

A2

24279

Vakcina

Kivonat

- 5 A találmány tárgyát hasított burkolt víruskészítményeket — de nem hasított influenza víruskészítményeket — tartalmazó vakcina-kiszerelések alkalmazása képezi intranazális bejutásra alkalmas vakcina-kiszerelés gyártására. A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások ilyen kiszerelések gyártására, és ilyen vakcinák alkalmazása betegség megelőzésére vagy kezelésére.

F. 100.



KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Vakcina

A találmány tárgyát vakcina-készítmények képezik, eljárások ilyen vakcinák gyártására és ilyen vakcinák alkalmazása betegség profilaxisára és terápiájára. Közelebbről a találmány tárgyát hasított burkolt víruskészítményeket tartalmazó vakcinák képezik.

A burkolt vírusok olyan vírusok, amelyekben a vírus magját lipidekben gazdag, virális fehérjéket tartalmazó külső burok veszi körül.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint a találmány szerinti vakcina-kiszerezésben található hasított burkolt vírus respiratorikus szinciciális vírusból származik. A burkolt vírusokkal való fertőzés veszélyeit az RSV-re hivatkozva mutatjuk be.

A humán respiratorikus szinciciális vírus (RSV) a *Paramyxoviridae* család tagja, és alsó légúti megbetegedéseket okoz, különösen fiatal gyermekekben és csecsemőkben. Újabb vizsgálatok azt sugallják, hogy az RSV jelentős patogén felnőttekben is, különösen az idősokban.

Az RSV egy burkolt vírus, nem szegmentált, negatív szálú ribonukleinsav (RNS) genommal, amely 15222 nukleotidot tartalmaz és 11, egyetlen fehérjét kódoló hírvivő RNS-t kódol. A 11 fehérje közül három felszíni transzmembrán fehérje: a G (kapcsolódási), az F (fúziós) és az SH fehérje. Egy fehérje a virion mátrixfehérje (M), három fehérje alkotja a nukleokapszidot (N, P és L), és 2 fehérje nem-szerkezeti (NS1 és NS2). Két további fehérje az M2-1 és az M2-2. Az RSV-nek két antigenikusan elkülönülő alcsoportja létezik, amelyeket A és B alcsoportnak neveznek. Törzseknek ezekbe az alcsoportokba történő osztályozásával meghatározták, hogy a különbségek főleg a G fehérjékben vannak, míg az F fehérjék konzerváltak.

A respiratorikus szinciciális vírus (RSV) szezonális járványokban fordul elő, leggyakrabban mérsékelt klímán a tél folyamán, melegebb klímán az esős évszakban.

Az RSV súlyos alsó légúti betegség fő oka gyermekekben. Úgy becsülik, hogy a bronchiolitisszel kórházba kerülő gyermekek 40-50%-a, és a tüdőgyulladással kórházba kerülő gyermekek 25%-a RSV fertőzés közvetlen következményeként kerül kórházba. Az elsődleges RSV fertőzés általában egy évnél fiatalabb gyermekek esetében fordul elő; két éves korra a gyermekek 95%-ában van szerológiai bizonyíték korábbi fertőzésre, és felnőttkorra a népesség 100%-ában van ez meg.

Csecsemőkben és kisgyermekekben a fertőzés a felső légutak felől az alsó légutak felé halad előre az esetek megközelítőleg 40%-ában, és a klinikai tünetek megegyeznek a bronchiolitisz és tüdőgyulladás tüneteivel. A kettő és hat hónapos kor közötti gyermekek van-

nak a legnagyobb veszélynek kitéve, hogy RSV fertőzés súlyos tünetei alakulnak ki (elsődleges respiratorikus elégtelenség); azonban meglévő szív- vagy tüdőbetegségben szenvedő gyerekek, koraszülöttek, és immunelégtelen csecsemők bármely korban ki vannak téve súlyos komplikációknak.

5 Szimptomatikus újrafertőzés az élet során előfordulhat, és egyre nyilvánvalóbb, hogy az RSV fontos felnőttkori patogén is, különösen az idősök esetében.

Az RSV fertőzést minden bizonnyal nem teljes mértékben diagnosztizálják felnőttekben, részben amiatt, hogy gyermekek fertőzésének tartják. Ennek megfelelően nem keresik a vírus jelenlétét felnőttekben a respiratorikus megbetegedés okaként. Ezenfelül az RSV-t nehéz azo-
10 nosítani olyan személyek orrváladékából, amelyeknek van valamekkora részleges immunitása a vírus ellen, mint a felnőttek nagy többségének. Fiatal és középkorú felnőttekben tipikusan folyamatos náthaszerű szindróma alakul ki RSV fertőzés hatására. Az idős személyekben elnyújtott respiratorikus szindróma alakulhat ki, amely gyakorlatilag megkülönböztethetetlen az influenza-tól, felső légúti tünetekkel, amelyeket alsó légúti betegségek is kísérnek, mint például
15 tüdőgyulladás. Idősök otthonában lévő populációk különösen érintettek, mivel nagyszámú, egy helyen lévő érzékeny személyt tartalmaznak. A fertőzés terjedését nehéz ellenőrzés alatt tartani egy ilyen populációban, ahol sokaknak lehet több olyan orvosi problémája, amely a betegség súlyosabb lefolyására a tesz hajlamossá.

Ezenfelül az RSV fertőzésnek, mint felnőttek és közösségi házakban élő idősök kórházba
20 kerülésének okaként való értékelésére készített újabb vizsgálatok arra is rámutatnak, hogy az RSV-nek fontos szerepe van a súlyos alsó légúti betegségekben ezekben a populációkban. Az RSV-t a felnőttek kórházba kerülését eredményező alsó légúti betegséget okozó négy leggyakoribb patogén egyikeként azonosították. Azt is kimutatták, hogy a súlyos RSV fertőzések az idősök között nem korlátozódnak a szanatóriumokra vagy járványos helyzetekre. Ehelyett az
25 RSV fertőzés súlyos megbetegedések megújuló oka a közösségben található idős páciensek között. Hasonlóan az influenza-A-eredetűekhez, az RSV fertőzésekkel kapcsolatos kórházba kerülések jelentős morbiditással párosultak, amit alátámaszt a hosszabb kórházi tartózkodás, az intenzív osztályon történő kezelés nagyobb gyakorisága és a mesterséges lélegeztetés nagyobb gyakorisága.

30 Ezek a vizsgálatok rámutatnak olyan vakcina orvosi és gazdasági szükségességére, amely megakadályozhatja az RSV fertőzéssel kapcsolatos komplikációkat, különösen csecsemők, felnőttek és közösségben élő egészséges és kezelt idősök között.

Hasonló veszélyt jelent a többi burkolt vírus is, és ezért még mindig szükség van hatékony védelemre az ilyen vírusok által okozott fertőzés és betegségek ellen.

A találmány tárgya hasított burkolt víruskészítmény — amely nem influenzavírus-készítmény — alkalmazása intranazális bejuttatásra kisserelt vakcina gyártásában.

5 Előnyösen a készítmény gyógyászatilag elfogadható kötőszert tartalmaz.

A találmány szerinti vakcina-kisserelések hasítódásra képes burkolt vírusokból származhatnak. A burkolt vírus különféle forrásokból származhat, beleértve humán vagy állati eredetű vírusokat. Amikor a vírus nem humán eredetű, mint például szarvasmarha eredetű, akkor a vírus előnyösen rekombináns vírus.

10 Előnyösen a találmány szerinti vakcina-kisserelések képesek védő immunválasz stimulálására a burkolt vírus ellen a bejuttatást követően.

A találmány szerinti vírusok közé tartozik az összes burkolt vírus (kivéve bármilyen influenzavírust), nem korlátozó példaként az alábbiak:

1) Paramixovírusok, mint például respiratorikus szinciciális vírus (A és B), parainfluenza
15 vírus (mint például PIV-3), metapneumovírus, kanyaróvírus, mumpsz vírus;

2) herpeszvírusok, mint például Epstein Barr vírus, *Herpes simplex* vírus, citomegalovírus;

3) flavivírusok, mint például dengue vírus, sárgaláz vírus, kullancsos encefalitisz vírus, Japán encefalitisz vírus;

20 4) togavírusok, mint például rubeóla vírus, keleti, nyugati vagy venezuelai lóencefalitisz vírus; és

5) retrovírusok, mint például humán immundeficiencia vírus.

A találmány szerinti vakcina-kisserelés adott esetben egynél több hasított víruskészítményt tartalmaz.

25 A találmány szerinti vakcina-kisserelés adott esetben tartalmaz patogénekből származó antigént vagy antigéneket a hasított készítménnyel együtt, hogy további védelmet biztosítson a betegség ellen. Alkalmas antigének — amelyeknek nem kell a hasított készítményekből származniuk — közé tartoznak például a fent felsorolt vírusokból származó antigének, és olyan patogénekből származó antigének, amelyek respiratorikus betegséget okozhatnak, mint például
30 a *Streptococcus pneumoniae*.

A vírus hasítását az egész vírus — legyen az fertőző (vad típusú vagy legyengített) vagy nem fertőző (például inaktivált) — szétrepesztésével vagy fragmentálásával hajtjuk végre hasító ágens szétrepesztő koncentrációjának alkalmazásával, amely ágens általában felületak-

tív anyag, de ez nem szükségszerű. A hasítandó vírus lehet kiméra rekombináns vírus is, amelynek az immunogén elemei egynél több különböző vírusból származnak. A szétrepesztés az összes vírusfehérje teljes vagy részleges szolubilizációját eredményezi, ami megváltoztatja a vírus integritását.

5 Megfelelő módon a hasított vírust a vírusnak hasító ágenssel történő érintkezésbe hozásával állíthatjuk elő a találmány szerint, hogy teljesen szétrepesszük a virális burkot. Más virális fehérjék is előnyösen teljesen vagy részlegesen szolubilizálttá válnak. Az integritás hasítás utáni elvesztése a vírust nem fertőzővé teszi, amit alkalmas *in vitro* titrálási vizsgálati eljárásokkal állapíthatunk meg. Ha egyszer szétrepesztettük, a virális burokfehérjék általában nem kapcsolódnak az egész intakt virionokhoz. Más virális fehérjék is előnyösen teljesen vagy részlegesen szolubilizáltak, és ezért nem kapcsolódnak, vagy csak részlegesen kapcsolódnak az egész intakt virionokhoz a hasítást követően.

A hasító ágens hatását a virális burokra és a vírusfehérjékre követhetjük a hasított vírus és a virális fehérjék vándorlásával szukrózopárnás kísérletekben, amit Western-blot elemzéssel és elektronmikroszkópiával tehetünk láthatóvá, amint a leírásban feltárjuk.

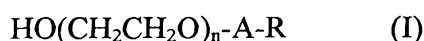
A találmány szerinti hasított vakcinák előállítására továbbá tartalmazhat további lépéseket a hasító ágens és a virális lipidanyag többségének eltávolítására. A hasított vakcina előállítási eljárása továbbá tartalmazhat számos különböző szűrési és/vagy egyéb elválasztási lépést, mint például ultracentrifugálást, ultrafiltrálást, zonális centrifugálást és kromatográfiát különféle kombinációkban, és adott esetben inaktiválási lépést, például formaldehiddel vagy β -propiolaktonnal vagy UV-kezeléssel, amelyet a hasítás előtt vagy után végezhetünk el. A hasítási eljárást batch-ként, folyamatos, vagy félig folyamatos eljárásként hajthatjuk végre.

A találmány szerinti hasított vakcinák általában membránfragmenseket és membrán burokfehérjéket tartalmaznak, valamint nem membránfehérjéket, mint például virális mátrixfehérjéket és nukleoproteint, szignifikáns egész virionok jelenléte nélkül. A találmány szerinti hasított vakcinák általában tartalmazhatják a vírus szerkezeti fehérjeinek legtöbbjét vagy összességét, habár nem szükségszerűen ugyanolyan arányban, amelyben azok egész vírusban előfordulnak. Előnyös hasított víruskészítmények a virális szerkezeti fehérjéknek legalább a felét tartalmazzák, és előnyösen az összes ilyen fehérjét tartalmazzák. Másrésről, az alegység-vakcinák lényegében egy vagy néhány nagyon tiszta virális fehérjét tartalmaznak. Például alegység-vakcina tartalmazhat tisztított virális felszíni fehérjéket, amelyek ismert módon felelősek a kívánt vírust semlegesítő ellenanyagok kiváltásáért a vakcinálást követően.

A találmányban különféle hasító ágenseket, mint például nemionos felületaktív anyagokat, valamint különféle egyéb reagenseket alkalmazhatunk. A találmány szerint alkalmas hasító ágensek példái közé tartoznak az alábbiak:

1. Epesavak és azok származékai. Az epesavak közé tartozik a kólsav, deoxikólsav, kenodeoxikólsav, litokólsav, ursodeoxikólsav, hiodeoxikólsav és származékaik, mint például a fent említett epesavak gliko-, tauro-, amidopropil-1-propáneszulfon-, amidopropil-2-hidroxi-1-propánszulfon-származékai, vagy N,N-bisz-(3D-glukonoamidopropil)-deoxikolamid. Egy különösen előnyös példa a nátrium-deoxikolát (NaDOC).

2. Nemionos felületaktív anyagok, mint például oktoxinolok (a Triton sorozat) polioxietilén-éterek, mint például polioxietilén-szorbitán-monooleát (Tween 80) és az (I) általános képlet szerinti polioxietilén-éterek vagy -észterek:



amelyben n értéke 1-50, A jelentése kémiai kötés vagy -C(O)-, R jelentése alkil- vagy fenil-C₁₋₅₀ alkil, vagy ezek közül kettő vagy több bármilyen kombinációja. Előnyös példák a Tween 80TM, Triton X-100TM és a Laureth 9.

3. Alkilglikozidok vagy alkiltioglikozidok, amelyekben a az alkilánc C₆-C₁₈ közötti, tipikusan C₈-C₁₄ közötti, a cukor-molekularész bármely pentóz vagy hexóz vagy azok kombinációja különböző kötésekkel, mint például 1->6, 1->5, 1->4, 1->3, 1-2. Az alkilánc lehet telített vagy telítetlen és/vagy elágazó.

4. A fenti 3. pont szerinti vegyületek származékai, amelyekben egy vagy több hidroxilcsoport, előnyösen a 6-os helyzetű hidroxilcsoport módosított, mint például észterek, etoxilátok, szulfátok, éterek, karbonátok, szulfoszukcinátok, izoetionátok, éterkarboxilátok, kvaterner ammónium vegyületek.

5. Acilcukrok, amelyekben az acillánc C₆-C₁₈ közötti, tipikusan C₈-C₁₂ közötti, a cukor-molekularész bármely pentóz vagy hexóz vagy azok kombinációja különböző kötésekkel, mint például 1-> 6, 1->5, 1->4, 1->3, 1-2. Az acillánc lehet telített vagy telítetlen és/vagy elágazó.

6. R-N,N-(R1,R2)-3-amino-1-propánszulfonát szerkezetű szulfobetainok, amelyekben R jelentése bármely alkilánc vagy arilalkilánc, C₆-C₁₈ között, tipikusan C₈-C₁₆ között. Az R jelű alkilánc lehet telített vagy telítetlen és/vagy elágazó. R1 és R2 jelentése előnyösen alkilánc C₁ és C₄ között, tipikusan C₁.

7. R-N,N-(R1,R2)-glicin szerkezetű betainok, amelyekben R jelentése bármely alkilánc C₆-C₁₈ között, tipikusan C₈-C₁₆ között. Az alkilánc lehet telített vagy telítetlen és/vagy elágazó. R1 és R2 jelentése előnyösen alkilánc C₁ és C₄ között, tipikusan C₁.

8. $R-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ szerkezetű polioxietilén-alkiléter, amelyben R jelentése bármely alkillánc C_6-C_{20} között, tipikusan C_8-C_{14} között. Az alkillánc lehet telített vagy telítetlen és/vagy elágazó. n értéke 5 és 30 közötti, tipikusan 8 és 25 közötti.

5 9. $R-(N-R_1)$ -glukamid szerkezetű N,N-dialkil-glukamidok, amelyekben R jelentése bármely alkillánc C_6-C_{18} között, tipikusan C_8-C_{12} között. Az alkillánc lehet telített vagy telítetlen és/vagy elágazó vagy ciklusos. R1 és R2 jelentése előnyösen alkillánc C_1 és C_6 között, tipikusan C_1 . A cukor-molekularész módosított pentóz vagy hexóz lehet.

10. *Hecameg*: (6-0-(N-heptil-karbamoil)-metil-alfa-D-glukopiranozid).

10 11. $R-C_6H_4-O-(CH_2-CH_2)_n-OH$ szerkezetű alkilfenoxi-polietoxietanol, amelyekben R jelentése bármely alkillánc C_6-C_{18} között, tipikusan C_8 . Az alkillánc lehet telített vagy telítetlen és/vagy elágazó ($n \geq 3$).

12. $R-N^+(-R_1,-R_2,-R_3)$ szerkezetű kvaterner ammónium vegyületek, amelyekben R jelentése bármely alkillánc C_6-C_{20} között, tipikusan C_{20} . Az alkillánc lehet telített vagy telítetlen és/vagy elágazó. R1, R2 és R3 jelentése alkillánc C_1 és C_4 között, tipikusan C_1 .

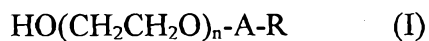
15 13. Szarkozil: N-laurilszarkozin Na sója.

14. CTAB (cetil-trimetil-ammónium-bromid) vagy Cetavlon.

A legelőnyösebb a NaDOC és a szarkozil. A hasító ágenseket előnyös szobahőmérsékleten inkubáljuk a hasítandó vírussal a hasítás elvégzéséhez, például éjszakán keresztül. Hasító ágensek kombinációit is alkalmazhatjuk, ha szükséges.

20 A hasított vakcina-készítmény előnyösen legalább egy felületaktív anyagot tartalmaz, amely különösen nemionos felületaktív anyag lehet. Az egy vagy több nemionos felületaktív anyag lehet a hasítási eljárás maradványa és/vagy hozzáadhatjuk a vírusához a hasítás után. Azt tartják, hogy a hasított antigén anyagok stabilizálódik nemionos felületaktív anyag jelenlétében, bár nyilvánvaló, hogy a találmány nem függ attól, hogy ez legyen feltétlenül a helyzet.

25 Megfelelő stabilizáló nemionos felületaktív anyagok közé tartoznak az oktoxinolok (a Triton sorozat) polioxietilén-éterek, mint például polioxietilén-szorbitán-monooleát (Tween 80™) és az (I) általános képlet szerinti polioxietilén-éterek vagy -észterek:



30 amelyben n értéke 1-50, A jelentése kémiai kötés vagy $-C(O)-$, R jelentése alkil- vagy fenil- C_{1-50} alkil, vagy ezek közül kettő vagy több bármilyen kombinációja.

Előnyös Triton sorozatbeli nemionos felületaktív anyagok közé tartozik a Triton X-100 (t-oktilfenoxi-polietoxietanol), Triton X-165, Triton X-205, Triton X-305 vagy Triton X-405 Triton N-101. A Triton X-100 különösen előnyös.

Előnyös nemionos felületaktív anyagok nem korlátozó példái közé tartoznak a fenti (I) általános képlet szerinti polioxietilén-éterek, különösen az alábbiak: polioxietilén-9-lauril-éter, polioxietilén-9-sztearil-éter, polioxietilén-8-sztearil-éter, polioxietilén-4-lauril-éter, polioxietilén-35-lauril-éter vagy polioxietilén-23-lauril-éter. Legelőnyösebben a polioxietilén-éter a polioxietilén-9-lauril-éter (Laureth 9). A polioxietilén-lauril-éter alternatív kifejezéseit és neveit a CAS-regiszterben tárják fel. A polioxietilén-9-lauril-éter CAS-regiszter száma 9002-92-0. Polioxietilén-étereket, mint például polioxietilén-lauril-étert a Merck Index tár fel (12. kiadás: 7717. szám alatt, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., USA; ISBN 0911910-12-3). A Laureth 9-et etilén-oxid és dodecil-alkohol reakciójával állítják elő, és átlagosan 9 etilén-oxid egységet tartalmaz.

Előnyösen a stabilizáló felületaktív anyag végkoncentrációja 0,001-20%, előnyösebben 0,01-10%, és legelőnyösebben körülbelül 2% (w/v) a végső vakcina-kiszerelésben. Amikor egy vagy több felületaktív anyag van jelen, ezek általában körülbelül 2% koncentrációban vannak jelen a végső kiszerelésben, általában mindegyik körülbelül 1%, tipikusan körülbelül 0,6% koncentrációig, és tipikusabban nyomokban és körülbelül 0,2% vagy 0,1 % koncentrációig. Felületaktív anyagok bármilyen keveréke jelen lehet a találmány szerinti vakcina-kiszerelésekben.

A burkolt vírust megfelelő sejtben, szérumban vagy szérummentes eljárással történő replikációval állíthatjuk elő. A szövettenyészetben tenyésztett vírust például humán sejtekben, mint például MRC-5, WI-38, HEp-2 sejtekben állíthatjuk elő, vagy majomsejtekben, mint például AGMK, Vero, LLC-Mk₂, LLC-Mk₂, FRhL, FRhL-2, vagy szarvasmarha sejtekben, mint például MDBK, vagy kutyasejtekben, mint például MDCK, vagy elsődleges sejtekben, mint például csirkeembrió fibroblasztokban, vagy bármilyen más sejtekben, amelyek alkalmasak vírusok vakcina céljára történő termelésére, beleértve a fent említett sejtvonalakból származtatott klónokat is.

A hasított vakcina-készítményt előnyösen kombináljuk gyógyászatilag elfogadható kötőszerezrel. Az alkalmazott gyógyászatilag elfogadható kötőszerek olyanok lehetnek, amelyeket hagyományosan alkalmaznak a vakcinák előállításának szakterületén. Egy adott vakcina-kiszerelésben az alkalmazott kötőszerek kompatibilisek mind egymással, mind a készítmény esszenciális alkotórészeivel, oly módon, hogy nincs olyan kölcsönhatás, amely zavarná az alkotórészek vagy a hatóanyagok teljesítményét. Az összes kötőszernak természetesen nem toxikusnak és elegendően tisztának kell lennie, hogy humán alkalmazásra alkalmasak legyenek. Kötőszerek megfelelő példái jól ismertek a szakterületen.

A vakcina-kiszerelés előnyösen adjuvánst is tartalmazhat, amely lehet hordozó és/vagy immunstimuláns. Az adjuváns lehet a hasítási eljárás maradványa és/vagy hozzáadhatjuk a vírushoz a hasítás után. Találmány szerinti vakcinákban történő alkalmazásra alkalmas adjuván-sok jól ismertek a szakterületen.

5 Ily módon egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya hasított burkolt ví-ruskészítmény — amely nem influenzavírus-készítmény — alkalmazása adjuvánssal kombinálva intranazális bejuttatásra kiszerelt vakcina gyártásában. Előnyösen a készítmény gyógyászatilag elfogadható kötőszert tartalmaz.

10 A találmány szerinti vakcina-készítményeket alkalmazhatjuk betegségre érzékeny, vagy betegségtől szenvedő emlős védelmére vagy kezelésére, azáltal, hogy a vakcinát nazális úton beadjuk. A találmány tárgyat képezik az ilyen kezelési és védő eljárások.

Elttekintve a fájdalmas injekciók szükségességének elkerülésétől és az ezzel kapcsolatban a páciensek tőltől való félelem miatti együttműködésének a negatív hatásaitól, a nyálkahártyai vakcinálás — mint például az intranazális eljárás — vonzó, mivel állatokban kimutatták, hogy
15 antigének nyálkahártyai beadásának nagyobb a hatékonysága védő immunválaszok indukálásá-ban a nyálkahártyai felszíneken, ami sok kórokozó bejutásának az útja. Ezenfelül azt javasol-ták, hogy a nyálkahártyai vakcinálás, mint például intranazális vakcinálás nemcsak az orrnyál-kahártyában indukálhat nyálkahártyai immunitást, hanem távoli nyálkahártyai helyeken is, mint például a genitális nyálkahártyán. A területen végzett sok kutatás ellenére még mindig szükség
20 van biztonságos és hatékony, humán alkalmazásra alkalmas intranazális bejuttatásra szolgáló vakcinák azonosítására.

A találmány szerinti intranazális beadás lehet csepp, permet vagy száraz por formájában. Porlasztott vagy aeroszolizált vakcina-kiszerelések is a találmány részét képezik.

Bármilyen alkalmas adjuvánst alkalmazhatunk a találmány szerinti bármilyen alkalmas
25 formában, mint például oldat, nem vezikuláris oldat, szuszpenzió vagy por formájában. Az elő-nyös adjuván-sok közé tartoznak a WO 99/52549. számú nemzetközi közzétételi iratban — amelynek teljes tartalma hivatkozás útján a kitanítás részét képezi — szemléltetettek. Az elő-nyös adjuván-sok nem korlátozó példái közé tartoznak nemionos felületaktív anyagok, mint például Tween 80™, Triton X-100™ és Laureth 9, és ezek kombinációi.

30 A nemionos felületaktív anyagokat előnyösen kombinálhatjuk immunstimulánssal, mint például lipid-A nem toxikus származékával, beleértve a 4 912 094. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban és a 2 220 211. számú brit szabadalmi iratban feltártakat, köz-tük a monofoszforil- és difoszforil-lipid-A nem toxikus származékait, mint például a 3-de-O-

acilált monofoszfóril-lipid-A-t (3D-MPL) és a 3-de-O-acilált difoszfóril-lipid-A-t. Egy előnyös kombináció a Laureth 9 kombinációja 3D-MPL-lel. A fenti immunstimulánsokat alkalmazhatjuk a kiserelésekben nemionos felületaktív anyagok nélkül is, ha ez alkalmas.

5 A 3D-MPL egy előnyös formája olyan emulzió, amelynek kicsi a részecskemérete (kisebb, mint 0,2 µm átmérőjű), és amelynek az előállítási módját a WO 94/21292. számú nemzetközi közzétételi iratban tárják fel. Monofoszfóril-lipid-A-t és felületaktív anyagot tartalmazó vizes oldatokat leírtak a WO 9843670A2. számú nemzetközi közzétételi iratban.

10 A találmány szerinti készítményekbe kiserelendő bakteriális lipopoliszacharidból származó adjuvánsokat bakteriális forrásokból tisztíthatjuk és dolgozhatjuk fel, vagy más megoldásként szintetikusak lehetnek. Például a tisztított monofoszfóril-lipid-A-t Ribi és mtsai. írják le [„Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins”, kiad.: Plenum Publ. Corp., NY, 407-419. old. (1986)], és a *Salmonella* sp.-ből származó 3-O-deacilált monofoszfóril- vagy difoszfóril-lipid-A-t a GB 2 220 211. számú brit szabadalmi iratban és a 4 912 094. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban írják le. Leírtak más tisztított és szintetikus lipopoliszacharidokat is [Hilgers és mtsai., Int. Arch. Allergy. Immunol. 79, 392-396. old. (1986); Hilgers és mtsai., Immunology 60, 1416. old. (1987); és EP 0 549 074 B1. számú európai szabadalmi irat]. Egy különösen előnyös bakteriális lipopoliszacharid adjuváns a 3D-MPL.

20 Ennek megfelelően a találmány szerint alkalmazható LPS-származék olyan immunstimuláns, amelynek a szerkezete hasonló az 3D-MPL MPL-éhez vagy LPS-éhez. A találmány egy másik megvalósítási módja szerint az LPS-származék lehet acilált monoszacharid, amely az MPL fenti szerkezetének egy része.

25 A találmány egy további megvalósítási módja szerint az adjuváns egy ADP-ribosziláló toxin vagy annak a mutánsa. Ilyen toxinok példái az *E. coli* hőlabilis toxinja (LT) és annak mutánsai, mint például az LTR192G, és ezeknek a toxinoknak a fragmensei, mint például a gangliozid-kötő komponens (LTB).

További előnyös adjuvánsok közé tartoznak a szaponin adjuvánsok, mint például a QS21.

30 Javított rendszer nem toxikus lipid-A-származék és szaponin-származék kombinációját tartalmazza, mint például QS21 és 3D-MPL kombinációját, amint azt a WO 94/00153. számú nemzetközi közzétételi irat feltárja, vagy egy kevésbé reaktogén készítményt, amelyben a QS21-et koleszterinnel csillapítjuk, amint azt a WO 96/33739. számú nemzetközi közzétételi irat feltárja.

Előnyös eszközök a találmány szerinti vakcinák intranazális beadására a permetező eszközök. Alkalmas nazális permetező eszközök kereskedelmi forgalomban kaphatók a Becton Dickinson, Pfeiffer GmbH és Valois cégektől.

5 Az intranazális alkalmazásra előnyös permetező eszközök teljesítménye nem függ a felhasználó által kifejtett nyomástól. A nyomásküszöb eszközök különösen hasznosak, mivel a folyadék csak akkor hagyja el a fúvókát, ha kialakul a határnyomás az eszközben. Ezek az eszközök könnyebbé teszik a szabályos cseppméretű permet elérését. A találmány szerinti alkalmazásra alkalmas nyomásküszöb eszközök ismertek a szakterületen, és például a WO 91/13281. számú nemzetközi közzétételi irat, és az EP 311 863 B. számú európai szabadalmi iratok tárják fel azokat. Ilyen eszközök jelenleg elérhetők a Pfeiffer GmbH cégnél, és azokat ismerteti Bommer is [Bommer, R., „Advances in Nasal drug delivery Technology”, Pharmaceutical Technology Europe, 26-33. old. (1999)].

15 Előnyös intranazális eszközök 1-500 μm -es tartományba eső méretű cseppeket hoznak létre (folyadékként víz alkalmazásával mérve). 10 μm alatt fennáll a belégzés veszélye, tehát kívánatos, hogy a cseppeknek nem több, mint 5%-a legyen kisebb 10 μm -nél.

A kétdózisos bejuttatás egy további előnyös sajátossága a találmány szerinti vakcinákkal történő alkalmazásra szolgáló intranazális bejuttatási rendszereknek. A kétdózisos eszközök egyetlen vakcina-dózis két aldózist tartalmaznak, egy aldózist mindegyik orrlyukba történő beadásra.

20 A találmány tárgyát képezi intranazális bejuttatási eszköz is, amely találmány szerinti hasított vakcina-kiszerezést tartalmaz.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya gyógyászati reagenskészlet, amely találmány szerinti intranazális beadási eszközt tartalmaz, vagy intranazális beadási eszközt és az eszközzel alkalmazandó különálló vakcina-kiszerezést tartalmaz.

25 A találmány ezen megvalósítási módja nem korlátozódik szükségszerűen folyékony kiszerezések permetezett bejuttatásra. Találmány szerinti vakcinákat más formában is beadhatunk, például porként.

A találmány szerinti kiszerezéseket alkalmazhatjuk profilaktikus és terápiás célokra is. Ennek megfelelően a találmány tárgya eljárás fertőző betegségekre érzékeny, vagy abban szenvedő emlős kezelésre. Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya találmány szerinti vakcina gyógyászatban történő alkalmazásra. Vakcina előállítását általában leírják a „New Trends and Developments in Vaccines” című könyvben [szerk.: Voller és mtsai., kiad.: University Park Press, Baltimore, Maryland, USA (1978)].

Vakcinákat bármilyen adagolási rend szerint beadhatunk, mint például egydózisos vagy kétdózisos rend szerint. A vakcinát naiv vagy beindított („primed”) populációkban alkalmazhatjuk, azaz seronegatív és szeropozitív személyekben.

Előnyös, ha a kiszereelés adjuvánst tartalmaz és/vagy vírusnak való kitétel útján már beindított személyeknek adjuk be.

A találmány tárgyát képezi tovább eljárás vakcina-kiszereelés előállítására, amely szerint:

- (a) burkolt vírust hasítunk;
- (b) adott esetben összekeverjük a hasított burkolt vírus-készítményt stabilizáló szerrel; és
- (c) adott esetben összekeverjük a hasított burkolt vírus-készítményt adjuvánssal (ahol az

adjuváns lehet hordozó és/vagy immunstimuláns is).

Alkalmas módon az eljárás az (a) és (b), (a) és (c), vagy (a), (b) és (c) lépéseket tartalmazza. Alkalmas módon a stabilizáló szer legalább egy felületaktív anyagot tartalmaz az alábbiak közül: polioxietilén-szorbitán-monooleát (Tween 80™); t-oktilfenoxi-polietoxietanol (Triton X-100™); polioxietilén-9-lauril-éter.

Adott esetben az ilyen módon előállított vakcinát összekeverjük hordozóval.

A találmány kiterjed burkolt vírusok hasítására szolgáló, a leírásban ismertetett eljárásokra is, amelyek a vírusnak megfelelő hasító ágenssel való kezelését tartalmazzák.

A találmányt az alábbi példákkal és ábrákkal szemléltetjük, de nem korlátozzuk azokra.

Az 1. ábrán hasított RSVA vírus Western-blotját mutatjuk be anti-F ellenanyaggal.

A 2. ábrán hasított RSVA vírus Western-blotját mutatjuk be anti-M2 ellenanyaggal.

A 3. ábrán hasított RSVA vírus Western-blotját mutatjuk be anti-G ellenanyaggal.

A 4. ábrán hasított RSVA vírus Western-blotját mutatjuk be anti-N ellenanyaggal.

Az 5. ábrán az EM-mel láthatóvá tett RSV/A kiindulási anyagot mutatjuk be.

A 6. ábrán az EM-mel láthatóvá tett, NaDOC-cal hasított RSV/A-t mutatjuk be.

A 7. ábrán az EM-mel láthatóvá tett PIV3 kiindulási anyagot mutatjuk be.

A 8. ábrán az EM-mel láthatóvá tett, NaDOC-cal hasított PIV3-t mutatjuk be.

A 9. ábrán az EM-mel láthatóvá tett HSV2 kiindulási anyagot mutatjuk be.

A 10. ábrán az EM-mel láthatóvá tett, NaDOC-cal hasított HSV2-t mutatjuk be.

A 11. ábrán az anti-FG ellenanyag-titerek (ELISA, a II. oltás után) mutatjuk be hasított

RSV-vel intramuszkuláris vagy intranazális úton immunizált beindított egerekben.

A 12. ábrán az anti-RSV/A semlegesítő ellenanyag-titerek (a II. oltás után) mutatjuk be hasított RSV-vel intramuszkuláris vagy intranazális úton immunizált beindított egerekben.

A 13. ábrán az anti-FG IgG izotípus-válaszokat (a II. oltás után) mutatjuk be hasított RSV-vel intramuszkuláris vagy intranazális úton immunizált beindított egerekben.

A 14. ábrán az anti-FG ellenanyag-titerek (ELISA, az I. oltás után) mutatjuk be hasított RSV-vel intramuszkuláris vagy intranazális úton immunizált beindított egerekben.

5 A 15. ábrán az anti-FG ellenanyag-titerek (ELISA) mutatjuk be hasított RSV-vel intramuszkuláris úton immunizált, nem beindított egerekben.

A 16. ábrán az anti-RSV/A semlegesítő ellenanyag-titerek mutatjuk be hasított RSV-vel intranazális úton immunizált, nem beindított egerekben.

10 1. példa. Hasított vírusok előállítása

A különféle víruscsaládokból származó burkolt vírusokat hasító ágensek, mint például felületaktív anyagok hozzáadásával hasítjuk. A hasítást a hasított vírusok vándorlásának jellemzésével értékeljük szukrózgradiensben vagy –párnában, SDS-PAGE/Western-blot elemzéssel, és a hasított virális termékek közvetlen vizsgálatával elektronmikroszkópos értékelés al-

15 kalmazásával.

Az ebben a példában leírt hasított vírusok különféle burkolt víruscsaládok képviselőit tartalmazzák. Például a *Paramyxoviridae* család (respiratorikus szinciciális vírus A és B, parainfluenza vírus 3, mumpsz és kanyaró vírus), *Togaviridae* család (rubeóla vírus) és a *Herpesviridae* család (Epstein Barr vírus, citomegalovírus vagy *Herpes simplex* vírus) tagjait

20 értékeljük.

A vírusrészecske szétrepesztésének műveletét (hasítás) hasító ágens, mint például felületaktív anyag hozzáadásával végezzük, a sejtmentes víruskészítményhez szolubilizáló koncentrációban hozzáadva. Közelebbről, epesavakat és alkilglikozidokat alkalmazunk felületaktív anyagként. A felületaktív anyagokat — egyedül vagy különféle kombinációkban — hozzá-

25 adjuk és inkubáljuk, hogy lehetővé tegyük a folyamat végbemenetelét.

A hatékony hasítás értékelését kezdetben szukrózgradiens vagy –párna centrifugálás alkalmazásával végezzük. Röviden, felületaktív anyaggal kezelt és nem kezelt mintákat viszünk fel szukrózgradiensre/párnára, és a frakciókat SDS-PAGE gélen elemezzük. A virion-fehérjék típusainak a szolubilis frakcióban való vándorlása a hatékony hasítást jelzi. A szukróz-SDS-

30 PAGE elemzéssel hatékonyan hasítottnak tekintett mintákat tovább elemezzük elektronmikroszkópiával. A mintákat szokásos negatív festési módszerekkel tesszük láthatóvá.

Az alábbi specifikus hasítási kísérleteket RSV-vel és PIV-vel hajtottuk végre.

1.1 Sejttenyésztési körülmények

Humán vad típusú RSV/A/Long és PIV-3 vírusokat replikáltunk Vero sejtekben szérummentes eljárással. A fertőzés előtt a Vero sejteket 4 napon keresztül tenyésztettük a konfluencia eléréséig. A vírustermelési körülményeket adaptáltuk az egyes vírusok esetében:

5 MOI 0,03, 4 nap az RSV/A esetében, MOI 0,001, 3 nap a HSV2 esetében és MOI 0,01, 5 nap a PIV-3 esetében 37 °C-on. A begyűjtés napján a sejtfoliadékokat visszanyertük lízis és stabilizáló szer hozzáadása után, és azonnal tároltuk -70 °C-on.

1.2 Vírustisztítás

10 Az 1,000 x g-n 10 percen keresztül tartó centrifugálással történő feltisztítás után a vírusrészecskéket csapadékba vittük a felülúszóból PEG 6000 kicsapással. A csapadékot újra feluszpendáltuk 50 mM Tris - 50 mM NaCl - 2 mM MgSO₄, pH 7,5 pufferben, majd benzonázzal kezeltük. Ezt az oldatot ultrafiltráltuk 500 kDa AGT membránon 5 térfogat foszfát-pufferelt sóoldattal szemben, majd diafiltráltuk 5 térfogat foszfát-pufferrel (pH 7,5) szem-

15 ben.

Intakt vírusrészecskéket állítottunk elő, amint ezt EM-mel és a leírásban ismertetett, szukrózpárnán történő centrifugálással igazoltuk. Meghatároztuk a fehérjekoncentrációt.

1.3 Vírushasítás

20 A vírusrészecskéket hasító ágensnek a sejtmentes víruskészítményhez történő hozzáadásával hasítottuk.

Ahhoz, hogy hatásos legyen, a detergenst a kritikus micellaképzési koncentrációja (cmc) felett kell alkalmazni. Az összes alkalmazott detergenst a cmc-értéke feletti végkoncentrációban alkalmaztuk. Megvizsgáltuk a D/P (detergens/protein) arányt. Sikeres hasítást értünk el

25 D/P ≥ 25 arány mellett, amely előnyös érték.

Az alábbi detergenseket alkalmaztuk 2% koncentrációban a vírusrészecskék hasítására: nátrium-deoxikolát, szarkozil, *Plantacare* és Laureth 9.

A hasítás után az oldatokat dializáltuk kiserelési pufferrel (10 mM PO₄/150 mM NaCl, pH 7,5) szemben, hogy eltávolítsuk a detergens feleslegét.

30

A hasítási eljárást az alábbiakban példaként RSV-t alkalmazva foglaljuk össze:

RSV-A: Vírustisztítási folyamatábra

Begyűjtött anyag feltisztítása

Centrifugálás Beckman JA10 rotorban, 3500 RPM (1000 x g) +4 °C-on 10 perc.



Feltisztított felülúszó.



10 % PEG-6000 kicsapás.

Lassú keverés 1 óra 30 percen keresztül +4 °C-on

Centrifugálás, 3500 RPM (1000 x g), 20 percen keresztül

A csapadékot felfuszpendáljuk 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM MgSO₄, pH 7,5 puf-

ferben.

Benzonáz-kezelés

125 egység/ml

Minimum 4 óra inkubálás keverés mellett

Ultraszűrés: AGT-VAGE4A-500 Kd - 420 cm²

5 térfogat 10 mM PO₄(Na), 150 mM NaCl, pH 7,5 pufferrel szemben

majd 5 térfogat 20 mM PO₄(Na), pH 7,5 pufferrel szemben

Hasítás

Detergens hozzáadása => ≤ 2% végkoncentrációban — inkubálás éjszakán keresztül

szobahőmérsékleten lassú keverés mellett

Feltisztítás

„Dead-end” szűrés Sartopure 300-on (GF2-depth filter 1,2 μm)

Ultraszűrés: detergens eliminálása — koncentráció

5 térfogat 20 mM PO₄(Na), pH 7,5

majd 5 térfogat 10 mM PO₄(Na), 150 mM NaCl, pH 7,5

Hasított anyag

1.4 Hasított vírus jellemzése

A kiindulási vírusok integritását és a hasítás minőségét 30% szukrózpárnán történő ultracentrifugálással határoztuk meg (1 órán keresztül 50000 rpm-mel Beckman TL100 rotorban). A frakciókat specifikus Western-blot vizsgálati eljárással elemeztük; ezeknek a frakcióknak 5 némelyikén elektronmikroszkópiát és fertőzőképességi titer vizsgálatokat hajtottunk végre.

1.4.1 Ultracentrifugálás:

Miután félig feltöltöttük a centrifugacsövet 30% szukróz oldattal (450 µl), az elemzendő mintát (450 µl) óvatosan rárétegeztük erre a szukrózpárnára, majd 1 órán keresztül centrifugáltuk 50000 rpm-mel +4 °C-on Beckman TL100 rotorban. A centrifugálás után a cső tartalmát háromfelé osztottuk. A felső fázist (300 µl) 'felülúszónak' nevezzük. A középső fázis (300 µl) az átmeneti fázis a minta és a szukrózpárna között, amit a leírás szerinti értelemben 'közép-sőnek' nevezünk. Az alsó fázis (300 µl) az alsó oldat a felszuszpendált csapadékkal, amikor a centrifugálást egész vírussal végezzük; ezt 'csapadéknak' nevezzük.

15 Ezt a három frakciót tovább elemeztük.

1.4.2 Western-blot elemzés:

Ez az elemzés lehetővé teszi a vírus integritásának az ellenőrzését (a csapadék frakció pozitív), és a hasítás hatékonyságának a meghatározását (alkalmas módon a felülúszó frakció pozitív az összes vagy a legtöbb szerkezeti fehérjére, mint például a burokfehérjékre).

Specifikus ellenanyagokat alkalmaztunk a specifikus virális fehérjék jellemzésére.

Az RSV-A nem hasított és hasított frakcióit elemeztük anti-F-fehérje (felszíni fehérje); anti-G-fehérje (felszíni fehérje); anti-N-fehérje (nukleokapszid) és anti-M-fehérje (mátrix) tartalomra.

25 A PIV-3 vírus esetében a nem hasított és hasított frakciókat elemeztük a HN fehérje tartalmukra monoklonális ellenanyag alkalmazásával, és az F, M, HN fehérjékre poliklonális ellenanyag alkalmazásával.

A HSV esetében a nem hasított és hasított frakciókat elemeztük a G fehérje, tegument fehérje és kapszid fehérje tartalmukra ellenanyagok alkalmazásával.

A hasítás kritériuma

A pozitív Western-blot (WB) szignál jelenléte mind a négy tesztelt fehérje ellen a csapadék frakcióban, és a szignál hiánya a két másik frakcióban a hasítás előtt az egész intakt vírus jelenlétét jelzi a víruskészítményben.

- 5 A hasítást hatásosnak tekintettük, ha a burok szétrepedt, és burokfehérjéket detektáltunk a felülúszóban és/vagy a középső frakcióban. Az RSV esetében a hasítás hatásos volt, amikor például F vagy G fehérjét detektáltunk a felülúszó vagy középső frakcióban. Előnyösen az F és G lényegében a felülúszó és/vagy középső rétegben helyezkedett el, és nem a csapadékban.

10 Az eredmények összefoglalása:

Az RSV-A eredményeket az 1-4. ábrákon mutatjuk be.

Az összes Western-blot eredmény esetében a 'Split-O' jelenti a vírust a hasítás előtt. 'S', 'M' és 'P' jelenti sorrendben a „felülúszó”, „középső” és „csapadék” mintákat, amelyeket a szukrózpárnán végzett ultracentrifugálás után vettünk. A sávok számozása balról jobbra történt. A térfogatok az SDS-PAGE gélre felvitt minták mennyiségét jelentik.

- 15

Az 1. ábrán az mAb B4 (anti-F) ellenanyaggal próbázott hasított RSVA Western-blotját mutatjuk be.

Felső rész:

Alsó rész:

1	STD	10 µl
2	Split – O	10 µl
3	Split O – S	10 µl
4	Split O – M	10 µl
5	Split O – P	10 µl
6	Split DOC – S	10 µl
7	Split DOC – M	10 µl
8	Split DOC – P	10 µl
9	Split sarco – S	10 µl
10	Split sarco – M	10 µl
11	Split sarco – P	10 µl

1	STD	10 µl
2	Split – O	10 µl
3	Split O – S	10 µl
4	Split O – M	10 µl
5	Split O – P	10 µl
6	Split planta – S	10 µl
7	Split planta – M	10 µl
8	Split planta – P	10 µl
9	Split laureth9 – S	10 µl
10	Split laureth9 – M	10 µl
11	Split laureth9 – P	10 µl

A 2. ábrán anti-M monoklonális ellenanyaggal próbázott hasított RSVA Western-blotját mutatjuk be.

Felső rész:

1	STD	10 µl
2	Split – O	20 µl
3	Split O – S	20 µl
4	Split O – M	20 µl
5	Split O – P	20 µl
6	Split DOC – S	20 µl
7	Split DOC – M	20 µl
8	Split DOC – P	20 µl
9	Split sarco – S	20 µl
10	Split sarco – M	20 µl
11	Split sarco – P	20 µl

Alsó rész:

1	STD	10 µl
2	Mintapuffer	20 µl
3	Split O – S	20 µl
4	Split O – M	20 µl
5	Split O – P	20 µl
6	Split planta – S	20 µl
7	Split planta – M	20 µl
8	Split planta – P	20 µl
9	Split laureth9 – S	20 µl
10	Split laureth9 – M	20 µl
11	Split laureth9 – P	20 µl

5 A 3. ábrán anti-G monoklonális ellenanyaggal próbázott hasított RSVA Western-blotját mutatjuk be.

Felső rész:

1	STD	10 µl
2	Split – O	20 µl
3	Split O – S	20 µl
4	Split O – M	20 µl
5	Split O – P	20 µl
6	Split DOC – S	20 µl
7	Split DOC – M	20 µl
8	Split DOC – P	20 µl
9	Split sarco – S	20 µl
10	Split sarco – M	20 µl
11	Split sarco – P	20 µl

Alsó rész:

1	STD	10 µl
2	Mintapuffer	20 µl
3	Split O – S	20 µl
4	Split O – M	20 µl
5	Split O – P	20 µl
6	Split planta – S	20 µl
7	Split planta – M	20 µl
8	Split planta – P	20 µl
9	Split laureth9 – S	20 µl
10	Split laureth9 – M	20 µl
11	Split laureth9 – P	20 µl

A 4. ábrán anti-N monoklonális ellenanyaggal próbázott hasított RSVA Western-blotját mutatjuk be.

Felső rész:

1	STD	10 µl
2	Split – O	20 µl
3	Split O – S	20 µl
4	Split O – M	20 µl
5	Split O – P	20 µl
6	Split DOC – S	20 µl
7	Split DOC – M	20 µl
8	Split DOC – P	20 µl
9	Split sarco – S	20 µl
10	Split sarco – M	20 µl
11	Split sarco – P	20 µl

Alsó rész:

1	STD	10 µl
2	Mintapuffer	20 µl
3	Split O – S	20 µl
4	Split O – M	20 µl
5	Split O – P	20 µl
6	Split planta – S	20 µl
7	Split planta – M	20 µl
8	Split planta – P	20 µl
9	Split laureth9 – S	20 µl
10	Split laureth9 – M	20 µl
11	Split laureth9 – P	20 µl

- 5 Szignál jelenléte a középső és felülúszó frakciókban, és alig valamekkora csík a csapadék frakcióban a hasítás után az F és G fehérjék esetében azt mutatja, hogy a virális burok teljesen szétrepedt. Az N és M fehérjék szignálja az összes frakcióban ezeknek a fehérjéknek a jelenlétét mutatja a hasított készítményben. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy mind a négy tesztelt detergens RSVA hasított vírus kialakulásához vezetett.
- 10 Az összes frakcióban, mind a négy fehérje elleni szignálok elemzése, és különösen az összehasonlító szignálok elemzése az N és M fehérjék ellen a hasítást követően a középső és felülúszó frakciókban azt sugallja, hogy a tesztelt körülmények között a NaDOC és szarkozil nemcsak hasított vírust eredményezett, hanem képes volt az összes virális szerkezet szétrepesztésére és a szerkezeti és nem szerkezeti fehérjék szolubilizálására.
- 15 Hasonló eredményeket kaptunk a hasított PIV, HSV és kanyaró vírussal, amelyet például 2% NaDOC-cal vagy szarkozillal hasíthatunk.

A NaDOC és szarkozil előnyös hasító ágens az összes vírus esetében.

1.5 In vitro vírustitrálások

Az integritás elvesztése a hasítást követően a vírust fertőzőképtelenné teszi. Az RSVA és PIV3 sikeres feltárását 10^6 vagy nagyobb csökkenés mutatja a vírustiterben a hasítást követően.

5

1.6 Elektronmikroszkópos (EM) elemzés

Elektronmikroszkópos elemzést hajtottunk végre szokásos kétlépéses negatív festési eljárással, Na-foszfowolframátot alkalmazva kontrasztanyagként [Hayat és Miller, „Negative Staining”, kiad.: McGraw, szerk.: Hill (1990)]. A rácsokat megvizsgáltuk az anyag hasítási mintázatának megállapítása végett.

10

A nem hasított és a NaDoc-cal vagy szarkozillal hasított RSVA, HSV2 és PIV3 víruskészítmények elektronmikroszkópos elemzése alátámasztja a Western-blot elemzéssel kapott megfigyeléseket. Az eredmények illusztrálására az RSVA, HSV2 és PIV adatokat mutatjuk be.

Az 5. ábrán EM-mel láthatóvá tett RSV/A kiindulási anyagot mutatunk be. A 6. ábrán RSV/A-t mutatunk be NaDOC-cal történő hasítás után. A 7. ábrán EM-mel láthatóvá tett PIV 3 kiindulási anyagot mutatunk be. A 8. ábrán PIV 3-t mutatunk be NaDOC-cal történő hasítás után. A 9. ábrán EM-mel láthatóvá tett HSV2 kiindulási anyagot mutatunk be. A 10. ábrán HSV2-t mutatunk be szarkozillal történő hasítás után.

15

A nem hasított vírus (egész intakt vírus) viszonylag jól megőrzött vagy kissé károsodott vírusrészecskéket tartalmazott, és valamennyi amorf anyagot. A NaDOC-cal vagy szarkozillal hasított vírusok heterogénen elkenődött amorf anyagot mutattak, különböző mértékben aggregálódva. Hasonló adatokat kaptunk a tesztelt vírussal (RSV, PIV és HSV). Ezenfelül csak kevés azonosítható vírusburok vagy nukleoprotein eredetű szerkezetet figyeltünk meg RSV-vel és PIV-vel.

20

25

2. példa. Hasított vakcinák immunogenitása egerekben.

Hasított RSV és/vagy PIV készítményeket alkalmaztunk immunogénként egerek vakcinálására, hogy megállapítsuk ezeknek a készítményeknek az immunogenitását. Röviden, 8 hetes nőstény egereket immunizáltunk intranazális hasított vakcina-készítményekkel. Nem adjuvánsozott kontrollt is alkalmaztunk. Két dózist adunk több hét eltéréssel.

30

Két héttel az utolsó dózis beadása után az állatokat feláldozzuk, és vért, lépsejteket és/vagy nazális öblítéseket gyűjtünk. A vírusspecifikus humorális immunválaszt a szérumban az

egérszérumnak vírusspecifikus ELISA vizsgálati eljárás alkalmazásával történő tesztelésével állapítjuk meg. Ezenfelül az ellenanyagválasz izotípus-profilját is meghatározzuk izotípus-specifikus vizsgálati eljárások alkalmazásával. A szérumban lévő semlegesítő ellenanyagok jelenlétét specifikus vírussemlegesítési vizsgálati eljárással állapítjuk meg. Releváns lokális immunválasz indukálását semlegesítő ellenanyagok alkalmazásával állapíthatjuk meg a nazális öblítésekben, vagy más megoldásképpen vírusspecifikus IgA mérésével a nazális öblítésekben.

A vírusspecifikus sejtes immunválasz indukálását begyűjtött lépsejtek *in vitro* stimulálásával állapítjuk meg, és a sejtproliferáció (triciált timidin felvétele) és/vagy IL-5 és IFN- γ stimulált sejtek általi szekréciójának mérésével.

A kísérletek változóinak a hatását a hasított kiserelések minőségének és az indukált válaszok nagyságának figyelemmel kísérésével állapíthatjuk meg.

2.1 Hasított RSV kiserelések

Az alábbi kísérletsorozat szemlélteti azt, hogy hasított vírusok, mint például RSV hatásos immunválaszt indukálnak, amikor intranazális (IN) úton beadjuk azokat. Annak érdekében, hogy pontosabban tükrözzük a gyermek (naiv) vagy idős (beindított) populációk immunológiai állapotát, az immunogenitást beindított vagy nem beindított állatokban értékeltük, és demonstráltuk az immunogenitást mindkét populációban. IM beadást alkalmaztunk összehasonlításként.

Az első kísérletsorozatban 8 hetes nőstény Balb/C egereket alkalmaztunk a hasított RSV készítmény immunogenitásának tesztelésére, vagy IM, vagy IN úton beadva. A beindítást 3×10^5 'tarfoltképző egység' (pfu) élő RSV vírus beadásával értük el, intranazálisan beadva 60 μ l (2 $\times$ 30 μ l) térfogatban. Három héttel a beindítást követően az állatokat hasított RSV antigénnel vakcináltuk. A hasított RSV termék mennyiségi meghatározását az RSV F fehérjére specifikus ELISA alapján végeztük, ami méri az F fehérje mennyiségét a hasított termékben, összehasonlítva rekombináns FG fehérjestandarddal. Az egerek A jelű csoportját 2 dózis hasított RSV antigénnel immunizáltuk, amely 4,2 μ g F fehérjét tartalmazott 100 μ l térfogatban, és intramuszkulárisan adtuk be 21 napos időközzel. Az egerek B jelű csoportját 2 dózis hasított RSV antigénnel immunizáltuk, amely 4,2 μ g F fehérjét tartalmazott, 50 μ g Al(OH)₃-mal adjuvánsozva 100 μ l térfogatban, és intramuszkuláris úton adtuk be 21 napos időközzel. Az egerek C jelű csoportját először egy dózis hasított RSV antigénnel immunizáltuk, amely 2,7 μ g F fehérjét tartalmazott 60 μ l térfogatban, és hasított RSV antigén 21 nappal később beadott második dóziséval, amely 4 μ g F fehérjét tartalmazott 60 μ l térfogatban, intranazális úton be-

adva. Két héttel az utolsó dózis beadását követően az összes állatot feláldoztuk, és értékeltük az immunválaszukat.

A kísérlet eredményeit a 11-16. ábrákon foglaljuk össze. Az immunválasz értékelésére alkalmazott első immunológiai eredmények ELISA vizsgálati eljárások voltak, amelyekkel mértük a vakcinált állatok szérumában jelen lévő összes RSV FG-re specifikus immunglobulin (Ig) vagy az FG-re specifikus IgG izotípusok (IgG₁ és IgG_{2A}) mennyiségét. Ezekben a vizsgálati eljárásokban 96-mérőhelyes mikrotiterlemezeket vontunk be rekombináns RSV FG antigénnel, és az állatok szérumát sorozatosan hígítottuk és felvittük a bevont mérőhelyekre. A megkötődött ellenanyagot biotinilált anti-egér Ig, IgG₁ vagy IgG_{2A}, majd peroxidázzal konjugált sztreptavidin hozzáadásával detektáltuk. A megkötődött ellenanyagot OPDA szubsztrát hozzáadásával, majd 2 N H₂SO₄-el történő kezeléssel hívtuk elő, és mértük az optikai denzitást (OD) 490 nm-en. Az ellenanyag-titert a *SoftMax Pro* szoftver alkalmazásával számítottuk ki (négyparaméteres egyenlet alkalmazásával), és EU/ml egységekben fejeztük ki.

Az ELISA vizsgálati eljárások mellett semlegesítési vizsgálati eljárásokat is végeztünk az immunizálások által indukált immunválasz minőségének további jellemzésére. A semlegesítési vizsgálati eljárás esetében állati szérumok felező hígításait inkubáltuk RSV/A vírussal (3000 pfu) és tengerimalac komplementtel 96-mérőhelyes szövettényésztő mikrotiterlemezeken 1 órán keresztül 37 °C-on. Hep-2 sejteket (10⁴ sejt/mérőhely) adtuk közvetlenül mindegyik mérőhelyhez, és a lemezeket 4 napon keresztül inkubáltuk 37 °C-on. A felülúszókat leszívtuk, és kereskedelmi forgalomban kapható WST-1 oldatot adtunk az egyes mérőhelyekhez. A mikrotiterlemezeket további 18-24 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on. Az OD-t 450 nm-en követtük, és a titrálást lineáris regressziós analízissel elemeztük. A számított titer annak a szérumhígításnak az inverze, amely a nem fertőzött sejtek esetében megfigyelt maximális OD 50%-os csökkenését eredményezte.

A 11. ábrán az összes Ig ELISA alkalmazásával kapott eredményeket mutatjuk be. Bein-
 25 dított egerekben hatásos anti-FG ellenanyagválaszt indukáltunk hasított RSV antigénnel törté-
 nő két vakcinálással, IM (A és B jelű csoport) vagy IN (C jelű csoport) beadva.

Közelebbről, a 11. ábrán anti-FG ellenanyagtitert (ELISA) mutatunk be (a második
 vakcinálást követően) egerekben, amelyeket élő RSV-vel indítottunk be és hasított RSV-vel
 30 immunizáltunk intramuszkuláris (IM) vagy intranazális (IN) úton. Az A jelű csoport 2 dózis,
 egyenként 4,2 µg hasított RSV-t kapott IM. A B jelű csoport 2 dózis, egyenként 4,2 µg hasí-
 tott RSV-t kapott alummal adjuvánsozva IM. A C jelű csoport 2 dózis, sorrendben 2,7 µg és
 4,0 µg hasított RSV-t kapott IN.

A 12. ábrán a semlegesítési vizsgálati eljárás eredményeit mutatjuk be. Hatásos vírus semlegesítési ellenanyagválaszt indukáltunk ezekben a beindított állatokban akár IM, akár IN vakcinálással, a hasított RSV termék két dóziséval.

Közelebbről, a 12. ábrán anti-RSV/A semlegesítő ellenanyag-titerek mutatunk be (a második vakcinálást követően) egerekben, amelyeket élő RSV-vel indítottunk be és hasított RSV-vel immunizáltunk intramuszkuláris (IM) és intranazális (IN) úton. Az A jelű csoport 2 dózis, egyenként 4,2 µg hasított RSV-t kapott IM. A B jelű csoport 2 dózis, egyenként 4,2 µg hasított RSV-t kapott alummal adjuvánsozva IM. A C jelű csoport 2 dózis, sorrendben 2,7 µg és 4,0 µg hasított RSV-t kapott IN.

A 13. ábrán az izotípus-elemzés eredményeit mutatjuk be. Az intranazálisan beindított állatokban az IgG_{2a}:IgG₁ arány megnövekedett a nem beindított egerekben kapott adatokhoz (lásd alább) viszonyítva, Th1-szerű válaszra való hajlamot sugallva, amikor az egereket élő vírussal indítjuk be (azaz ami a természetes helyzet idős populációkban).

Közelebbről, a 13. ábrán anti-FG IgG izotípus (ELISA) válaszokat mutatunk be (a második vakcinálást követően) egerekben, amelyeket élő RSV-vel indítottunk be és hasított RSV-vel immunizáltunk intramuszkuláris (IM) és intranazális (IN) úton. Az A jelű csoport 2 dózis, egyenként 4,2 µg hasított RSV-t kapott IM. A B jelű csoport 2 dózis, egyenként 4,2 µg hasított RSV-t kapott alummal adjuvánsozva IM. A C jelű csoport 2 dózis, sorrendben 2,7 és 4,0 µg hasított RSV-t kapott IN.

A 14. ábrán azt mutatjuk be, hogy még akár egyetlen antigéndózis után is erős immunválasz alakul ki beindított populációkban hasított RSV-vel történő IN vakcinálás hatására. Ily módon a beindított populációkban a hasított RSV hatásos immunogén, amely magas titerű ellenanyagválaszokat indukál IN vakcinálást követően.

Közelebbről, a 14 ábrán anti-FG ellenanyag-titerek (ELISA) mutatunk be (a második vakcinálást követően) egerekben, amelyeket élő RSV-vel indítottunk be és hasított RSV-vel immunizáltunk intramuszkuláris (IM) és intranazális (IN) úton. Az A jelű csoport 2 dózis, egyenként 4,2 µg hasított RSV-t kapott IM. A B jelű csoport 2 dózis, egyenként 4,2 µg hasított RSV-t kapott alummal adjuvánsozva IM. A C jelű csoport 2 dózis, sorrendben 2,7 és 4,0 µg hasított RSV-t kapott IN. A D jelű csoport csak be volt indítva, de nem kapott vakcinálást — az erre a csoportra megadott ellenanyag-titerek a 21 nappal a beindítást követően mért detektálási szint alatt voltak.

Egy második kísérletsorozatban beindítatlan egereket alkalmaztunk az antigéndózisnak és az adjuvánsozásnak a hasított RSV termék immunogénitására gyakorolt hatásának doku-

mentálására. Egerek 2,4 µg F fehérjét tartalmazó RSV antigént kaptak (60 µl — 2 x 30 µl dózisban beadva) első dózisként. A második dózist 30 nappal később adtuk be, az egerek 3,5 µg F fehérjét tartalmazó hasított RSV antigént kaptak. Az IN adott hasított RSV-t vagy adjuváns nélkül adtuk be, vagy 5 µg *E. coli* hőlabilis toxin (LT) hozzáadásával adjuvánsoztuk, vagy 0,5% polioxietilén-9-lauril-éterrel ('Laureth 9'). Egy kontroll csoportot intranazálisan immunizáltunk egész tisztított RSV vírussal, amely 2,0 µg F fehérjét tartalmazott az első dózisban, és 3,5 µg F fehérjét tartalmazott a második dózisban. Két héttel az utolsó vakcinálás után az összes állatot feláldoztuk, és értékeltük az immunválaszukat.

Amint a 15. és 16. ábrákon bemutatjuk, ellenanyagválaszok indukálódnak az IN kiszere-
lések hatására a nem beindított egerekben. Míg az ELISA eredmények (15. ábra) azt sugallják,
hogy az IN vakcinálásra adott válaszok alacsonyabbak, mint az IM által indukáltak, a semlege-
sítési eredmények (16. ábra) azt sugallják, hogy az LT-vel adjuvánsozott hasított RSV IN ki-
szerelés legalább olyan jó a semlegesítő ellenanyagok indukálásában, mint az IM, és hogy a
többi kiszerelés szintén összehasonlítható az IM-mel. Ily módon a nem beindított egerekben az
IN úton beadott hasított RSV is immunogén.

Közelebbről, a 15. ábrán anti-FG ellenanyag-titerek (ELISA) mutatunk be (a második
vakcinálást követően) nem beindított egerekben, amelyeket hasított RSV-vel immunizáltunk
intranazális (IN) és intramuszkuláris (IM) úton. Az A jelű csoport 2 dózis, egyenként 2,4 és
3,5 µg hasított RSV-t kapott IN. A B jelű csoport 2 dózis, egyenként 2,4 és 3,5 µg hasított
RSV-t kapott Laureth 9-cel adjuvánsozva IN. A C jelű csoport 2 dózis, egyenként 2,4 és 3,5
µg hasított RSV-t kapott LT-vel adjuvánsozva IN. A D jelű csoport 2 dózis, egyenként 2,0 és
3,5 µg egész tisztított RSV vírust kapott IN. Az E jelű csoport 2 dózis, egyenként 4,2 µg ha-
sított RSV-t kapott IM.

A 16. ábrán anti-RSV/A semlegesítő ellenanyag-titerek mutatunk be (a második
vakcinálást követően) nem beindított egerekben, amelyeket hasított RSV-vel immunizáltunk
intranazális (IN) és intramuszkuláris (IM) úton. Az A jelű csoport 2 dózis, egyenként 2,4 és
3,5 µg hasított RSV-t kapott IN. A B jelű csoport 2 dózis, egyenként 2,4 és 3,5 µg hasított
RSV-t kapott Laureth 9-cel adjuvánsozva IN. A C jelű csoport 2 dózis, egyenként 2,4 és 3,5
µg hasított RSV-t kapott LT-vel adjuvánsozva IN. A D jelű csoport 2 dózis, egyenként 2,0 és
3,5 µg egész tisztított RSV vírust kapott IN. Az E jelű csoport 2 dózis, egyenként 4,2 µg ha-
sított RSV-t kapott IM.

Összefoglalva, ezek a kísérletek demonstrálták, hogy a hasított RSV antigén erősen immunogén mind naiv, mind beindított populációkban. Ezenfelül ezek a kísérletek megmutatták, hogy a hasított RSV hatékonyan beadható intranazális úton, és immunogén.

Szabadalmi igénypontok

1. Hasított burkolt víruskészítmény — amely nem influenzavírus-készítmény — alkalmazása intranazális bejuttatásra alkalmas vakcina-kiszerelés gyártásában.

5 2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a hasított burkolt víruskészítmény respiratorikus szinciciális vírus, parainfluenza vírus kanyaróvírus vagy *Herpes simplex* vírus, vagy ezek keveréke.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a hasított burkolt víruskészítmény virális membránfragmenseket, virális membrán-burokfehérjéket, virális mátrixfehérjéket és nukleoproteineket tartalmaz.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, amely egy vagy több reziduális hasító ágens alkalmazását is tartalmazza.

5. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a reziduális hasítási ágens az alábbiak bármelyike: Laureth 9, NaDOC, szarkozil csoport, Tween 80TM vagy Triton X-100TM.

15 6. Az 5. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a hasító ágens NaDOC vagy szarkozil.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, amely stabilizáló ágens alkalmazását is tartalmazza.

8. A 7. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a stabilizáló ágens felületaktív anyag.

9. A 8. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a felületaktív anyag vagy polioxietilén-szorbitán-monooleát (TWEEN 80TM), t-oktilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100TM) vagy polioxietilén-9-lauril-éter önmagában, vagy ezek keveréke.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, amely adjuvánst alkalmazását is tartalmazza.

11. Eljárás 1-10. igénypontok bármelyike szerinti intranazális vakcina-kiszerelés — amely nem hasított influenzavírus-készítmény — előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(a) burkolt vírust hasítunk; és

(b) adott esetben összekeverjük a hasított burkolt vírust stabilizáló szerrel; és

(c) adott esetben összekeverjük a hasított burkolt vírust adjuvánssal (hordozó és/vagy immunstimuláns).

12. A 11. igénypont szerinti eljárás vakcina-kiszerelés előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a hasított vírus-készítményt összekeverjük stabilizáló szerrel, amely stabilizáló szer legalább egy felületaktív anyagot tartalmaz az alábbiak közül: polioxietilén-szorbitán-monooleát

(TWEEN 80™), t-oktilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) vagy polioxietylén-9-lauril-éter.

13. Hasított burkolt vírus vakcina-készítmény — amely nem hasított influenzavírus-készítmény — alkalmazása betegség profilaxisára vagy kezelésére alkalmas intranazális vakcina-kiszerelés gyártására.

14. Reagenskészlet 1-10. igénypontok bármelyike szerinti vakcina-kiszerelés intranazális bejuttatására, amely

(a) hasított burkolt víruskészítményt; és

(b) intranazális bejuttató eszközt tartalmaz.

15. Intranazális bejuttató eszköz, amely 1-10. igénypontok bármelyike szerinti vakcinát tartalmaz.

16. A 15. igénypont szerinti eszköz, amely nyomásküszöb eszköz.

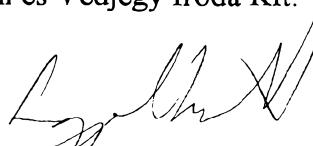
17. Eljárás burkolt vírus által okozott betegségre érzékeny, vagy abban szenvedő emlős védelmére vagy kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy 1-10. igénypontok bármelyike szerinti vakcinát nazális úton beadunk.

18. Eljárás, alkalmazás, reagenskészlet vagy eszköz az 1-17. igénypontok bármelyike szerint, *azzal jellemezve*, hogy a vakcina-kiszerelés immunogén szeropozitív és szeronegatív személyekben.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

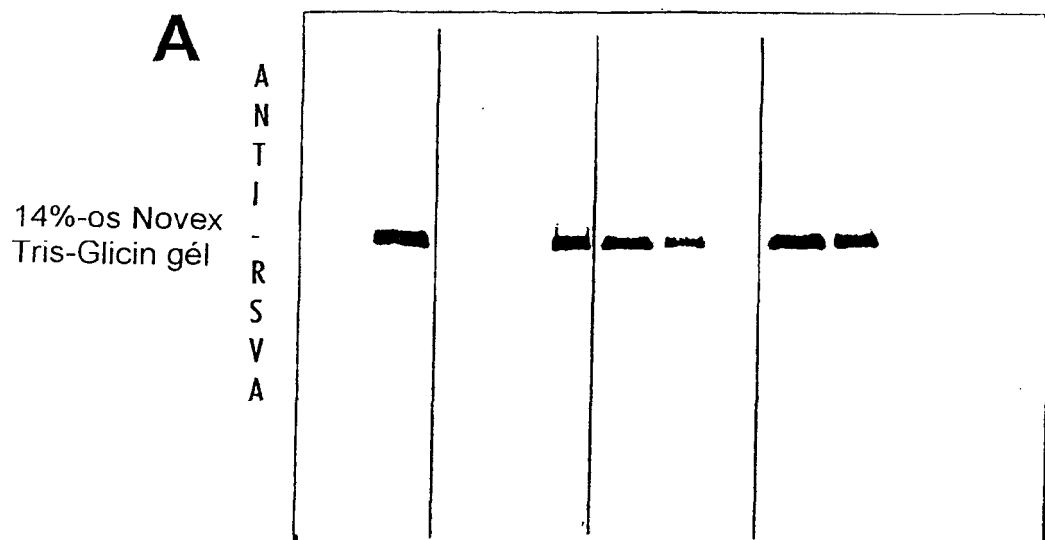


Lengyel Zsolt

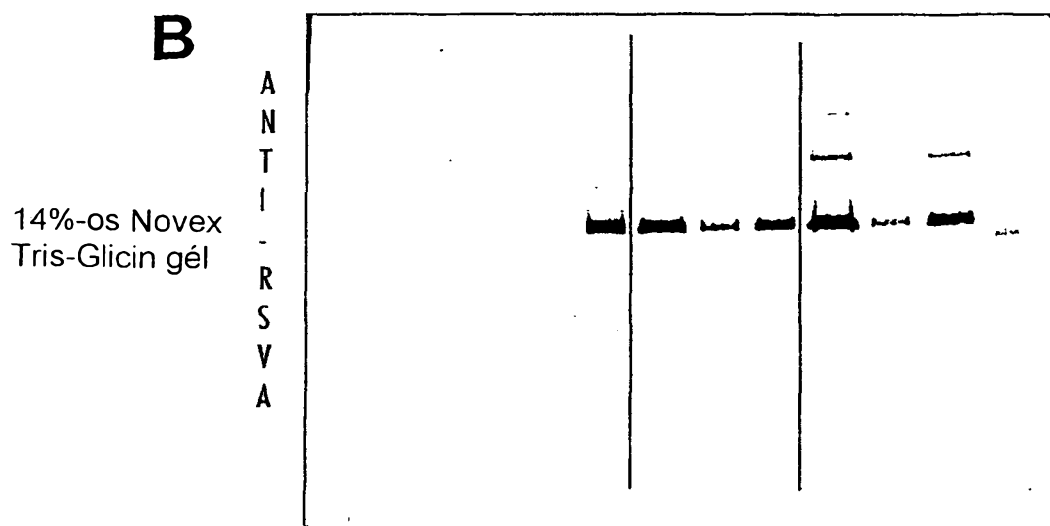
szabadalmi ügyvivőjelölt

26 oldal + 16 táblázat

Relevancia

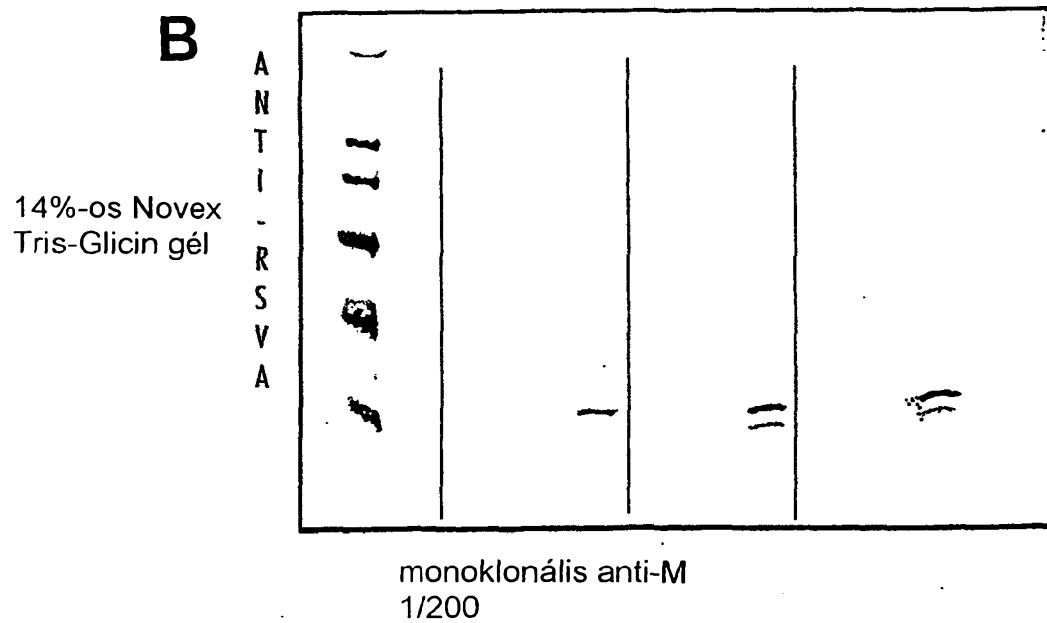
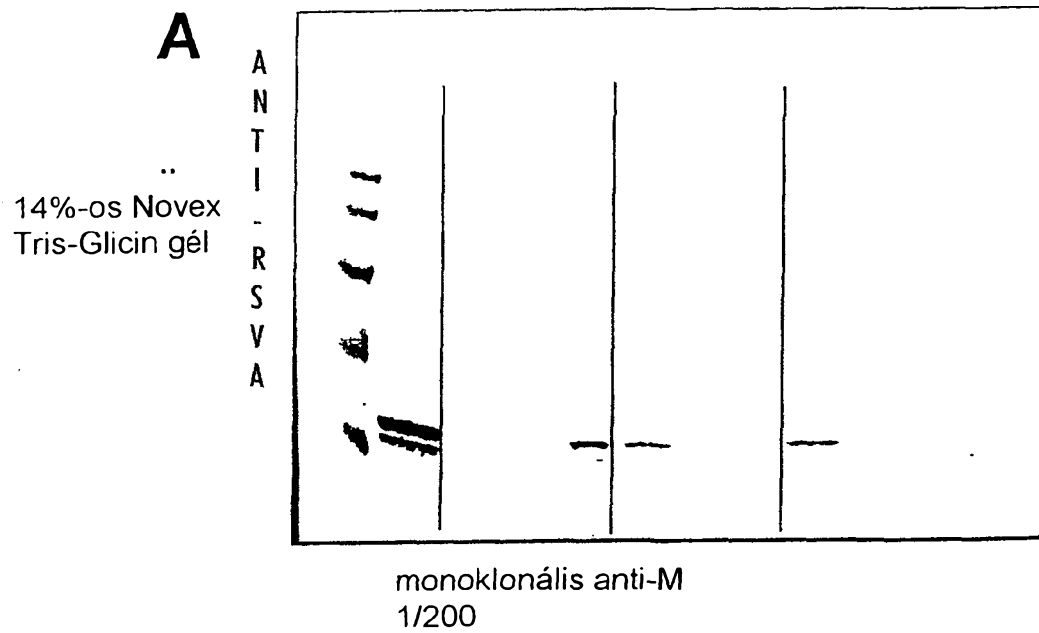


monoklonális anti-F
1/1000

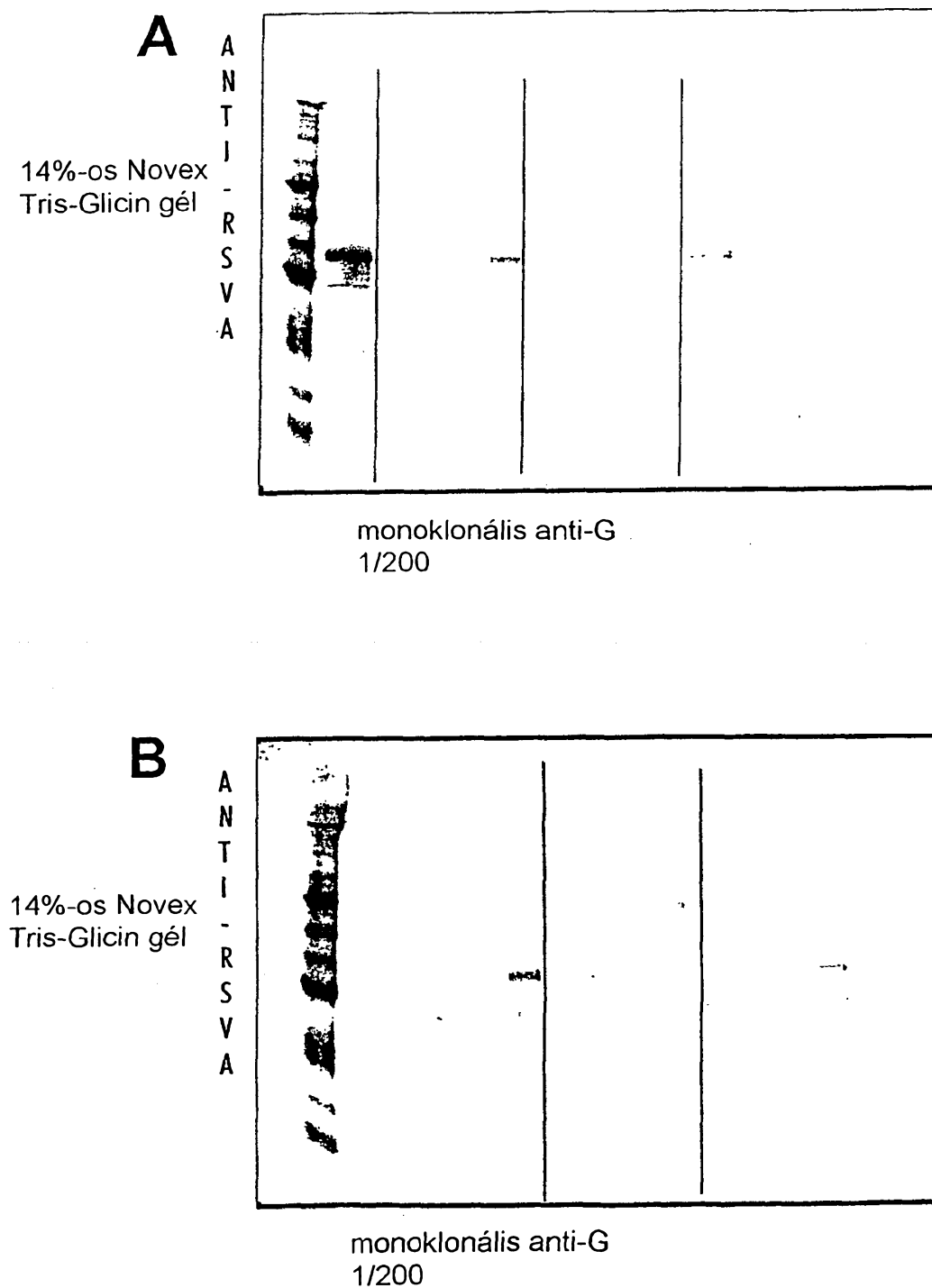


monoklonális anti-F
1/1000

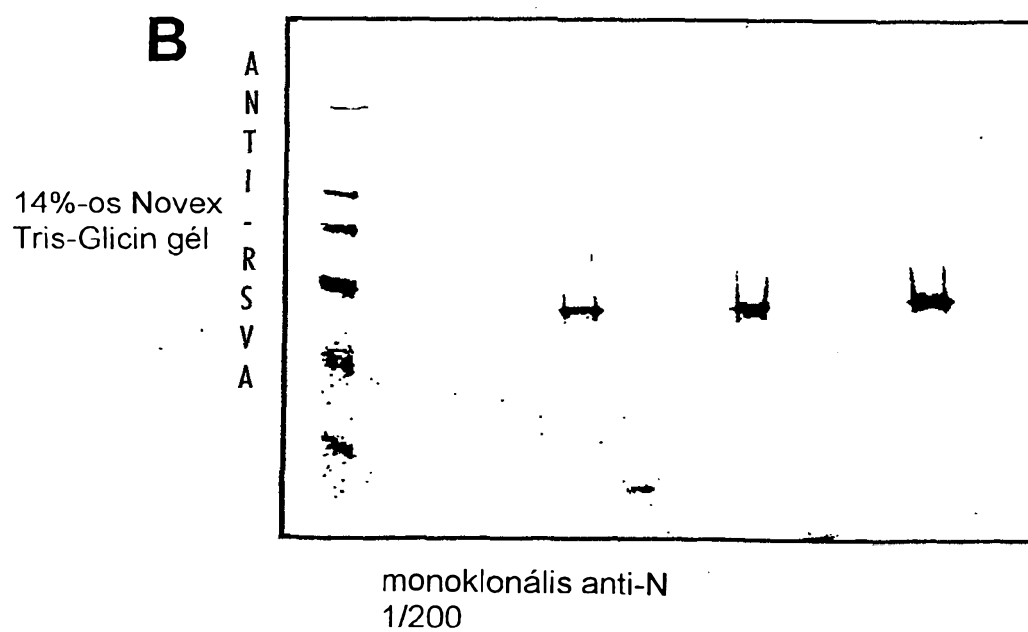
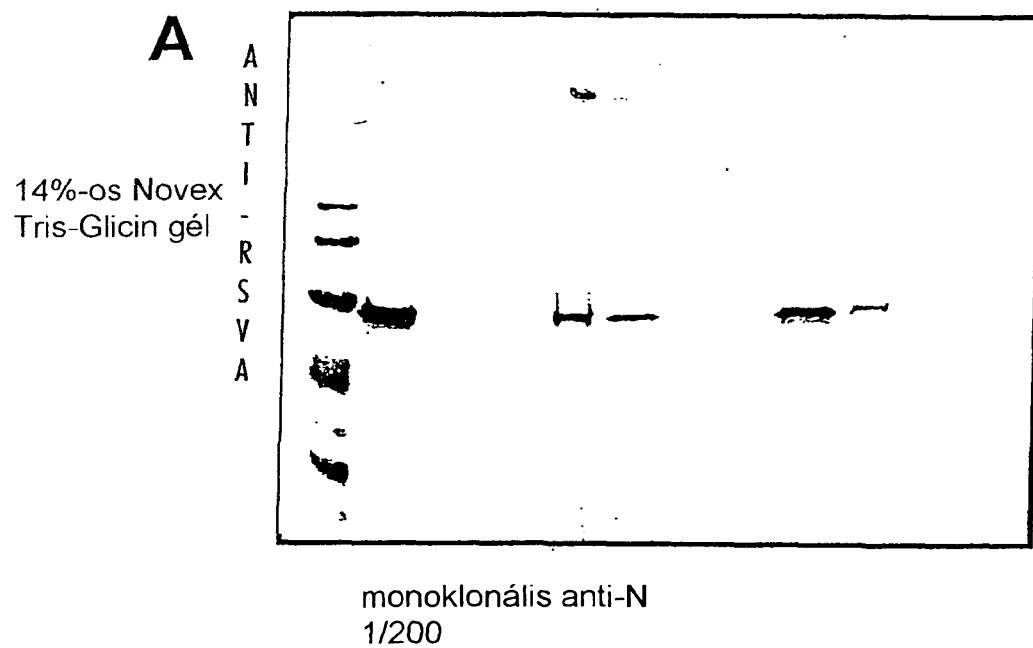
1. ábra



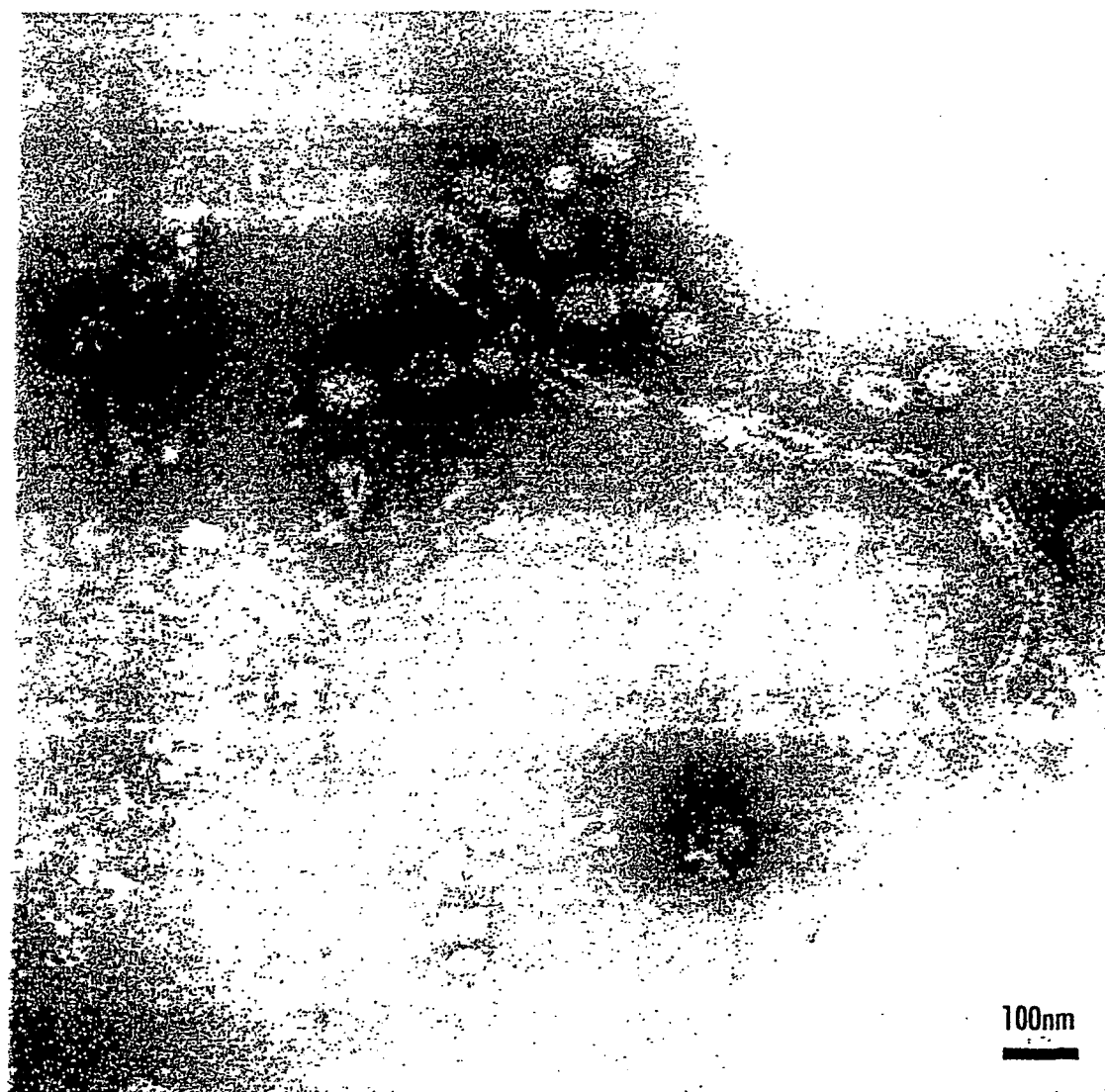
2. ábra



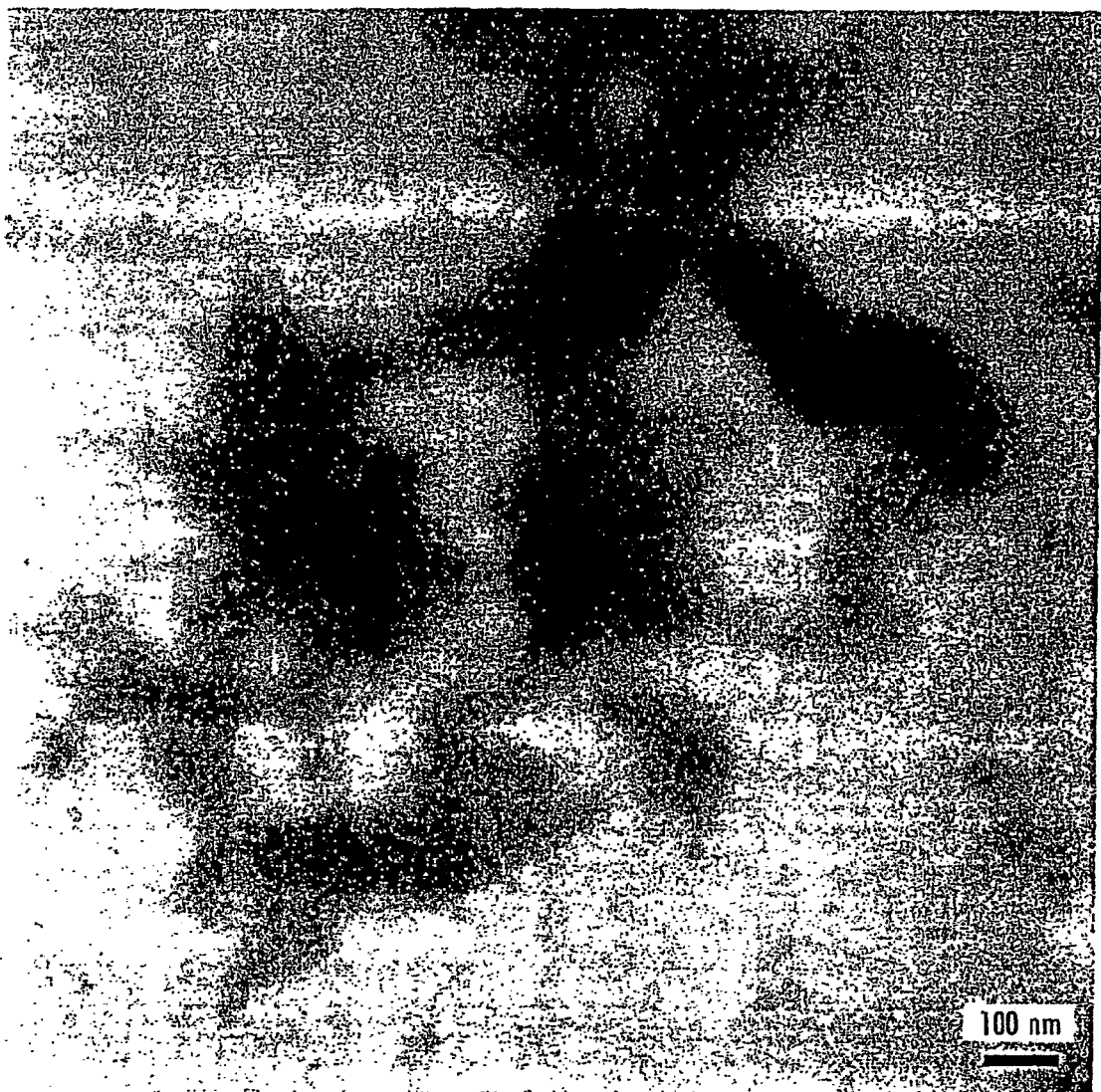
3. ábra



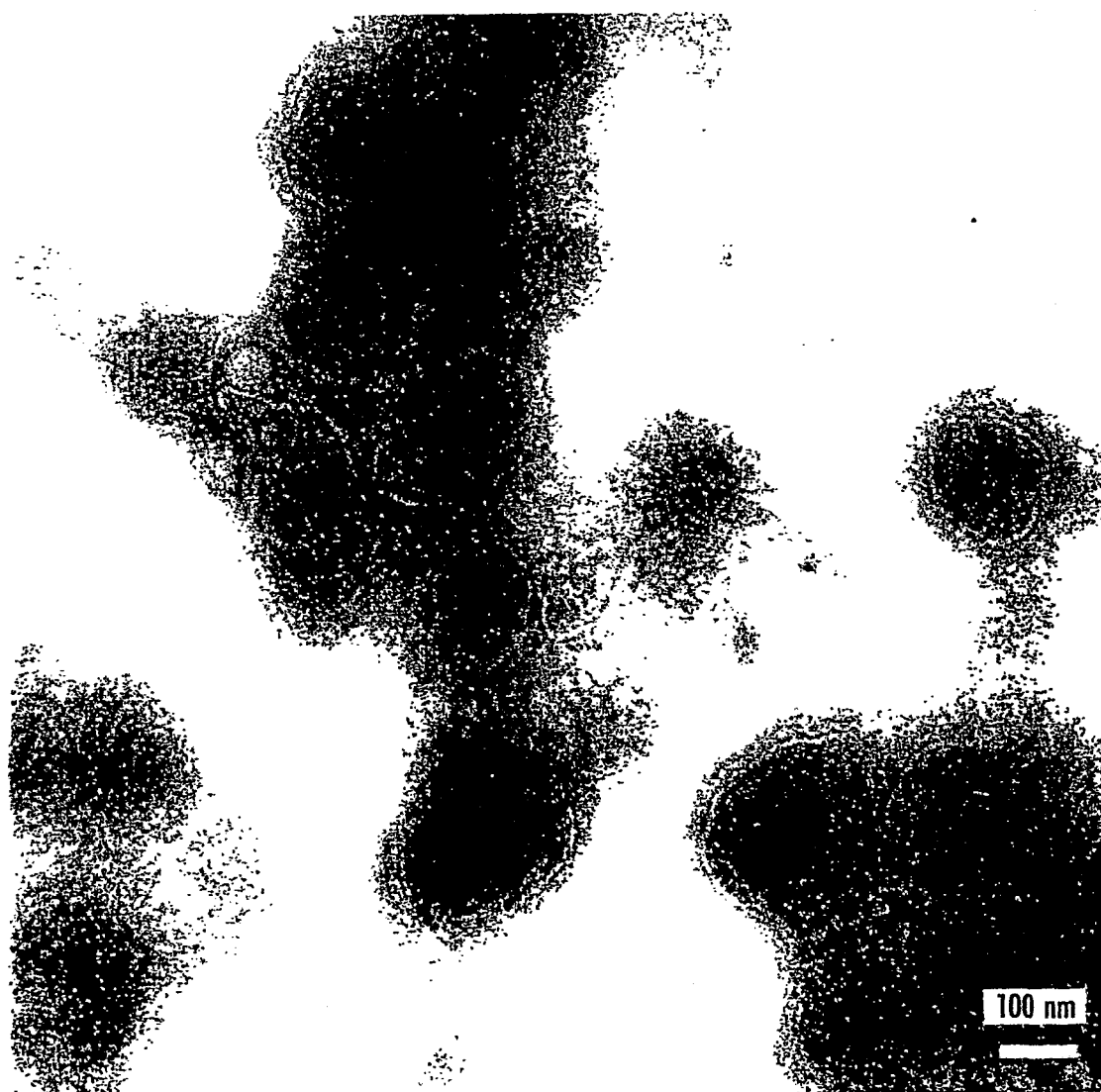
4. ábra



5. ábra



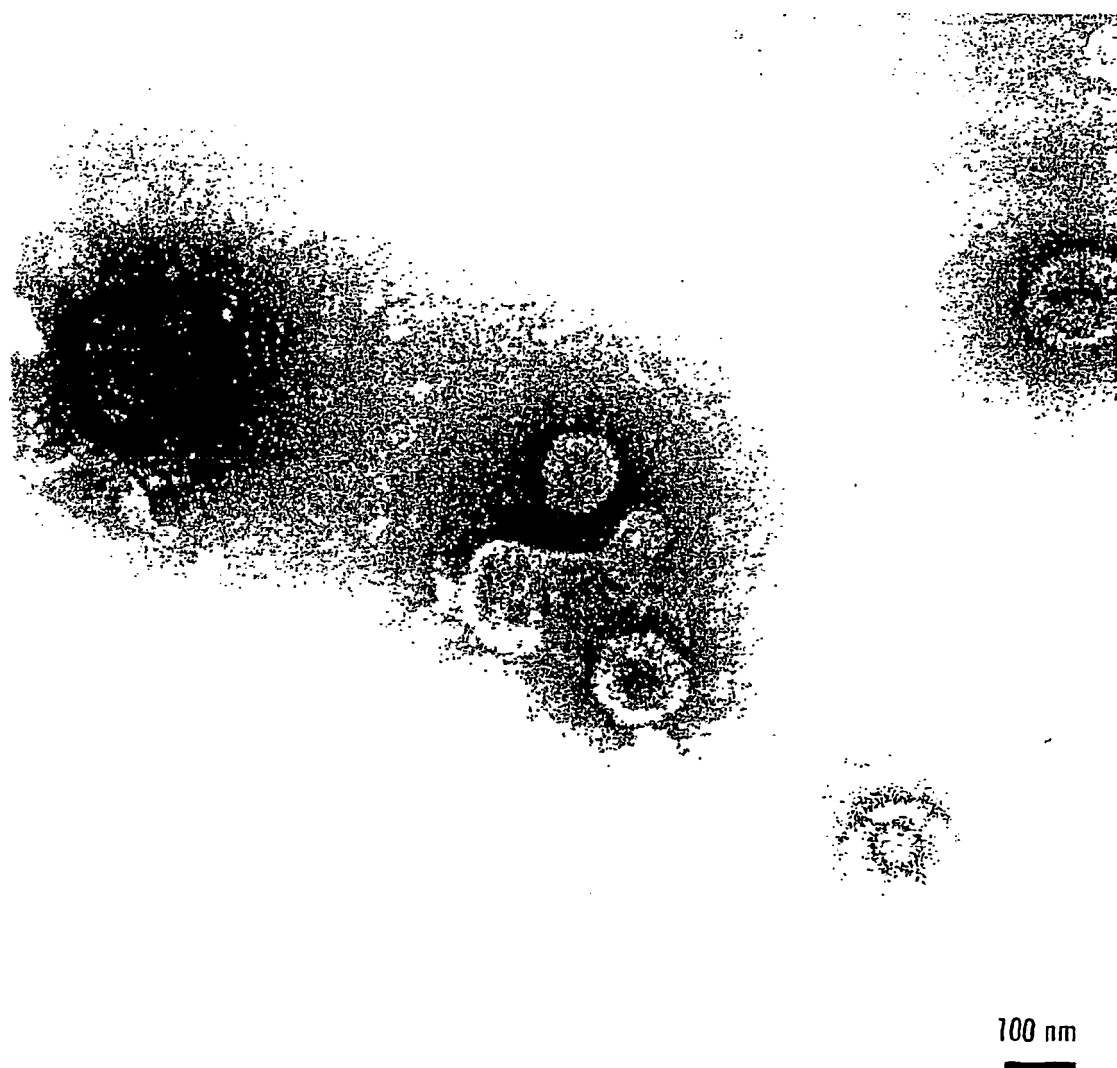
6. ábra



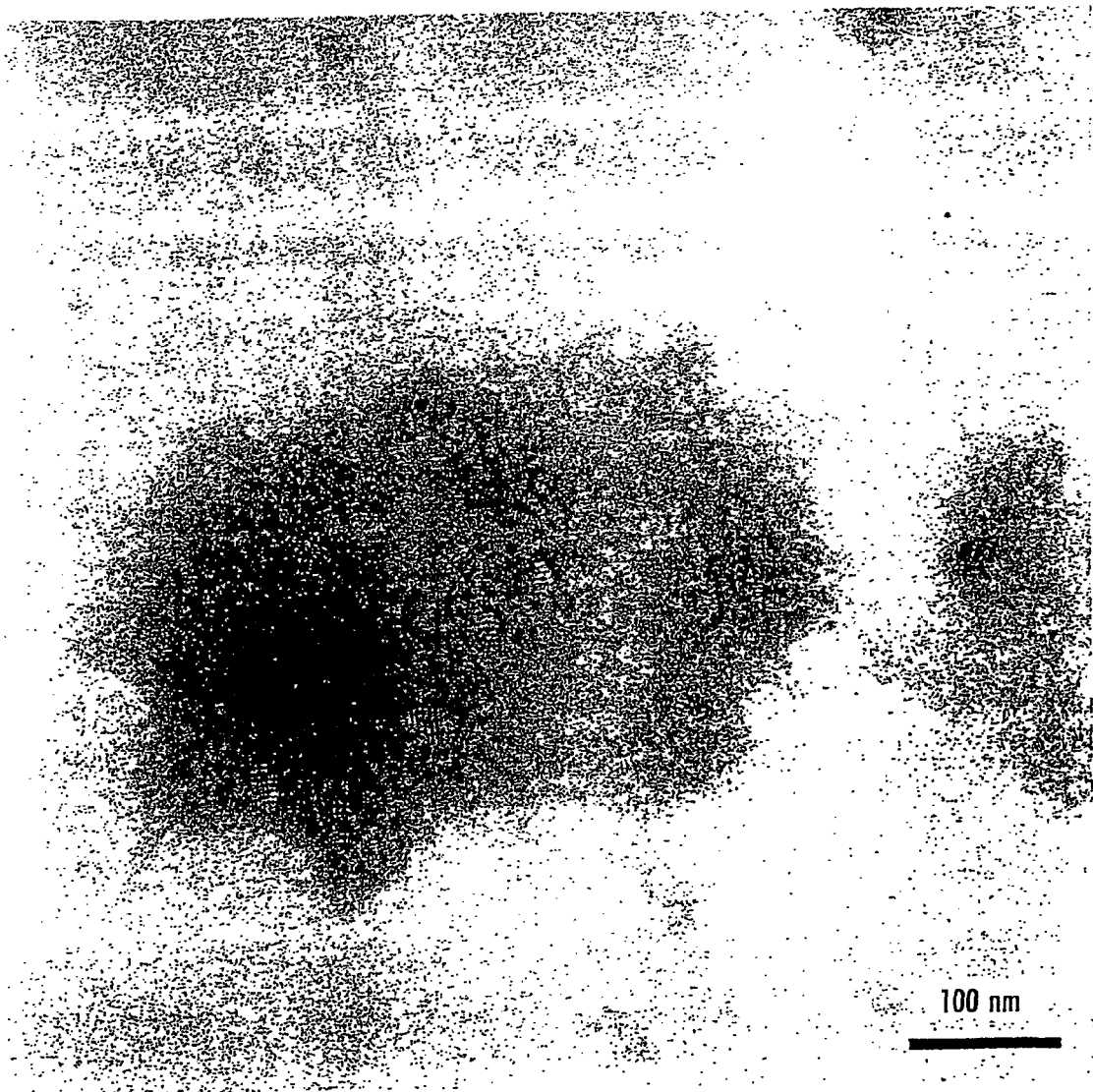
7. ábra



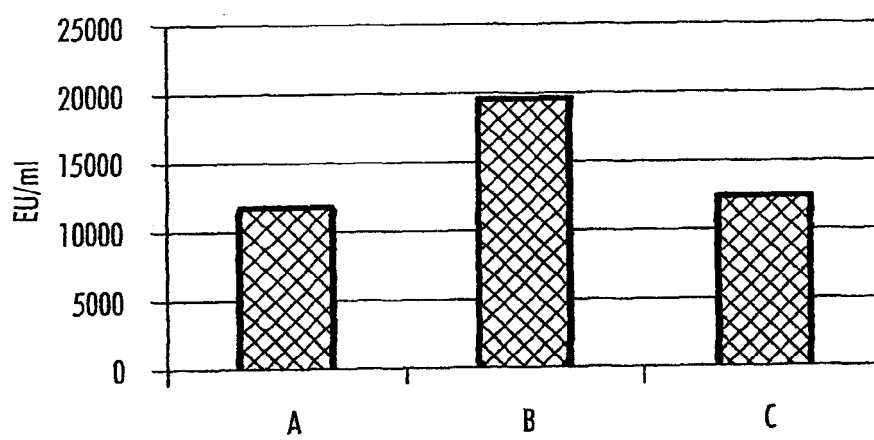
8. ábra



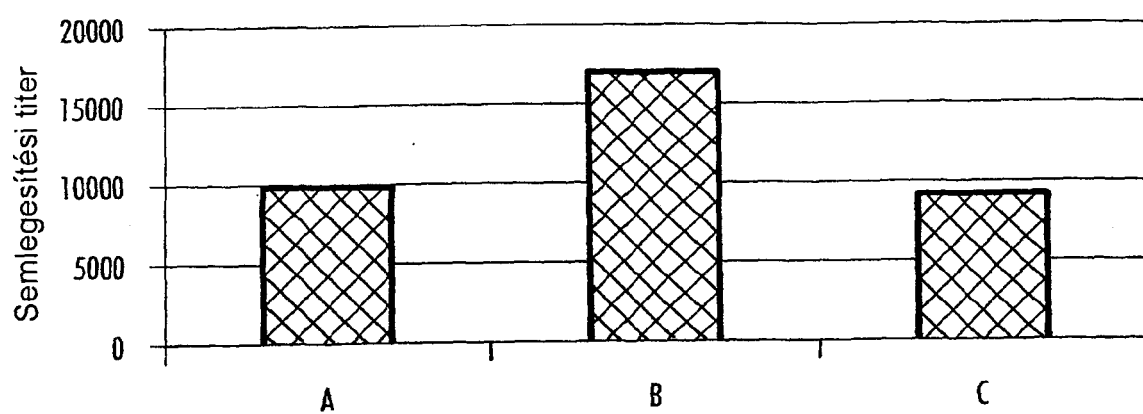
9. ábra



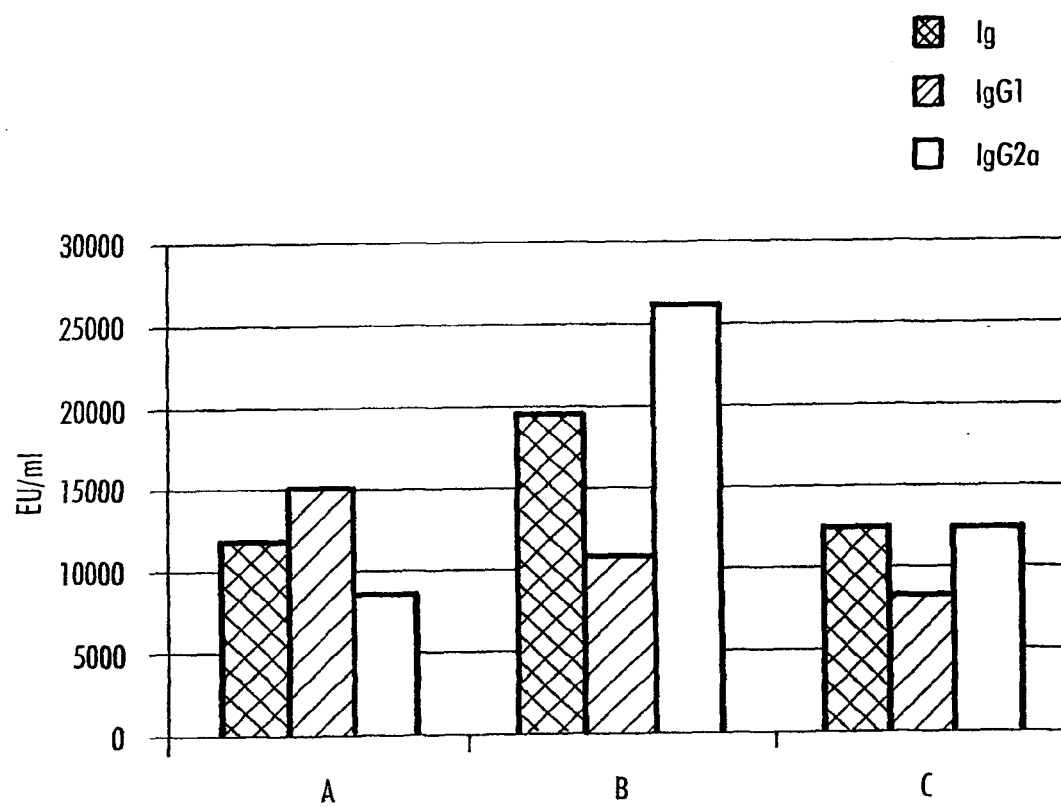
10. ábra



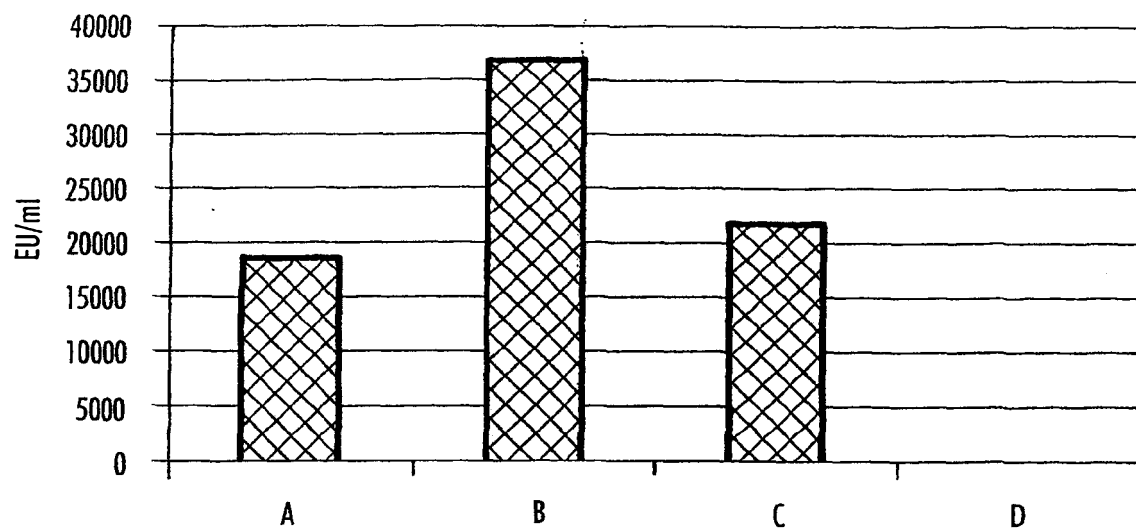
11. ábra



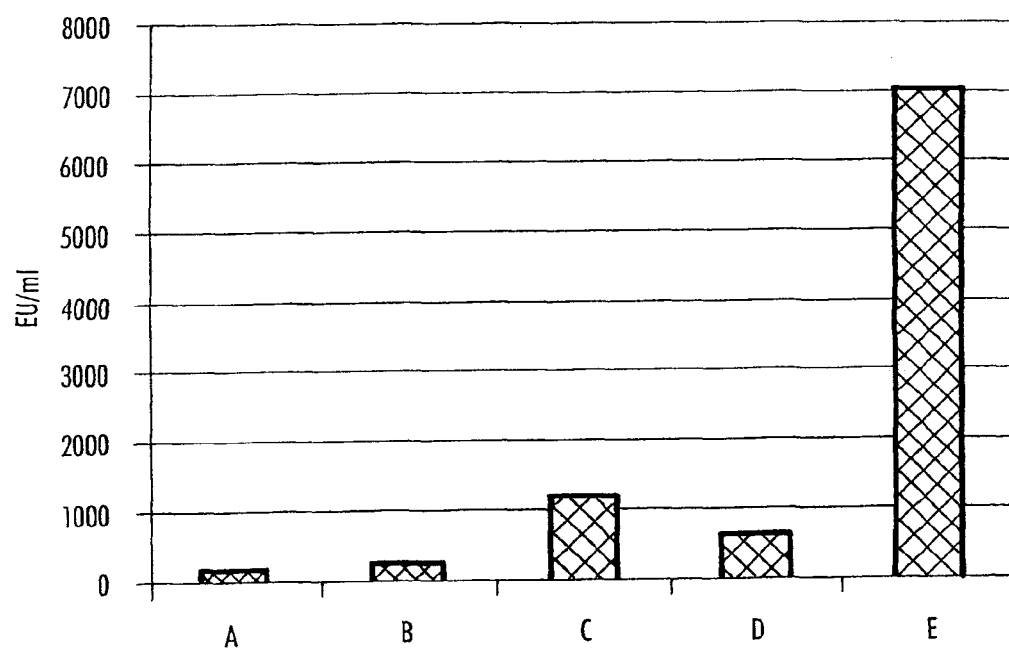
12. ábra



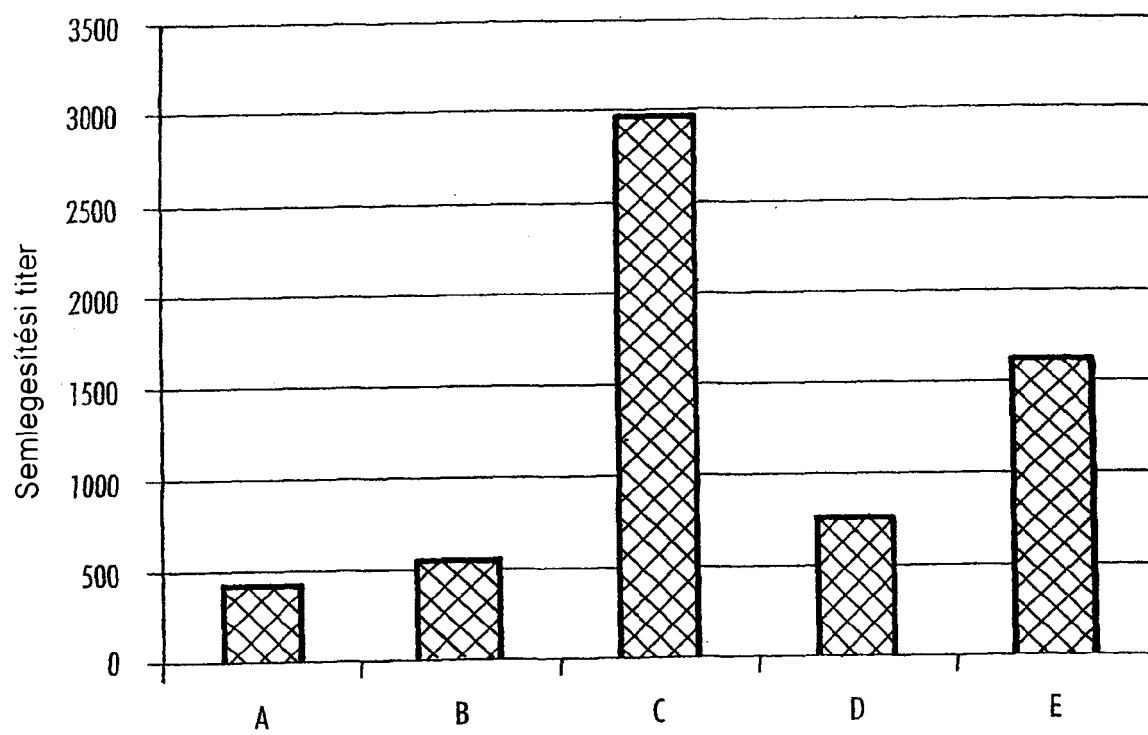
13. ábra



14. ábra



15. ábra



16. ábra