

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

289 810

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1997 - 3597

(22) Přihlášeno: 24.05.1996

(30) Právo přednosti:
24.05.1995 FR 1995/9506417

(40) Zveřejněno: 16.06.1999
(Věstník č. 6/1999)

(47) Uděleno: 07.02.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.04.2002
(Věstník č. 4/2002)

(86) PCT číslo: PCT/FR96/00791

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 96/37222

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

A 61 K 39/385

A 61 P 31/12

(73) Majitel patentu:

PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS
S. A., Lyon, FR;

(72) Původce vynálezu:

Arminjon Francois, Lyon, FR;
Cartier Jean René, Lyon, FR;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název vynálezu:

**Vakcínová kompozice obsahující alespoň jeden
antigen a způsob její přípravy**

(57) Anotace:

Řešením je vakcínová kompozice obsahující alespoň jeden antigen vytvořený kapsulárním polysacharidem chřipky Haemophilus typu b nebo polyribosylribitolfosfátem o vysoké molekulové hmotnosti kondenzovaným k anatoxinu tetanu a adjuvans na bázi hliníku, ve které adjuvans na bázi hliníku má bod nulového náboje menší než 7,2. Řešením také je způsob přípravy takové vakcínové kompozice, který spočívá v tom, že se nejprve sníží bod nulového náboje adjuvans na bázi hliníku na méně než 7,2 a poté se k výchozí kompozici vakcíny přidá antigen vytvořený kapsulárním polysacharidem chřipky Haemophilus typu b.

CZ 289810 B6

Vakcínová kompozice obsahující alespoň jeden antigen a způsob její přípravy

Oblast techniky

5

Tento vynález se týká oblasti vakcínových kompozic a zejména se týká vakcínových kompozic, které obsahují alespoň jeden antigen vytvořený kapsulárním polysacharidem chřipky Haemophilus typu b nebo polyribosylribitolfosfátem o vysoké molekulové hmotnosti kondenzovaným na anatoxin tetanu.

10

Dosavadní stav techniky

Antigen, který se může použít pro účely vakcinace u člověka, a jehož účelem je ochrana člověka před infekcemi způsobenými chřipkou Haemophilus typu b, je znám podle dosavadního stavu znalostí a zejména z článku „Quantitative and Qualitative Analyses of Serum Antibodies Elicited in Adults by Haemophilus influenzae Type b and Pneumococcus Type 6A Capsular Polysaccharide Tetanus Toxoid Conjugates“, Rachel Schneerson a kol., Infect. Immun. (květen 1986). Tento antigen je vytvořen kapsulárním polysacharidem bakterie, polyribosylribitolfosfátem (PRP), který je T-dependentní následkem kondenzace na nosičový protein, anatoxin tetanu. Zkoušky prováděné na rheus dětem ukazují, jak tento článek uvádí, že imunitní odezva je v jednom a téže čase větší a časnější, pokud antigen je doprovázen hydroxidem hlinitým. Avšak jak ukazuje jiný článek o názvu „Clinical and Immunologic Responses to the Capsular Polysaccharide of Haemophilus Influenzae Type b Alone or Conjugated to Tetanus Toxoid in 18–23 Month-old Children“, Bo A. Claesson a kol., The Journal of Pediatrics (květen 1988), upozorňuje se, že tento antigen, adsorbovaný na hydroxid hlinitý, je méně imunogenní po skladování než antigen udržovaný ve fyziologickém roztoku, co může být důsledkem degradace polysacharidu.

Aby se vyřešil problém stability PRP–T, podle dosavadního stavu techniky bylo navrženo provést jeho lyofilizaci. Toto řešení rovněž projevuje určité nevýhody, zejména však při výrobní úrovni, i když dovoluje antigenu zachovat jeho imunogenní charakter v průběhu času. Lyofilizace a zvláštní operace kondicionování, která se požaduje, komplikují výrobní proces, což zvyšuje náklady. Kromě toho v době podání je nezbytné znovu absorbovat lyofilizát, což znamená, že je nutné mít kromě lyofilizátu i kapalinu pro absorbování tohoto lyofilizátu. Tato operace představuje doplňkové omezení pro praktického pracovníka a představuje riziko, podobně jako jakákoli manipulace, že bude provedena špatně.

Kromě toho určitý počet kapalných vakcínových kombinací má antigeny adsorbované na adjuvand na bázi hliníku a je výhodné, že jsou schopny bez ztráty imunogenity, umožnit přidání antigenu vytvořeného PRP–T k této substanci. Ve skutečnosti řešení navržené podle dosavadního stavu techniky a spočívající ve zvláštní injekční stříkačce se dvěma odděleními (první oddělení obsahující PRP–T v lyofilizované formě a druhé oddělení obsahuje jiné antigeny ve vodné suspenzi), jejichž obsahy se smíchají pro použití pouze v době podání, není uspokojivé buď z důvodu hladiny nákladů na produkci nebo úrovně operací, které musí být prováděny praktickým pracovníkem.

Je žádoucí být schopen mít kapalnou vakcínovou kompozici sestávající z antigenu vytvořeného PRP–T projevujícího velmi dobrý imunogenní charakter zachovávaný v průběhu času a jehož podmínky přípravy dovolují produkci při nejnižších nákladech.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je vakcínová kompozice obsahující alespoň jeden antigen vytvořený kapsulárním polysacharidem chřipky Haemophilus typu b nebo polyribosylribitolfosfátem o vysoké molekulové hmotnosti kondenzovaným k anatoxinu tetanu a adjuvans na bázi hliníku, ve které adjuvans na bázi hliníku má bod nulového náboje menší než 7,2.

Předmětem tohoto vynálezu také je způsob přípravy výše uvedené vakcínové kompozice, který spočívá v to, že se nejprve sníží bod nulového náboje adjuvans na bázi hliníku na méně než 7,2 a poté se k němu přidá alespoň jeden antigen vytvořený kapsulárním polysacharidem chřipky Haemophilus typu b nebo polyribosylribitolfosfátem kondenzovaným k anatoxinu tetanu.

Některé jiné znaky tohoto vynálezu jsou uvedeny dále.

Je třeba poznamenat, že překvapivě za těchto podmínek si PRP-T uchovává v průběhu času v kapalném prostředí svůj velmi dobrý imunogenní charakter.

Podle zvláštní charakteristiky vynálezu adjuvans na bázi hliníku zahrnuje hydroxidy hlinité, ke kterým jsou přidány aniony.

Tak je možné použít adjuvans přesně kvalifikované pro použití vakcíny, i když si PRP-T uchovává v kapalném prostředí velmi dobrou imunogenitu.

Podle jiné charakteristiky vynálezu se aniony volí z fosfátů a citrátů.

Tak získané kompozice mají vždy záruku míry bezpečnosti, která je nutné pro podávání vakcíny.

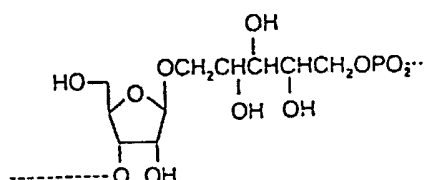
Podle zvláštního způsobu provedení vynálezu vakcínová kompozice kromě toho zahrnuje jednu nebo větší počet vakcínových valencí zvolených ze záškrtu, tetanu, černého kašle, hepatitidy B a poliomyelitidy.

Tak je možné dostat kapalnou stabilní vakcínovou kompozici, ve které každý antigen uchovává svou imunogenitu, co dovoluje praktickému pracovníkovi bez dodatečné manipulace z jeho strany vakcinovat současně proti několika chorobám. To umožňuje snížit náklady na jeden produkt i pokud se tak současně týká dalších produktů, stejně jako pokud jde o počet návštěv.

Tento vynález se obdobně týká způsobu přípravy vakcínové kompozice obsahující alespoň jeden antigen vytvořený kapsulárním polysacharidem chřipky Haemophilus typu b nebo polyribosylribitolfosfátem o vysoké molekulové hmotnosti kondenzovaným k anatoxinu tetanu, který spočívá v tom, že se přidá adjuvans k vakcínové kompozici pomocí suspenze komplexů hliníku, které mají bod nulového náboje menší než přibližně 7,2.

Tomuto vynálezu se lépe porozumí přečtením podrobného popisu, který s uvádí dále.

Antigen vytvořený kapsulárním polysacharidem chřipky Haemophilus typu b je přímý polymer sestávající z ibózy, ribitolu a kyseliny fosforečné, který má monomerní strukturu vyjádřenou vzorcem



Počet monomerů tohoto typu je vysoký (vyšší než 100), co vede k polysacharidu, jehož molekulová hmotnost je řádově 500 000 a 1 000 000.

- 5 Za účelem vyvolání imunitní odezvy T buněk malých dětí se tento antigen kondenzuje k nosičovému proteinu vytvořenému anatoxinem proteinu.

Takový antigen se může například dostat způsobem, který je popsán v „Quantitative and Qualitative Analysis of Serum Antibodies Elicited in Adults by *Haemophilus Influenzae* Type b and *Pneumococcus* Type 6A Capsular Polysaccharide-tetanus Toxoid Conjugates“, Schneerson a kol., *Infect. Immun.*, 52, 519 (1986).

Charakteristické vlastnosti příslušné tomuto antigenu a to vysoký počet monomerů polysacharidu, povahu nosičového proteinu a povaha vazby mezi polysacharidu, povaha nosičového proteinu a povaha vazby mezi polysacharidem a nosičovým proteinem, udělují zvláštní jakost tomuto antigenu a zejména jeho velmi dobrou imunogenitu.

K dosažení této jakosti v kapalném prostředí v průběhu času bylo nyní nalezeno, že je možné používat komplexy hliníku, jejichž bod nulového náboje je menší než přibližně 7,2. Ve skutečnosti bylo s překvapením nalezeno, že pokud PRP-T je doprovázen takovými komplexy hliníku, jeho velmi dobrý charakter imunogenity se udržuje v průběhu doby v kapalném prostředí a to nastává ve všech jeho stupních imobilizace na komplexy hliníku.

Bod nulového náboje komplexů hliníku je ekvivalentní isoelektrickému bodu proteinů, to je hodnotě pH, při které náboj na povrchu komplexů hliníku je nulový. Ve skutečnosti se tomuto bodu nulového náboje přiblíží změřením zeta potenciálu, přičemž měření se může provádět rozdílnými technickými postupy, avšak základní metodou je elektroforéza. Je možné provádět měření pomocí přístroje, jako je DELSA 440 firmy Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA.

Měřicí metody a přístroj mohou být rozdílné a získané výsledky se mohou pravděpodobně lišit. Mezi komplexy hliníku vhodné pro účely tohoto vynálezu patří komplexy, pro které tento bod nulového náboje je menší než přibližně 7,2, přičemž hodnota 7,2 je pouze hodnota přibližná.

Komplexy hliníku vhodné pro účely tohoto vynálezu jsou komplexy, které podle povahy mají bod nulového náboje menší než 7,2 nebo komplexy, které mohou být modifikovány za účelem snížení svého bodu nulového náboje.

Mezi komplexy hliníku, které mají povahu bodu nulového náboje menší než 7,2, je možné jmenovat takové komplexy, které jsou obecně označovány jako fosfáty hliníku v oblasti vakcínových adjuvans, a rovněž jestliže, z hlediska chemického, mají soli odlišné od fosfátu hliníku. Těmi je například ADJUFOS^(R) fosfát hlinitý, který dodává firma SUPERFOS BIOSECTOR a/s.

Takovými komplexy mohou být pravděpodobně komplexy hliníku, které byly získány reakcí uhličitanu sodného se síranem draselným nebo hlinitým v PBS pufru.

S takovými komplexy, kde PRP-RT je buď úplně nebo částečně vázán ke komplexům hliníku, se imunogenita může udržet v průběhu času.

Alternativně je možné podle tohoto vynálezu použít komplexů hliníku, které podle své povahy mají bod nulového náboje větší než 7,2 a které jsou modifikovány ke snížení tohoto bodu náboje.

Existují zvláštní komplexy hliníku známé v oblasti vakcínových adjuvans, jako hydroxidy hlinité, třebaže z chemického hlediska nejsou tvořeny výlučně z hydroxidu hlinitého. Zejména může jít o ALHYDROGEL^(R), hydroxid hlinitý dodávaný firmou SUPERFOS BIOSECTOR a/s, produkt

používaný jako adjuvans v D. T. CoqTM, který dodává na trh firmy PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins nebo rovněž o produkt používaný jako adjuvans s Recombivax^(R), který je podáván na trhu firmou MERCK.

5 Podle tohoto vynálezu modifikace komplexů hliníku spočívá v přidavku anionů. Přidávané aniony mohou být rozdílné povahy za podmínky, že vždy je zaručena bezpečnost nutná pro použití k účelům vakcíny. Bylo pozorováno, že přidávek citrátových ionů nebo fosfátových ionů by zejména byl vhodný pro účely vynálezu. Fosfátové iony mohou obzvláště být dodávány roztokem, který obsahuje dihydrogenfosfát draselný, monohydrogenfosfát sodný a chlorid sodný.

10 Je pravděpodobně možné používat kombinaci rozdílných ionů, například kombinaci fosfátových ionů a uhličitanových ionů.

15 Je možné, aby aniony byly přidávány k suspenzi komplexů hliníku před přidáním PRP-T, nebo aby aniony byly přidány k PRP-T před jeho uvedením do styku s komplexem hliníku. Podle potřeby je výhodné suspendovat PRP-T v roztoku, který obsahuje zvolené aniony před jeho stykem s adjuvans.

20 Vypočítá se množství přidaného anionu ke snížení bodu nulového náboje použitých komplexů hliníku na hodnotu menší než přibližně 7,2. Toto množství se mění jako funkce povahy použitých komplexů hliníku, stejně jako množství anionů, kterými případně přispívají použité pufovací substance. Stanovení tohoto množství je v rozsahu znalostí odborníka v oboru.

25 Stabilní vakcínová kompozice v kapalném stavu se dostane, pokud si PRP-T uchová své dobré imunogenní vlastnosti.

Dodatkově bylo pozorováno, že díky přidání anionů, imobilizace PRP-T na komplexech hliníku se sníží, co může přispět k zachování integrity a tak imunogenity.

30 Třebaže to není výhodné ve smyslu tohoto vynálezu, je pravděpodobně možné přidávat aniony ke komplexům hliníku, které podle povahy mají bod nulového náboje již menší než přibližně 7,2. V tomto případě se pozorovalo, že bod nulového náboje se může snížit a že imobilizace PRPT na komplexech hliníku se pravděpodobně omezí.

35 Výrazu imobilizace se má rozumět, že znamená jakoukoliv formu vazby způsobující, že PRP-T je nepřístupný pro dávku, pokud po odstředění se zachytí supernatant.

40 Vakcínová kompozice podle tohoto vynálezu obsahuje antigen vakcíny vytvořený PRP-T, ale může pravděpodobně zahrnovat jiné antigeny vakcíny a zejména ty, které jsou zamýšleny pro ochranu proti záškrtu, tetanu, černému kašli (buněčnému nebo nebuněčnému), poliomyelitidě, hepatitidě A, hepatitidě B a podobně. Ve skutečnosti libovolný antigen vakcíny kompatibilní s PRP-T a komplexem hliníku jsou schopny vstupovat do vakcínové kompozice podle tohoto vynálezu. Tak je možné mít kapalnou vakcínovou kompozici, které při jednoduchém podání dovolují vakcinaci proti vážným chorobám. Vakcínové kompozice podle tohoto vynálezu je
45 zvláště uzpůsobeny pro podávání malým dětem.

Kromě toho bylo pozorováno, že použití takové kapalnou vakcínové kompozice během vakcinace posilovací dávkou, prováděné na dětech starých 12 měsíců, které dostaly injekce ve 2, 4 a 6 měsících dovoluje, aby produkce anti-PRP-T protilátek se zvýšila a zejména se zvýšila
50 s ohledem na posilovací dávku vedenou za stejných podmínek s vakcínou TETRAct-HIBTM, prodávanou firmou PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins.

Příklady provedení vynálezu

5 Příklad 1

Připraví se vakcínová kompozice a přitom se vychází z těchto složek:

	Čištěný anatoxin tetanu (PTA)	1 vakcinační jednotka
10	Čištěný anatoxin záškrtu (PDA)	1 vakcinační jednotka
	Směs buněk černého kašle	15 opacimetrických jednotek (OU)
	PRP-T (vyjádřeno jako hmotnost polyribosylribitolfosfátu)	12 µg
	Merthiolát	43,75 µg
15	Hydroxid hlinitý (vyjádřeno jako hliník), jak je přítomen v D. T. Coq TM	0,3 mg
	Fosfáty	30 µmol
	10-mmolární Tris-pufr	0,125 ml
	obsahující 8,5 % (hmotn./obj.) sacharózy	
20	Voda pro injekce, qsp	0,5 ml

Fosfátové iony se přidají k výchozímu roztoku obsahujícímu dihydrogenfosfát draselný, mono-hydrogenfosfát sodný a chlorid sodný.

25

Příklad 2

Imunogenita vakcínové kompozice získané podle příkladu 1 se testuje na malých dětech při srovnání s imunogenitou vakcíny předchozího typu, kterou tvoří vakcína prodávaná pod názvem
30 TETRAAct-HIBTM, jež má stejné vakcínové valence, ale kde lyofilizované uchovaná PRP-T valence se rekonstituuje právě před injekcí vakcínové kompozice obsahující anatoxiny záškrtu a tetanu, stejně jako buněčnou směs černého kašle.

Tento test se provádí na skupině 262 dětí, z nichž 130 obdrželo přípravek podle příkladu 1 a 132
35 obdrželo komerčně dostupnou vakcínu TETRAAct-HIBTM. Podávání vakcíny se provádí ve 2, 6 a 12 měsících intramuskulárně.

Před imunizací GMT titr anti-polyribosylribitolfosfátové protilátky činí 0,2 µg/ml v obou skupinách, 1,9 a 1,4 µg/ml po druhé injekci a 5,9 a 5,8 µg/ml po třetí injekci pro vakcínu podle
40 tohoto vynálezu a pro vakcínu podle dosavadního stavu techniky.

Po druhé injekci má 98 % (s vakcínou podle tohoto vynálezu) a 93 % (s vakcínou podle dosavadního stavu techniky) ze všech dětí hladinu anti-polyribosyltribitolfosfátové protilátky větší než 0,15 µg/ml. Tato hladina je dosažena po třetí injekci u 100 % ze všech dětí, které
45 obdržely vakcínu podle tohoto vynálezu a u 99 % ze všech dětí, které dostaly vakcínu podle dosavadního stavu techniky.

Po třetí injekci množství protilátek zaměřených proti každé z vakcínových valencí je v průměru
50 toto:

	Vakcína podle dosavadního stavu techniky	Vakcína podle tohoto vynálezu
Záškrť mezinár. jednotek/ml	1,35	1,56
Tetanus mezinár. jednotek/ml	5,1	4,9
Pertussis aglutin. titr	597	601
GMT		
PRP µg/ml	5,8	5,9

Po injekci posilovací dávky podané ve 12 měsících je množství protilátek v této době takovéto:

	Vakcína podle dosavadního stavu techniky	Vakcína podle tohoto vynálezu
Záškrť mezinár. jednotek/ml	3,2	4,5
Tetanus mezinár. jednotek/ml	12,0	11,5
Pertussis aglutin. titr	2447	2560
GMT		
PRP µg/ml	19,4	32,6

5

Tyto výsledky ukazují, že vakcínová kombinace získaná podle tohoto vynálezu je stabilní. Ve skutečnosti injekce posilovací dávky podávaná dětem sterým 12 měsíců se provádí s vakcínou, která byla připravena před 18 měsíci, avšak výsledky ukazují, že imunogenita každého z antigenů kombinace se zachovala. Kromě toho je překvapující, že se dostane účinek posilovací dávky, který je zřetelně větší s vakcínovou kompozicí podle tohoto vynálezu, ve srovnání s účinkem posilovací dávky dosaženým s vakcínou podle dosavadního stavu techniky, která má stejné vakcínové valence.

10

15 Příklad 3

Dávky vakcínové kompozice, jako je popsána v příkladu 1, se udržuje za teploty 4 °C po dobu 18 až 24 měsíců a potom použijí při klinických zkouškách, které zahrnují 104 děti.

20 Dosažené titry pro každou z vakcínových valencí jsou shrnuty do tabulky zařazené dále.

	Před vakcinací	Po vakcinaci
Záškrť	0,013	0,736
GMT		
Tetanus	0,181	3,831
GMT		
PRP	0,22	6,40
GMT µg/ml		

25 Tak může být zřejmé, že rovněž po skladování během dlouhého období při teplotě +4 °C si vakcínová kompozice podle tohoto vynálezu uchovává svůj imunogenní charakter, jak pokud jde o PRP-T, tak pokud jde o jiné antigeny obsažené ve vakcíně.

Příklad 4

5 Vakcínové kompozice obsahující PRP-T při koncentraci 20 µg polyribosylribitolfosfatu na ml se připraví v přítomnosti komplexů hliníku různých typů a při rozdílných bodech nulového náboje (PZC). Množství komplexů hliníku je takové, že koncentrace hliníku v kompozici činí 0,6 g/l.

10 Kompozice 1: Komplex hliníku vytvořený hydroxidem hlinitým, jako je použit v D. T. CoqTM vakcíně prodávané firmou Pasteur Merieux Serum et Vaccins. Bod nulového náboje odpovídá 11,3.

Kompozice 2: Komplex hliníku vytvořený hydroxidem hlinitým, jako je použit v Recombivax^(R) vakcíně prodávané firmou Merck. Bod nulového náboje odpovídá 7,4.

15 Kompozice 3: Komplex hliníku vytvořený fosfátem hlinitým, který byl získán smícháním chloridu sodného a fosfátu sodného. Bod nulového náboje odpovídá 6,2.

20 Kompozice 4: Komplex hliníku vytvořený produktem Alum, který byl získán reakcí uhličitanu sodného v PBS pufru na síranu draselném a hlinitém. Bod nulového náboje odpovídá 5,4.

Vakcínové kompozice se dostanou jednoduchým smícháním suspenzí obsahujících komplexy hliníku s PRP-T.

25 Příklad 5

Imunogenita získaných různých kompozic se testuje na myších.

30 Za účelem ověření imunogenní stability se získané kompozice podrobí podmínkám urychlujícím stárnutí, to znamená, že se udržují při teplotě 37 °C po dobu 2 týdnů.

35 Testy stanovení imunogenity se provádějí na myších o hmotnosti 22 až 24 g, kterým se subkutánně podávají dávky 0,5 ml přípravků, z nichž každý obsahuje 2,5 µg polyribosylribitolfosfátu. Podávání se provádí ve dnech 0 a 14. Krev myši se odebere ve dnech 14 a 21 a hladina protilátek se určí radioimunologickým stanovením. Počet naočkovaných myši pro každou vakcínovou kompozici je 8.

Výsledky jsou pokládány za uspokojivé, pokud:

40 * je alespoň 75 % ze všech myši ve dni 21, které mají titr větší nebo roven 0,5,

* je signifikantní rozdíl mezi výsledky dosaženými ve dni 14 a výsledky dosaženými ve dni 21.

45 Předpokládá se, že získaná vakcínová kompozice je stabilní, pokud výsledky dosažené po urychlení stárnutí jsou uspokojivé.

Dosažené výsledky pro testované kompozice jsou shrnuty v dále zařazené tabulce.

	PZC	Imunologický test
C1	11,3	neuspokojivý
C2	7,4	neuspokojivý
C3	6,2	uspokojivý
C4	5,4	uspokojivý

50

Zdá se, že pokud bod nulového náboje komplexů hliníku leží v kyselé oblasti pH, získaná vakcínová kompozice je stabilní.

5 Příklad 6

Procento PRP–T imobilizovaného na komplexech hliníku se ověřuje pro každou kompozici v příkladu 4.

10 K tomuto účelu se každá z kompozic odstředí, supernatant se zachytí a v něm se změří množství neimobilizovaného PRP–T testem ELISA nebo RIA.

Rozdíl mezi koncentrací PRP–T ve výchozí kompozici a množství stanoveným v supernatantu dovoluje stanovit procentuální obsah imobilizovaného PRP–T.

15

Dosažené výsledky uvádějí dále.

	C1:	100 %
	C2:	100 %.
20	C3:	100 %.
	C4:	70 %.

Procentuální hodnoty v tomto příkladě jsou ve všech případech vztaženy na množství PRP–T vyjádřené v µg/ml.

25

Příklad 7

30 Kompozice se upraví přidáním fosfátových ionů za účelem dosažení jejich koncentrace 50 mmol/l. Test stanovení imunogenity provedený na myších po urychleném stárnutí roztoku potom vede k uspokojivým výsledkům.

35 Stanovení procenta imunizovaného PRP–T na komplexech hliníku ukazuje, že za těchto podmínek pouze 20 % PRP–T je imobilizováno. Procentuální hodnota v tomto případě je vztažena na množství PRP–T vyjádřené v µg/ml.

Příklad 8

40 Kompozice 1 se upraví v této době přidáním citrátových ionů k této kompozici za účelem dosažení jejich koncentrace 200 mmol/l.

Test stanovení imunogenity provedený na myších po urychlení stárnutí roztoku potom vede k uspokojivému výsledku.

45

Stanovení procenta imobilizace PRP–T na komplexech hliníku ukazuje, že za těchto podmínek PRP–T není dále vůbec imobilizován.

50 Příklad 9

Kompozice 2 se upraví přidáním fosfátových iontů k této kompozici za účelem dosažení koncentrace 20 mmol/l.

Test stanovení imunogenity provedený na myších po urychlení stárnutí roztoku potom vede k uspokojivému výsledku. Stanovení procenta imobilizace PRP-T na komplexech hliníku ukazuje, že za těchto podmínek PRP-T není dále vůbec imobilizován.

5

Příklad 10

Kompozice 3 se upraví přidáním fosfátových ionů k této kompozici v rozdílných množstvích a stanoví se procento imobilizace PRP-T na komplexech hliníku.

10

Pokud se přidá takové množství fosfátových ionů, že koncentrace fosfátů v kompozici je 2 mmol/l, procentuální obsah imobilizovaného PRP-T se sníží na 10 %, kde procentuální hodnota je vztaženo na množství PRP-T vyjádřené v µg/ml.

15

Pokud se přidá takové množství fosfátových ionů, že koncentrace fosfátů v kompozici je 4 mmol/l, PRP-T není dále vůbec imobilizován.

Testy imunogenity provedené na myších po stárnutí roztoku jsou uspokojující.

20

Příklad 11

Kompozice 4 se upraví přidáním fosfátových ionů k této kompozici, pro dosažení koncentrace 60 mmol/l.

25

Stanovení procenta PRP-T imobilizovaného na komplexech hliníku ukazuje, že za těchto podmínek pouze 30 % PRP-T je imobilizováno, přičemž procentuální hodnota je vztažena na množství PRP-T vyjádřené v µg/ml. Test stanovení imunogenity provedený na myších po urychlení stárnutí roztoku vede k uspokojivým výsledkům.

30

Příklad 12

Připraví se vakcínová kompozice a přitom se vychází z těchto složek:

35

Hydroxid hlinitý (vyjádřeno jako hliník)	0,025 mg
PRP-T (vyjádřeno jako hmotnost polyribosylribitolfosfátu)	10 µg
Čištěný anatoxin záškrtu (PDA)	1 vakcinační dávka
Čištěný anatoxin tetanu (PTA)	1 vakcinační dávka
40 Fosfáty	15 µmol
Antigeny dětské obrny typ I	40 jednotek
typ II	8 jednotek
typ III	32 jednotek
Anatoxin černého kašle	25 µg
45 Pertussis F-HA	25 µg
50-mmolární Tris-pufr	0,125 ml
obsahující 42,5 % (hmotn./obj.) sacharózy	
Voda pro injekce, qsp	0,5 ml

50

Test stanovení imunogenity ve vztahu k PRP-T se provádí na myších s roztokem připraveným uvedeným způsobem, stejně jako s roztokem skladovaným za teploty 37 °C po dobu 1 měsíce, roztokem skladovaným za teploty 25 °C po dobu 2 měsíců a s roztokem skladovaným za teploty 4 °C po dobu 6 měsíců. Všechny případy vedou k uspokojivým výsledkům, co ukazuje na stabilitu PRP-T v takovém prostředí.

Příklad 13

5 Přípraví se vakcínová kompozice a přitom se vychází z těchto složek:

	Hydroxid hlinitý (vyjádřeno jako hliník)	0,3 mg
	PRP-T (vyjádřeno jako hmotnost polyribosylribitolfosfátu)	10 µg
	Čištěný anatoxin záškrtu (PDA)	1 vakcinační dávka
10	Čištěný anatoxin tetanu (PTA)	1 vakcinační dávka
	Anatoxin černého kašle	25 µg
	F-HA	25 µg
	Hbs protein (jako je přítomen ve vakcíně GenHevac B PASTEUR ^(R))	20 µg
	Antigeny dětské obrny typ I	40 jednotek
15	typ II	8 jednotek
	typ III	32 jednotek
	Fosfáty	20 µmol
	Uhličitany	5 µmol
	50-mmolární Tris-pufr	0,125 ml
20	obsahující 42,5 % (hmotn./obj) sacharózy	
	Voda pro injekce, qsp	0,5 ml

25 Stabilita roztoku připraveného tímto způsobem se ověří tím, že se roztok vystaví teplotě 37 °C po dobu 2 týdnů a potom se provede test stanovení imunogenity PRP-T na myších, jak je popsáno v příkladu 5.

Dosažené výsledky jsou uspokojivé.

30 Provede se test imunogenity pro Hbs protein. Tento test se provádí na myších a spočívá ve stanovení anti-HBs protilátky testem Elisa, přičemž potom se určí na těchto myších 50% účinná dávka, která může být menší než 0,970 µg Hbs proteinu, pokud se předpokládá, že test je uspokojivý.

35 Výsledky dosažené s roztokem připraveným jak je uvedeno výše a udržovaným za teploty 37 °C po dobu 2 týdnů před testováním jsou uspokojivé.

Příklad 14

40 Přípraví se vakcínová kompozice a přitom se vychází z těchto složek:

	Hydroxid hlinitý (vyjádřeno jako hliník)	0,3 mg
	PRP-T (vyjádřeno jako hmotnost polyribosylribitolfosfátu)	10 µg
	Čištěný anatoxin záškrtu (PDA)	1 vakcinační dávka
45	Čištěný anatoxin tetanu (PTA)	1 vakcinační dávka
	Anatoxin černého kašle	10 µg
	F-HA	5 µg
	Řasy	5 µg
	Pertactin	3 µg
50	HBS protein (jako je přítomen ve vakcíně GenHevac B PASTEUR ^(R))	20 µg
	Antigeny dětské obrny typ I	40 jednotek
	typ II	8 jednotek
	typ III	32 jednotek
	Fosfáty	20 µmol

Uhličitany	10 µmol
Chlorid hořečnatý	5 µmol
50–mmolární Tris–pufr	0,125 ml
obsahující 42,5 % (hmotn./obj.) sacharózy	
5 Voda pro injekce, qsp	0,5 ml

Testy imunogenity ve vztahu k PRP–T se provádí jak je popsáno v příkladu 5. Test stanovení imunogenity vzhledem k Hbs proteinu se provádějí jak je popsáno v příkladu 13. Všechny tyto testy vedou k uspokojivým výsledkům, co ukazuje na stabilitu vakcínové kompozice podle tohoto vynálezu.

15

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Vakcínová kompozice obsahující alespoň jeden antigen vytvoření kapsulárním polysacharidem chřipky Haemophilus typu b nebo polyribosylribitolfosfátem o vysoké molekulové hmotnosti kondenzovaným k anatoxinu tetanu a adjuvans na bázi hliníku, **vyznačující se tím**, že adjuvans na bázi hliníku má bod nulového náboje menší než 7,2.
2. Vakcínová kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že adjuvans na bázi hliníku obsahuje hydroxidy hlinité chemicky modifikované přidanými aniony.
3. Vakcínová kompozice podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že aniony jsou vybrány z fosfátů a citrátů.
4. Vakcínová kompozice podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že adjuvand na bázi hliníku obsahuje fosfáty hlinité.
5. Vakcínová kompozice podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že adjuvans na bázi hliníku obsahuje síran draselný a hlinitý.
6. Vakcínová kompozice podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje alespoň jeden z vakcínovaných antigenů zvolených ze záškrtu, tetanu, černého kašle, hepatitidy b a polyomyelitidy.
7. Způsob přípravy vakcínové kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se nejprve sníží bod nulového náboje adjuvans na bázi hliníku na méně než 7,2 a poté se k němu přidá alespoň jeden antigen vytvořený kapsulárním polysacharidem chřipky Haemophilus typu b nebo polyribosylribitolfosfátem kondenzovaný k anatoxinu tetanu.
8. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že se nejprve sníží bod nulového náboje adjuvans na bázi hliníku na méně než 7,2 přidáním anionu vybraného z fosfátu a citrátů.

Konec dokumentu
