagos titeretek idős emberekben



6. ábra, A pozitív szérumok aránya idős emberekben (%)

