



H U 0 0 0 2 2 4 5 1 4 B 1

(19) **HU****MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**
Magyar Szabadalmi Hivatal(11) Lajstromszám: **224 514**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 99 00061**(22) A bejelentés napja: **1996. 06. 19.**(51) Int. Cl.⁷: **A 61 K 39/39****A 61 K 39/145**(40) A közzététel napja: **1999. 04. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2005. 10. 28.**

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/EP 96/02690(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9700697**

(30) Elsőbbségi adatok:

9512827.8	1995. 06. 23.	GB
9513443.3	1995. 07. 01.	GB
9525657.4	1995. 12. 15.	GB
9606032.2	1996. 03. 22.	GB

(72) Feltalálók:

Hauser, Pierre, Rixensart (BE);
Peetermans, Julien, Rixensart (BE)

(73) Jogosult:

SmithKline Beecham Biologicals S. A.,
Rixensart (BE)

(74) Képviselő:

dr. Gárdonyi Zoltánné, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54)

Alumínium-foszfátra adszorbeált konjugált poliszacharid antigént
tartalmazó vakcinakompozíciók

(57) Kivonat

A találmány *Haemophilus influenzae* B (Hib) fertőzések megelőzésére szolgáló vakcinakompozíciókra vonatkozik, amelyek az antigént alumínium-foszfátra adszorbeáltatva tartalmazzák. A találmány továbbá olyan

többértékű vakcinákra is vonatkozik, amelyek több betegség kezelésére vagy megszüntetésére alkalmasak. A találmány tárgya továbbá eljárás az említett vakcinakompozíciók előállítására.

HU 224 514 B1

A találmány olyan új vakcinakészítményekre vonatkozik, amelyek hordozóproteinhez kapcsolt, konjugált poliszacharidantigént tartalmaznak. Közelebbről a találmány B típusú *Haemophilus influenzae* (Hib) fertőzések megelőzésére alkalmas vakcinakészítményekre vonatkozik, amelyek alumínium-foszfátra adszorbeált antigént tartalmaznak. A találmány vonatkozik továbbá multivalens vakcinákra is, azaz olyan vakcinákra, amelyek egynél több betegség megszüntetésére vagy kezelésére szolgálnak. A találmány tárgykörébe tartozik a vakcinák előállítására, valamint alkalmazásukra szolgáló eljárás is.

Az olyan vakcinák, amelyek hatóanyagként poliszacharidot tartalmaznak, ismertek a technika állása szerint. Így például a *Haemophilus influenzae* B (Hib) fertőzések megelőzésére szolgáló vakcinák egy hordozóproteinrel konjugált burokpoliszacharidon (PRP) alapulnak. A poliszacharid egy ribózból, ribitolból és foszfátból felépülő polimer. Ezek a vakcinák tipikusan egyszerű készítmények (azaz adjuváns nélküliek). Bár egy esetben (Pedvax Hib; Merck gyártmány) a liofilizált konjugátum rekonstituálására olyan hígítószer alkalmaznak, amely alumínium-hidroxidot tartalmaz. A hordozóprotein tipikusan egy diftéria vagy tetanusz toxoid vagy *N. meningitidis* külső membrán proteinje. Ilyen konjugátum-vakciná-
 20 antigéneket ismertet például az US-4 365 170, US-4 673 574, EP-208 375, EP-477 508 és az EP-161 188 számú dokumentum.

Az ilyen konjugátumvakcinákat célszerű más antigénnel vagy vakcinákkal együtt, egy időben adagolni, ami többszörös injekciók adagolását jelentheti. A többszörös injekciókkal kapcsolatos problémák közé tartozik a bonyolultabb adagolási eljárás és az injekció nagy összterfoglata. Ez különösen akut probléma, ha a vakcina gyermekeknek adagolandó.

Ezért javasolták kombinált vakcinák előállítását. Egy jól ismert kombinált vakcina Diphtherin, Tetanus és B. pertussis fertőzések ellen biztosít védelmet. Ez a vakcina egy teljessejt- vagy egy sejtmentes pertussis-komponentst tartalmaz, amely tipikusan két vagy három antigénből (toxinmentesített PT, FHA, és gyakran, de nem kizárólag 69 kDa) áll, bár bizonyos körülmények között más B. pertussis antigének, valamint diftéria toxoidok és tetanusz toxinok is jelen lehetnek. Az ilyen vakcinákat gyakran DTPw vagy DTPa néven említik. Az ilyen kombinált vakcinákhoz kívánatos lenne más antigéneket is hozzáadni, például az olyan betegségek, mint a hepatitis B vagy gyermekbénulás megelőzésére.

Kívánatos lenne a poliszacharid-konjugátumvakcinákat az ilyen kombinációkhoz adni. Úgy találtuk azonban, hogy a komponensek egyszerű keverése csökkenti a poliszacharidkomponens antitesttiterét.

Felismertük, hogy ez a csökkenés gátolható, ha a konjugátumantigént alumínium-foszfáton adszorbeáltatjuk. Ezzel szemben, ha az antigént alumínium-hidroxidon adszorbeáltatjuk, a poliszacharidkomponens antitesttiterének teljes eltűnése figyelhető meg.

Ennek megfelelően a találmány olyan vakcinakompozíciókra vonatkozik, amelyek poliszacharid-konjugá-

tumantigént tartalmaznak alumínium-foszfátra adszorbeáltatva. Az antigén előnyösen egy hordozóproteinhez konjugált, Hib burokpoliszacharid (PRP).

A hordozóprotein előnyösen egy diftéria vagy tetanusz toxoid, Diphtheria Crm₁₉₇ protein vagy baktérium, például *N. meningitidis* külső membrán proteinje.

A poliszacharidkonjugátum bármely ismert kapcsolódási módszerrel előállítható. Így például a poliszacharid egy tioéterkötésen keresztül kapcsolható. Ez a kapcsolási módszer azon alapszik, hogy a poliszacharidot 1-ciano-4-(dimetil-amino)-piridinium-tetrafluor-boráttal (CDAP) aktiváljuk, így cianát-észtert alakítunk ki. Az aktivált poliszacharid azután közvetlenül vagy egy tércsoporton keresztül a hordozóprotein aminocsoportjához kapcsolható. Előnyösen úgy járunk el, hogy a cianát-észtert hexán-diaminnal kapcsoljuk, és az aminoszármazékká alakított poliszacharidot a hordozóproteinhez heteroligációs kémia útján – melybe beletartozik a tioéterkötés kialakítása – kapcsoljuk. Ilyen konjugátumokat ismertet például a WO-93/15760 számon közrebocsátott nemzetközi szabadalmi bejelentés is.

A konjugátumok előállíthatók közvetlen redukatív aminálási módszerrel is, amint az US-4 365 170 és az US-4 673 574 számú szabadalmi leírások ismertetik. Más eljárásokat ismertet például az EP-161 188, EP-208 375 és az EP-477 508 számú dokumentum.

Eljárhatunk úgy is, hogy a cianogén-bromiddal aktivált, adipinsav-hidrazid-származékká (ADH) alakított poliszacharidot karbodiimidkondenzációval kapcsoljuk a hordozóproteinhez. Ilyen kapcsolási eljárást ismertetnek Chu C. és munkatársai az *Infect. Immunity*, 1983, 245-256 irodalmi helyen.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint a PRP poliszacharid és a hordozóprotein tömegarányát a tipikus 1:3-ról 1:0,3 és 1:2 közötti értékre csökkentettük. Az ilyen alacsony arányban történt konjugálás azért előnyös, mert így a komponensek nincsenek kitéve interferenciahatásoknak.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint a találmány szerinti készítmény előnyösen tartalmaz még legalább egy további olyan antigénkomponentst, amely a következő kórokozók közül egy vagy több ellen biztosít védelmet: hepatitis A vírus (HAV), diftéria, tetanusz, hepatitis B és poliomyelitis.

A találmány szerinti kombinált vakcinák közé tartozik különösen a DTPa (diftéria-tetanusz-sejtmentes pertussis)-Hib kombinált vakcinakészítmény, DTPa-Hib-hepatitis B vakcinakészítmény és egy IPV (inaktivált poliovakcina)-DTPa-Hib-hepatitis B vakcinakészítmény.

A fenti kombinációk adott esetben tartalmazhatnak egy olyan komponentst is, amely hepatitis A ellen nyújt védelmet.

Az ilyen vakcinákban alkalmazható megfelelő komponensek kereskedelembe kaphatók, részletes ismertetés kapható a World Health Organizationtól. Így például IPV-komponensként alkalmazhatunk Salk inaktivált poliovakcinát. A diftéria-tetanusz-pertussis vakcina lehet egy sejtmentes termék, így például Infanrix DTPa (SmithKline Beecham Biologicals). A hepatitis

A ellen védelmet nyújtó komponens előnyösen a „Havrix” nevű (SmithKline Beecham Biologicals) készítmény, amely a HM-175 jelű HAV-törzsből készített elölt, attenuált vakcina [lásd: „Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A”, F. E. Andre, A. Hepburn, E. D'Hondt, *Prog. Med. Virol.* 37, 72–95 (1990); és „Havrix” monográfia, melyet a SmithKline Beecham Biologicals tett közzé 1991-ben]. A hepatitis B komponens lehet az „S” antigén, mint például az „Engerix-B” készítményben.

A találmány szerinti *Haemophilus influenzae* B vagy kombinált vakcina előnyösen gyermekgyógyászati vakcina.

A vakcinakészítést általában a következő irodalmi helyen ismertetett módon végezzük: Vaccine Design – The Subunit and adjuvant approach, kiadó: Powell and Newman; Penum Press. A liposzómákba történő kapszulázást például az US-4 235 877 (Fullerton) számú szabadalmi leírásban ismertetett módon végezzük. A proteinek makromolekulákhoz történő konjugálását például az US-4 372 945 (Likhite) és az US-4 474 757 (Armor) számú szabadalmi leírásban ismertetettek szerint végezhetjük.

Az egyes vakcinákban a konjugált antigén mennyiségét úgy választjuk meg, hogy immunvédő választ váltson ki anélkül, hogy a vakcinák esetén tipikus káros mellékhatások szignifikáns mértékben fellépnének. A mennyiségek függenek az egyes alkalmazott immunogénektől. Az egyes dózisok általában 1–1000 µg, előnyösen 2–100 µg, még előnyösebben 4–40 µg összes immunogént tartalmaznak. Az illető vakcina optimális mennyisége standard módszerekkel, beleértve az antitesttiter és más válaszok megfigyelésével meghatározható. Az első vakcina beadása után a kezelt személy kb. 4 hetes időközönként egy vagy két emlékeztetőt kaphat.

A találmány tárgya továbbá eljárás a vakcina előállítására oly módon, hogy a konjugált antigént alumínium-foszfátra adszorbeáltatjuk. Az adszorbeáltatást előnyösen 5 és 6 közötti, különösen kb. 5,4 pH-értéknél végezzük. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a vakcinát 24 óránál hosszabb ideig állni hagyjuk, majd fagyasztva szárítjuk. Eljárhatunk úgy is, hogy a találmány szerinti vakcinát más folyékony antigénnel kombináljuk.

A találmány az ilyen vakcinák első indikációs alkalmazására vonatkozik.

A találmány szerinti vakcina alkalmas *Haemophilus influenzae* B fertőzések megelőzésére vagy megszüntetésére, ilyenkor a találmány szerinti vakcinát nem toxikus, hatásos mennyiségben adagoljuk.

A találmány szerinti megoldást a következő példákkal szemléltetjük a korlátozás szándéka nélkül.

1. példa

Alumínium-foszfátra adszorbeált, tetanusz toxoidhoz konjugált Hib poliszacharidot tartalmazó vakcinakészítmény

Haemophilus influenzae B kapszula poliszacharid (PRP)/tetanusz toxoid (TT) konjugátum szintézise

1a) Cianogén-bromidos kapcsolás

A PRP és a TT kovalens kapcsolását a NIH-nél kidolgozott kapcsolási módszerrel végezzük [Chu C. et al., Further studies on immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcal type 6A polysaccharide protein conjugates, *Infect. Immunity*, 245–256 (1983)]. A PRP-t ellenőrzött körülmények között cianogén-bromiddal aktiváljuk, és adipin-hidrazid-térközcsoportot kapcsolunk hozzá. A kapott aktivált poliszacharidot (PRP-AH) diaszűrővel tisztítjuk. A két tisztított komponens (PRP-AH és TT) kapcsolását karbodiimid-kondenzációval végezzük. A konjugátumot azután ultraszűrővel és gélszűrővel tisztítjuk a reagens és az el nem reagált PRP és TT eltávolítására.

PRP-TT konjugátumok szintézise

1b) CDAP-kapcsolás

30 mg natív Hib PRP-t feloldunk 6 ml 2 mol/l-es NaCl-oldatban. A poliszacharidoldathoz hozzáadunk 225 µl CDAP-t (1-ciano-4-dimetil-amino-piridinium-tetrafluor-borát) egy 100 mg/ml-es acetonitriles törzsoldatból. 90 másodperccel később 450 µl 0,2 mol/l-es trietil-amint adunk hozzá. Az aktiválást pH=10,0 értéknél 1 percig jégen és 1 percig szobahőmérsékleten végezzük.

Az aktivált poliszacharidhoz hozzáadunk 90 mg tetanusz toxoidot (kezdeti PS/protein tömegarány 1:3), és a kapcsolási reakciót szobahőmérsékleten 1 óra hosszat folytatjuk. Ezután a reakcióelegyet 3 ml 1 mol/l-es gliánoldattal (pH=5,0) kezeljük, 30 percig szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán át 4 °C-on.

A konjugátumot gélszűrővel, 0,2 mol/l-es NaCl-oldattal kiegyensúlyozott sephacryl HR 500 oszlopon tisztítjuk. A szénhidrát- és proteintartalmat minden egyes frakcióban meghatározzuk. A konjugátumot összegyűjtjük és sterilre szűrjük (Minisart ⊕ 0,222 µm membrán).

Alumínium-foszfátra történő adszorbeáltatás

1c) 0,15 mg alumínium-foszfáthoz hozzáadunk 12,5 µg 1a) lépés szerinti poliszacharidkonjugátumot. Az elegyet 2 óra hosszat keverjük, majd a pH-t 5,1 értékre állítjuk, és az elegyet egy napig szobahőmérsékleten állni hagyjuk, ezután az adszorbeált konjugátumot további 9 napig 2–8 °C-on állni hagyjuk. A fagyasztva szárított termék előállításához az adszorbeált terméket laktózzal (15,75 mg) hígítjuk, így milliliterenként 25 µg poliszacharidot és 0,4 mg Al-ot tartalmazó terméket kapunk, amelyet 0,5 ml-es fiolákba töltünk, és fagyasztva szárítjuk.

Folyékony termék előállításához az adszorbeált konjugátumot 150 mmol/l NaCl-ot és 5 mg/ml fenoxi-etanol tartalmazó vízzel hígítjuk, milliliterenként 20 µg poliszacharid és 0,32 mg Al-végkoncentrációig.

1d) Hepatitis B-t tartalmazó, illetve nem tartalmazó diftéria-tetanusz-pertussis (sejtmentes) vakcinát a WO93/24148 számon közrebocsátott nemzetközi szabadalmi bejelentés szerinti módszerrel (SmithKline Beecham Biologicals) készítünk.

1e) „Alacsony arányú” PRP-TT alumínium-foszfát-preadsorbeált konjugátum előállítása

A konjugátumot az 1a) lépés szerinti módon készítjük, de csökkentett mennyiségű (30 µg, 60 µg) teta-

nuszt alkalmazunk, így 1:1, illetve 1:2 poliszacharid:protein arányú terméket kapunk. A konjugátumot azután az 1e) lépés szerinti módon alumínium-foszfátra adszorbeáltatjuk. A végső fagyasztva szárított termék 12,5 µg konjugátumot, 0,15 mg AlPO_4 -ot, 15,75 mg laktózt tartalmaz. Ezt alkalmazás előtt 0,5 ml vízzel (injekciós minőség) 0,1+0,1 pH-értéknél rekonstituáljuk.

2. példa

DTPa-val vagy DTPa HB-vel kombinált, alumínium-foszfáton preadszorbeált, PRP-TT konjugátum immunogenitása

Az 1a) példa szerinti Hib konjugátumot, sima vagy AlPO_4 -on preadszorbeált formában (mindkét vakcina liofilizált) az alkalmazás előtt legfeljebb 1 órával DTPa-val, illetve DTPa HB-vel kevertük, és egyhetes patkányoknak szubkután úton a humán dózis 1/20-ának megfelelő (1,5 µg PRP) dózisban adagoltuk. A patkányok 2 és 4 héttel később emlékeztetést kaptak, és minden injektálás után szérummintát vettünk az anti-PRP antitestek meghatározására. A kontrollegyeket konyhasóoldattal rekonstituált Hib vakcinát (nem adszorbeált, illetve AlPO_4 -ra adszorbeált) kaptak.

Véletlenszerűen tízes csoportokba osztott 1 hetes ago-OFA törzsbeli patkányoknak szubkután úton a 0., 14. és 28. napon 1/20 humán dózis Hib vakcinát ad-

tunk, önmagában, illetve DTPa-val vagy DTPa HB-vel (1/20 humán dózis) kombinálva. A liofilizált Hib vakcina konyhasóoldattal történő rekonstituálását, illetve a DTPa-val vagy DTPa HB-vel való kombinálását az adagolás előtt egy órán belül végeztük.

- 5 A patkányoktól a 14., 28., 42. és 56. napon vért vettünk. Az anti-PRP antitesteket ELISA módszerrel határoztuk meg az egyes szérumokban, és a títet egy kalibrált referencia alapján µg/ml értékben fejeztük ki.
- 10 A GMT-értéket minden csoportra, minden időpontra kiszámoltuk. A 95%-os konfidenciahatárokat a harmadik immunizálás után kapott titerekre számoltuk.

- Amint az 1. táblázatból látható, a Hib konjugátum AlPO_4 -ra történő adszorbeáltatása nem befolyásolja annak immunogenitását: némi anti-PS termelődött a második dózis után, és jó boosterhatás mutatkozott a harmadik dózis után. A Hib vakcina DTPa-val, illetve DTPa HB-vel történő kombinálása 3–8-szorosan csökkentette az anti-PRP választ, és ez a csökkenés DTPa HB esetén szignifikáns. Ezzel szemben, ha a Hib vakcinát előzőleg AlPO_4 -ra adszorbeáltatjuk, a kapott anti-PRP válasz azonos szintű a sima vakcinával kapott válasszal.

Következtetés

- 25 A Hib/alumínium-foszfát készítmény potenciálisan megoldja a Hib más gyermekgyógyászati vakcinákkal való kombinációjakor fellépő problémákat.

1. táblázat

DTPa-val vagy DTPa HB-vel kombinált, alumínium-foszfátra preadszorbeált PRP-TT konjugátum immunogenitása patkánykölyökmodellben

Vakcina	Anti-PRP titer (µg/ml)			
	14. (Post I)	28. (Post II)	42. (Post III)	56. (Post III 30)
– (NaCl 0,9%)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Hib-001	<0,05	0,06	12,9 (4–37)	10,9 (4–31)
Hib/ AlPO_4 (Dhib-024)	<0,05	1,3	11,8 (5,29)	15,4 (7–35)
Hib-001+DTPa (119)	<0,05	0,16	3,4 (0–28)	1,4 (0,1–17)
Hib/ AlPO_4 +DTPa (119)	>0,05	1,9	20,9 (7–59)	19,7 (9,42)
Hib-001+DTPa HB (16 705)	<0,05	0,14	2,8 (1–6)	3,9 (2–9)
Hib/ AlPO_4 +DTPa HB (16 705)	<0,05	0,47	11,4 (5–27)	18,1 (9,38)
Hib/Al (OH_3)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,14

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Kombinált vakcinakompozíció, amely a következő elemeket tartalmazza:

- hordozóproteinhez konjugált Haemophilus influenzae B kapszula poliszacharid, amely alumínium-foszfátra van adszorbeáltatva,
- egy vagy több, Haemophilus influenzae B-től eltérő patogén ellen védelmet biztosító antigén.

2. Az 1. igénypont szerinti kombinált vakcinakompozíció, amelyben a konjugátum egy vagy több, a következő betegségek ellen védelmet biztosító antigénnel van keverve: hepatitis A fertőzés, diftéria, tetanusz, pertussis, hepatitis B, polio.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti kombinált vakcinakompozíció, amely hordozóproteinként diftéria toxoidot, Diphtheria CRM197 proteint és/vagy Meningococcus külső membrán proteint tartalmaz.

4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti kombinált vakcinakompozíció, amelyben a *Haemophilus influenzae* B kapszula poliszacharidjához konjugált hordozóprotein-ként tetanusz toxoidot tartalmaz.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti kombinált vakcinakompozíció, amelyben a *Haemophilus influenzae* B poliszacharid és a hordozóprotein tömegaránya 1:0,3 és 1:2 közötti.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti vakcinakompozíció, amelyben az adszorbeált konjugátum fagyaszta szárított formában van a többi antigénnel kombinálva.

7. A 6. igénypont szerinti vakcinakompozíció, amelyben a többi antigén folyadék formában van.

8. Készlet, amely kombinált vakcina készítésére szolgál, és amely tartalmaz egy első, hordozóproteinhez konjugált *Haemophilus influenzae* B kapszula poliszacharidot alumínium-foszfátra adszorbeáltatott formában tartalmazó edényt, valamint egy második, valamely más patogén elleni vakcinát tartalmazó edényt.

9. Eljárás az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti vakcinakompozíció előállítására, *azzal jellemezve*, hogy *Haemophilus influenzae* B kapszula poliszacharidantigént hordozóproteinhez konjugálunk, a konjugátumot alumínium-foszfátra adszorbeáltatjuk, és egy

vagy több más, a *Haemophilus influenzae* B-től eltérő patogén ellen védelmet biztosító antigénnel keverjük.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy vagy több következő betegség ellen védelmet biztosító antigént alkalmazunk: hepatitis A fertőzés, diftéria, tetanusz, pertussis, hepatitis B, polio.

11. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti vakcinakompozíció gyógyításra történő felhasználásra.

12. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti vakcinakompozíció biztonságos és hatékony mennyiségének alkalmazása olyan gyógyszerkészítmény előállítására, amely *Haemophilus influenzae* B fertőzésben szenvedő vagy erre érzékeny beteg gyógyítására szolgál.

13. A 2. igénypont szerinti kombinált vakcinakompozíció, amelyben a *Haemophilus influenzae* B kapszula poliszacharid tetanusz toxoidhoz van konjugálva, és amely még a következő antigéneket tartalmazza: diftéria toxoid, tetanusz toxoid, sejtmentes pertussis antigének, hepatitis B felületi antigén és inaktivált poliovakcina.

14. A 2. igénypont szerinti kombinált vakcinakompozíció, amelyben a *Haemophilus influenzae* B kapszula poliszacharid tetanusz toxoidhoz van konjugálva, és amely még a következő antigéneket tartalmazza: diftéria toxoid, tetanusz toxoid, pertussis teljes sejt és hepatitis B felületi antigén.