SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

283 565

(21) Číslo prihlášky: **1818-98**

(22) Dátum podania prihlášky: **2. 7. 1997**

(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **11. 9. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **9/2003**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **08/672 530**

(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **2. 7. 1996**

(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**

(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **16. 5. 2000**
Vestník ÚPV SR č.: **05/2000**

(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **18. 8. 2003**

(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:

(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/CA97/00472**

(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO98/00167**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.[7]:

A61K 39/295

(73) Majiteľ: **CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED, North York, Ontario, CA;**

(72) Pôvodca: **Fahim Raafat E. F., Mississauga, Ontario, CA;**
Tan Larry U. L., Mississauga, Ontario, CA;
Barreto Luis, Concord, Ontario, CA;
Thipphawong John, Toronto, Ontario, CA;

(74) Zástupca: **Hörmannová Zuzana, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Multivalentná imunogénna kompozícia a jej použitie**

(57) Anotácia:
Je opísaná multivalentná vakcínová kompozícia obsahujúca komponenty nebunkovej vakcíny proti čiernemu kašľu, toxoid diftérie, toxoid tetanu a inaktivovaný poliovírus. Kompozícia môže navyše obsahovať konjugát kapsulárneho polysacharidu z *Haemophilus influenzae* typ b na nosičovej molekule toxoidu tetanu alebo toxoidu diftérie v lyofilizovanej forme, ktorá sa pred podaním rozpustí skombinovaním s ostatnými zložkami. Zložky multivalentnej vakcíny sú formulované tak, že sa nezmenšuje imunogenita jednotlivých zložiek ako výsledok interferencie s ostatnými zložkami vakcíny.

SK 283565 B6

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka multivalentných vakcín, obzvlášť vakcín podávaných v pediatrii.

Doterajší stav techniky

Čierny kašeľ alebo pertussis je ťažká, vysoko nákazlivá infekcia horných dýchacích ciest spôsobená baktériou *Bordetella pertussis*. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) odhaduje, že existuje až 60 miliónov prípadov čierneho kašľa ročne a s tým spojených 0,5 až 1 milión úmrtí (cit. 1). V rámci opisu tohto patentu sa uvádzajú rôzne citácie uvedené v zátvorkách, kvôli dokonalejšiemu opísaniu uvedenej problematiky, ktorej sa tento vynález týka. Úplná bibliografická informácia sa pre každú citáciu nachádza na konci tohto opisu, tesne pred patentovými nárokmi. Zverejnenia týchto citácií sa tu preto uvádzajú vo forme citácie uvedenej v predkladanom zverejnení. Pri neočkovanej populácii sa pri deťoch mladších ako 5 rokov zistili hodnoty výskytu čierneho kašľa až po 80 % (cit. 2). Hoci sa vo všeobecnosti čierny kašeľ považuje za detské ochorenie, existuje narastajúce množstvo dôkazov klinického a asymptomatického ochorenia u dospievajúcich a dospelých (cit. 3, 4 a 5).

Dôsledkom zavedenia vakcín obsahujúcich celé bunky, zložených z chemicky a teplom inaktivovaných organizmov *B. pertussis* v 40-tych rokoch bolo prudké zníženie výskytu čierneho kašľa spôsobeného baktériou *B. pertussis*. Účinnosti vakcín obsahujúcich celé bunky sa odhadovali až na 95 % v závislosti od spôsobu definovania prípadu (cit. 6). Kým infekcia baktériou *B. pertussis* vyvoláva celoživotnú imunitu, narastajú dôkazy, že dochádza k vytrácaniu ochrany po imunizácii vakcínami obsahujúcimi celé bunky (cit. 3). V niekoľkých prácach uvádzaný vzťah medzi vakcináciou proti čiernemu kašľu celými bunkami, reaktogenitou a vážnymi vedľajšími efektmi, viedol k poklesu akceptácie vakcíny a následnému opätovnému obnoveniu epidémií (cit. 7). V poslednom čase sa vyvinuli viaczložkové vakcíny proti čiernemu kašľu pozostávajúce z definovaných zložiek.

Antigény na vakcíny proti čiernemu kašľu s definovanými zložkami

Vyvinuli sa rôzne nebunkové vakcíny proti čiernemu kašľu, ktoré zahrnujú antigény *Bordetella pertussis*, pertussis toxín (PT), filamentózny hemaglutinín (FHA), 69 kDa proteín vonkajšej membrány (pertaktín) a fimbriálne aglutinogény (pozri tabuľka 1 neskôr. Tabuľky sa nachádzajú na konci opisu).

Toxín čierneho kašľa

Toxín čierneho kašľa je exotoxín, ktorý patrí do A/B skupiny bakteriálnych toxínov s ADP-ribozyltransferázovou aktivitou (cit. 8). Časť A týchto toxínov má ADP-ribozyltransferázovú aktivitu a časť B sprostredkuje väzbu toxínu k hostiteľským bunkovým receptorom a prenos časti A na miesto jej pôsobenia. PT taktiež sprostredkováva prilípavosť *B. pertussis* k riasinkovým epiteliálnym bunkám (cit. 9) a hrá taktiež úlohu pri invázii makrofágov baktériami *B. pertussis* (cit. 10).

Všetky nebunkové vakcíny proti čiernemu kašľu zahrňovali PT, o ktorom sa predpokladalo, že je hlavným virulentným faktorom a ochranným antigénom (cit. 11, 12). Pri prirodzenej infekcii baktériami *B. pertussis* dochádza k vzniku humorálnej, ako i bunkami sprostredkovanej odpovede na PT (cit. 13 až 17). Novorodenci získavajú anti-PT protilátky transplacentárne (cit. 16, 18) a anti-PT protilátky obsiahnuté v ľudskom mledzive boli účinné pri pasívnej ochrane myší proti aerosólovej infekcii (cit. 19). Po imunizácii nebunkovou vakcínou sa dokázala bunkami sprostredkovaná imunitná odpoveď (CMI) na PT podjednotky (cit. 20) a CMI odpoveď na PT sa vytvorila aj po vakcinácii celými bunkami (cit. 13). Chemicky inaktivovaný PT prítomný vo vakcínach obsahujúcich celé bunky alebo vo viaczložkových vakcínach pôsobí ochranne na zvieracích modeloch a u ľudí (cit. 21). A navyše monoklonálne protilátky špecifické pre podjednotku S1 chránia proti infekcii *B. pertussis* (cit. 22 a 23).

Hlavné patofyziologické efekty PT sú spôsobené jeho ADP-ribozyltransferázovou aktivitou. PT katalyzuje prenos ADP-ribózy z NAD na G_i proteín viažuci guanínový nukleotid, čím sa naruší bunkový adenylátcyklázový regulačný systém (cit. 24). PT taktiež zabraňuje migrácii makrofágov a lymfocytov na miesta zápalu a interferuje s neutrofilmi sprostredkovanou fagocytózou a likvidovaním baktérií (cit. 25). Na stanovenie enzymatickej aktivity S1 a/alebo PT sa použili početné *in vitro* a *in vivo* stanovenia vrátane ADP-ribozylácie bovinného transducínu (cit. 26), sledovania zhlukovania ováriových buniek čínskeho škrečka (CHO) (cit. 27), senzitizácie histamínom (cit. 28), leukocytózy a NAD glykohydrolázy. Po expozícii PT vytvoria CHO bunky charakteristickú chumáčovitú morfológiu. Tento jav je závislý od naviazania PT a následného prenosu a prítomnosti ADP-ribozyltransferázovej S1 aktivity a preto sa stanovenie zhlukovania CHO buniek bežne používa na testovanie integrity a toxicity PT holotoxínov.

Filamentózny hemaglutinín

Filamentózny hemaglutinín je veľký (220 kDa) netoxický polypeptid, ktorý počas bakteriálnej kolonizácie sprostredkuje pripojenie baktérií *B. pertussis* k riasinkovým bunkám horných dýchacích ciest (cit. 9, 29). Prirodzená infekcia indukuje anti-FHA protilátky a bunkami sprostredkovanú imunitu (cit. 13, 15, 17, 30 a 31). Anti-FHA protilátky sa nachádzajú v ľudskom mledzive a prenášajú sa taktiež transplacentárne (cit. 17, 18 a 19). Vakcinácia s vakcínami proti čiernemu kašľu obsahujúcimi celé bunky alebo s nebunkovými vakcínami proti čiernemu kašľu vyvolá tvorbu anti-FHA protilátok a nebunkové vakcíny obsahujúce FHA taktiež indukujú CMI odpoveď na FHA (cit. 20, 32). FHA je ochranným antigénom v myšom respiračnom imunologickom testovacom modeli po aktívnej alebo pasívnej imunizácii (cit. 33, 34). Ale samotný FHA nechráni myši pri intracerebrálnom imunologickom stanovení účinnosti (cit. 28).

69 kDa proteín vonkajšej membrány (pertaktín)

69 kDa proteín je proteínom vonkajšej membrány, ktorý sa pôvodne identifikoval z baktérie *B. bronchiseptica* (cit. 35). Tento proteín je taktiež známy ako pertaktín alebo P.69. Zistilo sa, že ide o ochranný antigén proti *baktériám B. bronchiseptica* a následne sa identifikoval pri baktérii *B. pertussis*, ako i u baktérie *B. bronchiseptica*. 69 kDa proteín sa viaže priamo na eukaryotické bunky (cit. 36) a prirodzená infekcia baktériou *B. pertussis* indukuje anti-P.69 humorálnu odpoveď (cit. 14) a P.69 taktiež indukuje bunkami sprostredkovanú imunitnú odpoveď (cit. 17, 37 a 38). Vakcinácia s vakcínami obsahujúcimi celé bunky alebo nebunkovými vakcínami indukuje anti-P.69 protilátky (cit. 32, 39) a nebunkové vakcíny indukujú P.69 CMI (cit. 39). Pertaktín chráni myši proti aerosólovému imunologickému testu s baktériou *B. pertussis* (cit. 40) a v kombinácii s FHA, chráni pri intracerebrálnom imunologickom teste

proti *B. pertussis* (cit. 41). Pasívny prenos polyklonálnych protilátok alebo monoklonálnych anti-P.69 protilátok taktiež chráni myši proti aerosólovému imunologickému testu (cit. 42).

Aglutinogény

Serotypy baktérií *B. pertussis* sa definujú podľa ich aglutinačných fimbrií. WHO odporúča, aby vakcíny obsahujúce celé bunky zahrňovali aglutinogény (Aggs) typu 1, 2 a 3, pretože neposkytujú krížovú ochranu (cit. 43). Agg 1 je nefimbriálny aglutinogén a nachádza sa na všetkých kmeňoch *B. pertussis*, zatiaľ čo Aggs serotypu 2 a 3 sú fimbriálnymi aglutinogénmi. Prirodzená infekcia alebo imunizácia vakcínami obsahujúcimi celé bunky alebo nebunkovými vakcínami indukuje anti-Agg protilátky (cit. 15, 32). Špecifická bunkami sprostredkovaná imunitná odpoveď sa môže u myší vyvolať pomocou Agg 2 a Agg 3 po aerosólovej infekcii (cit. 17). Aggs 2 a 3 chránia myši pri respiračnom imunologickom teste, a pri tomto stanovení pôsobí ochranne taktiež ľudské mledzivo obsahujúce anti-aglutinogény (cit. 19, 44, 45).

Nebunkové vakcíny proti čiernemu kašľu

Prvou vyvinutou nebunkovou vakcínou proti čiernemu kašľu bola dvojzložková PT + FHA vakcína (JNIH 6) od Sato a kol. (cit. 46). Táto vakcína sa pripravila súčasnou purifikáciou PT antigénu a FHA antigénu zo supernatantu kultúry *B. pertussis* kmeň Tohama, s následnou detoxifikáciou formalínom. Nebunkové vakcíny pochádzajúce od rôznych výrobcov s rôznymi zloženiami sa úspešne použili na imunizáciu japonských detí proti čiernemu kašľu od roku 1981, výsledkom čoho bol výrazný pokles výskytu tohto ochorenia (cit. 47). Vakcína JNIH 6 a jednozložková vakcína obsahujúca PT toxoid (JNIH 7) sa testovali vo veľkej klinickej štúdii vo Švédsku v roku 1986. Počiatočné výsledky naznačili nižšiu účinnosť, ako bola opisovaná účinnosť vakcíny obsahujúcej celé bunky, ale následné štúdie ukázali, že bola účinnejšia proti miernejšiemu ochoreniu diagnostikovanému sérologickými metódami (cit. 48, 49, 50, 51). Zistila sa však reverzia formalínom inaktivovaného PT v týchto vakcínach na toxickú formu. Pri týchto vakcínach sa taktiež zistilo, že chránia skôr proti ochoreniu, ako proti infekcii.

V súčasnosti sa študujú početné nové nebunkové a viaczložkové vakcíny proti čiernemu kašľu, ktoré zahrnujú kombinácie PT, FHA, P.69 a/alebo aglutinogénov, a ktoré sú uvedené v tabuľke 1. Na chemickú detoxifikáciu PT sa použilo niekoľko postupov vrátane inaktivácie formalínom (cit. 46), glutaraldehydom (cit. 52), peroxidom vodíka (cit. 53) a tetranitrometánom (cit. 54).

Tetanus

Tetanus je akútnou infekciou spôsobenou baktériou *Clostridium tetani*. Toto ochorenie je typické silnými, bolestivými kontrakciami svalov, ktoré sú sprevádzané hypersenzitivitou, hyperreflexiou a zvýšenou autonómnou stimuláciou ovplyvnených časti (častí) tela. Mierne stimuly môžu spôsobiť prudké reflexívne spazmy svalov. Horúčka sa môže vyskytovať z dôvodu rozsiahlych svalových spazmov. Tetanus môže byť rozšírený po celom tele vrátane tváre, krku, brucha a drieku, alebo môže byť lokalizovaný na špecifickú časť tela (miesto poranenia). Postihnutie žuvacieho svalu tváre má za následok kŕč žuvacieho svalstva alebo stuhnutú sánku, čím vzniká klasický výraz tváre, známy ako „risus sardonicus" („sardonický úsmev") (cit. 78).

C. tetani existuje ako nepatogénny organizmus v črevách človeka a zvierat. Tento organizmus sa taktiež nachádza v pôde kontaminovanej výkalmi a môže prežívať v pôde celé roky vo forme infekčných spór (cit. 79).

Tetanus je výsledkom anaeróbneho rastu baktérií *C. tetani* a tvorby neurotoxínu v kontaminovaných ranách. Infekcia je spôsobená vnesením materiálov kontaminovaných organizmami alebo spórami do tkaniva. Najbežnejší priebeh spočíva v infekcii prostredníctvom penetrantného poranenia. Ale v mnohých prípadoch sa nezaznamenalo žiadne predchádzajúce poranenie. Prítomnosť nekrotického alebo ischemického tkaniva umožňuje rast baktérie (cit. 78). Prevencia infekcie spočíva v očkovaní a v dobrej starostlivosti o ranu vrátane starostlivého vyčistenia rany a excízie nečivých tkanív. Jedinci s kontaminovanými ranami a tí, u ktorých sa nedokončilo očkovanie, by mali dostať vakcínu proti tetanusu ako aj imunoglobulín proti tetanusu.

Liečba tohto syndrómu je hlavne podporná a môže zahrňovať podporu dýchania, podávanie antitoxínu tetanusu a starostlivé vyčistenie infikovaných rán. Napriek modernej zdravotnej starostlivosti úmrtnosť týchto prípadov je stále vysoká, a to 30 až 90 % (cit. 79). Toto obzvlášť platí v prípade starších jedincov. Prirodzená infekcia nevytvára vždy imunitu proti ďalšej infekcii.

Prevencia infekcie očkovaním je najúčinnejšou metódou zvládnutia tohto ochorenia. Od zavedenia všeobecnej vakcinácie sa vo vyspelých krajinách stal tetanus veľmi ojedinelým ochorením. Prípady tetanusu sa vyskytujú takmer výlučne u osôb, ktoré nedokončili sériu očkovaní, alebo ktoré neobdržali adekvátnu dávku pri preočkovaní. Jedinci by mali dostať druhú posilňovaciu dávku raz každých desať rokov.

Diftéria

Diftéria je akútna infekcia spôsobená baktériou *Corynebacterium diphteriae*. Hlavným miestom infekcie sú horné cesty dýchacie (nos, hltan, hrtan a priedušnica) (cit. 80). Typickým poškodením, ktoré je výsledkom bakteriálneho cytotoxínu, sú plochy sivastej pseudomembrány obkolesenej zápalom. Toto je sprevádzané cervikálnou lymfadenopatiou, zdurením a edémom hrdla. V ťažkých prípadoch môže zdurenie postúpiť až do bodu obštrukcie (laryngeálna diftéria). Ostatné komplikácie zahrnujú myokarditídu, účinky na centrálny nervový systém (kraniálne, motorické a senzorické neuropatie, ako je postupujúca paralýza) a trombocytopénia. Ostatné mukózové membrány môžu byť postihnuté menej často. Klinická prezentácia sa môže rôzniť od asymptomatickej infekcie po bleskovú multisystémovú infekciu a smrť (cit. 79). Kožné a ranové infekcie diftériou sú bežné v trópoch a často sa opisovali v pôvodnej populácii USA. Jediným rezervoárom baktérie *C. diphtheriae* je človek (cit. 79).

Predpokladaná diagnóza sa môže vykonať na základe klinického pozorovania charakteristických lézií, ale mala by sa potvrdiť bakteriologickým sledovaním týchto lézií. Ak existuje silné klinické podozrenie na diftériu, liečba antibiotikami (penicilín alebo erytromycín) a antitoxínom diftérie by sa mala započať okamžite, dokonca i vtedy, ak sa diagnóza nepotvrdí. Mortalita sa zvyšuje s časom od započatia klinických symptómov (cit. 80). Úmrtnosť jednotlivých prípadov je v rozmedzí od päť po desať percent napriek modernej lekárskej starostlivosti (cit. 79) a deje sa hlavne u veľmi mladých a u starých jedincov. Prirodzená infekcia nevytvára vždy imunitu proti ďalšej infekcii (cit. 80).

Prenos sa uskutočňuje priamym kontaktom so sekrétmi alebo výlučkami infikovaného jedinca. Jedinci sú nákazliví

dovtedy, pokiaľ sa v sekrétoch nachádzajú baktérie. Toto môže trvať až do štyroch týždňov po infikovaní. Prenos sa môže uskutočniť taktiež prostredníctvom infikovaných predmetov (cit. 79). Doporučuje sa prísna izolácia týchto prípadov.

Zriedkavo sa jedinci stávajú prenášačmi a šíria tieto organizmy až do šiestich mesiacov od infikovania. Neimunizovaní prenášači by sa mali rýchlo podrobiť vakcinácii celou sériou očkovania. Liečba antibiotikami eliminuje prenos a infekčnosť prípadov za 4 dni (cit. 80).

Poliomyelitída

Na zvládnutie poliomyelitídy vo svetovom meradle sa ukázali ako účinné inaktivované (IPV), ako aj atenuované (OPV) vakcíny proti poliovírusom. Kombinovaná DPT-IPV vakcína sa v súčasnosti registruje v Európe a v Kanade a na miliónoch detí na svete sa ukázalo, že je bezpečná a účinná.

Haemophilus influenzae typ b

Haemophilus influenzae typ b (Hib) bol pred dostupnosťou účinných vakcín hlavnou príčinou meningitíd, invazívnych krvou prenášaných infekcií u malých detí, a bol hlavnou príčinou meningitíd počas prvých 2 rokov života (cit. 81). Približne 10 % obetí meningitíd vyvolaná baktériou *Haemophilus influenzae* umiera napriek zdravotníckej starostlivosti. U tých, ktorí prežijú sú bežné trvalé následky. Očkovanie proti *Haemophilus influenzae* začalo v Kanade v roku 1987 polysacharidovou vakcínou (polyribózoribitolfosfátom (PRP) z *Haemophilus influenzae* typ b). Zlepšená imunogénnosť sa dosiahla u detí starých 18 mesiacov po zavedení vakcíny pozostávajúcej z PRP konjugovaného s toxoidom záškrtu (PRP-D) v roku 1988. Imunizácia dojčiat bola možná od roku 1992 po zaregistrovaní PRP konjugovaných vakcín, ktoré boli imunogénne u dojčiat mladších ako jeden rok (PRP konjugovaný s toxoidom tetanusu alebo PRP-T). Použitie týchto konjugovaných vakcín proti *Haemophilus influenzae* bolo spojené s výrazným poklesom výskytu invazívnej infekcie baktériami *Haemophilus* v Kanade a inde (cit. 82). Dve kanadské klinické štúdie, ktoré zahrnuli takmer 900 detí v Britskej Kolumbii a Alberte ukázali, že lyofilizovaný PRP-T sa okrem zvyčajného rozpustenia vo fyziologickom roztoku môže rozpustiť vo vakcíne DTP (COMBIPACK) (cit. 83) alebo vo vakcíne „DTP-polio absorbed" (PENTA™) (cit. 84). Klinické štúdie zahrnujúce viac ako 100 000 detí na celom svete ukázali účinnosť lyofilizovanej PRP-T (ActHib™). Viac ako 90 % dosiahne anti-PRP hladiny, ktoré sa môžu považovať za ochranné (≥ 0,15 μg/ml) po 3 dávkach PRP-T začínajúc v dvoch mesiacoch alebo po jednej dávke PRP-T, ktorá sa podáva po dosiahnutí 12 mesiacov veku. Časť detí, u ktorých sa dosiahli hladiny naznačujúce dlhodobú ochranu (>1,0 μg/ml) varírovala od 70 po 100 % v závislosti od štúdie. Od roku 1992 sa v Kanade predali milióny dávok PRP-T. Plne rozvinuté prípady invazívnej infekcie hemofilom sú po vakcinácii s PRP-T zriedkavé a môžu byť spojené s inými ochoreniami, ako je napríklad imunodeficiencia (cit. 85).

Kombinované vakcíny

Hoci existuje mnoho skutočných, ako aj potenciálnych výhod z vakcín, v ktorých sú skombinované antigény, a ktoré vyvolávajú ochranu proti mnohopočetným patogénom, tieto kombinácie môžu mať nepriaznivý efekt na imunogenitu jednotlivých zložiek. Kombinácie toxoidov záškrtu a tetanusu s vakcínou proti čiernemu kašľu obsahujúcou celé bunky (DTP) sú dostupné už viac ako 50 rokov a protilátková odpoveď na túto kombináciu je lepšia ako na jednotlivé zložky, čo je snáď výsledkom adjuvačného vplyvu vakcíny proti čiernemu kašľu obsahujúcej celé bunky. DTP kombinácie, ktoré zahrňujú taktiež inaktivovanú poliovírusovú vakcínu sú zaregistrované v mnohých jurisdikciách, hoci protilátková odpoveď na antigény čierneho kašľa môže vplyvom tejto kombinácie vymiznúť (cit. 69 až 71). Vplyv kombinácie DTP vakcín s Hib konjugovanou vakcínou bol premenlivý. Štúdie s francúzskou DTP a PRPT ukázali podobnú bezpečnosť, ale zníženú protilátkovú odpoveď na PRP (cit. 72 a 73), zatiaľ čo štúdie s kanadskou DTP a PRPT vakcínou neukázali žiaden vplyv na PRP odpoveď, ale zistili sa nižšie hladiny aglutinogénov čierneho kašľa a zvýšená citlivosť miesta vpichu v skupine, kde sa použila kombinovaná imunizácia (cit. 74, 75).

V súčasnosti sa stávajú dostupnými údaje o vplyve kombinovaných APDT vakcín s Hib konjugovanou vakcínou. Dva mesiace staré dojčatá, ktoré dostali tri dávky nebunkovej vakcíny proti čiernemu kašľu, záškrtu a tetanusu (APDT) kombinovanej s Hib konjugovanou vakcínou (PRP-T) sa zistilo, že protilátková odpoveď na PRP bola preukazne nižšia ako v skupine, ktorej sa podali samostatné injekcie v ten istý deň (cit. 76). Podobné výsledky sa získali s ďalšou nebunkovou vakcínou proti čiernemu kašľu záškrtu a tetanusu kombinovanou s PRP-T, ktorá sa podávala počas prvých troch dávok (cit. 77).

Na rozdiel od iných uverejnených štúdií mali deti imunizované s kombinovanou vakcínou lepšiu protilátkovú odpoveď na PRP, záškrtu a niekoľko antigénov čierneho kašľa v porovnaní s deťmi, ktorým sa podal PRP pri samostatnej návšteve. Môže existovať niekoľko dôvodov pre rovnakú alebo lepšiu imunogenitu týchto vakcín, ktoré sa podali ako kombinovaná injekcia v porovnaní s nižšou imunogenitou opísanou pri iných produktoch. Všetky nebunkové a viaczložkové vakcíny proti čiernemu kašľu sa líšia vo svojom antigénom obsahu, spôsobe detoxifikácie, v adjuvanciu alebo konzervačnej látke. Znížená imunogenita sa však opísala pri nebunkových vakcínach proti čiernemu kašľu obsahujúcim PT, FHA a 69K (cit. 77) a pri vakcínach obsahujúcich PT, FHA, 69K a fimbrie (cit. 76).

Zistilo sa, že päťzložková APDT vakcína, ktorá sa sledovala v tejto štúdii, poskytuje 85 % účinnosť ochrany (príklad 5) (95 % CI 81/89) vo fáze III klinickej štúdie, ktorá sa v poslednom čase ukončila vo Švédsku pod dohľadom National institute of health (cit. 78).

V súčasnosti komerčne dostupné kombinované vakcíny nemusia obsahovať vhodné formulácie vhodných antigénov vo vhodných imunogénnych formách na to, aby sa dosiahla žiadaná hladina účinnosti v ľudskej populácii náchylnej na čierny kašeľ.

Bolo by žiaduce, aby sa poskytli účinné kombinované vakcíny, ktoré zahrnujú nebunkové zložky čierneho kašľa obsahujúce vybrané vzájomné množstvá vybraných antigénov.

Podstata vynálezu

Predkladaný vynález sa zameriava na kombinované alebo multivalentné vakcíny obsahujúce nebunkové zložky vakcíny proti čiernemu kašľu, a na spôsoby ich použitia.

Podľa jednej časti predkladaného vynálezu sa poskytuje multivalentná imunogénna kompozícia na vyvolanie ochrany u hostiteľa proti ochoreniu spôsobenému infekciou baktériami *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, poliovírusom a/alebo baktériou *Haemophilus influenzae*, ktorá zahŕňa:

a) toxoid čierneho kašľa, filamentózny hemaglutinín, pertaktín a aglutinogény v purifikovanej forme,
b) toxoid tetanusu,
c) toxoid diftérie,
d) inaktivovaný poliovírus a príležitostne,
e) konjugát molekuly nosiča vybranej z toxoidu tetanusu a toxoidu diftérie s kapsulárnym polysacharidom z baktérie *Haemophilus influenzae* typ b.

Imunogénna kompozícia sa môže formulovať ako vakcína pre *in vivo* podanie hostiteľovi, pričom jednotlivé zložky kompozície sa formulujú tak, aby sa neovplyvnila imunogenita jednotlivých zložiek inými jednotlivými zložkami tejto kompozície.

Imunogénna kompozícia môže ďalej zahrňovať adjuvans, konkrétne hydroxid hlinitý alebo fosforečnan hlinitý. Takáto imunogénna kompozícia môže obsahovať približne 5 až približne 30 μg dusíka z toxoidu čierneho kašľa, približne 5 až približne 30 μg dusíka z filamentózneho hemaglutinínu, približne 3 až približne 15 μg dusíka z pertaktínu a približne 1 až približne 10 μg dusíka z aglutinogénov.

V jednej špecifickej časti opisu môže imunogénna kompozícia zahrňovať toxoid čierneho kašľa, fimbriálny hemaglutinín, 69 kDa proteín a filamentózne aglutinogény *Bordetella pertussis* v hmotnostnom pomere približne 20:20:5:3, čo predstavuje približne 20 μg toxoidu čierneho kašľa, približne 20 μg filamentózneho hemaglutinínu, približne 5 μg fimbriálnych aglutinogénov a približne 3 μg 69 kDa proteínu v jednej dávke postačujúcej pre človeka . V ďalšej špecifickej časti opisu môže vakcína zahrňovať toxoid čierneho kašľa, filamentózny hemaglutinín, 69 kDa proteín a fimbriálny aglutinogén z baktérie *Bordetella pertussis* v hmotnostnom pomere 10 : 5 : 5 : 3, čo predstavuje približne 10 μg toxoidu čierneho kašľa, približne 5 μg filamentózneho hemaglutinínu, približne 5 μg fimbriálneho aglutinogénu a približne 3 μg 69 kDa proteín v jednej dávke postačujúcej pre človeka . V jednej časti opisu imunogénnej kompozície, ktorá sa tu poskytuje, táto vakcína obsahuje približne 15 Lfs toxoidu diftérie a približne 5 Lfs toxoidu tetanusu.

Inaktivovaný poliovírus použitý v imunogénnej kompozícii tohto vynálezu zahŕňa vo všeobecnosti zmes inaktivovaných poliovírusových typov 1, 2 a 3. Takáto zmes inaktivovaných poliovírusových typov 1, 2 a 3 sa môže použiť v nasledujúcich kompozíciách:
približne 20 až približne 50 jednotiek D antigénu poliovírusu typ 1;
približne 5 až približne 10 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 2;
približne 20 až približne 50 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 3;
v jednej dávke postačujúcej pre človeka . V jednej formulácii môžu takéto zmesi inaktivovaných poliovírusových typov zahrňovať:
približne 40 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 1,
približne 8 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 2,
približne 32 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 3 v jednej dávke postačujúcej pre človeka.

Zložka konjugovanej molekuly imunogénnej kompozície môže zahrňovať konjugát toxoidu tetanusu alebo toxoidu diftérie a polyribózoribitolfosfát (PRP) z baktérie *Haemophilus influenzae* typ b. Takáto konjugovaná molekula sa môže poskytnúť v lyofilizovanej forme, ktorá sa pred podaním rozpustí skombinovaním s ostatnými zložkami. Imunogénna kompozícia môže obsahovať konjugát v množstve približne 5 až približne 15 μg PRP konjugovaného s približne 15 až približne 35 μg toxoidu tetanusu, v jednej dávke postačujúcej pre človeka . V jednej formulácii sa konjugát používa v množstve približne 10 μg PRP konjugovaného s približne 20 μg toxoidu tetanusu.

V takýchto konkrétnych častiach vynálezu poskytujú imunogénne kompozície imunitnú odpoveď na každý z antigénov čierneho kašľa, ktoré obsahuje a odpoveď vyvolaná nebunkovými zložkami je v podstate rovnaká ako odpoveď, ktorá sa vytvára celé bunky obsahujúcou vakcínou proti čiernemu kašľu.

V uprednostnenej časti opisu tohto vynálezu sa poskytuje multivalentná vakcínová kompozícia zahrnujúca v 0,5 ml dávke 20 μg toxoidu čierneho kašľa, 20 μg filamentózneho hemaglutinínu; 5 μg fimbrií 2 a 3; 3 μg pertaktínového membránového proteínu; 15 Lf toxoidu diftérie; 5 Lf toxoidu tetanusu; 40 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 1; 8 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 2; 1,5 μg fosforečnanu hlinitého.

Takáto kompozícia môže ďalej zahrňovať v 0,5 ml dávke 10 μg purifikovaného kapsulárneho polysacharidu polyribózoribitolfosfátu (PRP) z baktérie *Haemophilus influenzae* typ b kovalentne naviazaného k 20 μg toxoidu tetanusu. Okrem toho môžu takéto kompozície obsahovať v 0,5 ml dávke 0,6 % 2-fenoxyetanolu.

V ďalšej časti vynálezu sa poskytuje spôsob imunizácie hostiteľa proti početným chorobám, ktorý zahŕňa podanie imunologicky účinného množstva imunogénnej kompozície alebo vakcíny, ktorá sa tu opisuje, hostiteľovi, ktorým môže byť človek.

Medzi výhody predkladaného vynálezu patrí multivalentná vakcína, ktorá môže bezpečným a účinným spôsobom vyvolať ochranu proti spektru bežných detských ochorení. Užitočným je poskytnutie jednej jedinej vakcinácie proti početným ochoreniam bez interferencie medzi imunogénnymi odpoveďami na rôzne imunogény.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Predkladaný vynález je možné ďalej pochopiť z nasledujúceho detailného opisu a na základe príkladov uskutočnenia vynálezu s odkazom na pripojenú kresbu, kde: obrázok 1 je názornou schémou postupu izolácie aglutinogénu z kmeňu rodu *Bordetella*.

Detailný opis vynálezu

Príprava aglutinogénu

Odvoláva sa na obrázok 1, na ktorom je znázornená schéma spôsobu prípravy aglutinogénu z kmeňu rodu *Bordetella*. Ako je vidno na obrázku 1, bunky *Bordetella* obsahujúce aglutinogény, akými sú bunky *B. pertussis,* sa extrahovali napríklad pufrom obsahujúcim močovinu, ako je 10 mM fosforečnan draselný s 150 mM NaCl a 4M močovinou, aby sa selektívne extrahovali aglutinogény z buniek, čím sa vytvoril prvý supernatant (sp1) obsahujúci aglutinogény a prvý zvyškový precipitát (ppt1). Prvý supernatant (sp1) sa oddelí od prvého zvyškového precipitátu (ppt1) napríklad centrifugáciou. Zvyškový precipitát (ppt1) sa odstráni. Vyčírený supernatant (sp1) sa potom môže zakoncentrovať a diafiltrovať napríklad proti 10 mM fosforečnanu draselnému/150 mM NaCl/0, 1 % Triton X-100 pomocou napríklad 100 až 300 kDa NMWL membránového filtra.

Tento prvý supernatant sa potom inkubuje pri takej teplote a po taký čas, aby sa vytvoril vyčírený supernatant (sp2) obsahujúci aglutinogény a druhý odstránený precipitát (ppt2) obsahujúci neaglutinogénne nečistoty. Vhodné

teploty zahrnujú teploty od približne 50 °C po približne 100 °C vrátane teploty od približne 75 °C po približne 85 °C a vhodné inkubačné časy zahrnujú čas od približne 1 po približne 60 minút. Vyčírený supernatant sa potom zakoncentruje napríklad pridaním polyetylénglykolu s molekulovou hmotnosťou približne 8000 (PEG 8000) do konečnej koncentrácie približne 4,5 ± 0,2 % a následne sa jemne mieša na magnetickom miešadle po minimálny čas približne 30 minút, čím sa vytvoril tretí precipitát (ppt3), ktorý sa môže zachytiť centrifugáciou. Zostávajúci supernatant sp3 sa odstráni.

Tento tretí precipitát (ppt3) sa extrahuje napríklad pufrom zahrnujúcim 10 mM fosforečnan draselný/150 mM NaCl, čím sa vytvoril roztok obsahujúci hrubý fimbriálny aglutinogén. Do roztoku obsahujúceho hrubý fimbriálny aglutinogén sa môže pridať 1 mM fosforečnan draselný tak, aby bol približne v 100 mM koncentrácii vzhľadom na fosforečnan draselný. Alebo sa môže vyčírený supernatant, ktorý obsahuje teplom ovplyvnené fimbriálne aglutinogény, purifikovať bez precipitácie chromatografickou gélovou filtráciou pomocou gélu, ako je Sepharose CL6B. Fimbriálne aglutinogény prítomné v hrubom roztoku sa potom purifikujú stĺpcovou chromatografiou, napríklad prechodom cez kolónu naplnenú PEI silikou, čím sa získa fimbriálny aglutinogén prítomný v nezachytenom eluáte.

Nezachytený eluát obsahujúci tento fimbriálny aglutinogén sa môže ďalej zakoncentrovať a diafiltrovať napríklad proti pufru obsahujúcemu 10 mM fosforečnan draselný/150 mM NaCl pomocou 100-300 kDa NMWL membrány. Aglutinogénny preparát sa môže sterilizovať filtráciou cez ≤ 0,22 µM membránový filter, čím sa získa konečný purifikovaný fimbriálny aglutinogénny preparát obsahujúci fimbriálny aglutinogén 2 a 3 v podstate bez aglutinogénu 1. Hmotnostný pomer Agg 2 k Agg 3 môže byť od približne 1,5:1 po približne 2:1. Vakcíny môžu obsahovať iné purifikované imunogény z baktérie *Bordetella* vrátane filamentózneho hemaglutinínu, 69 kDa proteínu vonkajšej membrány a toxínu čierneho kašľa alebo jeho toxoidu vrátane geneticky detoxifikovaných analógov PT tak, ako sa to opisuje napríklad v citácii 68.

Ostatné imunogény baktérie *Bordetella*, toxín čierneho kašľa (vrátane jeho geneticky detoxifikovaných analógov, ako ich opisujú napríklad Klein a kol. v USA patente č. 5 085 862 pripísaného tomuto nadobúdateľovi, pričom tento patent je tu zahrnutý vo forme odkazu na neho), FHA a 69 kDa protein sa môžu získať v purifikovanej forme rôznymi spôsobmi, akými sú spôsoby opísané neskôr.

Purifikácia PT

PT sa môže izolovať zo supernatantu kultúry kmeňa *B. pertussis* pomocou bežných spôsobov. Môže sa použiť napríklad spôsob, ktorý opísali Sekura a kol. (cit. 55). PT sa izoluje najprv absorpciou supernatantu kultúry na kolónu obsahujúcu gélový nosič s farebným ligandom, Affi-Gel Blue (Bio-Rad laboratories, Richmond, CA). PT sa eluuje z tejto kolóny vysokým obsahom soli, ako je 0,75 M chlorid horečnatý a po odstránení soli sa nechá prejsť cez kolónu naplnenú afinitným nosičom fetuín-Sepharose, zloženým z fetuínu naviazaného k brómkyánom aktivovanej Sepharose. PT sa eluuje z kolóny obsahujúcej fetuín pomocou 4 M horečnatej soli.

Alebo sa môže použiť spôsob, ktorý opísali Irons a kol. (cit. 56). Supernatant kultúry sa absorbuje na kolónu naplnenú Sepharose 4B aktivovanou CNBr, ku ktorej sa pred tým kovalentne naviazal haptoglobín. PT sa viaže na absorbent pri pH 6,5 a eluuje sa z kolóny pomocou 0,1 M Tris/0,5 M NaCl pufru postupnou zmenou pH na 10.

Alebo sa môže použiť spôsob opísaný v patente USA č. 4 705 686 udelenom pre autorov Scott a kol. 10. novembra 1987, pričom tento patent je tu uvedený vo forme citácie. V tomto spôsobe sa supernatanty kultúry alebo bunkové extrakty *B. pertussis* nechajú prejsť cez kolónu naplnenú živicovým anexom s dostatočnou kapacitou na absorbciu endotoxínu, ktorý však umožní prechod antigénov z baktérie *Bordetella* cez kolónu, to znamená, že umožní ich oddelenie od endotoxínu.

Alebo sa PT môže purifikovať pomocou perlitovej chromatografie tak, ako sa to opísalo v EP patente č. 336 736, ktorý bol pridelený jeho nadobúdateľovi a je tu zahrnutý vo forme citácie.

Detoxifikácia PT

PT sa detoxifikuje, aby sa odstránili nepriaznivé aktivity, ktoré by mohli spôsobiť vedľajšie reakcie výslednej vakcíny. Môže sa použiť ktorýkoľvek z mnohých bežne používaných chemických detoxifikačných spôsobov, ako je pôsobenie formaldehydom, peroxidom vodíka, tetranitrometánom alebo glutaraldehydom.

PT sa môže napríklad detoxifikovať glutaraldehydom pomocou modifikácie postupu, ktorý opísali Munoz a kol (cit. 57). V tomto detoxifikačnom procese sa purifikovaný PT inkubuje v roztoku obsahujúcom 0,01 M fyziologický roztok tlmený fosfátom. Tento roztok sa upravil glutaraldehydom na koncentráciu 0,05 % a táto zmes sa inkubovala pri laboratórnej teplote počas dvoch hodín a potom sa upravila L-lyzínom na koncentráciu 0,02 M. Táto zmes sa ďalej inkubovala počas dvoch hodín pri laboratórnej teplote a potom sa dialyzovala počas dvoch dní proti 0,01 M PBS. V konkrétnej časti opisu patentu sa môže použiť detoxifikačný postup podľa EP patentu č 336 736. V stručnosti sa môže PT detoxifikovať glutaraldehydom nasledovne:

Purifikovaný PT v 75 mM fosforečnane horečnatom s pH 8,0 obsahujúcom 0,22 M chlorid sodný sa rozriedil rovnakým množstvom glycerolu tak, aby koncentrácia proteínov bola približne 50 až 400 µg/ml. Tento roztok sa zahrieval na teplotu 37 °C a detoxifikoval sa pridaním glutaraldehydu do konečnej koncentrácie 0,5 % (w/v). Táto zmes sa udržuje pri teplote 37 °C počas 4 hodín a potom sa pridá kyselina asparágová (1,5 M) až do konečnej koncentrácie 0,25 M. Táto zmes sa inkubuje pri laboratórnej teplote počas 1 hodiny a potom sa kvôli redukcii glycerolu a odstráneniu glutaraldehydu diafiltruje 10 objemami 10 mM fosforečnanu draselného s pH 8,0 obsahujúceho 0,15 M chlorid sodný a 5 % glycerol. PT toxoid sa sterilizuje filtráciou cez membránu s 0,2 µM pórmi.

Chemická detoxifikácia nie je nutná v prípade, ak sa ako toxoidné molekuly použijú mutantné molekuly PT, ktoré sa pripravili rekombinantnými technikami, a ktoré nemajú žiadnu alebo len malú toxicitu.

Purifikácia FHA

FHA sa môže purifikovať zo supernatantu kultúry v podstate tak, ako to opísali Cowell a kol. (cit. 58). Na zvýšenie výťažku FHA v supernatantoch kultúr sa môžu použiť rastové stimulátory, ako sú metylované beta-cyklodextríny. Supernatant kultúry sa aplikuje na kolónu naplnenú hydroxylapatitom. FHA sa absorbuje na kolónu, ale PT nie. Táto kolóna sa premýva nadbytkom Tritonu X-100, aby sa odstránil endotoxín. FHA sa potom eluuje pomocou 0,5 M NaCl v 0,1 M fosforečnane sodnom a ak je to potrebné, aplikuje sa na kolónu fetuín-Sepharose, aby sa odstránil reziduálny PT. Ďalšia purifikácia môže zahrňovať prechod cez kolónu Sepharose CL-6B.

Alebo sa FHA môže purifikovať pomocou monoklonálnych protilátok k tomuto antigénu, pričom sa tieto protilátky naväzujú na CNBr-aktivovanú afinitnú kolónu (cit. 59).

Alebo sa FHA môže purifikovať pomocou perlitovej chromatografie tak, ako sa to opísalo v spomínanom EP 336 736.

Purifikácia 69 kDa proteínu vonkajšej membrány (pertaktín)

69 kDa proteín vonkajšej membrány (69K alebo pertaktín) sa môže získať z bakteriálnych buniek v prvom rade po inaktivácii buniek bakteriostatickým činidlom, ako je timerosal tak, ako sa to opísalo v uverejnenom EP 484 621, ktorý je tu zahrnutý vo forme jeho citácie. Inaktivované bunky sa rozsuspendujú vo vodnom médiu, ako je PBS (pH 7 až 8) a podrobia sa opakovanej extrakcii pri zvýšenej teplote (45 až 60 °C) a následnému ochladeniu na laboratórnu teplotu alebo na 4 °C. Tieto extrakcie uvoľnia 69K proteínu z buniek. Materiál obsahujúci 69K proteín sa zachytí precipitáciou a nechá sa prejsť cez kolónu Affi-gel Blue. 69K proteín sa eluuje vysokou koncentráciu soli, ako je 0,5 M chlorid horečnatý. Po dialýze sa nechá prejsť cez chromatofokuzačné médium.

Alebo sa 69 kDa proteín môže purifikovať zo supernatantu kultúry *B. pertussis* tak, ako sa to opísalo v uverejnenej PCT prihláške WO 91/15505, v mene tu uvedeného nadobúdateľa, pričom sa tu táto prihláška uvádza vo forme jej citácie. Takýto spôsob sa uprednostňuje, pretože sa získa pertaktín, ktorý neobsahuje znečistenie adenylátcyklázovými farbivovými chromatografickými materiálmi.

Iné vhodné spôsoby purifikácie 69 kDa proteínu vonkajšej membrány z baktérie *B. pertussis* sa opísali v patente USA č. 5 276 142, ktorý sa udelil pre Gotto a kol. 4 januára 1984 a v patente USA č. 5 101 014, ktorý sa udelil pre Burns 31 marca 1992.

Ďalšie súčasti tohto vynálezu

Vakcíny tohto vynálezu obsahujú taktiež imunogény nepochádzajúce z *Bordetella* vrátane toxoidu tetanusu, toxoidu diftérie, inaktivovaného poliovírusu (IPV) a príležitostne konjugátu toxoidu diftérie alebo toxoidu tetanusu s kapsulárnym polysacharidom z baktérie *Haemophilus influenzae* typ b. Ďalšie potenciálne zložky týchto viaczložkových vakcín zahrnujú proteíny vonkajšej membrány *Haemophilus*, povrchový antigén hepatitídy B, mumps, osýpky a rubeolu.

Konjugáty toxoidu tetanusu alebo toxoidu diftérie s kapsulárnym polysacharidom Hib sa môžu vytvoriť z polyribózoribitolfosfátu (PRP), ktorý sa izoloval z baktérie *H. influenzae* typ b, derivatizoval sa tak, aby sa získal dihydrazid kyseliny adipovej a kovalentne sa konjugoval k toxoidu tetanusu, aby sa získal konjugát PRP-T alebo k toxoidu diftérie, aby sa získal konjugát PRP-D.

Každý z týchto antigénov sa individuálne absorbuje na adjuvans, ako je fosforečnan hlinitý alebo hydroxid hlinitý, ktoré sa spolu nazývajú kamenec, čím sa umožní pohodlná a rýchla výroba vakcín obsahujúcich vybrané relatívne množstvá týchto antigénov vo vakcínach, ktoré sa tu uvádzajú.

Vybrané formulácie multivalentných vakcín

Vo vybraných častiach opisu vynálezu sa poskytujú vakcíny s nasledujúcimi charakteristikami (µg proteínov, ktoré sa tu uvádzajú sú založené na výsledkoch Kjedahlovho testu, ktorý sa vykonal na purifikovaných koncentrátoch a vyjadrili sa ako µg dusíka proteínov), pričom všetky sa môžu podať pomocou intramuskulárnej injekcie.

(a) $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (HYBRID)

Jedna formulácia zahŕňa kombináciu viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu (CP) kombinovanej s toxoidom diftérie (DI) a toxoidom tetanusu (T) a s inaktivovaným poliovírusom (mIPV) a označuje sa $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (HYBRID). Poliovírusy, ktoré sa pestovali na bunkách MRC-5 sa označujú ako mIPV, zatiaľ čo poliovírusy, ktoré sa pestovali na vero bunkách sa označujú ako IPV alebo vIPV. V týchto formuláciách sa môže použiť ktorýkoľvek z týchto inaktivovaných poliovírusových materiálov ako vzájomne zameniteľný.

Každá 0,5 ml ľudská dávka $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (HYBRID) sa formulovala tak, aby obsahovala približne:
- 20 µg toxoidu čierneho kašľa (PT),
- 20 µg filamentózneho hemaglutinínu (FHA),
- 5 µg fimbriálnych aglutinogénov 2 a 3 (FIM),
- 3 µg pertaktínu – proteínu vonkajšej membrány (69kDa),
- 15 Lf toxoidu diftérie,
- 5 Lf toxoidu tetanusu,
- 40 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 1,
- 8 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 2,
- 32 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 3,
- 1,5 mg fosforečnanu hlinitého,
- 0,6 % 2-fenoxyetanolu ako konzervačnej látky.

(b) $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (HYBRID) + PRP-T

Ďalšia formulácia zahŕňa kombináciu viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu (CP) skombinovanú s toxoidom diftérie (D) a toxoidom tetanusu (T) a s inaktivovaným poliovírusom (mIPV) a označuje sa $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (HYBRID) a používa sa na rozpustenie lyofilizovaného PRP-T. Výsledná kompozícia obsahuje, v 0,5 ml dávke, približne:
- 20 µg toxoidu čierneho kašľa (PT),
- 20 µg filamentózneho hemaglutinínu (FHA),
- 5 µg fimbriálnych aglutinogénov 2 a 3 (FIM),
- 3 µg pertaktínu – proteínu vonkajšej membrány (69kDa),
- 15 Lf toxoidu diftérie,
- 5 Lf toxoidu tetanusu,
- 10 µg purifikovaného polyribózoribitolfosfátu kapsulárneho polysacharidu (PRP) z *Haemophilus influenzae* typ b kovalentne naviazaného k 20 µg toxoidu tetanusu,
- 40 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 1,
- 8 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 2,
- 32 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 3,
- 1,5 mg fosforečnanu hlinitého,
- 0,6 % 2-fenoxyetanolu.

(c) $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV (HYBRID:

Ďalšia formulácia zahŕňa kombináciu viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu (CP) skombinovanú s toxoidom diftérie (D) a toxoidom tetanusu (T) a s inaktivovaným poliovírusom (mIPV) a PRP-T a označuje sa $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV (HYBRID). Každá 0,5 ml dávka tejto kompozície určená človeku obsahuje približne:
- 20 µg toxoidu čierneho kašľa (PT),
- 20 µg filamentózneho hemaglutinínu (FHA),
- 5 µg fimbriálnych aglutinogénov 2 a 3 (FIM),
- 3 µg pertaktínu – proteínu vonkajšej membrány (69kDa),
- 15 Lf toxoidu diftérie,
- 5 Lf toxoidu tetanusu,

- 10 µg purifikovaného polyribózoribitolfosfátu kapsulárneho polysacharidu (PRP) z *Haemophilus influenzae* typ b kovalentne naviazaného k 20 µg toxoidu tetanusu,
- 40 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 1,
- 8 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 2,
- 32 jednotiek antigénu D poliovírusu typ 3,
- 1,5 mg fosforečnanu hlinitého,
- 0,6 % 2-fenoxyetanolu.

Klinické štúdie

(a) DTP viaczložková vakcína proti čiernemu kašľu

Z dôvodu stanovenia bezpečnosti, nereaktívnosti a užitočnosti viaczložkových vakcín proti čiernemu kašľu, ktoré obsahovali fimbriálne aglutinogény na ochranu proti čiernemu kašľu, a ktoré sa pripravili tak, ako sa tu opisuje, sa vykonali početné klinické štúdie. Konkrétne sa získali údaje o imunitnej odpovedi na každý z antigénov obsiahnutých v týchto vakcínach (ako je uvedené napríklad v tabuľke 3). Jedna konkrétna multivalentná vakcína proti čiernemu kašľu, $CP_{10/5/5/3}DT$, sa analyzovala vo veľkej placebom kontrolovanej, multicentrickej, dvojito randomizovanej klinickej štúdii v rizikovej populácii ľudí, aby sa zistila účinnosť tejto vakcíny proti typickému čiernemu kašľu.

Definícia prípadu typického čierneho kašľa bola nasledovná:

Spastický kašeľ pretrvávajúci dvadsať jeden dní alebo viac, a buď kultiváciou potvrdená prítomnosť baktérií *B. pertussis* alebo sérologický dôkaz špecifickej infekcie baktériou *Bordetella*, o ktorom svedčí 100 % nárast IgG alebo IgA protilátky proti FHA alebo PT v párovom sére zistený pomocou ELISA testu, alebo ak sérologické údaje chýbajú, ale študované dieťa bolo v kontakte s prípadom infekcie baktériou *B. pertussis*, ktorý sa potvrdil kultiváciou v tej istej domácnosti, so začiatkom kašľa do 28 dní pred alebo po započatí kašľa študovaného dieťaťa.

Výsledky tejto štúdie ukázali, že vakcína $CP_{10/5/5/3}DT$ má približne 85 % účinnosť v prevencii čierneho kašľa tak, ako sa definoval pri definovaní prípadu typického ochorenia čiernym kašľom, ako sa to opísalo skôr. V tejto istej štúdii bola dvojzložková nebunková vakcína proti čiernemu kašľu obsahujúca iba PT a FHA účinná na približne 58 % (PT_{25}.FHA_{25}.DT) a vakcína proti čiernemu kašľu obsahujúca celé bunky (DTP) mala účinnosť približne 48 % (pozri tabuľku 4). Okrem toho, $CP_{10/5/5/3}DT$ vakcína zabránila miernemu čiernemu kašľu, ktorý sa definuje ako kašeľ s dĺžkou trvania aspoň jeden deň, s účinnosťou približne 77 %. Obzvlášť priebeh imunitnej odpovede bol v podstate ten istý ako priebeh, ktorý sa zistil pri imunizácii s vakcínami proti čiernemu kašľu obsahujúcimi celé bunky, o ktorých sa uvádza, že sú vysoko účinné proti čiernemu kašľu.

(b) Multivalentná DPT-PRP-T-IPV vakcína

(I) Bezpečnosť a imunogenita viaczložkových vakcín proti čiernemu kašľu kombinovaných s adsorbovanými toxoidmi diftérie a tetanusu, vakcínou obsahujúcou konjugát z *Haemophilus influenzae* typ b s toxoidom tetanusu a s vakcínou proti poliomyelitíde z inaktivovaných vírusov kultivovaných na vero bunkách ($CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV) sa porovnávala s vakcínou proti čiernemu kašľu obsahujúcou (a) celé bunky v kombinácii s adsorbovanými toxoidmi diftérie a tetanusu a inaktivovanou vakcínou proti poliomyelitíde (b) celé bunky v kombinácii s absorbovanými toxoidmi diftérie a tetanusu a vakcínou proti poliomyelitíde z inaktivovaných vírusov kultivovaných na MRC-5 bunkách (DTP-polio adsorbovaná vakcína), ktorá sa použila na rozpustenie lyofilizovanej vakcíny obsahujúcej konjugát z *Haemophilus influenzae* typ b s toxoidom tetanusu (PENTA™), alebo (c) viaczložkovú vakcínu proti čiernemu kašľu v kombinácii s adsorbovanými toxoidmi diftérie a tetanusu, vakcínou obsahujúcou konjugát z *Haemophilus influenzae* typ b s toxoidom tetanusu a vakcínou proti poliomyelitíde z inaktivovaných vírusov kultivovaných na MRC-5 bunkách ($CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV), ktoré sa podávali jednotlivo alebo sa použili na rozpustenie lyofilizovanej vakcíny obsahujúcej konjugát z *Haemophilus influenzae* typ b s toxoidom tetanusu (PRP-T) u detí vo veku 2, 4, 6 a 18 mesiacov.

Táto randomizovaná kontrolovaná štúdia zahrnula 897 dvojmesačných kojencov, ktorí dostali jedno z ôsmich rôznych očkovaní: vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV (tekutá); vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT, ktorá sa podávala súbežne, ale na druhej strane ako PRP-T; alebo kontrolná vakcína, celé bunky obsahujúca DTP-polio, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T (PENTA™).

Všetky študované vakcíny boli dobre tolerované. Nepozorovali sa žiadne preukazné rozdiely v rozsahu reakcií medzi dvomi typmi rekombinantných kombinácií proti čiernemu kašľu. Deti, ktoré dostali kombinovanú vakcínu $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T, mali o niečo väčší rozsah lokálnych reakcií v porovnaní s tými istými produktmi podanými na rôznych miestach. Kombinácie zahrnujúce všetky komponenty čierneho kašľa mali opakovane nižšie rozsahy lokálnych a systémových reakcií v porovnaní s kombináciou obsahujúcou celé bunky. Rozdiely v rozsahoch reakcií medzi viaczložkovou vakcínou proti čiernemu kašľu a vakcínou obsahujúcou celé bunky boli najzjavnejšie počas prvých 24 hodín hneď po vakcinácii.

Obe viaczložkové kombinácie proti čiernemu kašľu vyvolali výborné odpovede na všetky antigény. Vo všetkých situáciách boli odpovede na PT čierneho kašľa, FHA a pertaktín lepšie ako odpovede, ktoré sa pozorovali pri kombináciách obsahujúcich celé bunky. Medzi viaczložkovými a celé bunky obsahujúcimi kombináciami sa nenašli žiadne preukazné rozdiely. Medzi viaczložkovými a celé bunky obsahujúcimi formuláciami sa nenašli žiadne preukazné rozdiely pre anti-PRP, difteriu a polio 1 a polio 2. Obe viaczložkové formulácie proti čiernemu kašľu vyvolali silnejšie odpovede na tetanus ako PENTA™. Obe viaczložkové formulácie vyvolali podobné sérologické odpovede na všetky antigény z výnimkou polio 3, v prípade ktorého vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T vyvolala silnejšie odpovede ako vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV. Spôsob podania neovplyvnil sérologické odpovede na ktorýkoľvek z antigénov s výnimkou tetanusu. V skupine s kombinovaným podaním ako i v skupine so samostatným podaním získalo 100 % detí ochranu proti tetanusu (> 0,01 EU/ml) po 3 dávkach vakcíny.

Najdôležitejšie je, že všetky očkované skupiny mali dobré reakcie na PRP-T, pričom 98,3 % detí dosiahlo hladiny > 0,15 µg/ml a viac ako 86,1 % detí dosiahlo hladiny > 1,0 µg/ml. Tieto čísla sú porovnateľné s tými, ktoré sa zistili v predchádzajúcich štúdiách, v ktorých sa použila vakcína proti čiernemu kašľu obsahujúca celé bunky s PRP-T.

Sérologické odpovede, ktoré sa dosiahli a opísali sú uvedené v tabuľkách 5 až 7 (H = hybrid).

(II) Bezpečnosť a imunogenita viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu v kombinácii s adsorbovanými toxoidmi diftérie a tetanusu a s vakcínou proti poliomyelitíde z

inaktivovaných vírusov kultivovaných na MRC-5 bunkách ($CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV), ktoré sa podávali samostatne, alebo sa použili na rozpustenie lyofilizovanej vakcíny obsahujúcej konjugát z *Haemophilus influenzae* typ b s toxoidom tetanusu (PRP-T) sa porovnávala s vakcínou proti čiernemu kašľu obsahujúcou celé bunky v kombinácii s adsorbovanými toxoidmi záškrtu a tetanusu a vakcínou proti poliomyelitíde z inaktivovaných vírusov kultivovaných na MRC-5 bunkách (DTP-polio adsorbovaná vakcína), ktorá sa použila na rozpustenie lyofilizovanej vakcíny obsahujúcej konjugát z *Haemophilus influenzae* typ b s toxoidom tetanusu (PENTA™) u detí vo veku 18 až 19 mesiacov.

Táto štúdia s piatimi alternatívami zahrňovala celé bunky obsahujúcu kontrolnú vakcínu PENTA™ a vakcínu $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T. Piata skupina dostávala súčasne vakcínu $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ale na odlišnú stranu vzhľadom k PRP-T. Štyristo osemdesiat deväť jedincov dostalo vakcínu vo veku 18-19 mesiacov, a z nich 466 (95 %) dokončilo štúdiu podľa protokolu. Vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T bola preukazne menej reaktogénna ako vakcína PENTA™ obzvlášť počas prvých 24 hodín po vakcinácii. Rozpustený produkt mal o niečo vyššie rozsahy miestnych reakcií ako produkt podaný jednotlivo.

Vakcína PENTA™ vyvolala silnejšiu odpoveď na polio 1 ako vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T. Žiadne preukazné rozdiely sa nenašli v prípade anti-PRP, záškrtie, aglutinínu čierneho kašľa, fimbrie, polio 2 alebo polio 3. Vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T vyvolala preukazne silnejšie sérologické odpovede na PT, FHA a pertaktín čierneho kašľa. Vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T, vyvolávala opakovane zhodné sérologické odpovede na všetky testované antigény. Nepozorovali sa žiadne preukazné rozdiely medzi vakcínou $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV podanou samostatne v porovnaní s vakcínou $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T, s výnimkou antitoxínu tetanusu (6,78 vs. 4,91 EU/ml).

Táto práca ukázala, že vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T vyvolala zhodné sérologické odpovede vo všetkých troch variantoch a bola viac imunogénna ako vakcína PENTA™. Vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV vyvolala taktiež preukazne menšie rozsahy lokálnych a systémových reakcií ako vakcína PENTA™.

(III) Bezpečnosť a imunogenita viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu v kombinácii s adsorbovanými toxoidmi záškrtie a tetanusu a vakcínou proti poliomyelitíde z inaktivovaných vírusov kultivovaných na MRC-5 bunkách ($CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV) sa porovnávala s vakcínou proti čiernemu kašľu obsahujúcou celé bunky v kombinácii s adsorbovanými toxoidmi záškrtie a tetanusu a vakcínou proti poliomyelitíde z inaktivovaných vírusov kultivovaných na MRC-5 bunkách (DTP-polio adsorbovaná vakcína) u detí vo veku 4 až 6 rokov.

Stošesťdesiatštyri jedincov sa náhodným spôsobom rozdelilo pomerom 4 ku 1, a dostávali buď $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (n=131) alebo DTP-polio (n=33). Počas štúdie sa nevyskytli žiadne preukazné alebo vážne nepriaznivé udalosti. Vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV mala stále nižšie rozsahy lokálnych a ako i systémových reakcií obzvlášť v období od 0 po 24 hodín. Lokálne reakcie boli bežné u oboch skupín, pričom 97 % príjemcov v DTP-polio skupine a 76,9 % v $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV skupine malo nejakú reakciu v období od 0 po 24 hodín. Lokálne reakcie v $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV skupine boli zvyčajne mierne alebo závažné. Na druhej strane mala viac ako polovica príjemcov vakcíny DTP-polio lokálne reakcie ohodnotené ako vážne. Citlivosť miesta injekčného vpichu vymizla zvyčajne do 72 hodín ale začervenanie alebo zdurenie malo tendenciu pretrvávať do obdobia 24 až 72 hodín.

Systémové reakcie boli v období od 0 do 24 hodín menej bežné u príjemcov $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV vakcíny (38,5 %) v porovnaní s príjemcami DTP-polio vakcíny (90,9 %). Systémové reakcie neboli v období 24 až 72 hodín bežné u žiadnej z týchto dvoch skupín.

Odpovede na záškrtie, tetanus, polio 2 a 3 boli pri oboch vakcínach porovnateľné. Príjemcovia DTP-polio vakcíny mali preukazne silnejšiu odpoveď na polio 1 (15 462) ako mali príjemcovia $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV vakcíny (10 903). Všetci jedinci mali výborné odpovede a považovali sa za jedincov s vytvorenou ochranou proti týmto ochoreniam. Sérologické odpovede na všetky antigény čierneho kašľa boli preukazne silnejšie u príjemcov $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV vakcíny.

(IV) Bezpečnosť a imunogenita viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu v kombinácii s adsorbovanými toxoidmi záškrtie a tetanusu, konjugovanou vakcínou z *Haemophilus influenzae* typ b s toxoidom tetanusu a s vakcínou proti poliomyelitíde z inaktivovaných vírusov kultivovaných na MRC-5 bunkách ($CP_{20/20/5/3}$DT-T-mIPV) sa porovnávala s vakcínou proti čiernemu kašľu obsahujúcou celé bunky v kombinácii s adsorbovanými toxoidmi záškrtie a tetanusu a s vakcínou proti poliomyelitíde z inaktivovaných vírusov kultivovaných na MRC-5 bunkách (DTP-polio adsorbovaná vakcína), ktorá sa použila na rozpustenie lyofilizovanej vakcíny obsahujúcej konjugát z *Haemophilus influenzae* typ b s toxoidom tetanusu (PENTA™), alebo s viaczložkovou vakcínou proti čiernemu kašľu v kombinácii s adsorbovanými toxoidmi záškrtie a tetanusu a vakcínou proti poliomyelitíde z inaktivovaných vírusov kultivovaných na MRC-5 bunkách ($CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV), ktorá sa použila na rozpustenie lyofilizovanej vakcíny obsahujúcej konjugát z *Haemophilus influenzae* typ b s toxoidom tetanusu (PRP-T) u detí vo veku 18 až 19 mesiacov.

Cieľom tejto randomizovanej kontrolovanej slepej štúdie s tromi možnosťami bolo stanoviť bezpečnosť a imunogenitu dvoch nových nebunkových kombinovaných vakcín proti čiernemu kašľu, $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV a $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ktoré sa použili na rozpustenie PRP-T v porovnaní s vakcínou PENTA™ (celé bunky obsahujúca DTP-polio vakcína proti čiernemu kašľu, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T) u detí vo veku 18 až 19 mesiacov. Štúdie sa zúčastnilo 99 detí; 33 v každej z troch očkovaných skupín, z ktorých 97 (98 %) ukončilo štúdiu podľa protokolu.

V tejto štúdii sa nepozorovali žiadne závažné reakcie. U príjemcov vakcíny PENTA™ bolo preukazne pravdepodobnejšie, že u nich dôjde k stredne závažným alebo závažným lokálnym a systémovým reakciám v porovnaní s príjemcami ostatných dvoch vakcín. Rozdiely boli najvýraznejšie po 24 hodinách a dosiahli štatistickú významnosť v prípade horúčky, začervenania, opuchu, citlivosti, mrzutosti, zníženej aktivity a redukovaného príjmu jedla. U detí, ktoré dostali viaczložkové kombinované vakcíny proti čiernemu kašľu boli reakcie skôr mierne. Medzi týmito dvomi viaczložkovými kombinovanými vakcínami proti čiernemu kašľu sa nevyskytli žiadne preukazné rozdiely v rozsahoch reakcií, hoci mrzutosť sa pozorovala častejšie po 24 hodinách u tých jedincov, ktorí dostali vakcínu $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T v porovnaní

s tými, ktorí dostali vakcínu $CP_{20/20/5/3}$DT-T-mIPV (18 % vs. 3 %).

Sérologické odpovede boli uspokojivé, pričom 100 % účastníkov dosiahlo hladiny antitoxínu difterie (≥ 0,01 IU/ml), antitoxínu tetanusu (≥ 0,01 IU/ml) a anti PRP (≥ 1,0 μg/ml), ktoré je možné považovať za ochranné. Stanoviteľné neutralizačné protilátky proti polio typ 1, 2 a 3 sa pozorovali po imunizácii u všetkých účastníkov.

Odpovede na difteriu boli silnejšie u príjemcov vakcíny PENTA™, čo odráža vyšší antigénový obsah v tejto vakcíne (25 Lf vs. 15 Lf).

Obsah protilátok proti čiernemu kašľu bol pravidelne vyšší v prípade oboch viaczložkových kombinácií proti čiernemu kašľu v porovnaní s vakcínou PENTA™, pričom štatistická preukaznosť sa dosiahla v GMT odpovedi v prípade anti-PT, anti-FHA a anti-pertaktínu. Príjemcovia viaczložkových vakcín proti čiernemu kašľu mali taktiež vyššie hladiny antifimbriálnych protilátok a aglutinačných protilátok proti čiernemu kašľu, hoci tieto rozdiely nedosiahli štatistickú významnosť.

V súhrne môžeme povedať, že táto štúdia ukázala, že tieto dve nebunkové kombinácie proti čiernemu kašľu, vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T a vakcína $CP_{20/20/5/3}$DT-PRP-T-IPV, boli porovnateľné a vytvorili uspokojujúco nízke rozsahy reakcií a silné sérologické odpovede, keď sa podali ako revakcinácia deťom vo veku 18 až 19 mesiacov.

(V) Študovala sa bezpečnosť a imunogenita viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu v kombinácii s adsorbovanými toxoidmi difterie a tetanusu ($CP_{20/20/5/3}$DT) samostatne alebo v kombinácii s jedným alebo dvomi typmi inaktivovaných poliovírusov, z ktorých sa jeden, mIPV, kultivoval na MRC-5 bunkách a druhý, vIPV, sa kultivoval na vero bunkách, alebo s perorálnou vakcínou proti poliomyelitíde (OPV) u detí vo veku 17 až 19 mesiacov.

Táto štúdia s piatimi možnosťami bola určená na skúmanie interakcie medzi vakcínou $CP_{20/20/5/3}$DT a dvomi IPV vakcínami (kultivovanými na vero bunkách alebo na MRC-5 bunkách). Obe tieto IPV vakcíny sa skombinovali vo forme jednoduchého tekutého produktu s vakcínou $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV a vakcínou $CP_{20/20/5/3}$DT-vIPV alebo sa podali súčasne, ale na rôzne miesta podania ($CP_{20/20/5/3}$DT + mIPV a $CP_{20/20/5/3}$DT + vIPV). Piata skupina štúdie dostala súčasne vakcínu $CP_{20/20/5/3}$DT a OPV. Všetci jedinci dostali PRP-T počas odberu krvi po imunizácii. V tejto štúdii sa nehodnotili anti-PRP odpovede.

Dizajn štúdie

Počet	Návšteva 1 (17-19 mesiacov)	Návšteva 2 (+1 mesiac)
85	1. $CP_{20/20/5/3}$DT-mIPV (1 injekcia)	PRP-T
85	2. $CP_{20/20/5/3}$DT+mIPV (2 injekcie)	PRP-T
85	3. $CP_{20/20/5/3}$DT-vIPV (1 injekcia)	PRP-T
85	2. $CP_{20/20/5/3}$DT+vIPV (2 injekcie)	PRP-T
85	3. $CP_{20/20/5/3}$DT+OPV (1 injekcia)	PRP-T

Vo všeobecnosti sa nezistili žiadne rozdiely v ohlásených nepriaznivých reakciách po podaní vakcín proti poliomyelitíde obsahujúcich inaktivované vírusy získané z MRC-5 alebo vero buniek bez ohľadu na to, či sa táto vakcína podala ako samostatná injekcia, alebo či sa skombinovala s $CP_{20/20/5/3}$DT (HYBRID) vakcínou.

Medzi jednotlivými skupinami sa nepozorovali žiadne významné rozdiely pre PT, HFA a pertaktín. Odpovede na FIM, aglutinín čierneho kašľa, difteriu a tetanus boli u detí, ktoré dostávali $CP_{20/20/5/3}$DT (HYBRID) vakcínu a OPV nepatrne, avšak nie významne, silnejšie, ako u detí, ktoré dostávali $CP_{20/20/5/3}$DT (HYBRID) vakcínu a IPV pochádzajúci z vero buniek. Odpovede na polio boli vo všeobecnosti porovnateľné alebo silnejšie u detí, ktoré dostávali IPV v porovnaní s OPV vakcínou. Všetci okrem jedného jedinca mali hladiny aglutinínu čierneho kašľa > 1:64. Všetci okrem jedného jedinca mali hladiny antitoxínu difterie ≥ 0,1 U/ml a u všetkých sa dosiahli hladiny antitoxínu tetanusu ≥ 0,1 EU/ml.

Výsledky tejto štúdie ukázali, že $CP_{20/20/5/3}$DT (HYBRID) vakcína je v kombinácii s IPV (kultivovanými na vero bunkách alebo na MRC-5 bunkách) bezpečná a imunogénna u detí vo veku 17 až 19 mesiacov. Kombinované vakcíny boli aspoň natoľko imunogénne ako vakcíny podané vo forme jednotlivých injekcií a v niektorých prípadoch ešte viac imunogénne. Skombinovanie vakcín do jednej jedinej injekcie nebolo spojené s významným nárastom lokálnych nepriaznivých reakcií. Nepozorovali sa žiadne podstatné rozdiely v rozsahu nepriaznivých reakcií alebo imunitnej odpovede na tieto dva IPV preparáty, či sa podali ako samostatné reakcie alebo ako kombinované produkty. Pridanie IPV nezvýšilo rozsah nepriaznivých reakcií v porovnaní s $CP_{20/20/5/3}$DT (HYBRID) vakcínou podanou samostatne (t.j. s OPV).

Sérologické výsledky, ktoré sa získali v tejto štúdii sú zhrnuté v tabuľke 8 (H = hybrid).

(VI) Bezpečnosť a imunogenita viaczložkových vakcín proti čiernemu kašľu v kombinácii s adsorbovanými toxoidmi difterie a tetanusu ($CP_{20/20/5/3}$DT a $CP_{10/5/5/3}$DT) podaných samostatne, alebo v kombinácii s vakcínou obsahujúcou konjugát z *Haemophilus influenzae* typ b, sa analyzovala u detí vo veku 18 až 19 mesiacov.

Táto štúdia so šiestimi možnosťami bola určená na skúmanie interakcie medzi viaczložkovou formuláciou proti čiernemu kašľu $CP_{10/5/5/3}$DT (CLASSIC) a viaczložkovou formuláciou proti čiernemu kašľu $CP_{20/20/5/3}$DT (HYBRID) a vakcínou obsahujúcou konjugát z *Haemophilus influenzae* typ b (PRP-T) u detí vo veku 18 až 19 mesiacov.

Použili sa tri schémy, v ktorých (a) každá z viaczložkových vakcín proti čiernemu kašľu sa použila na rozpustenie PRP-T, (b) vakcíny sa podali súčasne, ale na inom mieste ako PRP-T alebo (c) PRP-T sa podalo 1 mesiac po podaní viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu. Všetky deti dostali OPV pri ich prvej návšteve a potom boli primárne imunizované s tou istou viaczložkovou vakcínou proti čiernemu kašľu po 2, 4 a 6 mesiacoch ich veku. Všetky tieto deti sa predtým zúčastnili veľkej štúdie zaoberajúcej sa bezpečnosťou týchto dvoch vakcínových formulácií.

Celkovo sa do štúdie zapojilo 545 jedincov, z ktorých 542 (99 %) túto štúdiu ukončilo.

Dizajn štúdie

Počet	Návšteva 1 (17-19 mesiacov)		Návšteva 2 (+1 mesiac)	Návšteva 3 (+2 mesiace)
154	$CP_{20/20/5/3}$DT sa použilo na rozpustenie PRP-T	Krv + + OPV	Krv	-
152	$CP_{20/20/5/3}$DT sa podalo súčasne s PRP-T OPV		Krv	-
159	$CP_{20/20/5/3}$DT		PRP-T	Krv

27	$CP_{10/5/5/3}DT$ sa použilo na rozpustenie PRP-T	Krv + + OPV	Krv	-
29	$CP_{10/5/5/3}DT$ sa podalo súčasne s PRP-T		Krv	-
21	$CP_{10/5/5/3}DT$		PRP-T	Krv

Sérologické odpovede na väčšinu antigénov boli vo všeobecnosti silnejšie, keď sa viaczložková kombinovaná vakcína proti čiernemu kašľu a PRP-T podali v ten istý deň v porovnaní s podaním počas samostatných dní (pozri tabuľka 9).

Je dôležité, že anti-PRP odpovede nevymizli, keď sa PRP-T podala samostatne v porovnaní s kombinovaním s viaczložkovou kombinovanou vakcínou proti čiernemu kašľu podanou v ten istý deň.

Pri deťoch, ktoré dostali tieto vakcíny v rôznych dňoch, boli hodnoty GMT po imunizácii preukazne nižšie. Rozdiely medzi anti-PRP odpoveďami medzi kombinovanými a samostatnými injekciami sa pozorovali vtedy, keď sa jedinci stratifikovali viaczložkovou formuláciou vakcíny proti čiernemu kašľu. Príjemcovia $CP_{20/20/5/3}DT$ (HYBRID) vakcíny vykazovali nižšie hladiny anti-PRP vtedy, keď sa vakcína podala skôr v kombinácii ako samostatne. Tieto rozdiely sa nepozorovali u príjemcov vakcíny $CP_{10/5/5/3}DT$ a tieto rozdiely vymizli, keď sa tieto skupiny skombinovali. Všetci účastníci dosiahli anti-PRP hladiny ≥ 0,15 µg/ml a viac ako 98 % z každej skupiny malo hladinu ≥ 1,0 µg/ml. Iba štyria účastníci štúdie (0,7 %) nedosiahli túto hladinu; traja z nich pri podaní samostatných injekcií v rôznych dňoch a jeden v skupine dostávajúcej kombinovanú injekciu. Viac ako 82 % z každej skupiny malo vyššie titre anti-PRP protilátky ako 10 µg/ml.

Z lokálnych reakcií, ktoré vakcinácia vyvolala, sa opisovala častejšie iba citlivosť v skupine dostávajúcej kombinovanú injekciu (27,8 %) v porovnaní so skupinou, kde sa očkovalo v rôznych dňoch (16,7 %). Táto frekvencia sa nelíšila od frekvencie, ktorá sa pozorovala v skupine, v ktorej sa vakcíny podávali v ten istý deň vo forme samostatných injekcií (24,2 %).

Celkovo sa systémová reakcia zistila s podobnou frekvenciu (60 až 62,1 %) u účastníkov každej z očkovaných skupín. Horúčka sa pozorovala u približne jednej tretiny účastníkov. Iba mrzutosť sa vyskytla bežnejšie v skupine dostávajúcej kombinovanú injekciu (33,3 %) v porovnaní so skupinou, v ktorej sa vakcíny podávali v ten istý deň vo forme samostatných injekcií (22,0 %), alebo so skupinou, kde sa očkovalo v rôznych dňoch (22,8 %).

Zhrnúc výsledky tejto štúdie je možné povedať, že súčasné podanie vakcíny $CP_{10/5/5/3}DT$ alebo vakcíny $CP_{20/20/5/3}DT$ a PRP-T v ten istý deň nezasahovalo do anti-PRP odpovedí, ale ich v skutočnosti mohlo zosilniť. Sérologické odpovede na ostatné antigény boli taktiež výborné. Tetanus bol jediným ovplyvneným antigénom, keď sa tieto dve vakcíny zmiešali dokopy, ale všetky deti mali vysoké hladiny ochrany.

Na ďalšie klinické štúdie sa pripravila vakcína $CP_{10/5/5/3}DT$-IPV z kultivácie na bunkách MRC5, ktorá sa použila na rozpustenie ActHib (PRP-T) a A5I ($CP_{10/5/5/3}DT$-PRP-T-IPV z kultivácie na vero bunkách 3 µg/ml). Viaczložkové antigény čierneho kašľa sa jednotlivo adsorbovali na fosforečnan hlinitý (3 mg/ml) v neprítomnosti konzervačnej látky. Čo sa tohto týka, PT bolo v 10 mM fosforečnane draselnom, 0,15 M NaCl, 5 % glycerole, FHA bolo v 10 mM fosforečnane draselnom, 0,5 M NaCl, 69K proteín bol v 10 mM fosforečnane draselnom, 0,15 M NaCl a fimbrie boli v 10 mM fosforečnane draselnom, 0,15 M NaCl. D antigén sa adsorboval na fosforečnan hlinitý (6,25 mg/ml) v koncentrácii 300 Lf/ml. 2-fenoxyetanol sa pridal ako konzervačná látka vo výslednej koncentrácii 0,6 %. T antigén sa adsorboval na fosforečnan hlinitý (6,25 mg/ml) v koncentrácii 300 Lf/ml. 2-fenoxyetanol sa pridal do výslednej koncentrácie 0,6 %.

Adsorbované viaczložkové antigény čierneho kašľa sa skombinovali s adsorbovaným D antigénom a adsorbovaným T antigénom v koncentrácii 3,65 dávok/ml alebo 55 % konečného objemu. Obsah 2-fenoxyetanolu bol 0,6 %. Pred skombinovaním s mIPV alebo v-IPV/PRP-T sa potvrdila sterilita, obsah hliníka a 2-fenoxyetanolu. Do 5 ml sa pridalo m-IPV a 2-fenoxyetanol a nariedili sa do výslednej koncentrácie. Do A5I sa pridalo v-IPV, PRP-T a 2-fenoxyetanol a nariedili sa do konečnej koncentrácie.

Na záver výsledkov klinických štúdií s multivalentnými vakcínami je možno vidieť, že vakcína $CP_{20/20/5/3}DT$-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T vytvorila porovnateľné sérologické odpovede na difitériu, tetanus a polio 1, 2 a 3 v porovnaní s vakcínou PENTA™ (obsahujúcou vakcínu proti čiernemu kašľu z celých buniek). Anti-PRP odpovede sú porovnateľné alebo vyššie ako odpovede, ktoré sa pozorovali s vakcínou PENTA™ pri dojčenskej, ako i posilňovacej dávke. Odpovede na tetanus sú slabšie pre vakcínu $CP_{20/20/5/3}DT$-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T v porovnaní s vakcínou $CP_{20/20/5/3}DT$-mIPV, ktorá sa podala inde ako PRP-T, ale tento pokles nie je klinicky relevantný. V súlade s ostatnými štúdiami sa zistilo, že vakcína obsahujúca celé bunky vyvolala porovnateľné alebo silnejšie odpovede na fimbrie a aglutiníny ako viaczložková vakcína proti čiernemu kašľu, ale o vakcíne obsahujúcej celé bunky je známe, že obsahuje silne imunogénnu fimbriálnu zložku. Všetky ostatné odpovede na čierny kašeľ boli opakovane silnejšie v prípade vakcíny $CP_{20/20/5/3}DT$-mIPV, ktorá sa použila na rozpustenie PRP-T v porovnaní s vakcínou PENTA™. Takže, predkladaný vynález poskytuje multivalentné imunogénne kompozície, v ktorých sa imunitné odpovede na antigény nevytrácajú alebo neoslabujú ostatnými zložkami alebo ich pridaním do multivalentnej vakcíny. Vymiznuté imunitné odpovede sa niekedy označujú ako rušenie (interferencia).

Príprava vakcín a ich použitie

Imunogénne kompozície, vhodné na použitie ako vakcíny, sa môžu teda pripraviť z imunogénov tak, ako sa tu zverejňuje. Vakcína vyvoláva imunitnú odpoveď v jedincovi, ktorý vytvára protilátky.

Imunogénne kompozície vrátane vakcín, sa môžu pripraviť vo forme injekčne podávaných preparátov, vo forme tekutých roztokov alebo emulzií. Imunogény sa môžu zmiešať s farmaceuticky prijateľnými vehikulami, ktoré sú kompatibilné s imunogénmi. Medzi takéto vehikulá môže patriť voda, fyziologický roztok, dextróza, glycerol, etanol a ich kombinácie. Imunogénne kompozície a vakcíny môžu ďalej obsahovať pomocné látky, ako sú zvlhčovacie a emulzifikačné činidlá, pufrujúce činidlá alebo adjuvanciá na zvýšenie ich účinnosti. Imunogénne kompozície a vakcíny sa môžu podávať parenterálne, injekciou podanou subkutánne alebo intramuskulárne. Imunogénne preparáty a vakcíny sa podávajú spôsobom, ktorý je v súlade s formuláciou dávky, a v takom množstve, aby boli terapeuticky účinné, imunogénne a poskytujúce ochranu. Množstvo, ktoré sa podá závisí od jedinca, ktorý sa má liečiť vrátane napríklad kapacity jeho imunitného systému syntetizovať protilátky a ak je to potrebné, vytvoriť taktiež bunkami sprostredkovanú imunitnú odpoveď. Presné množstvá aktívnej zložky,

podanie ktorých sa požaduje, závisia od posúdenia praktickým lekárom. Ale vhodné rozsahy dávkovania sa ľahko stanovujú odborníkom v danej oblasti a môžu sa pohybovať rádovo v mikrogramoch jednotlivých imunogénov. Vhodné režimy na počiatočné podanie a posilňovacie dávky taktiež varírujú, ale môžu zahrňovať počiatočné podanie s následnými podaniami. Dávka môže závisieť taktiež od cesty podania a bude varírovať podľa telesného vzrastu hostiteľa.

Koncentrácia imunogénov v imunogénnej kompozícii podľa tohto vynálezu je vo všeobecnosti približne 1 až približne 95 %. Imunogenita sa môže preukazne zlepšiť, ak sa antigény podajú súčasne s adjuvanciami, bežne používanými ako 0,005 až 0,5 percentný roztok vo fyziologickom roztoku tlmenom fosfátom. Adjuvanciá zvyšujú imunogenitu antigénu, ale nie sú nevyhnutne samy osebe imunogénne. Adjuvanciá môžu pôsobiť prostredníctvom lokálneho udržiavania antigénu v blízkosti miesta podania, aby sa vytvoril efekt predĺženého účinku, umožňujúci pomalé, trvalé uvoľňovanie antigénu pre bunky imunitného systému. Adjuvanciá môžu taktiež priťahovať bunky imunitného systému do miesta uloženia antigénu a stimulovať takéto bunky k vyvolaniu imunitných odpovedí.

Imunostimulačné činidlá alebo adjuvanciá sa používajú mnoho rokov na zlepšenie imunitných odpovedí hostiteľa napríklad na vakcíny. Intrinzické adjuvanciá, ako sú lipopolysacharidy, sú za normálnych okolností zložkami usmrtených alebo oslabených baktérií, ktoré sa použili ako vakcíny. Extrinzické adjuvanciá sú imunomodulátory, ktoré sú zvyčajne nekovalentne naviazané k antigénom a sú formulované tak, aby zvýšili imunitné odpovede hostiteľa. Adjuvanciá sa teda opísali ako činidlá, ktoré zosilňujú imunitnú odpoveď na antigény, ktoré sa podali parenterálne. Ale niektoré z týchto adjuvancií sú toxické a môžu spôsobiť nepriaznivé vedľajšie účinky, čo je dôvodom ich nevhodnosti na použitie u ľudí a mnohých zvierat. V skutočnosti sa ako adjuvanciá v humánnych a veterinárnych vakcínach bežne používajú iba hydroxid hlinitý a fosforečnan hlinitý (spoločne nazývané kamenec). Účinnosť kamenca pri zvyšovaní protilátkových odpovedí na difitériu a tetanus je dobre známa.

Široké spektrum extrinzických adjuvancií môže vyvolať silné imunitné odpovede na antigény. Patria medzi ne saponíny v komplexe s antigénmi membránových proteínov (imunitné stimulačné komplexy), pluronické polyméry s minerálnymi olejmi, usmrtené mykobaktérie v minerálnom oleji, Freundovo úplné adjuvans, bakteriálne produkty, ako je muramyldipeptid (MDP) a lipopolysacharid (LPS), ako i lipid A a lipozómy.

Imunogény sa často emulzifikujú v adjuvanciách, aby sa účinne indukovali humorálne imunitné odpovede (HIR) a bunkami sprostredkovaná imunita (CMI). Mnohé z adjuvancií sú toxické a vyvolávajú napríklad granulómy, akútne a chronické zápaly (Freundovo úplné adjuvans, FCA), cytolýzy (saponíny a Pluronické polyméry) a pyrogenicitu, artritídu a anteriórnu uveitídu (LPS a MDP). Hoci je FCA výborným adjuvans a bežne sa používa pri výskume, nemá registráciu na použitie v ľudských alebo veterinárnych vakcínach, z dôvodu jeho toxicity.

Žiaduce vlastnosti ideálneho adjuvans zahrnujú:
1. absenciu toxicity;
2. schopnosť stimulovať dlhotrvajúcu imunitnú odpoveď;
3. jednoduchosť jeho výroby a stabilitu pri dlhotrvajúcom uskladnení;
4. schopnosť vyvolať tak CMI, ako aj HIR na antigény podané rôznymi cestami;
5. synergizmus s ostatnými adjuvanciami;
6. schopnosť selektívnej interakcie s populáciami antigény prezentujúcich buniek (APC);
7. schopnosť špecificky vyvolať vhodné imunitné odpovede špecifické pre T_H1 alebo T_H2 bunky; a
8. schopnosť selektívneho nárastu hladín vhodných protilátkových izotypov (napríklad IgA) proti antigénom.

Patent USA č. 4 855 283 udelený pre Lockhoff a kol. 8 augusta 1989, ktorý je tu zahrnutý vo forme citácie, pojednáva o glykolipidových analógoch vrátane *N*-glykozylamidov, *N*-glykozylureí a *N*-glykozylkarbamátov, z ktorých každý má sacharidový zvyšok nahradený aminokyselinou, ako imunomodulátoroch alebo adjuvanciách. Lockhoff a kol. (patent USA č. 4 855 283 a cit 60) teda zistili, že *N*-glykolipidové analógy, ktoré vykazujú štrukturálne podobnosti s prirodzene sa vyskytujúcimi glykolipidmi, ako sú glykosfingolipidy a glykoglycerolipidy, sú schopné vyvolať silné imunitné odpovede v prípade vakcíny proti vírusu herpes simplex a vakcíny proti vírusu nepravej besnoty. Niektoré glykolipidy sa syntetizovali z alkylamínov s dlhým reťazcom a mastných kyselín, ktoré sú napojené priamo na cukry cez anomérny atóm uhlíka, čím napodobňujú funkcie prirodzene sa vyskytujúcich lipidových zvyškov.

Patent USA č. 4 258 029 udelený pre Moloney a kol., ktorý je pridelený jeho nadobúdateľovi, a ktorý je tu zahrnutý vo forme citácie, pojednáva o tom, že oktadecyltyrozínhydrochlorid (OTH) funguje ako adjuvans potom, ako sa vytvorí jeho komplex s toxoidom tetanusu a formalínom inaktivovanou vírusovou vakcínou proti polymyelidíde typ I, II a III. Taktiež Nixon-George a kol. (cit. 61) opísali, že oktodecylové estery aromatických aminokyselín v komplexe s rekombinantným povrchovým antigénom hepatitídy B zosilňujú imunitné odpovede hostiteľa proti vírusu hepatitídy B.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Opísané zverejnenie opisuje predkladaný vynález vo všeobecnosti. Úplnejšie pochopenie sa môže získať pomocou nasledujúcich špecifických príkladov uskutočnenia vynálezu. Tieto príklady uskutočnenia vynálezu sa opisujú výhradne z ilustračného dôvodu a nie sú mienené tak, aby obmedzovali rámec tohto vynálezu. Uvažuje sa o zmenách formy a o ekvivalentných nahradeniach podľa toho, čo za daných podmienok môže byť navrhnuté alebo predložené ako účelné. Napriek tomu, že sa tu používajú špecifické pojmy, tieto pojmy sú mienené v opisnej rovine a nie sú určené na to, aby boli limitujúce.
V tomto zverejnení sa používajú spôsoby biochémie proteínov, fermentácie a imunológie bez podrobného opisu a tieto príklady uskutočnenia vynálezu sú bohato opísané vo vedeckej literatúre a sú v rámci schopností odborníkov v danej oblasti.

Príklad 1
V tomto príklade sa opisuje rast baktérií *Bordetella pertussis*.

Východisková kultúra
Východisková kultúra baktérií *Bordetella pertussis* sa udržiavala v lyofilizovaných dávkach pri teplote 2 °C až 8 °C.

Inokulum:
Lyofilizovaná kultúra sa rozsuspendovala v Hornibrookovom médiu a použila sa na očkovanie platničiek s Bor-

det-Gengou agarom (BGA). Hornibrookovo médium malo nasledovné zloženie.

Zložka	na 1 liter
Kazeínový hydrolyzát (opracovaný aktívnym uhlím)	10,0 g
Kyselina nikotínová	0,001 g
Chlorid vápenatý	0,002 g
Chlorid sodný	5,0 g
Hexahydrát chloridu horečnatého	0,025 g
Chlorid draselný	0,200 g
Dvojsýtny fosforečnan draselný	0,250
Škrob	1,0 g
Destilovaná voda	do 1 litra

Hodnota pH sa upravila na 6,9 ± 0,1 pomocou 1 % roztoku uhličitanu sodného. Toto médium sa rozdelilo do skúmaviek a sterilizovalo sa parou v autokláve počas 20 minút a následne sa autoklávovalo počas 20 minút pri teplote 121 °C až 124 °C. Inokulum sa kultivovalo dvakrát, najprv na BGA platničkách a potom na „Component pertussis agare" (CPA). „Component pertussis agar" (CPA) má nasledovné zloženie.

NaCl	2,5 g/l
KH_2PO_4	0,5 g/l
KCl	0,2 g/l
$MgCl_2 (H_2O)_6$	0,1 g/l
Tris báza	1,5 g/l
Casamino kyseliny	10,0 g/l
NaHglutamát	10,0 g/l
Koncentrovaná HCl	do pH 7,2
Agar	15,0 g/l
Rastové faktory (CPGF)	10,0ml/l

„Component pertussis rastové faktory" (CPGF) – 100X majú nasledujúce zloženie.

L-cysteín HCl	4,0 g/l
Niacín	0,4 g/l
Kyselina askorbová	40,0 g/l
Glutatión, redukovaný	15,0 g/l
$Fe_2SO_4, (H_2O)_7$	1,0 g/l
Dimetyl-â-cyklodextrín	100 g/l
$CaCl_2 (H_2O)_2$	2,0 g/l

Výsledná kultúra sa resuspendovala v „Pertussis seed suspension pufor" (CPSB), rozdelila sa na 2 až 4 ml alikvotné častí a uskladnila sa zmrazená na –60 °C až –85 °C. „Pertussis seed suspension pufor" (CPSB) má nasledovné zloženie.

Casaminové kyseliny	10,0 g/l
Tris báza	1,5 g/l
Bezvodý glycerol	100 ml/l
Koncentrovaná HCl	do pH 7,2

Tieto glycerolové suspenzie poskytli východiskový materiál pre prípravu inokula

Kultivačný proces

Množenie inokula sa vykonalo v nádobách s „Component pertussis agar roux" počas 4 až 7 dní pri teplote 34 °C až 38 °C. Následne po tejto kultivácii sa bunky premyli od agaru pomocou „Component pertussis bujónu" (CPB). Čistota vzorky a jej opacita sa sledovali Gramovým farbením.

Bunky sa preniesli do 4 litrových kónických nádob obsahujúcich CPB a inkubovali sa na trepačke pri teplote 34 °C až 38 °C počas 20 až 26 hodín. Vzorky sa pozorovali Gramovým farbením a skontrolovala sa čistota kultúry. Obsah nádob sa zjednotil a táto suspenzia sa použila ako inokulum pre dva fermentory obsahujúce CPB (10 litrový objem s iniciálnou OD_{600} 0,1-0,4). Inokulum sa nechalo rásť do konečného OD_{600} 5,0 až 10,0. Čistota vzorky sa skontrolovala Gramovým farbením, antigén špecifickými ELISA stanoveniami a kontrolovala sa taktiež jej sterilita.

Príklad 2

V tomto príklade sa opisuje purifikácia antigénov z bunkovej kultúry *Bordetella pertussis.*

Príprava bujónu a bunkových koncentrátov

Bakteriálna suspenzia sa pestovala v dvoch produkčných fermentoroch pri teplote 34 °C až 37 °C počas 35 až 50 hodín. Z fermentorov sa odoberali vzorky na kontrolovanie sterility média. Suspenzia sa napojila na centrifúgu s kontinuálnym tokom (12,000 x g), aby sa oddelili bunky od bujónu. Bunky sa zbierali kvôli extrakcii fimbriálnej zložky. Vyčírená tekutina sa nechala prejsť cez ≤ 0,22 μm membránový filter. Prefiltrovaná tekutina sa zakoncentrovala ultrafiltráciou pomocou membrány s 10 až 30 kDa limitom molekulovej hmotnosti (NMWL). Koncentrát sa uskladnil kvôli separácii a purifikácii toxínu čierneho kašľa (PT), filamentózneho hemaglutinínu (FHA) a 69 kDa proteínu (pertaktín).

Separácia komponentov prítomných v bujóne

Komponenty prítomné v bujóne (69 kDa, PT a FHA) sa separovali a purifikovali chromatografiou na perlite a postupnými elučnými krokmi v podstate tak, ako sa to opisuje v EP patente č. 336 736 a v žiadateľmi publikovanej PCT prihláške č. WO 91/15505, ktorá sa opísala skôr. Špecifické procesy purifikácie, ktoré sa tu uskutočnili, sa opisujú neskôr.

Toxín čierneho kašľa (PT)

Kolóna naplnená perlitom sa premyla 50 mM Tris pufrom, 50 mm Tris/0,5 % Triton X-100 pufrom a 50 mM Tris pufrom. PT frakcia sa eluovala z kolóny perlitu 50 mM Tris/0,12 M NaCl pufrom.

PT frakcia získaná z perlitovej chromatografie sa naniesla na hydroxylapatitovú kolónu a potom sa premyla 30 mM pufrom fosforečnanu draselného. PT sa eluoval 75 mM pufrom fosforečnanu draselného/225 mM NaCl. Kolóna sa premyla 200 mM fosforečnanom draselným/0,6 M mM NaCl, aby sa získala FHA frakcia, ktorá sa odstránila. Do purifikovaného PT sa pridal glycerol do koncentrácie 50 % a táto zmes sa uskladnila pri teplote 2 °C až 8 °C, až kým sa nevykonala detoxifikácia v rámci jedného týždňa.

Filamentózny hemaglutinín (FHA)

FHA frakcia sa eluovala z perlitovej kolóny s 50 mM Tris/0,6 M NaCl. Filamentózny hemaglutinín sa purifikoval chromatografiou na hydroxylapatite. FHA frakcia získaná z perlitovej kolóny sa naniesla na hydroxylapatitovú kolónu, potom sa premyla 30 mM fosforečnanom draselným obsahujúcim 0,5 % Triton X-100, a následne 30 mM pufrom fosforečnanu draselného. PT frakcia sa eluovala 85 mM pufrom fosforečnanu draselného a odstránila sa. FHA frakcia sa potom eluovala 200 mM fosforečnanom draselným/0,6 M mM NaCl a uskladnila sa pri teplote 2 °C až 8 °C až kým sa nevykonala detoxifikácia v rámci jedného týždňa.

69 kDa proteín (pertaktín)

Koncentrát bujónu sa rozriedil vodou pre injekcie (WFI) tak, aby sa dosiahla vodivosť 3 až 4 mS/cm a naniesol sa na kolónu perlitu v množstve 0,5 až 3,5 mg proteínu na ml perlitu. Nezachytený eluát (frakcia obsahujúca 69 kDa zložku) sa zakoncentroval ultrafiltráciou pomocou 10 až 30 kDa NMWL membrány. Do koncentrátu nezachyteného eluátu sa pridal síran amónny do koncentrácie 35 % ± ± 3 % (w/v) a výsledná zmes sa uskladnila pri teplote 2 °C až 8 °C počas 4 ± 2 dni alebo sa okamžite centrifugovala (7 000 x g). Prebytočný supernatant sa zlial a precipitát sa zachytil centrifugáciou (7 000 x g). Pelet obsahujúci 69 kDa proteín sa buď uskladnil zamrznutý pri teplote –20 °C až – 30 °C, alebo sa rozpustil v Tris pufri alebo vo fosfátovom pufri a použil sa okamžite.

69 kDa proteín vonkajšej membrány, ktorý sa získal precipitáciou 35 % (w/v) síranom amónnym z koncentrovaného nezachyteného eluentu z perlitovej chromatografie, sa použil na ďalšiu purifikáciu. K 69 kDa frakcii sa pridal síran amónny (100 ± 5 g na liter) a táto zmes sa miešala na magnetickom miešadle počas aspoň 2 hodín pri teplote 2 °C až 8 °C. Zmes sa potom centrifugovala (7 000 x g), aby sa znovu získal supernatant. Do supernatantu sa pridal síran amónny (100 až 150 g na liter) a táto zmes sa miešala na magnetickom miešadle počas aspoň 2 hodín pri teplote 2 °C až 8 °C. Zmes sa potom centrifugovala (7 000 x g), aby sa získal pelet, ktorý sa rozpustil v 10 mM Tris, HCl, pH 8. Iónová sila tohto roztoku sa upravila ekvivalentne k 10 mM Tris HCl (pH 8), ktorý obsahoval 15 mM síran amónny.

69 kDa proteín sa naniesol na hydroxylapatitovú kolónu napojenú do série s kolónou Q-Sepharose. 69 kDa proteín sa nachádzal v nezachytenom eluáte, z kolón sa vyplavil pomocou 10 mM Tris HCl (pH 8) obsahujúcom 15 mM síran amónny a zjednotil sa s 69 kDa proteínom prítomným v nezachytenom eluáte. Zjednotený 69 kDa proteín sa diafiltroval cez 100 až 300 kDa NMWL membránu proti 6 až 10 objemom 10 mM fosforečnanu draselného (pH 8) obsahujúcim 0,15 M NaCl. Ultrafiltrát sa zachytil a 69 kDa proteín prítomný v ultrafiltráte sa zakoncentroval.

69 kDa proteín sa rozpustil v čerstvom 10 mM Tris HCl (pH 8) a adsorboval sa na Q-Sepharose, premyl sa 10 mM Tris HCl (pH 8)/5 mM síran amónny. 69 kDa proteín sa eluoval pomocou 50 mM fosforečnanu draselného (pH 8). 69 kDa proteín sa diafiltroval cez 100 až 300 kDa NMWL membránu proti 6 až 10 objemom 10 mM fosforečnanu draselného (pH 8) obsahujúcim 0,15 M NaCl. 69 kDa proteín sa sterilizoval filtráciou cez ≥ filter s 0,22 µm pórmi. Tento sterilný zásobný roztok sa uskladnil pri teplote 2 °C až 8 °C a adsorpcia sa vykonala do troch mesiacov.

Fimbriálne aglutinogény

Aglutinogény sa purifikovali z buniek po ich oddelení od bujónu. Bunky sa rozriedili na objem zodpovedajúci 0,05 objemu podielu buniek v pufri obsahujúcom 10 mM fosforečnan draselný, 150 mM NaCl a 4 M močovinu a miešali sa počas 30 minút. Bunkový lyzát sa vyčíril centrifugáciou (12 000 x g) a potom sa zakoncentroval a diafiltroval proti 10 mM fosforečnanu draselnému/150 mM NaCl/0,1 % Triton X-100 pomocou 100 až 300 kDa NMWL membránového filtra.

Na koncentrát sa pôsobilo teplotou 80 °C počas 30 minút a potom sa znovu vyčíril centrifugáciou (9 000 x g). Do vyčíreného supernatantu sa pridal PEG 8000 do konečnej koncentrácie 4,5 % ± 0,2 % a tento sa jemne miešal na magnetickom miešadle počas minimálne 30 minút. Výsledný precipitát sa pozbieral centrifugáciou (17 000 x g) a pelet sa extrahoval pufrom 10 mM fosforečnanu draselného/150 mM NaCl, čím sa získal hrubý roztok fimbriálneho aglutinogénu. Fimbriálne aglutinogény sa purifikovali prechodom cez PEI siliku. Koncentrácia tohto hrubého roztoku sa upravila na 100 mM vzhľadom na fosforečnan draselný pomocou 1 M pufra fosforečnanu draselného a potom sa nechal tento roztok prejsť cez kolónu PEI siliky.

Nezachytený eluát z kolón sa zakoncentroval a diafiltroval sa pomocou 100 až 300 kDa NMWL proti 10 mM pufru fosforečnanu draselného/150 mM NaCl membránového filtra. Tento sterilný zásobný roztok sa uskladnil pri teplote 2 °C až 8 °C a adsorpcia sa vykonala do troch mesiacov. Fimbriálny aglutinogénny preparát obsahoval fimbriálny Agg 2 a fimbriálny Agg 3 v hmotnostnom pomere približne 1,5 až približne 2:1 a zistilo sa, že je v podstate bez Agg 1.

Príklad 3

V tomto príklade sa opisuje detoxifikácia purifikovaných antigénov PT a FHA z baktérií *Bordetella pertussis*.

PT, ktorý sa pripravil v čistej forme tak, ako sa to opísalo v príklade 2, sa detoxifikoval upravením koncentrácie glutaraldehydu v roztoku PT na 0,5 % ± 0,1 % a inkubáciou pri 37 °C ± 3 °C počas 4 hodín. Reakcia sa zastavila pridaním L-aspartátu do koncentrácie 0,21 ± 0,02 M. Táto zmes sa potom držala pri laboratórnej teplote počas 1 ± 0,1 hodiny a potom pri 2 °C až 8 °C počas 1 až 7 dní.

Výsledná zmes sa diafiltrovala pomocou 30 kDa NMWL membránového filtra proti 10 mM pufru fosforečnanu draselného/0,15 mM NaCl/5 % glycerolu a potom sa sterilizovala prechodom cez ≤ membránový filter s 0,22 µm pórmi. Tento sterilný zásobný roztok sa uskladnil pri teplote 2 °C až 8 °C a adsorpcia sa vykonala do troch mesiacov.

FHA frakcia, ktorá sa pripravila v čistej forme tak, ako sa to opísalo v príklade 2, sa detoxifikovala upravením koncentrácie L-lyzínu na 47 ± 5 mM a formaldehydu na 0,24 ± 0,05 % a inkubáciou pri 35 °C až 38 °C počas 6 týždňov. Táto zmes sa diafiltrovala pomocou 30 kDa NMWL membránového filtra proti 10 mM pufru fosforečnanu draselného/0,5 mM NaCl a potom sa sterilizovala prechodom cez membránový filter. Tento sterilný zásobný roztok sa uskladnil pri teplote 2 °C až 8 °C a adsorpcia sa vykonala do troch mesiacov.

Príklad 4

V tomto príklade sa opisuje adsorpcia purifikovaných antigénov z baktérií *Bordetella pertussis*.

Pre jednotlivé adsorpcie PT, FHA, Agg a 69 kDa proteín na fosforečnan hlinitý (kamenec) sa pripravil zásobný roztok fosforečnanu hlinitého v koncentrácii 18,75 ± 1 mg/ml. Pripravili sa vhodné nádobky a ktorýkoľvek z antigénov sa asepticky umiestnil do nádobky. Asepticky sa pridal 2-fenoxyetanol tak, aby sa dosiahla jeho konečná koncentrácia 0,6 % ± 0,1 % (v/v) a roztok sa miešal, až kým nebol homogénny. Do nádobky sa asepticky pridal vhodný objem fosforečnanu hlinitého. Asepticky sa pridal vhodný objem sterilnej destilovanej vody tak, aby sa dosiahla konečná koncentrácia 3 mg fosforečnanu hlinitého/ml. Nádobky sa uzavreli a označili a nechali sa miešať na magnetickom miešadle počas 4 dní pri laboratórnej teplote. Nádobka sa potom uskladnila na použitie pri konečnej formulácii.

Príklad 5

V tomto príklade sa opisuje formulácia viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu kombinovanej s toxoidmi diftérie a tetanusu.

Antigény baktérie *Bordetella pertussis*, ktoré sa pripravili tak, ako sa to opísalo v predchádzajúcich príkladoch, sa formulovali s toxoidmi diftérie a tetanusu, čím sa poskytlo niekoľko viaczložkových vakcín proti čiernemu kašľu (CP) tak, ako sa to opisuje neskôr.

Jednotlivé zložky čierneho kašľa sa získali z baktérie *Bordetella pertussis*, ktorá sa pestovala v submerznej kultúre tak, ako sa to detailne opísalo v uvedených príkladoch 1 až 4. Po ukončení rastu sa kultivačný bujón oddelil od bakteriálnych buniek centrifugáciou. Každý antigén sa purifikoval samostatne. Toxín čierneho kašľa (PT) a filamentózny hemaglutinín (FHA) sa purifikovali z bujónu pomocou sekvenčnej chromatografie na perlite a hydroxylapatite. PT sa detoxifikoval glutaraldehydom a akýkoľvek reziduálny PT (približne 1 %), ktorý bol prítomný vo FHA frakcii sa detoxifikoval formaldehydom. Fimbriálne aglutinogény (2+3) (AGG) sa pripravili z bakteriálnych buniek. Bunky sa rozrušili močovinou a pôsobením tepla a fimbriálne aglutinogény sa purifikovali precipitáciou polyetylénglykolom a chromatografiou na polyetylénimínovej silike. 69 kDa proteín (pertaktín) sa izoloval z nezachyteného eluentu z perlitovej chromatografie (príklad 2) pomocou precipitácie síranom amónnym a purifikoval sa sekvenčnou chromatografiou na hydroxylapatite a Q-sepharose. Všetky komponenty sa sterilizovali filtráciou cez 0,22 µm membránový filter.

Toxoid diftérie sa pripravil z baktérií *Corynebacterium diphtheriae*, ktoré sa pestovali v submerznej kultúre štandardnými spôsobmi. Príprava toxoidu diftérie je rozdelená do piatich krokov, konkrétne udržiavanie inokula, pestovanie *Corynebacterium diphtheriae*, zbieranie toxínu diftérie, detoxifikácia toxínu diftérie a zakoncentrovanie toxoidu diftérie.

Príprava toxoidu diftérie

(I) Inokulum

Kmeň baktérie *Corynebacterium diphtheriae* sa udržiaval vo forme lyofilizovaných dávok. Rozsuspendované inokulum sa pestovalo na Loefflerových šikmých agaroch počas 18 až 24 hodín pri teplote 35 °C ± 2 °C a potom sa prenieslo do nádob obsahujúcich diftériové médium. Potom sa testovala čistota a Lf obsah tejto kultúry. Zostávajúce inokulum sa použilo na inokuláciu fermentora.

(II) Rast Corynebacterium diphtheriae

Kultúra sa inkubovala pri teplote 35 °C ± 2 °C a miešala sa vo fermentore. Do kultúry sa pridali dopredu určené množstvá roztokov síranu železnatého, chloridu vápenatého a fosforečnanu vápenatého. Skutočné množstvá každého roztoku (síranu železnatého, chloridu vápenatého a fosforečnanu vápenatého) sa zistili experimentálne pre každú dávku média. Vybrali sa tie koncentrácie, ktoré dávali najvyšší Lf obsah. Na konci rastového cyklu (30 až 50 hodín) sa v kultúrach kontrolovala čistota a Lf obsah.

Hodnota pH sa upravila pomocou hydrogenuhličitanu sodného a kultúra sa inaktivovala 0,4 % toluénom počas 1 hodiny pri teplote udržiavanej na 35 °C ± 2 °C. Potom sa vykonal test sterility, aby sa potvrdila neprítomnosť živých baktérií *C. diphtheriae*.

(III) Zbieranie toxínu diftérie

Toluénom opracované kultúry z jedného alebo niekoľkých fermentorov sa zjednotili do veľkej nádoby. Pridalo sa približne 0,12 % hydrogenuhličitanu sodného, 0,25 % aktívneho uhlia a 23 % síranu amónneho a potom sa zistila hodnota pH.

Táto zmes sa miešala počas približne 30 minút. Pridala sa kremelina a zmes sa pumpovala do filtra. Filtrát sa recirkuloval, až kým nebol čistý a potom sa pozbieral a skontroloval sa obsah Lf. Do filtrátu sa pridal ďalší síran amónny tak, aby jeho koncentrácia dosiahla 40 %. Pridala sa taktiež kremelina. Táto zmes sa nechala 3 až 4 dni pri teplote 2 °C až 8 °C, aby sa umožnilo usadenie precipitátu. Vyzrážaný toxín sa pozbieral a rozpustil v 0,9 % fyziologickom roztoku. Kremelina sa odstránila filtráciou a toxín sa dialyzoval proti 0,9 % fyziologickému roztoku, aby sa odstránil síran amónny. Dialyzovaný toxín sa zjednotil a skontroloval sa obsah Lf a jeho čistota.

(IV) Detoxifikácia toxínu diftérie

Detoxifikácia sa uskutočňuje okamžite po dialýze. Kvôli detoxifikácii sa toxín nariedil tak, aby výsledný roztok obsahoval:

a) toxín diftérie v koncentrácii 1000 ± 10 % Lf/ml,
b) 0,5 % hydrogenuhličitan sodný,
c) 0,5 % formalín,
d) 0,9 % (w/v) monohydrochlorid L-lyzínu.

Objem roztoku sa potom upravil fyziologickým roztokom a hodnota pH sa upravila na 7,6 ± 0,1.

Toxoid sa prefiltroval cez vrstvu celulózy s kremelinou a/alebo cez membránový predfilter a cez 0,2 µm membránový filter do zbernej nádoby a inkuboval sa 5 až 7 týždňov pri teplote 34 °C. Odobrala sa vzorka na testovanie toxicity.

(V) Zakoncentrovanie toxínu diftérie

Roztoky toxoidu sa zjednotili, potom sa zakoncentrovali ultrafiltráciou a zbierali sa do vhodnej nádoby. Odobrali sa vzorky na testovanie obsahu Lf a čistoty. Pridala sa konzervačná látka (2-fenoxyetanol) tak, aby sa dosiahla konečna koncentrácia 0,375 % a hodnota pH sa upravila na 6,6 až 7,6.

Toxoid sa sterilizoval filtráciou cez membránový predfilter a cez 0,2 µm membránový filter (alebo jeho ekvivalent) a pozbieral sa. V sterilnom toxoide sa potom skúmala ireverzibilita Lf obsahu toxoidu, obsah konzervačnej látky, čistota (obsah dusíka), sterilita a toxicita. Sterilný zakoncentrovaný toxoid sa uskladnil pri teplote 2 °C až 8 °C až do času konečnej formulácie.

Príprava toxoidu tetanusu

Toxoid tetanusu (T) sa pripravil z baktérií *Clostridium tetani* pestovaných v submerznej kultúre.

Príprava toxoidu tetanusu sa môže rozdeliť na päť štádií, konkrétne udržiavanie inokula, pestovanie *Clostridium tetani*, zbieranie toxínu tetanusu, detoxifikácia toxínu tetanusu a purifikácia toxoidu tetanusu.

(I) Inokulum

Kmeň baktérií *Clostridium tetani*, ktorý sa použil na prípravu toxínu tetanusu, ktorý sa konvertoval na toxoid tetanusu, sa udržiaval vo forme lyofilizovaných dávok. Rozsuspendované inokulum sa inokulovalo na tioglykolátové médium a nechalo sa rásť počas 24 hodín pri teplote 35 °C ± 2 °C. Odobrala sa vzorka na testovanie čistoty kultúry.

(II) Rast Clostridium tetani

Tetanové médium sa rozptýlilo vo fermentore, pôsobilo sa naň teplom a ochladilo sa. Fermentor sa potom zaočkoval a kultúra sa nechala rásť počas 4 až 9 dní pri

teplote 34 °C ± 2 °C. Odobrala sa vzorka na testovanie čistoty kultúry a obsahu Lf.

(III) Zbieranie toxínu tetanusu

Toxín sa oddelil filtráciou cez vrstvu celulózy s kremelinou a vyčírený toxín sa potom sterilizoval filtráciou pomocou membránových filtrov. Odobrali sa vzorky na testovanie sterility kultúry a obsahu Lf. Toxín sa zakoncentroval ultrafiltráciou pomocou filtra s veľkosťou pórov 30 000 daltonov.

(IV) Detoxifikácia toxínu tetanusu

Pred detoxifikáciou sa zmeral obsah Lf toxínu v odobratej vzorke. Zakoncentrovaný toxín (475 až 525 Lf/ml) sa detoxifikoval pridaním 0,5 % (w/v) hydrogenuhličitanu sodného, 0,3 % (v/v) formalínu a 0,9 % (w/v) monohydrochloridu L-lyzínu a objem roztoku sa potom upravil pridaním fyziologického roztoku. Hodnota pH sa upravila na 7,5 ± 0,1 a táto zmes sa inkubovala 20 až 30 dní pri teplote 37 °C. Odobrali sa vzorky na testovanie sterility a toxicity.

(V) Purifikácia toxoidu

Koncentrovaný toxoid sa sterilizoval filtráciou cez membránové predfiltre a následne cez 0,2 µm membránové filtre. Odobrali sa vzorky na testovanie sterility a obsahu Lf. Optimálna koncentrácia síranu amónneho sa odvodila z frakcionačnej „S" krivky určenej zo vzoriek toxoidu. K toxoidu (nariedenému na 1900-2100 Lf/ml) sa pridala prvá koncentrácia. Zmes sa potom udržiavala aspoň 1 hodinu pri teplote 20 °C až 25 °C a supernatant sa pozbieral a precipitát obsahujúci vysokomolekulovú frakciu sa odstránil.

K supernatantu sa pridala druhá koncentrácia síranu amónneho kvôli druhej frakcionácii, ktorou sa odstránili nízkomolekulové nečistoty. Zmes sa udržiavala pri teplote 20 °C až 25 °C aspoň počas 2 hodín a potom by sa mohla ešte udržiavať pri teplote 2 °C až 8 °C počas maximálne troch dní. Precipitát, ktorý predstavuje purifikovaný toxoid sa pozbieral centrifugáciou a filtráciou.

Síran amónny sa z purifikovaného toxoidu odstránil diafiltráciou s PBS pomocou ultrafiltračných membrán Amicon (alebo ich ekvivalentu), až kým v roztoku toxoidu nebolo možné zistiť žiaden síran amónny. Hodnota pH sa upravila na 6,6 až 7,6 a 2-fenoxyetanol sa pridal do konečnej koncentrácie 0,375 %. Toxoid sa sterilizoval membránovou filtráciou a vzorky sa odobrali na testovanie (ireverzibilita toxoidu, Lf obsah, pH, obsah konzervačnej látky, čistota, sterilita a toxicita).

Formulácia multivalentnej vakcíny

Jedna formulácia viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu skombinovanej s toxoidmi diftérie a tetanusu sa nazvala $CP_{10/5/5/3}DT$ (niekedy označená ako CLASSIC). Každá 0,5 ml ľudská dávka vakcíny $CP_{10/5/5/3}DT$ sa formulovala tak, aby obsahovala:

- 10 µg toxoidu čierneho kašľa (PT),
- 5 µg filamentózneho hemaglutinínu (FHA),
- 5 µg fimbriálnych aglutinogénov 2 a 3 (FIMB),
- 3 µg 69 kDa proteínu vonkajšej membrány,
- 15 Lf toxoidu diftérie,
- 5 Lf toxoidu tetanusu,
- 1,5 mg fosforečnanu hlinitého,
- 0,6 % 2-fenoxyetanolu ako konzervačnej látky.

Ďalšia formulácia viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu skombinovanej s toxoidmi diftérie a tetanusu sa nazvala $CP_{10/5/5}DT$ (niekedy označená ako HYBRID). Každá 0,5 ml ľudská dávka vakcíny $CP_{10/5/5}DT$ sa formulovala tak, aby obsahovala:

- 10 µg toxoidu čierneho kašľa (PT),
- 5 µg filamentózneho hemaglutinínu (FHA),
- 5 µg fimbriálnych aglutinogénov 2 a 3 (FIMB),
- 15 Lf toxoidu diftérie,
- 5 Lf toxoidu tetanusu,
- 1,5 mg fosforečnanu hlinitého,
- 0,6 % 2-fenoxyetanolu ako konzervačnej látky.

Ďalšia formulácia viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu skombinovanej s toxoidmi diftérie a tetanusu sa nazvala $CP_{20/20/5/3}DT$. Každá 0,5 ml ľudská dávka vakcíny $CP_{20/20/5/3}DT$ sa formulovala tak, aby obsahovala:

- 20 µg toxoidu čierneho kašľa (PT),
- 20 µg filamentózneho hemaglutinínu (FHA),
- 5 µg fimbriálnych aglutinogénov 2 a 3 (FIMB),
- 3 µg 69 kDa proteínu vonkajšej membrány,
- 15 Lf toxoidu diftérie,
- 5 Lf toxoidu tetanusu,
- 1,5 mg fosforečnanu hlinitého,
- 0,6 % 2-fenoxyetanolu ako konzervačnej látky.

Ďalšia formulácia viaczložkovej vakcíny proti čiernemu kašľu skombinovanej s toxoidmi diftérie a tetanusu sa nazvala $CP_{20/10/10/6}DT$. Každá 0,5 ml ľudská dávka vakcíny $CP_{20/10/10/6}DT$ sa formulovala tak, aby obsahovala:

- 20 µg toxoidu čierneho kašľa (PT),
- 10 µg filamentózneho hemaglutinínu (FHA),
- 10 µg fimbriálnych aglutinogénov 2 a 3 (FIMB),
- 6 µg 69kDa proteínu vonkajšej membrány,
- 15 Lf toxoidu diftérie,
- 5 Lf toxoidu tetanusu,
- 1,5 mg fosforečnanu hlinitého,
- 0,6 % 2-fenoxyetanolu ako konzervačnej látky.

Príklad 6

V tomto príklade sa opisuje klinické hodnotenie viaczložkových nebunkových vakcín proti čiernemu kašľu.

Štúdie na dospelých

Štúdie na dospelých a deťoch vo veku 16 až 20 mesiacov naznačili, že mnohozložkové vakcíny obsahujúce fimbriálne aglutinogény sú bezpečné a imunogénne (tabuľka 2).

Klinická štúdia Phase I sa vykonala na 17 a 18 mesiacov starých deťoch v Calgary, Alberta s päťzložkovou vakcínou proti čiernemu kašľu ($CP_{10/5/5/3}DT$) a oznamovali sa nepriaznivé reakcie. Tridsať tri detí dostalo túto vakcínu a ďalších 35 dostalo tú istú vakcínu bez 69 kDa proteínu.

Lokálne reakcie boli zriedkavé. Systémové nepriaznivé reakcie, hlavne tvorené dráždivosťou, sa vyskytli u približne polovice účastníkov štúdie bez ohľadu na vakcínu, ktorú dostali. Zistili sa preukazné nárasty anti-PT, anti-FHA, anti-fimbriálnych aglutinogénov a anti-69kDa IgG protilátok pomocou enzymatického imunostanovenia a anti-PT protilátok, ktoré sa merali stanovením neutralizácie CHO buniek. S výnimkou anti-69kDa protilátky sa u detí, ktoré dostávali štvorzložkovú ($CP_{10/5/5}DT$) alebo päťzložkovú ($CP_{10/5/5/3}DT$) vakcínu nezistili žiadne rozdiely v protilátkovej odpovedi. Deti, ktoré dostávali päťzložkovú vakcínu obsahujúcu 69kDa proteín, mali po imunizácii preukazne vyššiu hladinu anti-69kDa protilátky.

Štúdia zameraná na sledovanie závislosti odpovede od dávky sa vykonala so štvorzložkovou vakcínou vo Winnipegu, Manitoba, Kanada. Použili sa dve formulácie viaczložkovej vakcíny: $CP_{10/5/5/3}DT$ a $CP_{20/10/10/6}DT$. Ako kontrola sa použila taktiež DPT vakcína obsahujúca celé bunky.

Táto štúdia bola dvojito-slepou štúdiou na 91 dojčatách, ktoré mali v čase očkovania posilňovacou dávkou

proti čiernemu kašľu vek 17 až 18 mesiacov. Obe vakcíny, $CP_{10/5/5/3}DT$ aj $CP_{20/10/10/6}DT$, boli týmito deťmi dobre tolerované. Nezistili sa žiadne rozdiely v počte detí, ktoré mali po podaní ktorejkoľvek z týchto viaczložkových vakcín akékoľvek lokálne reakcie alebo systémové reakcie. Na druhej strane, malo preukazne viac detí, ktoré dostali vakcínu obsahujúcu celé bunky lokálne a systémové reakcie ako tie deti, ktoré dostali $CP_{20/10/10/6}DT$ viaczložkové vakcíny.

Štúdie na dojčatách
Phase II

Štúdia sa vykonala pomocou $CP_{10/5/5/3}DT$ vakcíny v Calgary, Alberta a British Columbia, Kanada. V tejto štúdii dostalo 432 dojčiat viaczložkovú vakcínu proti čiernemu kašľu alebo kontrolnú DPT vakcínu obsahujúcu celé bunky vo veku 2, 4 a 6 mesiacov. $CP_{10/5/5/3}DT$ vakcína bola týmito dojčatami dobre tolerovaná. Po každej dávke boli lokálne reakcie menej bežné v prípade viaczložkovej vakcíny, ako u vakcíny obsahujúcej celé bunky.

Po vakcinácii viaczložkovou vakcínou proti čiernemu kašľu sa dokázala preukazná protilátková odpoveď na všetky antigény. Príjemcovia vakcíny obsahujúcej celé bunky mali silnú protilátkovú odpoveď na fimbriálne aglutinogény, D aglutinogén a T aglutinogén. Vo veku 7 mesiacov, malo 82 % až 89 % príjemcov viaczložkovej vakcíny a 92 % príjemcov vakcíny obsahujúcej celé bunky štvornásobný alebo väčší nárast titru protilátok proti fimbriálnym aglutinogénom. Na druhej strane, bola protilátková odpoveď na FHA 75 % až 78 % v prípade viaczložkových vakcín v porovnaní s 31 % u príjemcov vakcíny obsahujúcej celé bunky. Štvornásobný nárast anti-69 kDa protilátky sa pozoroval u 90 % až 93 % príjemcov viaczložkových vakcín a 75 % príjemcov vakcíny obsahujúcej celé bunky. Štvornásobný nárast protilátky proti PT sa pozoroval pomocou enzýmového imunostanovenia u 40 % až 49 % príjemcov viaczložkových vakcín a u 32 % príjemcov vakcín obsahujúcich celé bunky; štvornásobný nárast protilátky proti PT sa pozoroval pomocou CHO neutralizácie u 55 % až 69 % príjemcov viaczložkových vakcín a u 6 % príjemcov vakcín obsahujúcich celé bunky. (Tabuľka 2).

Phase IIB

Vakcíny $CP_{20/20/5/3}DT$ a $CP_{10/5/5/3}DT$ sa hodnotili v randomizovanej slepej štúdii na 100 dojčatách vo veku 2, 4 a 6 mesiacov a porovnávali sa s $D_{15}PT$ kontrolou s nižším obsahom toxoidu diftérie (15 Lf) v porovnaní s formuláciou obsahujúcou 25 Lf toxoidu diftérie. Nepozorovali sa žiadne rozdiely v rozsahu nepriaznivých reakcií medzi dvomi viaczložkovými formuláciami; obe boli preukazne menej reaktogénne ako kontrolná vakcína obsahujúca celé bunky. U príjemcov $CP_{20/20/5/3}DT$ vakcíny s vyšším antigénnym obsahom sa dosiahli vyššie protilátkové titre proti PT a FHA zistené enzýmovým imunostanovením a CHO neutralizáciou. Vo veku 7 mesiacov bol geometrický priemer anti-FHA 95,0 u príjemcov $CP_{20/20/5/3}DT$, 42,5 u príjemcov $CP_{10/5/5/3}DT$ vakcíny a iba 8,9 u príjemcov $D_{15}PT$ vakcíny. Anti-PT titre zistené imunostanovením boli 133,3 u príjemcov $CP_{20/20/5/3}DT$ vakcíny, 58,4 u príjemcov $CP_{10/5/5/3}DT$ vakcíny a 10,4 u príjemcov $D_{15}PT$ vakcíny a anti-PT titre zistené CHO neutralizáciou boli 82,4 u príjemcov $CP_{20/20/5/3}DT$ vakcíny, 32,7 u príjemcov $CP_{10/5/5/3}DT$ vakcíny a 4,0 u príjemcov $D_{15}PT$ vakcíny (tabuľka 2).

Táto štúdia ukázala, že viaczložková vakcína proti čiernemu kašľu kombinovaná s adsorbovanými toxoidmi diftérie a tetanusu a so zvýšeným antigénovým obsahom bola bezpečná a imunogénna pre dojčatá, a že zvýšený antigénny obsah zosilnil imunitnú odpoveď na pripravené antigény (PR a FHA) bez nárastu reaktogenity.

NIAID, Phase II, americká porovnávacia štúdia

Štúdia Phase II sa uskutočnila v USA pod dozorom National institute of allergy and infectious diseases (NIAID) ako sledovanie predchádzajúce k veľkej štúdii účinnosti nebunkových vakcín proti čiernemu kašľu. Do štúdie bola zaradená popri 12 ďalších nebunkových vakcínach a dvoch celé bunky obsahujúcich vakcínach taktiež jedna viaczložková vakcína proti čiernemu kašľu podľa predkladaného vynálezu v kombinácii s adsorbovanými toxoidmi diftérie a tetanusu ($CP_{10/5/5/3}DT$). Výsledky bezpečnosti sa zisťovali u 137 detí imunizovaných vo veku 2, 4 a 6 mesiacov viaczložkovou vakcínou $CP_{10/5/5/3}DT$.
Tak, ako sa ukázalo v predchádzajúcich štúdiách, zistilo sa, že viaczložková vakcína je bezpečná, má nízku reaktogenitu a je dobre tolerovaná vakcínami.

Vo veku 7 mesiacov boli hladiny anti-PT protilátky, anti-FHA protilátky, anti-69kDa protilátky a protilátky proti fimbriálnym aglutinogénom vyššie alebo zhodné ako hladiny, ktoré sa dosiahli po vakcínach obsahujúcich celé bunky (cit. 71 a tabuľka 2). Uskutočnila sa dvojito-slepá štúdia, v ktorej sa deti náhodne priraďovali do skupín, ktoré dostali buď $CP_{20/20/5/3}DT$ vakcínovú formuláciu alebo $CP_{10/5/5/3}DT$ vakcínovú formuláciu. Celkovo sa do štúdie zapojilo 2050 dojčiat v USA a v Kanade; 1961 dojčiat štúdiu ukončilo. Obe vakcínové formulácie boli bezpečné, mali nízku reaktogenitu a boli imunogénne pre tieto dojčatá. Imunogenita sa zhodnotila v podskupine 292 dojčiat. Obe vakcínové formulácie vyvolali nárast protilátok proti všetkým antigénom obsiahnutým vo vakcínach. $CP_{20/20/5/3}DT$ formulácia indukovala vyššie protilátkové titre proti FHA, ale nie proti PT. $CP_{10/5/5/3}DT$ formulácia vyvolala vyššie protilátkové titre proti fimbriám, ako i vyššie aglutinogénne titre.
Ďalšia štúdia bezpečnosti a imunogenity sa uskutočnila vo Francúzku. Dizajn tejto štúdie bol podobný ako u severoamerickej štúdie, ktorá sa opísala, s tým rozdielom, že vakcíny sa podávali v 2, 3 a 4 mesiaci veku. Lokálne a systémové reakcie boli vo všeobecnosti nepatrné. Celkovo bola táto vakcína dobre prijatá francúzskymi účastníkmi štúdie, ktorí použili tento režim podania.

Placebom kontrolovaná štúdia účinnosti dvoch nebunkových vakcín proti čiernemu kašľu a vakcíny obsahujúcej celé bunky pri 10 000 dojčiat

Po získaní výsledkov z americkej porovnávacej štúdie NIAID, Phase II, sa vybrali dvojzložkové a päťzložkové nebunkové vakcíny pre multicentrickú, kontrolovanú, dvojito randomizovanú placebom kontrolovanú štúdiu účinnosti. Klinická štúdia sa uskutočnila vo Švédsku, kde je vysoký výskyt čierneho kašľa. Dvojzložková vakcína obsahovala glyceraldehydom a formalínom inaktivovaný PT (25 µg), formalínom opracovaný FHA (25 µg) a 17 Lf toxoidu diftérie a 10 Lf toxoidu tetanusu. Päťzložkovou vakcínou proti čiernemu kašľu bola $CP_{10/5/5/3}DT$. Pre túto štúdiu sa pomocou registrácie narodených naverbovalo v 14 geograficky definovaných študijných miestach desať tisíc dojčiat, čo predstavuje približne jednu polovicu všetkých dojčiat tejto vekovej skupiny vo Švédsku.

Deti narodené v januári a februári 1992 boli náhodným spôsobom rozdelené do štúdie s tromi skupinami. Po získaní súhlasu rodičov, dve tretiny dojčiat dostali jednu z dvoch diftéria-tetanus nebunkových preparátov proti čiernemu kašľu vo veku dva, štyri a šesť mesiacov. Kontrolná skupina dostala iba DT. V máji 1992 sa na trh uviedla v USA za-

registrovaná komerčne dostupná celé bunky obsahujúca DTP vakcína a deti narodené v marci až decembri 1992 sa náhodným spôsobom rozdelili do štúdie so 4 skupinami. Po získaní súhlasu rodičov, tri štvrtiny dojčiat dostali jeden z troch DTP preparátov vo veku dva, štyri a šesť mesiacov. Kontrolná skupina dostala iba DT.

Každá vakcína sa podala približne 2500 deťom. Vakcíny sa podávali v troch dávkach. Prvá dávka sa podala vo veku 2 mesiace a nie neskôr ako vo veku 3 mesiace. Následné dávky sa podali v 8 týždňových intervaloch. Vakcíny sa podávali intramuskulárnou injekciou.

Deti a ich domácnosti sa sledovali 30 mesiacov. Ak bolo podozrenie na čierny kašeľ, zozbierali sa klinické údaje a laboratórne overenia sa hľadali v nosných odsávaniach určených pre bakteriologickú kultiváciu a diagnostiku pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Akútne vzorky krvi a vzorky z uzdravujúcich sa jedincov sa zozbierali pre sérologickú diagnostiku.

Pred touto štúdiou nebol v rizikovej ľudskej populácii (obzvlášť u novorodencov) známy rozsah pertaktínu poskytnutého viaczložkovou vakcínou proti čiernemu kašľu podľa predkladaného vynálezu. Konkrétne nebol známy príspevok rôznych zložiek *Bordetella* a ich prítomnosti vo vakcínach proti čiernemu kašľu v určených vzájomných množstvách na účinnosť týchto vakcín.

Hlavným cieľom tejto štúdie bolo odhadnúť schopnosť nebunkových vakcín proti čiernemu kašľu a vakcín obsahujúcich celé bunky poskytnúť ochranu proti typickému čiernemu kašľu v porovnaní s placebom.

Sekundárnym cieľom bolo skúmať účinnosť vakcíny proti potvrdeným prípadom infekcie čiernym kašľom s rôznou závažnosťou. Účinnosť sa definuje ako percentuálne zníženie pravdepodobnosti nakazenia sa čiernym kašľom medzi príjemcami vakcíny v porovnaní s neočkovanými deťmi.

Relatívne riziko čierneho kašľa v týchto dvoch očkovaných skupinách sa vyjadrilo ako pomer pravdepodobnosti ochorenia v týchto dvoch skupinách.

Pravdepodobnosť ochorenia na čierny kašeľ, tiež označovaná ako rozsah postihnutia, sa môže odhadnúť rôznymi spôsobmi. Pri vypočítavaniach veľkosti vzorky sa pravdepodobnosť ochorenia na čierny kašeľ v danej študovanej skupine odhaduje pomocou podielu medzi počtom detí s čiernym kašľom a detí zostávajúcich v študovanej skupine pri ukončení tejto štúdie.

Účinnosť viaczložkovej vakcíny $CP_{10/5/5/3}DT$ pri prevencii typického čierneho kašľa v tejto štúdii sa uvádza v tabuľke 4 a bola približne 85 %. V tej istej štúdii mala dvojzložková nebunková vakcína proti čiernemu kašľu obsahujúca iba PT a FHA účinnosť približne 58 % a celé bunky obsahujúca vakcína bola účinná na približne 48 %. Vakcína $CP_{10/5/5/3}DT$ bola účinná taktiež pri prevencii mierneho čierneho kašľa s odhadovanou účinnosťou približne 77 %.

Príklad 7

V tomto príklade sa opisuje formulácia a imunogenita multivalentnej kombinovanej vakcíny obsahujúcej kapsulárny polysacharid z *Haemophilus influenzae*.

(a) Príprava PRP-T

Kapsulárny polysacharid (PRP) z *H. influenzae* sa purifikoval a konjugoval k toxoidu tetanusu nasledovným spôsobom. Z lyofilizovaných ampuliek inokula baktérií *H. influenzae* sa vykonali tri následné predkultivovania. Prvé predkultivovanie bolo na pevnom médiu. Ampulky sa inokulovali na misky agaru s aktívnym uhlím + uvarenou krvou (10 % konskej krvi zahriatej počas 15 minút pri 80 °C) a inkubovali sa počas 20 ± 4 hodiny pri 36 °C až 37 °C v atmosfére CO_2. Druhá predkultivácia sa vykonala v tekutom médiu počas 8 hodín pri 37 °C. Tekuté médium malo nasledujúce zloženie na liter roztoku.

1.	Casamino kyseliny Difco	10 g
	Fosforečnan monosodný $2H_2O$	2,03 g
	Fosforečnan dvojsodný $12H_2O$	31,14 g
	Laktát sodný (60 % roztok)	1,5 ml
	L-cystín	0,07 g
	L-tryptofán	0,02 g
	$CaCl_2$, $2H_2O$	0,02 g
	$(NH_4)_2SO_4$	1 g
	$MgSO_4$, $7H_2O$	0,4 g

Protipenivá látka firmy Dow Corning M.S.A s koncentráciou 25 % v parafínovom oleji

2. Ultrafiltrát hemínu + dextrózy v pomere 20 g dextrózy a 1 mg hemínu. Tento roztok sa pridal s 5 mg nikotínamidadeníndinukleotidu. Sterilizoval sa filtráciou.
3. Extrakt z kvasiniek Difco 5 g
   Sterilizované filtráciou.

Tretia predkultúra bola v tekutom médiu so súčasným miešaním na magnetickom miešadle počas 4 hodín pri teplote 37 °C. Tretia predkultúra sa použila na inokuláciu fermentora a táto kultúra sa udržiavala miešaním na magnetickom miešadle miešaní počas 12 až 14 hodín pri teplote 37 °C. Kultúra sa pozbierala do chladenej nádoby. Pridal sa formalín v koncentrácii 10 ml/liter. Kultúra sa jemne miešala a udržiavala sa pri + 4 °C počas 2 – 24 hodín a potom sa centrifugovala. Formalín sa nepridával kvôli úplnej inaktivácii baktérií, ale pre zastavenie ich rastu a inhibíciu ich metabolizmu. Týmto pridaním sa znížil výskyt bunkovej lýzy s následnou kontamináciou intracelulárnymi zložkami. Trvanie tejto fixácie bolo v rozpätí medzi 2 a 24 hodinami a zvyčajne sa nechala kultúra fixovať cez noc pred tým, ako sa centrifugovala. Supernatant obsahujúci tento polysacharid sa zachytil a bakteriálny pelet sa odstránil. Purifikačný proces sa vo všeobecnosti uskutočnil v chladiacom boxe alebo v takých podmienkach, že teplota produktov a reagentov bola menšia alebo sa rovnala + 10 °C s výnimkou fenolového purifikačného kroku, ktorý sa vykonal pri izbovej teplote. Po centrifugácii kultúry sa supernatant pochádzajúci z bakteriálnej kultúry zakoncentroval. Kapsulárny polysacharid sa vyzrážal z výsledného koncentrátu pridaním centrimidu do výslednej koncentrácie 5 % (w/v). Centrimid vyzrážal PS z koncentrovanej tekutiny (SNF). Súčasne sa vyzrážalo malé množstvo proteínov, nukleových kyselín a lipopolysacharidov (LPS). Zrazeniny sa pozbierali centrifugáciou, pričom ďalšie znečisťujúce látky a proteíny zostali v SNF. Výsledný pelet sa pozbieral centrifugáciou a uskladnil sa pri teplote ≤ -20 °C.

Pelety sa rozsuspendovali v 0,3 M roztoku NaCl a táto suspenzia sa opäť centrifugovala. NaCl selektívne uvoľnilo polysacharidové centrimidové komplexy. Počas tohto procesu sa uvoľnili taktiež niektoré prímesi (nukleové kyseliny, LPS, proteíny). Do supernatantu sa pridal vychladený absolútny etanol do konečnej koncentrácie 60 %. Výsledný precipitát sa zbieral centrifugáciou a premyl sa chladným, absolútnym etanolom. Precipitát, ktorý predstavoval medziprodukt, sa vysušil vo vákuu pri 0-4 °C. Tento medziprodukt sa rozpustil v pufri acetátu sodného s fenolom pri laboratórnej teplote. Kontinuálnou centrifugáciou sa pozbierala vodná fáza. Fenolová extrakcia a centrifugácia sa môžu zopakovať niekoľkokrát a vodná fáza sa dialyzovala

a diafiltrovala. Kapsulárny polysacharid sa z diafiltrovaného roztoku vyzrážal pridaním vychladeného absolútneho etanolu do konečnej koncentrácie 60 % v prítomnosti 0,3 M NaCl. Tento precipitát sa pozbieral centrifugáciou, premyl sa vychladeným absolútnym etanolom, acetónom a éterom a vysušil sa vo vákuu pri 4 °C. Vysušený precipitát sa potom rozdrvil na jemný prášok pri nízkej vlhkosti a tento produkt pozostával z purifikovaného polysacharidu z *Haemophilus influenzae* typ b.

Purifikovaný polysacharid sa rozpustil vo vode tak, aby sa získalo 5 mg polysacharidu na ml roztoku a pH sa upravilo s NaOH na 10,8 ± 0,2. Pridal sa vodný roztok brómkyánu v množstve 0,5 mg CNBr/mg polysacharidu. Hodnota pH reakčnej zmesi sa udržiavala s NaOH na 10,8 ± 0,2 počas 35 až 40 minút pri 23°± 3 °C. Hodnota pH sa znížila na pH 9 pridaním HCl. Pridal sa dihydrazid kyseliny adapic tak, aby sa dosiahla výsledná koncentrácia 3,5 mg ADH/mg polysacharidu a pH sa upravilo na 8,5. Reakčná zmes sa inkubovala pri 23 ± 3 °C počas 15 minút (pH udržiavané na 8,5) a potom sa tento roztok inkuboval cez noc pri + 4 °C so súčasným jemným miešaním. Reakčná zmes sa dialyzovala proti roztoku NaCl a potom sa zakoncentrovala. Tento roztok sa potom filtroval cez 0,45 µm filter a zmrazil sa pri teplote ≤ -40 °C. Tento roztok pozostáva z AH-polysacharidu a uskladnil sa pri teplote ≤ -40 °C.

Na prípravu toxínu tetanusu sa kmeň *Clostridioum tetani* inokuloval do série skúmaviek obsahujúcich 10 ml Rosenowho média alebo tioglykolátového média. Rosenowo médium malo nasledovné zloženie.

Zlúčenina (v gramoch na liter destilovanej vody)	
Peptón	10
Extrakt z mäsa	3
Glukóza	2
Chlorid sodný	5
Indikátor „Andrade“	
(5 % kyselina fuchsínová)	10 ml
Biely mramor	1 kus
Mozog	1 kus

Médium sa pripravilo tesne pred použitím z dopredu nachystaných produktov, naplnilo sa do skúmaviek a sterilizovalo sa pri 120 °C počas 20 minút.

Päť litrová nádoba obsahujúca 3 litre média „Massachusetts“ sa inokulovala s baktériami *C. tetani* a inkubovala sa počas 16 až 18 hodín pri teplote 35 °C ± 1 °C. Obsah sa potom preniesol do 20 litrovej nádoby obsahujúcej 15 litrov sterilného média „Massachusetts“, ktorá sa inkubovala počas 8 hodín pri teplote 35 °C ± 1 °C. Každá z nádob sa použila na inokuláciu fermentora obsahujúceho 582 litrov média „Massachusetts“ a inkuboval sa so súčasným prevzdušňovaním počas 5 až 6 dní pri teplote 35 °C. Fermentory sa ochladili a do kultúry sa pridalo 12 kg chloridu sodného, 8 kg citrátu trojsodného. Pretrepávanie pokračovalo ešte jeden deň a potom sa zastavilo a tento proces umožnil extrakciu reziduálneho toxínu z baktérií na konci kultivácie. Toxín sa vyčíril buď filtráciou alebo prechodom cez kontinuálnu centrifúgu.

Supernatant z 1200 l kultúry sa zakoncentroval ultrafiltráciou a koncentrovaný toxín sa diafiltroval proti 0,07 M roztoku fosforečnanu dvojsodného s pH 8,2. Konečný objem sa upravil na 500 Lf/m.

Uskutočnila sa dvojitá precipitácia síranom amónnym, aby sa získal purifikovaný toxín tetanusu. Pomaly sa teda pridal síran amónny a 10 g aktívneho uhlia na jeden liter predtým získaného diafiltrovaného toxínu. Po 16 až 24 hodinách inkubácie pri +4 °C sa toxín prefiltroval cez kazetové filtre, aby sa odstránil precipitát. Potom sa pomaly pridalo dostatočné množstvo síranu amónneho na dosiahnutie koncentrácie 320 g/l predtým získaného supernatantu. Po inkubácii približne 48 hodín pri +4 °C sa centrifugáciou pozbieral pelet a rozpustil sa v 0,05 M roztoku fosforečnanu dvojsodného s pH 8,2. Tento roztok sa diafiltroval proti 0,05 M roztoku fosforečnanu dvojsodného s pH 8,2 a konečná koncentrácia sa upravila na 300 Lf/m. Tento roztok sa potom sterilizoval filtráciou. Na ml roztoku toxínu sa pridalo 7,5 mikromólov (0,225 %) formaldehydu. Detoxifikácia sa dosiahla po inkubácii počas 24 dní pri 37 °C, ktorá zahrňovala medziobdobia s teplotou + 4 °C a + 22 °C. Uskutočnila sa sterilizácia filtráciou (0,22 µm), aby sa získal toxoid tetanusu. Toxoid tetanusu sa dialyzoval a zakoncentroval sa proti NaCl pomocou membrány, ktorá prepúšťala molekulové hmotnosti ≤ 50 000. Koncentrovaný proteín sa potom asepticky filtroval a uskladnil sa pri + 4 °C.

Rovnaké množstvá AH-polysacharidu a toxoidu tetanusu (± 20 %) sa zmiešali s 0,05 M NaCl, čím sa dosiahla koncentrácia 7,5 mg polysacharidu na ml. Hodnota pH roztoku sa upravila na pH 5,7 ± 0,2 s HCl a pridal sa 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid (EDAC) do výslednej koncentrácie 19,17 mg EDAC/ml reakčnej zmesi. Karboxylové skupiny proteínu tetanusu sa aktivovali väzbou k EDAC. Za mierne kyslých reakčných podmienok nasleduje kondenzačná reakcia, v ktorej sa AH-PS a EDAC-aktivovaný proteín tetanusu stávajú kovalentne viazané. Táto zmes sa inkubovala pri konštantnom pH (5,7) počas 60 minút pri +4 °C a potom sa pH upravilo na pH 6,9 ± 0,2 s NaOH a táto reakčná zmes sa dialyzovala proti NaCl pri +4 °C. Konjugát sa purifikoval zónovou centrifugáciou na sacharózovom gradiente (4 % až 60 %), aby sa odstránil EDAC, voľný AH-polysacharid, voľný proteín tetanusu a nízkomolekulový konjugát. Do frakcie obsahujúcej polysacharidový konjugát sa potom pridala voda neobsahujúca pyrogény, sacharóza, Tris-HCl pufer tak, aby sa získal roztok konjugátu s nasledovným zložením:

- sacharóza 8,5 % ± 0,5 % (w/v),
- polysacharidový koncentrát približne 200 µg/ml,
- Tris-HCl pufor 10 mM pH 7,0 ± 0,5.

Tento roztok sa potom asepticky filtroval pomocou 0,2 µ filtra a uskladnil sa pri teplote - 40 °C.

Zásobný roztok konjugovaného polysacharidu z *Haemophilus influenzae* typ b sa rozriedil pri sterilných podmienkach s riedidlom tak, aby sa získalo konečné zloženie.

Zásobný roztok konjugovaného polysacharidu *Haemophilus influenzae* typ b	na	200 mg polysacharidu
Tris-HCl pufor 200 mM s pH 7,2	na	10 mM
Sacharóza	do	850 g
Voda pre injekcie	do	10 litrov

Konečný zásobný roztok sa naplnil do skúmaviek so závitom a lyofilizoval sa. (Lyofilizovaná vakcína sa pre používanie rozpustila v 0,5 ml alebo s 0,4 % NaCl).

(b) Formulácia

Testovali sa dve formulácie multivalentnej viaczložkovej vakcíny (APDT). Prvá z nich (APDT-low) obsahovala 10 µg toxoidu čierneho kašľa (PT), 5 µg filamentózneho hemaglutinínu (FHA), 5 µg fimbrie 2 a 3 µg 69K proteínu (69K) v 0,5 ml dávke (CLASSIC). Druhá formulácia (APDT-high) obsahovala dvojnásobné množstvo PT (20 µg) a zhodné množstvá FIM a 69K (HYBRID). Obe formulácie obsahovali 15 jednotiek flokulácie (Lf) toxoidu

diftérie, 5 Lf toxoidu tetanusu, 1,5 mg fosforečnanu hlinitého ako adjuvancia a 0,6 % 2-fenoxyetanolu ako konzervačného prostriedku. Hib-tetanus toxoid konjugovaná vakcína (PRPT) sa vyrobila podľa opísaného spôsobu v Connaught Laboratories Inc. (Swiftwater, USA).

Populácia

Do štúdie sa zapojili zdravé 17 až 21 mesiacov staré deti, ktoré boli imunizované tromi dávkami buď APDT-low alebo PRPT vo forme samostatných injekčných dávok vo veku 2, 4 a 6 mesiacov v predchádzajúcej klinickej štúdii. Po získaní písomného súhlasu sa deti pomocou počítačom vytvoreného zoznamu na základe náhodných čísiel umiestnili do skupín, ktoré dostali PRP-T buď ako samostatnú injekciu v ten istý deň, ako samostatnú injekciu PRP-T mesiac po APDT vakcíne, alebo ako jednu injekciu (lyofilizovaného PRP-T rozpusteného v APDT). APDT formulácia (high alebo low) zostala pre každé dieťa tá istá, ako bola tá, ktorú dostali počas prvých troch dávok (rozvrhnutie pomeru medzi APDT-high a APDT-low bolo 6:1). Vakcíny sa podávali intramuskulárne s 25 mm ihlou do deltoidného svalu ramena alebo svalu vastus lateralis v stehne, ak deltoidný sval nemal dostatočný objem. Tam, kde bola nutná druhá injekcia pre PRPT, táto injekcia sa podala do opačnej končatiny.

Klinické a laboratórne sledovanie

Lokálne a systémové nepriaznivé reakcie sa u účastníkov sledovali hneď po imunizácii a rodičia ich sledovali 72 hodín po imunizácii. Údaje sa získali pomocou štrukturovaného telefonického rozhovoru po 24 a 72 hodinách. Teplota tela sa merala aspoň jedenkrát denne alebo kedykoľvek si rodičia mysleli, že je dieťa febrilné. Citlivosť a systémové reakcie (dráždivosť, znížená aktivita, znížený príjem potravy) sa ohodnotili ako mierne, stredné alebo vážne podľa dopredu stanovených kritérií, podľa ktorých si rodič vybral závažnosť na základe štrukturovaných príkladov. Merané lokálne reakcie sa ohodnotili podľa ich veľkosti a dlhšie trvajúci plač podľa jeho trvania.

Vzorky krvi sa odoberali venepunkciou alebo pichnutím do prsta pred a 28 dní po imunizácii; u detí, ktoré dostali PRP-T injekciu (preto 2 mesiace po APDT). Protilátky proti kapsulárnemu polysacharidu z Hib (PRP) sa merali pomocou RIA. IgG protilátky proti PT sa merali pomocou ELA a PT-neutralizujúca protilátka cytotoxickou neutralizáciou ováriových buniek čínskeho škrečka (CHO). IgG anti-FHA, anti-FIM a anti-69K protilátky sa merali pomocou EIA; jednotky sa vypočítali pomocou referenčného antiséra US FDA (č. 3). Merali sa taktiež aglutinogény čierneho kašľa. Antitoxín diftérie sa meral mikroneutralizačným stanovením a antitoxín tetanusu pomocou EIA. Titre protilátok sa vyjadrili ako geometrické priemery titrov; vzorky sér s titrami nižšími ako detekčný limit testu sa z dôvodu štatistických výpočtov pripísali hodnoty rovnajúce sa polovici najnižšieho detekčného limitu.

Štatistické analýzy

Po zhrnutí výsledkov sa analyzovala klinická preukaznosť nepriaznivých reakcií. Rozsahy nepriaznivých reakcií sa porovnávali pomocou Mantel-Haenszelovho odhadu používajúc stred a vakcínovú formuláciu ako stratifikačné premenné. V každom prípade sa vykonali odhady bodu a 95 % CI z RR. CI, ktoré nezahrňovali 1,00 sú štatisticky preukazné.

Geometrický priemer protilátkových titrov a 95 % CI sa vypočítali pre protilátkový titer antigénu každej vakcíny pred imunizáciou a po imunizácii. Priemerné logaritmické titre sa porovnali trojfaktorovou analýzou variancie. Podiel jedincov, ktorí dosiahli dopredu stanovené hladiny v každej skupine sa porovnal logaritmickou regresiou. Pre mnohonásobné porovnania sa neurobili žiadne úpravy.

Do štúdie sa zapojilo celkovo 545 detí (44 % dievčat), z ktorých 74 % dokončilo dojčenecku štúdiu. Podiel účastníkov tejto štúdie, ktorí dostali dve formulácie zostal 6:1 (468 APDT-high, 77 APDT-low). Priemerný vek bol 18,9 mesiaca (rozsah 17-21 mesiacov); všetky deti okrem troch (99,4 %) dokončili štúdiu.

Nepriaznivé reakcie

Rozsahy nepriaznivých reakcií sa nelíšili v skupinách imunizovaných s APDT-high alebo APDT-low; rozsahy boli taktiež podobné, či sa imunizácie podávali samostatne pri jednej návšteve, pri samostatných návštevách alebo v jednej kombinovanej injekcii.

Protilátková odpoveď

Hladiny protilátok proti všetkým antigénom s výnimkou FHA boli pred imunizáciou podobné u detí, ktoré dostali APDT-high alebo APDT-low vakcíny ako ich prvé tri dávky. Deti preočkované s APDT-high s jej štvornásobným obsahom FHA mali preukazne vyššie FHA titre ako deti imunizované APDT-low ($p=0,0001$). Po imunizácii APDT-high indukovalo vyššie protilátkové titre ako APDT-low ($p=0,0001$). Na druhej strane, anti-PT titre merané pomocou CHO neutralizácie alebo EIA testom boli pred imunizáciou podobné v oboch skupinách. Paradoxne, napriek dvojnásobnému antigénnemu obsahu, boli anti-PT titre nižšie po imunizácii s APDT-high ako s APDT-low ($p=0,038$). Podobne, hladiny anti-FIM protilátky a aglutinínu boli vyššie po imunizácii v APDT-low skupine ($p=0,01$ a $p=0,04$) napriek identickým množstvám fimbriálneho antigénu v oboch vakcínových formuláciách.

Pred imunizáciou existovalo málo rozdielov v protilátkach proti čiernemu kašľu v rámci skupiny, ktorá sa náhodným spôsobom rozdelila medzi tých, ktorí dostali PRPT kombinovanú s APDT vo forme jednej jedinej injekcie alebo tých, ktorí ich dostali ako samostatné injekcie v ten istý deň alebo v rôznych dňoch (tabuľka 10). Údaje sú uvedené samostatne pre príjemcov APDT-high alebo APDT-low; ale, tieto výsledky sa nebudú ďalej spomínať, z dôvodu malého počtu detí v APDT-low skupine. Skupina, ktorá mala dostávať samostatné injekcie v ten istý deň mala vyššie anti-PT protilátky stanovené CHO neutralizáciou, ako skupina, ktorá mala dostávať tieto injekcie počas rôznych dní (6,14 vs. 4,80 jednotiek; $p<0,05$). V tejto skupine boli vyššie taktiež protilátkové hladiny po imunizácii (176 jednotiek) ako v skupine, ktorá dostávala samostatné injekcie počas rôznych dní (122 jednotiek; $p<0,01$), hoci podobne zvýšené hladiny sa našli v skupine, ktorá dostávala jednu kombinovanú imunizáciu (171 jednotiek; $p<0,01$). Po imunizácii sa v tejto skupine zistila anti-69K protilátková odpoveď, hoci deti imunizované dvomi injekciami v ten istý deň mali vyššiu protilátkovú odpoveď ako deti imunizované jednou kombinovanou vakcínou a deti imunizované dvomi injekciami v ten istý deň mali vyššiu protilátkovú odpoveď ako deti imunizované počas rôznych dní (243 vs. 190 jednotiek; $p<0,001$).

Hladiny anti-PRP protilátky boli v týchto troch skupinách pred imunizáciou podobné. Po imunizácii boli vyššie pri deťoch imunizovaných samostatnými injekciami v ten istý deň (66,0 µg/ml) ako pri deťoch imunizovaných počas rôznych dní (28,4 µg/ml; $p<0,001$), alebo pri deťoch, ktoré dostali jednu kombinovanú imunizáciu (47,1 µg/ml; $p<0,05$). Kombinovaná imunizácia vyvolala taktiež preu-

kazne vyššie hladiny protilátok ako vakcíny podané počas rôznych dní ($p<0,05$). Medzi skupinami sa nezistili žiadne rozdiely v percente tých, ktorí dosiahli hladiny „poskytujúce ochranu"; všetci zúčastnení mali po imunizácii titre vyššie ako 0,15 µg/ml a iba 4 účastníci (0.7 %) nedosiahli titer vyšší ako 1 µg/ml (3 zo skupiny, ktorá dostala samostatné injekcie počas rôznych dní a jeden zo skupiny, ktorá dostala jednu kombinovanú injekciu). Viac ako 82 % detí v každej skupine prekročilo hladinu anti-PRP protilátky 10 µg/ml.

Silná protilátková odpoveď sa vyvolala taktiež proti toxoidom záškrtu a tetanusu. Preukazne vyššie hladiny antidifteritickej protilátky sa vyvolali u detí imunizovaných s dvomi injekciami v ten istý deň (3,1; $p<0,01$ IU/ml) alebo kombinovanou jednou injekciou (3,3; $p<0,01$ IU/ml) v porovnaní so skupinou, ktorá dostávala imunizáciu počas rôznych dní (2,1 IU/ml). Antitetanové protilátky boli vyššie pri príjemcoch dvoch injekcií v ten istý deň (6,7 IU/ml) ako pri deťoch imunizovaných počas rôznych dní (4,8 IU/ml; $p<0,001$). Po imunizácii mali všetky deti protilátkové antidifteritické a anti-tetanové titre vyššie ako 0,1 IU/ml, čo je desať násobok domnelej ochrannej hladiny. Viac ako 96 % anti-tetanových titrov a viac ako 74 % anti-difteritických titrov presiahlo hladinu 1,0 IU/ml; nenašli sa žiadne rozdiely medzi imunizovanými skupinami.

Príklad 8

V tomto príklade sa opisuje formulácia a imunogenita multivalentnej kombinovanej vakcíny obsahujúcej inaktivovanú polio vakcínu.

(a) Príprava inaktivovaných poliovírusov

(i) Rast na bunkách MRC-5

Inaktivované poliovírusy pestované na bunkách MRC 5 sa pripravovali nasledovným spôsobom. Tieto bunky sa získali z obličkových buniek opice (*Ceropithacus aethiops*).

Trivalentná inaktivovaná poliovírusová vakcína obsahuje ako zložky Typ I (Mahoney), Typ II (MEF) a Typ III (Saukett), ktoré sa pestovali na MRC-5 bunkách na mikronosičových guľôčkach, spracovali sa a inaktivovali sa samostatne pred ich skombinovaním do trivalentnej poliovírusovej vakcíny.

Suspenzia MRC-5 buniek sa pridala do bunkového rastového média prítomného vo fermentore s pH 7,2 (6,9 až 7,6) a teplotou 37 °C ± 0,5 °C. Rastové médium malo nasledovné zloženie:

- CMRL médium 1969,
- Hydrogenuhličitan sodný 0,15 %,
- Adultné bovinné sérum 5,00 % - 7,00 %,
- Neomycínsulfát (µg aktivity) 10 IU/ml,
- Polymyxín B 200 IU/ml.

CMRL médium malo nasledovné zloženie:

Suchý prášok

Zložky Aminokyseliny	mg/liter
L-Alanín	25,0
L-Arginín (voľná báza)	58,0
Kyselina L-asparágová	30,0
L-Cysteín.HCl	0,1
L-Cystín dvojsodný	24,0
Kyselina L-glutámová.H_2O	67,0
L-Glutamín	200,0
L-Glycín	50,0
L-Histidín (voľná báza)	16,2
L-Hydroxyprolín	10,0
L-Izoleucín	20,0
L-Leucín	60,0
L-Lyzín.HCl	70,0
L-Metionín	15,0
L-Fenylalanín	25,0
L-Prolín	40,0
L-Serín	25,0
L-Treonín	30,0
L-Tryptofán	10,0
L-Tyrozín	40,0
L-Valín	25,0
Vitamíny	
Kyselina *p*-aminobenzoová	0,05
Kyselina askorbová	0,05
d-Biotín	1,00
Pantotenát vápenatý	1,00
Dihydrogencitrát cholínu	2,12
Kyselina listová	1,00
Glutatión	0,05
i-Inozitol	2,00
Nikotínamid	1,00
Pyridoxal.HCl	1,00
Riboflavín-5-fosfát	0,10
Tiamín HCl	1,00
Ostatné zložky	
Chlorid sodný	8000,0
Chlorid draselný	400,0
Chlorid vápenatý (bezvodý)	140,0
Síran horečnatý.$7H_2O$	200,0
Síran sodný, dvojsýtny bezvodý	180,0
Fosforečnan trojsodný	70,0
D-glukóza (bezvodá)	1000,0
Fenolová červená	20,0

Výťažok z 1 litra média CMRL 1969 je 10,852 g.
Médium sa pripravilo nasledovným spôsobom.

Do 905 ml 1 N kyseliny chlorovodíkovej sa pridalo 450 litrov destilovanej vody neobsahujúcej pyrogény. Do tejto zmesi sa pridalo 5426,5 g média CMRL 1969 vo forme suchého prášku za súčasného miešania až kým sa nerozpustil a roztok nebol číry. Nasledujúce chemikálie sa pridali v danom podaní za súčasného miešania pričom sa čakalo, kým sa každá chemikália rozpustí a až potom sa pridala ďalšia.

Neomycín	10 µg/ml
Polymyxín B	200jednotiek/ml
Roztok TES pufru	5000,0 ml
Hydrogenuhličitan sodný	750,0 g
Bovinné sérum	30,0 litrov

Objem sa upravil na 500 litrov čerstvou destilovanou vodou a médium sa miešalo až kým nebolo rovnomerne rozmiešané.

Monitoroval sa rast buniek a keď sa zistilo, že sa bunky nachádzajú v logaritmickej fáze, tak sa využité rastové médium odstránilo a nahradilo sa vírusovým rastovým médiom. Vírusové rastové médium malo nasledovné zloženie.

Chemikálie Média 199 s Earleho soľami

Hydrogenuhličitan sodný	0,26 %
Tween 80	20 ppm
Neomycínsulfát (µg aktivity)	10 IU/ml
Polymyxín B	200 IU/ml
L-Glutamín	100 mg/l
L-Arginín	29 mg/l

L-Leucín	30 mg/l
L-Izoleucín	10 mg/l
L-Metionín	7,5 mg/l
L-Serín	12,5 mg/l
L-Treonín	15 mg/l
L-Cystín	10 mg/l
Cholíndihydrogencitrát	107 mg/l

CMRL 199 médium malo nasledovné zloženie.

Suchý prášok

Zložky	mg/liter
L-Alanín	25,0
L-Arginín (voľná báza)	58,0
Kyselina L-asparágová	30,0
L-Cysteín.HCl.H_2O	0,1
L-Cystín dvojsodný	24,0
Kyselina L-glutámová.H_2O	67,0
L-Glutamín	100,0
Glycín	50,0
L-Histidín (voľná báza)	16,2
L-Hydroxyprolín	10,0
L-Izoleucín	20,0
L-Leucín	60,0
L-Lyzín	70,0
L-Metionín	15,0
L-Fenylalanín	25,0
L-Prolín	40,0
L-Serín	25,0
L-Treonín	30,0
L-Tryptofán	10,0
L-Tyrozín	40,0
L-Valín	25,0
Kyselina p-aminobenzoová	0,050
Kyselina askorbová	0,050
d-Biotín	0,010
Pantotenát vápenatý	0,010
Dihydrogencitrát cholínu	1,060
Kyselina listová	0,010
Glutatión	0,050
i-Inozitol	0,050
Menadión	0,010
Nikotínamid (niacínamid)	0,025
Kyselina nikotínová (niacín)	0,025
Pyridoxal.HCl	0,025
Pyridoxín.HCl	0,025
Riboflavín-5-fosfát	0,010
Tiamín HCl	0,010
Acetát vitamínu A	0,100
Vitamín D (kalciferol)	0,100
Vitamín E (tokoferolfosfát)	0,010
Adenínsulfát	10,000
Adenozíntrifosfát	1,000
Kyselina adenozín-5-fosforečná	0,200
Deoxy-2-ribóza	0,500
d-ribóza	0,500
Cholesterol	0,200
Guanín	0,300
Hypoxantín	0,300

Kultúry sa infikovali s vhodným inokulom vírusu formou mnohonásobnej infekcie. Infekcia postupovala pri 36 °C ± 1 °C. Keď vírusová C.P.E. bola úplná, kultúra sa ochladila na 2 °C až 15 °C.

Získané vírusy sa vyčírili filtráciou. Objem kvapaliny so získanými vírusmi sa zmenšil pomocou membránovej ultrafiltrácie, s obmedzením molekulovej hmotnosti nad 100 000, na objem vhodný na diafiltráciu proti 0,04 M fosfátovému pufru. Po diafiltrácii sa objem ďalej zakoncentroval na objem vhodný na gélovú filtráciu. Koncentrát živých vírusov sa analyzoval a uskladnil sa pri 2 °C až 8 °C.

Koncentrát živého vírusu sa aplikoval na kolónu gélovej filtrácie a eluoval sa z kolóny pomocou 0,04 M fosfátového pufru. Vírusová frakcia sa zachytila na základe sledovania optickej hustoty eluátu z kolóny pri 254 a 280 nm.

Druhý purifikačný krok sa vykonal pomocou DEAE-ionexového média, s 0,04 M fosfátom ako elučným pufrom. Na základe monitorovania pri 254 a 280 nm sa tento krok môže zopakovať dvakrát v prípade, že množstvo použitého ionexového média nebolo dostačujúce.

Zachytená vírusová frakcia sa zakoncentrovala a dialyzovala sa proti Hankovmu špeciálnemu médiu, aby sa redukoval obsah fosforečnanu. Hankovo špeciálne médium malo nasledovné zloženie.

Aminokyseliny	mg/liter
D, L-Alanín	25,00
L-Arginín.HCl	58,00
Kyselina D, L-asparágová	30,00
L-Cysteín.HCl H_2O	0,10
L-Cystín 2HCl	26,00
Kyselina D, L-glutámová	67,00
L-Glutamín	100,00
Glycín	50,00
L-Histidín HCl.H_2O	16,20
L-Hydroxyprolín	10,00
D, L-Izoleucín	20,00
D, L-Leucín	60,00
L-Lyzín.HCl	70,00
D, L-Metionín	15,00
D, L-Fenylalanín	25,00
L-Prolín	40,00
D, L-Serín	25,00
D, L-Treonín	30,00
D, L-Tryptofán	10,00
L-Tyrozín (dvojsodná soľ)	40,00
D, L-Valín	25,00
Vitamíny	
Kyselina askorbová	0,050
d-Biotín	0,010
Vitamín D (kalciferol)	0,100
D-Pantotenát vápenatý	0,010
Cholínchlorid	1,060
Kyselina listová	0,010
i-Inozitol	0,050
Minerálne soli	
Chlorid vápenatý (bezvodý)	40,00
Dusičnan železitý.9H_2O	0,10
Chlorid draselný	400,00
Chlorid sodný	8000,00
Síran horečnatý.7H_2O	200,00
Ďalšie zložky	
Adenín sulfát	10,000
Adenozíntrifosfát (dvojsodná soľ)	1,000
Kyselina adenylová	0,200
d-á-Tokoferolfosfát sodný	0,010
Cholesterol	0,200
Deoxyribóza	0,500

Glukóza	1000,000
Glutatión	0,050
Guanín.HCl	0,300
Hypoxantín (sodná soľ)	0,300
Ribóza	0,500
Acetát sodný.$3H_2O$	81,500
Tymín	0,300
Tween 80	20,000
Uracil	0,300
Xantín (sodná soľ)	0,300
Menadión	0,010
Kyselina nikotínová	0,025
Nikotínamid	0,025
Kyselina *p*-aminobezoová	0,050
Pyridoxal.HCl	0,025
Pyridoxín.HCl	0,025
Riboflavín-5-fosfát	0,010
Tiamín.HCl	0,010
Vitamín A (acetát)	0,140

Purifikovaná vírusová frakcia sa prefiltrovala cez filter s 0,2 µm pórmi.

Pri inaktivácii sa môže zjednotiť jedna alebo viacero frakcií purifikovaného vírusového koncentrátu. Na základe výsledkov ELISA testu sa monovalentný vírusový zásobný roztok nariedil nasledovne:
- Typ I: 1750 ± 250 DU/ml,
- Typ II: 1500 ± 250 DU/ml a
- Typ III: 1250 ± 250 DU/ml pomocou Hankovho špeciálneho média.

Monovalentný vírusový zásobný roztok sa zahrial na 37 °C ± 1 °C a potom sa prefiltroval cez filter s 0,2 µm pórmi.

Pridalo sa nutné množstvo formalínu, aby sa dosiahla koncentrácia 1:4000. Vírusový zásobný roztok a formalín sa zmiešali a kontinuálne sa miešali na magnetickom miešadle pri teplote 37 °C ± 1 °C. Z monovalentného vírusového zásobného roztoku sa odobrali vzorky, na ktorých sa sledovala životaschopnosť. Na šiesty deň sa inaktivujúci vírusový zásobný roztok prefiltroval cez filter s 0,2 µm pórmi a udržiaval sa pri teplote 37 °C ± 1 °C. Na trinásty deň inaktivácie sa vírusový zásobný roztok prefiltroval cez filter s 0,2 µm pórmi.

Vybral sa jeden alebo viacero inaktivovaných monovalentných zložiek a asepticky sa napojili na zbernú nádobu. Monovalentný zásobný roztok sa ďalej zakoncentroval membránovou ultrafiltráciou s obmedzením molekulovej hmotnosti nad 100 000. Potom sa vykonala dialýza proti RIV-PBS zrieďovadlu tvorenému: hydrogenfosforečnanom disodným (Na_2HPO_4), 0,346 g/ml, dihydrogenfosforečnanom draselným (KH_2PO_4), 0,187 g/ml, s Tween, aby sa dosiahla uniformita konečného produktu.

Pridal sa albumín (ľudský), aby sa dosiahla konečná koncentrácia 0,5 %. Zjednotený monovalentný koncentrát sa potom filtroval cez filter s 0,2 µm pórmi. Pridalo sa RIV-PRB zrieďovadlo s Tween, aby sa dosiahla výpočtom odhadnutá koncentrácia 10 až 15 dávok na 0,5 ml. Zjednotený koncentrát sa uskladnil pri 2 °C až 8 °C do času, kým nebol potrebný.

Vypočítali sa vhodné objemy monovalentných zložiek typu I, II a III a tieto sa skombinovali. Cieľom bolo, aby trivalentná vakcína obsahovala:
- Typ I: 40 DU/0,5 ml dávku,
- Typ II: 8 DU/0,5 ml dávku,
- Typ III: 32 DU/0,5 ml dávku.

Trivalentný koncentrát sa uskladnil pri teplote 2 °C až 8 °C, až kým sa nepoužil. Pridali sa formaldehyd a 2-fenoxyetanol a zmiešali sa. Pridal sa albumín (ľudský), aby sa podľa výpočtu dosiahla konečná koncentrácia 0,5 %.

(ii) Rast na Vero bunkách

Ampulky s pracovnou kultúrou Vero buniek sa subkultivovali do úrovne, pri ktorej sa vykonala bunková pasáž. Ampulky s bunkami sa uchovávali v tekutom dusíku. Bunky rástli pomocou mikropodporných guľôčok, ktoré boli guľovitými útvarmi s priemerným priemerom približne 100 mikrometrov, tvorených dextranovými polymérmi, ktoré majú DEAE skupiny ukotvené na svojom povrchu (dietylaminoetyl), čo im dáva pozitívny náboj.

Základným médiom pre rast buniek bolo „Minimálne esenciálne médium" (MEM) Eagle in Earle fyziologického roztoku obohateného o 0,2 % hydrolyzátu mliečneho albumínu, 0,1 % dextrózy, 5 % teľacieho séra. Každý ml média obsahuje nasledujúce antibiotiká:
- Streptomycín: 75 jednotiek na ml,
- Neomycín: 14 jednotiek na ml,
- Polymixín B sulfát: 35 jednotiek na ml.

Vero bunky sa postupne subkultivovali v biogenerátoroch so zväčšujúcou sa veľkosťou. Potom sa kultivačné médium a dostatočný objem mikropodporných guľôčok na liter média vložilo do priemyselného biogenerátora. Teplota sa stabilizoval na +37 °C. Pridali sa bunky pozbierané trypsináciou a započalo sa miešanie. Kultivácia pokračovala 4 až 7 dní pri +37 °C, pričom sa postupne zvyšovala rýchlosť miešania. Na konci kultivovania sa zvyčajne pozoroval 6 až 20 násobný nárast bunkového rastu. Na rast vírusov sa použilo médium 199 (Parker) v Earle fyziologickom roztoku obohatenom o 0,1 % dextrózy. Toto médium obsahuje tie isté antibiotiká s tou istou koncentráciou ako médium pre bunkový rast, ale toto médium neobsahuje teľacie sérum. Na 4./7. deň bunkového rastu sa zastavilo miešanie biogenerátora uloženého na priemyselnom stojane; guľôčky sa nechali usadiť na dne nádoby a staré médium sa odstránilo. Potom sa do každého biogenerátora pridalo trochu média 199 bez séra a obsah sa premiešaval. Toto médium sa potom odsalo, čím sa vykonalo premytie guľôčok a buniek. Trochu média 199 bez séra sa prenieslo do biogenerátora spolu s nevyhnutným objemom inokula. Vírus sa adsorboval na bunky pomocou jemného miešania. Na konci kultivácie vírusov sa miešanie zastavilo. Vírusová suspenzia sa zliala a pozbierala sa a guľôčky sa zadržali filtráciou. Vírusová suspenzia sa homogenizovala. Získané vírusy prefiltrované cez organickú membránu so strednou veľkosťou otvorov 0,20 mm sa uskladnili pri +4 °C. Vírus sa zakoncentroval ultrafiltráciou.

Vírus sa ďalej purifikoval ionexovou chromatografiou pomocou DEAE-dextran-Spherosilového nosiča, vyváženého 0,04 M fosfátovým pufrom, pH = 7,00. Vírus sa ďalej purifikoval gélovou filtračnou chromatografiou pomocou kolóny obsahujúcej agarózový gél, Sepharosis CL-6B tlmený 0,04 M fosfátovým pufrom, pH = 7,00. Vírus sa ďalej purifikoval ionexovou chromatografiou pomocou DEAE-dextran-Spherosilu, tlmeného 0,04 M fosfátovým pufrom, pH = 7,00. Akonáhle sa dokončila posledná purifikácia, vírusová suspenzia sa upravila na požadovaný objem pomocou média M-199, pH = 7,0 bez fosfátu, zakoncentrovala sa desaťkrát v 5 mm EDTA, 0,5 % glycíne a Tween 80 s konečnou koncentráciou 50 mg/liter (inaktivačné médium). Táto zmes predstavovala „koncentrovanú vírusovú zmes" a filtrovala sa cez membránu s 0,2 µm otvormi. Koncentrovaná vírusová suspenzia sa uskladnila pri +4 °C až do inaktivácie.

Jedna alebo viacero várok „koncentrovanej vírusovej zmesi rovnakého typu vírusu sa zmiešalo vo vhodnej nádo-

be, a ak to bolo nutné, tak sa nariedili alebo sa upravili pridaním „inaktivačného média". Riedenie sa upravilo na správny objem podľa typov, aby sa získal titer D antigénu medzi:
- 1500 a 2000 jednotiek D antigénu v type 1,
- 800 a 1000 D jednotiek D antigénu v type 2,
- 1000 a 1500 D jednotiek D antigénu v type 3
a proteínový rozsah:
- ≤ 40 μg/ml v type 1,
- ≤ 70 μg/ml v type 2,
- ≤ 30 μg/ml v type 3.

Upravená suspenzia purifikovaného koncentrovaného vírusu sa filtrovala cez 0,22 μm membránu najviac 72 hodín pred začiatkom inaktivácie. Vírusová suspenzia sa potom zahriala znovu na + 37 °C. Kvôli inaktivácii sa pridal roztok formaldehydu tak, aby sa získala koncentrácia 1/4000. Vzorky sa počas prvých štyroch dní odoberali kvôli sledovaniu kinetiky inaktivácie, po 24, 48, 72 a 96 hodinách. Odobrala sa 10 ml vzorka, v ktorej sa okamžite neutralizoval formaldehyd pôsobením hydrogensiričitanu sodného a vzorka sa hneď uložila pri - 20 °C až do titrácie.

Na 6. deň sa vírusová suspenzia počas inaktivácie prefiltrovala pomocou 0,22 μm filtra. Po filtrácii sa vykonala inkubácia tekutiny pri +37 °C počas ďalších 6 dní s konštantným miešaním. Na 9. deň inaktivácie sa trikrát odobral objem zodpovedajúci 3000 ľudským dávkam a minimálne 500 ml hrubého samostatného výťažku vírusu. Tento objem sa vypočítal podľa titru D antigénu v „koncentrovanej vírusovej zmesi". Vzorky sa priamo neutralizovali hydrogensiričitanom sodným, aby sa zastavilo pôsobenie reziduálneho formaldehydu. Homogenizovaná a inaktivovaná vírusová suspenzia sa potom vybrala z inkubátora pri +37 °C po 12. dni inaktivácie. Celý objem sa priamo neutralizoval hydrogensiričitanom sodným a uskladnil sa pri teplote +4 °C.

Na prípravu koncentrovanej trivalentnej várky z monovalentných izolácií IPV sa zmiešali tak, aby poskytli:

Typ 1 (Mahoney)	400 jednotiek D antigénu,
Typ 2 (MEF-1)	80 jednotiek D antigénu,
Typ 3 (Saukett)	320 jednotiek D antigénu,

Médium 199- pH 7,2 q.s. do 1 ml.

Zmes sa miešala na magnetickom miešadle kvôli homogenizácii a potom sa prefiltrovala cez membránu s 0,22 mikrometrovými pórmi.

Konečný zásobný produkt sa získal z koncentrovaných trivalentných zásobných várok, ako sú tie, ktoré sa tu opísali, rozriedením médiom 199, pH 7,2, bez fenolovej červenej tak, aby jednotková dávka obsahovala na 0,5 ml:
- 40 jednotiek D antigénnu typ 1,
- 8 jednotiek D antigénnu typ 2,
- 32 jednotiek D antigénnu typ 3.

(b) Formulácie

Formulácia multivalentnej vakcíny (APDT) obsahovala päť antigénov čierneho kašľa (10 μg PT, 5 μg FHA, 5 μg FIM 2 a 3, 3 μg 69K), 15 Lf toxoidu záškrtu, 5 Lf toxoidu tetanusu, 1,5 mg fosforečnanu hlinitého ako adjuvans a 0,6 % 2-fenoxyetanolu ako konzervačnej látky na 0,5 ml (CLASSIC). Táto vakcína sa používala buď samostatne alebo v kombinácii buď s IPV vytvorenom na bunkách MRC-5 (mIPV) pripravenom tak, ako sa to opísalo, s IPV vytvorenom na Vero bunkách (vIPV) tak, ako sa to opísalo, alebo s OPV (Connaught laboratories limited). Aby sa nenarušala ich imunizačná schéma, vakcína obsahujúca konjugát z *Haemophilus influenzae* b s toxoidom tetanusu sa podala v čase následnej návštevy.

Populácia

Do štúdie sa zapojili zdravé 17 až 19 mesiacov staré deti, ktoré boli imunizované tromi dávkami DTP a 2 dávkami OPV, alebo 3 dávkami DTP-IPV pred 8 mesiacom veku. Po získaní písomného súhlasu od rodičov alebo opatrovateľov sa deti umiestnili pomocou počítačom vytvorených zoznamov náhodných čísiel do skupín, ktoré dostali jeden z piatich očkovacích režimov (tabuľka 10). Kombinované vakcíny obsahujúce A3DT sa podali intramuskulárnou cestou pomocou 25 mm ihly do deltoidného svalu ramena alebo do stehenného svalu vastus lateralis, ak deltoidný sval nemal dostatočný objem. Ak sa IPV (0,5 ml; mIPV alebo vIPV) podávalo samostatne, podávalo sa subkutánne pomocou ihly dlhej 1/2 až 5/8 palca (12,5 až 16 mm), vakcíny obsahujúce APDT sa podávali do ľavého údu; pravý úd sa použil pre inaktivované poliovírusové vakcíny, keď sa podávali samostatne a pre všetky vakcíny obsahujúce konjugát z *Haemophilus influenzae* b s toxoidom tetanusu pri druhej návšteve.

Klinické a laboratórne sledovanie

Vzorky krvi sa odoberali venepunkciou alebo pichnutím z prsta pred imunizáciou a 28 dní po imunizácii. IgG protilátky proti PT sa merali pomocou enzýmového imunostanovenia a PT-neutralizujúca protilátka sa merala CHO neutralizáciou. IgG anti-FHA, anti-FIM a anti-69K protilátky sa merali pomocou enzýmového imunostanovenia; jednotky sa vypočítali za pomoci referenčného antiséra US FDA (č. 3). Merali sa taktiež aglutinogény čierneho kašľa. Antitoxín záškrtu sa meral mikroneutralizačným stanovením a antitoxín tetanusu pomocou imunostanovenia. Protilátky proti poliovírusu typ 1, 2 a 3 sa merali vírusovou neutralizáciou. Titre protilátok sa vyjadrili ako geometrické priemery titrov; vzorky sér s titrami nižšími, ako je detekčný limit testu sa z dôvodu štatistických výpočtov pripísali hodnoty rovnajúce sa polovici najnižšieho detekčného limitu.

Z výsledkov protilátkových titrov antigénu každej vakcíny pred imunizáciou a po imunizácii sa vypočítal geometrický priemer protilátkových titrov a 95 % interval spoľahlivosti. Priemerné log titre a priemerné nárasty log titrov protilátok sa porovnali analýzou profilu a analýzou variancie. Logickou regresiou sa porovnal podiel jedincov, ktorí dosiahli dopredu určené hladiny v každej skupine. Porovnania sa urobili medzi každou poliovírusovou vakcínou podanou samostatne alebo vo forme kombinovanej injekcie, medzi mIPV a vIPV (obe podané samostatne a v kombinácii) a medzi kombinovanými IPV vakcínami a OPV. Neurobili sa žiadne úpravy z dôvodu mnohonásobných porovnaní.

Do štúdie sa zapojilo celkovo 425 detí (52 % dievčat) a dostalo posilňovaciu dávku (tabuľka 10). Priemerný vek na začiatku štúdie bol 17,8 mesiaca (rozsah 17,0 až 20,0). Vzorky sér po imunizácii sa obdržali od 422 (99,3 %) účastníkov v priemere 29,2 dní po imunizácii (rozsah 28 až 41 dní). Nepriaznivé udalosti zaradené do kategórie vážnych boli v tejto štúdii zriedkavé.

Pred imunizáciou boli hladiny protilátok pre väčšinu antigénov rovnaké medzi skupinami. Výnimkami boli účastníci, ktorí dostali APDT a mIPV ako samostatné injekcie a mali preukazne nižšie protilátkové hladiny pre anti-FIM, aglutinín, anti-difteriu a anti-tetanus ako skupina, ktorá dostávala kombinovanú APDT-mIPV vakcínu. Podobne skupina, ktorá dostala samostatné injekcie APDT a vIPV mala nižšie protilátkové hladiny pre anti-tetanus ako skupina, ktorá mala dostať kombinovanú APDT-vIPV vakcínu.

Po imunizácii došlo k preukaznému nárastu protilátok u všetkých očkovaných skupín proti všetkým antigénom zahrnutým vo vakcínach. Našlo sa málo rozdielov v protilátkovej odpovedi na antigény čierneho kašľa v závislosti od skupiny s polio vakcínou. Pomocou enzýmového imunostanovenia alebo CHO neutralizácie sa nezistili žiadne rozdiely v anti-PT protilátke alebo v anti-FHA protilátkach. Anti-69K protilátky boli preukazne vyššie v skupine, ktoré dostala mIPV vakcínu skombinovanú s APDT (77,7 jednotiek), ako v skupine, ktorá dostala mIPV ako samostatné injekcie (37,9 jednotiek; $p<0,001$) alebo ako v skupine, ktorá dostala OPV (47,7; $p<0,05$). V skupine, ktorá dostávala kombinovanú APDT-mIPV vakcínu boli vyššie taktiež anti-FIM protilátky a aglutinogény, ako v skupine, ktorá dostávala samostatné injekcie; ale rovnaké rozdiely sa zistili taktiež v sérach odobratých pred imunizáciou.

Rozdiely sa zistili v anti-poliovírusových protilátkových odpovediach. APDT-mIPV ako aj APDT-vIPV vyvolali vyššie hladiny protilátok proti poliovírusu typ 1 a typ 3 ($p<0,001$ pre všetky porovnania). Hladiny protilátok proti poliovírusu typ 2 boli taktiež vyššie po APDT-mIPV (10 633 ekvivalentných riedení) a APDT-vIPV (10 256) ako po OPV (7185); ale, tento rozdiel dosiahol štatistickú významnosť iba pre APDT-mIPV ($p<0,05$). Anti-poliovírusové protilátkové titre, ktoré sa dosiahli s kombinovanou APDT-MIPV vakcínou boli taktiež vyššie ako v prípade, keď sa mIPV podal ako samostatná injekcia (6620-1 $p<0,05$).

Anti-tetanové protilátkové titre boli vyššie u príjemcov OPV, ako pri ktorejkoľvek z IPV kombinácií ($p<0,05$). Anti-difteriové protilátkové titre boli taktiež vyššie u príjemcov OPV, ale tento rozdiel dosiahol štatistickú preukaznosť iba pri porovnaní s APDT-vIPV skupinou ($p<0,05$). Po imunizácii mali všetky deti hladiny protilátok proti difterii a tetanusu vyššie ako 0,01 IU/ml a všetky deti, okrem jedného dieťaťa, mali hladiny vyššie ako 0,1 IU/ml.

Výsledky tejto štúdie ukázali, že viaczložková vakcína proti čiernemu kašľu obsahujúca PT, FHA, 69K a FIM kombinovaných s toxoidmi difterie a tetanusu sa môže kombinovať taktiež s inaktivovanou poliovírusovou vakcínou bez akéhokoľvek preukazného nárastu reaktogenity alebo straty imunogenity. Na rozdiel od výsledkov získaných s DTP vakcínou obsahujúcou celé bunky sa nezistilo žiadne vymiznutie protilátkovej odpovede na antigény baktérie *Bordetella pertussis*. Neexistovali žiadne podstatné rozdiely medzi IPV vakcínami pripravenými na bunkových líniách MRC-5 alebo Vero; obe vakcíny indukovali vyššie sérové anti-poliovírusové protilátkové hladiny ako OPV vakcína. Zdokumentovanie porovnateľnosti mIPV a vIPV umožňuje zavedenie nebunkovej vakcíny proti čiernemu kašľu do jurisdikcií s uprednostnením IPV odvodeného z konkrétnej bunkovej línie.

Na záver experimentálnej časti opísanej v tomto príklade sa ukázalo, že päťzložková nebunková vakcína proti čiernemu kašľu sa ako štvrtá dávka vakcíny podané medzi 17 a 19 mesiacom veku môže bezpečne kombinovať s ktoroukoľvek z dvoch IPV vakcín.

Zhrnutie zverejnenia

Zhrnúc toto zverejnenie, predkladaný vynález poskytuje nové preparáty antigénov z baktérie *Bordetella* a antigénov nepochádzajúcich z baktérie *Bordetella* použité na vytvorenie viaczložkových vakcín proti čiernemu kašľu. Takéto vakcíny sú bezpečné, nereaktogénne, imunogénne a poskytujúce ochranu pre ľudí. Modifikácie sú možné v rámci rozsahu tohto vynálezu.

Tabuľka 1
Nebunkové vakcíny proti čiernemu kašľu

Vakcína	PT	Detoxifikačné činidlo	FHA	P.69	AGG2	AGG3	Citácia
AMVC	+	H_2O_2[a]	-	-	-	-	62
Mass PHL[b]	+	TMN[c]	-	-	-	-	63
Institut Mérieux	+	GI[d]	+	-	-	-	64
Smith-Kline	+	FI[e]/GI	+	-	-	-	32
	+	FI/GI	+	+	-	-	32
CAMR[f]	+	FI	+	-	+	+	65
Lederle/Takeda	+	FI	+	+	+	-	66
Connaught	+	GI	+	-	+	+	32
	+	GI	+	+	+	+	67

[a]Aktivované peroxidom vodíka, [b]Massachusetts public health laboratories, [c]TNM, inaktivované tetranitrometánom, [d]GI, inaktivované glutaraldehydom, [e]FI, inaktivované formalínom, [f]Centre for applied microbiology and research

Tabuľka 2
IgG protilátkové odpovede na antigén čierneho kašľa a toxoidy záškrtu a tetanusu u dospelých a malých detí po imunizácii placebom alebo nebunkovou vakcínou proti čiernemu kašľu (AP), vakcínou proti záškrtu-tetanu-čiernemu kašľu (DTP), alebo viaczložkovou nebunkovou DTP vakcínou (ADTP).

	Dospelí				Deti			
	Pred imunizáciou		28 deň po imunizácii		Pred imunizáciou		Po imunizácii	
	Placebo	AP $CP_{10/5/5/3}$	Placebo	AP $CP_{10/5/5/3}$	DTP	ADTP $CP_{10/10/5/3}$	DTP	ADTP $CP_{10/10/5/3}$
Toxoid čierneho kašľa	16,45 (9,46-28,62)	22,78 (12,11-42,86)	16,56 (9,08-30,22)	415,87 (243,91-709,09)	43,71 (14,29-133,88)	15,45 (8,50-28,10)	221,32 (99,83-490,67)	306,55 (155,84-603,03)
Filamentózny hemaglutinín	15,24 (10,28-22,60)	23,59 (15,59-35,69)	13,36 (7,71-23,16)	317,37 (243,05-141,41)	2,93 (1,81-4,73)	3,86 (3,03-4,93)	30,06 (11,82-76,46)	29,86 (16,51-53,99)
Aglutinogény	21,26 (12,14-37,23)	28,64 (12,20-67,21)	27,0 (15,37-47,78)	2048,00 (1025,62-4089,55)	26,72 (16,94-42,15)	29,24 (13,63-62,75)	315,2 (127,4-779,9)	1243,3 (594,8-2603,5)
Pertaktín	7,89 (4,00-15,56)	11,47 (6,41-20,55)	7,46 (3,51-15,87)	855,13 (396,41-1844,67)	6,54 (2,79-15,33)	9,45 (5,50-16,23)	60,13 (24,59-147,04)	116,16 (57,87-233,19)
Stanovenie neutralizáciou CHO buniek	12,30 (6,97-21,68)	21,11 (10,35-43,06)	10,78 (5,54-20,97)	604,67 (403,82-405,41)	27,47 (7,36-102,62)	9,71 (4,71-20,03)	270,60 (24,6-1100,8)	342,51 (146,6-800,2)
Toxoid záškrtu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	8,75 (6,52-23,92)	9,65 (5,62-16,57)

Tabuľka 3
Sérologické výsledky viaczložkových vakcín proti čiernemu kašľu u dojčiat (2, 4 a 6 mesiacov starých)

Klinická štúdia	Geometrický priemer titrov										
	Produkt	Štúdia	Počet účastníkov	PT	FHA	69 KDa	Fimbriálne aglutinogény	neutralizácia CHO buniek	Aglutinogény	Tet	Dift
1	$CP_{10/5/5}DT$	U.S. NIAID	108	38	37	3	229	160	85	7,8	0,8
	$CP_{10/5/5/3}DT$	Multicentrická	113	36	36	113	241	150	73	5,0	0,4
	Celobunková (Mass.)	porovnávacia	95	20	51	101	70	80	42	-	-
	Celobunková (Lederle)	štúdia (Cyklus I)	312	67	3	64	193	270	84		-
2	$CP_{10/5/5/3}DT$	Phase II	315	87,1	50,2	29,9	239,8	29,6	-	1,5	0,3
	Celobunková (CLL)	Kanada	101	20	4,7	6,4	603,2	2,6	-	1,2	0,4
3	$CP_{10/5/5/3}DT$	Phase IIB	32	58,4	45,2	40,6	111,4	32,7	-	1,0	0,14
	$CP_{20/20/5/3}DT$	Kanada	33	133,3	95,0	37,1	203,8	82,4		1,1	0,21
	Celobunková (CLL)		30	10,4	8,9	6,8	393,9	4,0		1,8	0,31
4	$CP_{10/5/5/3}DT$	Phase IIC	42	105,1	82,5	71,1	358,6	66,9	307,0	2,0	0,33
	$CP_{20/20/5/3}DT$	Kanada	250	101,6	163,9	87,6	220,6	68,7	219,2	1,8	0,38
5	$CP_{20/20/5/3}DT$	Montrealská	58	212,7	83,4	106,3	601,9	109,6	-	1,9	0,53
	Celobunková (CLL)	štúdia efektívnosti	58	101,4	11,7	16,8	906,9	6,0		1,1	0,27
6	$CP_{10/5/5}DT$	U.S. NIAID	80	42	34	50	310	196	185	-	
	$CP_{20/20/5/3}DT$	Multicentrická	80	39	87	43	184	254	137		
	Celobunková (CLI)	porovnávacia	80	2	3	9	33	54	167		
	Celobunková (Lederle)	štúdia (Cyklus II)	80	18	2	16	129	137	86		

CLI - Connaught laboratories incorporated, Swiftwater, Pennsylvania

CLL - Connaught laboratories limited, Willowdale, Ontario

Mass - Massachusetts public laboratories

Lederle - Lederle laboratories Inc.

Tabuľka 4
Účinnosť nebunkových vakcín proti čiernemu kašľu

Vakcína	Účinnosť %	
	A	B
$CP_{10/5/5/3}DT$	84,7 (80,3-88,5)[1]	77
PT_{25}-$FHA_{25}DT$	58 (49,8-64,8)[1]	
DPT[2]	47,9 (37,1-56,9)[1]	

A: definícia prípadu: 21 dní trvajúci spastický kašeľ a pozitívna kultivácia
B: definícia prípadu: mierny dusivý kašeľ trvajúci aspoň jeden deň
Poznámka 1: hranice spoľahlivosti
Poznámka 2: celobunková vakcína proti čiernemu kašľu

Tabuľka 5

Vakcína	Počet	GMT (95%CI)	%≥0,15	%≥1,0
HCPDT-vIPV-PRP-T (tekutá)	327	4,78 (4,12-5,50)	97,9	88,4
HCPDT-mIPV na rozpustenie PRP-T	322	4,37 (3,74-5,09)	98,4	84,5
HCPDT-mIPV a PRP-T (samostatne)	108	3,83 (3,05-4,80)	100	88,9
DPT-IPV na rozpustenie PRP-T	105	3,84 (2,90-5,07)	97,1	81,0

Tabuľka 6

Vakcína	Počet	Polio 1	Polio 2	Polio 3
HCPDT-vIPV-PRP-T (tekutá)	328	624 (533-732)	2 397 (2 043-2 814)	1 268 (1 082-1 485)
HCPDT-mIPV na rozpustenie PRP-T	323	718 (589-875)	2 173 (1 837-2 570)	1 938 (1 640-2 291)
HCPDT-mIPV a PRP-T (samostatne)	108	702 (513-960)	2 595 (2 005-3 360)	1 837 (1 362-2 477)
DPT-mIPV na rozpustenie PRP-T	105	889 (630-1 255)	2 597 (2 000-3 373)	2 726 (2 108-3 525)

Tabuľka 7

Antigén	HCPDT-vIPV-PRP-T (tekutá) (n=324)	HCPDT-mIPV na rozpustenie PRP-T (n=322)	HCPDT-mIPV a PRP-T (samostatne) (n=108)	DPT-mIPV na rozpustenie PRP-T (n=105)
PT	86,7 (80,9-93,0)	89,1 (82,5-96,1)	102,6 (90,5-116,4)	15,2 (12,2-19,0)
FHA	155,7 (147,2-164,7)	152,5 (143,6-162,0)	165,3 (148,4-184,3)	31,4 (27,2-36,2)
FIM	276,2 (242,2-315,1)	244,5 (211,4-282,7)	355,0 (279,4-451,1)	332,3 (264,6-417,3)
Pertaktín	55,2 (48,7-62,5)	56,0 (49,4-63,4)	40,5 (33,0-49,7)	8,9 (6,8-11,7)
DIPH	0,29 (0,25-0,33)	0,28 (0,24-0,33)	0,36 (0,28-0,46)	0,29 (0,22-0,38)
TET	1,09 (1,00-1,19)	0,88 (0,80-0,96)	1,61 (1,40-1,86)	0,63 (0,51-0,78)

Tabuľka 8

Antigén	HCPDT-vIPV 1 injekcia (n=85)	HCPDT+vIPV 2 injekcie (n=84)	HCPDT-mIPV 1 injekcia (n=87)	HCPDT+mIPV 2 injekcie (n=81)	HCPDT + OPV HYBRID + OPV (n=85)
Différia	4,1	4,57	4,99	3,89	6,19
Tetanus	3,17	3,13	3,25	3,31	4,02
PT	73,9	68,2	80,5	65,2	86,8
FHA	93,9	98,1	112,8	117,8	120,9
Pertaktín	63,8	45,1	77,7	37,9	47,7
FIM	922,7	809,1	1 210	753,3	1 215
Aglutiníny	1278	1 285	1 606	1 040	1 532
Polio typ 1	6 672	5 681	10 242	8 784	2 110
Polio typ 2	10 256	7 861	10 633	6 620	7 185
Polio typ 3	5 771	7 781	6 798	8 541	556,3

Tabuľka 9
Kombinácia PRP-T s viaczložkovou vakcínou proti čiernemu kašľu pri podávaní v kombinácii alebo samostatne v ten istý deň alebo počas rôznych dní
$CP_{10/5/5/3}DT$ (CLASSIC) a $CP_{20/20/5/3}DT$ (HYBRID) vo veku 19 mesiacov (po 1 mesiaci)

Antigén	Classic/Hybrid na rozpustenie PRP-T jedna injekcia (n=181)	Classic/Hybrid a PRP-T samostatné injekcie v ten istý deň (n=181)	Classic/Hybrid a PRP-T samostatné injekcie v rôzne dni (n=180)
anti-PRP	59,3	80,8	32,4
Diftéria	3,7	3,3	2,4
Tetanus	5,0	6,6	5,3
PT	120	114	96,1
CHO	195	189	136
FHA	102	99,3	87,5
Pertaktín	187	223	168
FIM	430	434	315
Aglutiníny	1 004	1 033	682

Poznámka: Hodnoty s totožnými písmenami sa preukazne líšili ($p \leq 0,05$)

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Multivalentná imunogénna kompozícia na vyvolanie ochrany hostiteľa proti ochoreniu spôsobenému infekciou baktériami *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae a* poliovírusom, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje:
a) toxoid čierneho kašľa, filamentózny hemaglutinín, pertaktín a aglutinogény v purifikovanej forme,
b) toxoid tetanusu,
c) toxoid diftérie,
d) inaktivovaný poliovírus, pričom je formulovaná ako vakcína pre *in vivo* podávanie hostiteľovi a jednotlivé zložky kompozície sú formulované tak, aby imunogenita jednotlivých zložiek nebola oslabená ďalšími jednotlivými zložkami kompozície.

2. Imunogénna kompozícia podľa patentového nároku 1, **vyznačujúca sa tým**, že ďalej obsahuje adjuvans.

3. Imunogénna kompozícia podľa patentového nároku 2, **vyznačujúca sa tým**, že adjuvans je hydroxid hlinitý alebo fosforečnan hlinitý.

4. Imunogénna kompozícia podľa niektorého z nárokov 1 až 3, **vyznačujúca sa tým**, že toxoid čierneho kašľa sa nachádza v tejto kompozícii v množstve 5 až 30 µg dusíka, filamentózny hemaglutinín sa nachádza v množstve 5 až 30 µg dusíka, pertaktín sa nachádza v množstve 3 až 15 µg dusíka a aglutinogény sa nachádzajú v množstve 1 až 10 µg dusíka v jednej dávke pre človeka.

5. Imunogénna kompozícia podľa patentového nároku 4, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje 20 µg dusíka v toxoide čierneho kašľa, 20 µg dusíka vo filamentóznom hemaglutiníne, 5 µg dusíka v pertaktíne a 3 µg dusíka v aglutinogénoch v jednej dávke pre človeka.

6. Imunogénna kompozícia podľa niektorého z patentových nárokov 1 až 5, **vyznačujúca sa tým**, že toxoid diftérie je prítomný v množstve 10 až 20 Lf a toxoid tetanusu je prítomný v množstve 1 až 10 Lf.

7. Imunogénna kompozícia podľa patentového nároku 6, **vyznačujúca sa tým**, že toxoid diftérie je prítomný v množstve 15 Lf a toxoid tetanusu je prítomný v množstve 5 Lf.

8. Imunogénna kompozícia podľa niektorého z patentových nárokov 1 až 7, **vyznačujúca sa tým**, že inaktivovaný poliovírus obsahuje zmes inaktivovaných poliovírusov typov 1, 2 a 3.

9. Imunogénna kompozíciu podľa patentového nároku 8, **vyznačujúca sa tým**, že inaktivovaný poliovírus obsahuje zmes inaktivovaných poliovírusov typov 1, 2 a 3 v pomere:
- 20 až 50 jednotiek D antigénu poliovírusu typu 1,
- 5 až 10 jednotiek D antigénu poliovírusu typu 2,
- 20 až 50 jednotiek D antigénu poliovírusu typu 3 v jednej dávke pre človeka.

10. Imunogénna kompozícia podľa patentového nároku 9, **vyznačujúca sa tým**, že inaktivovaný poliovírus obsahuje zmes inaktivovaných poliovírusov typu 1, 2 a 3 v pomere:
- 40 jednotiek D antigénu poliovírusu typu 1,
- 8 jednotiek D antigénu poliovírusu typu 2,
- 32 jednotiek D antigénu poliovírusu typu 3,
v jednej dávke pre človeka.

11. Imunogénna kompozícia podľa niektorého z patentových nárokov 1 až 10, **vyznačujúca sa tým**, že ďalej obsahuje na nosičovej molekule toxoidu tetanusu alebo toxoidu diftérie konjugovanú molekulu kapsulárneho polysacharidu *Haemophilus influenzae* typu b, čím ďalej poskytuje aj ochranu proti chorobe spôsobenej infekciou *Haemophilus influenzae* typu b.

12. Imunogénna kompozícia podľa patentového nároku 11, **vyznačujúca sa tým**, že konjugát obsahuje toxoid tetanusu alebo toxoid diftérie a polyribózoribitolfosfát (PRP) *Haemophilus influenzae* typ b.

13. Imunogénna kompozícia podľa patentového nároku 11 alebo 12, **vyznačujúca sa tým**, že konjugát je v lyofilizovanej forme a pred podaním sa rozpustí v imunogénne kompozície pomocou ostatných zložiek kompozície.

14. Imunogénna kompozícia podľa niektorého z patentových nárokov 11 až 13, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje konjugát v množstve 5 až 15 µg PRP konjugovaného s 15 až 35 µg toxoidu tetanusu v jednej dávke pre človeka.

15. Imunogénna kompozícia podľa patentového nároku 14, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje konjugát v množstve 10 µg PRP konjugovaného s 20 µg toxoidu tetanusu v jednej dávke pre človeka.

16. Multivalentná vakcínová kompozícia podľa patentového nároku 1 až 3, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje v 0,5 mililitrovej dávke:
- 20 µg toxoidu čierneho kašľa,
- 20 µg filamentózneho hemaglutinínu,
- 5 µg fimbrií 2 a 3,
- 3 µg membránového proteínu pertaktínu,
- 15 Lf toxoidu diftérie,
- 5 Lf toxoidu tetanusu,
- 40 jednotiek D antigénu poliovírusu typu 1,
- 8 jednotiek D antigénu poliovírusu typu 2,
- 1,5 µg fosforečnanu hlinitého.

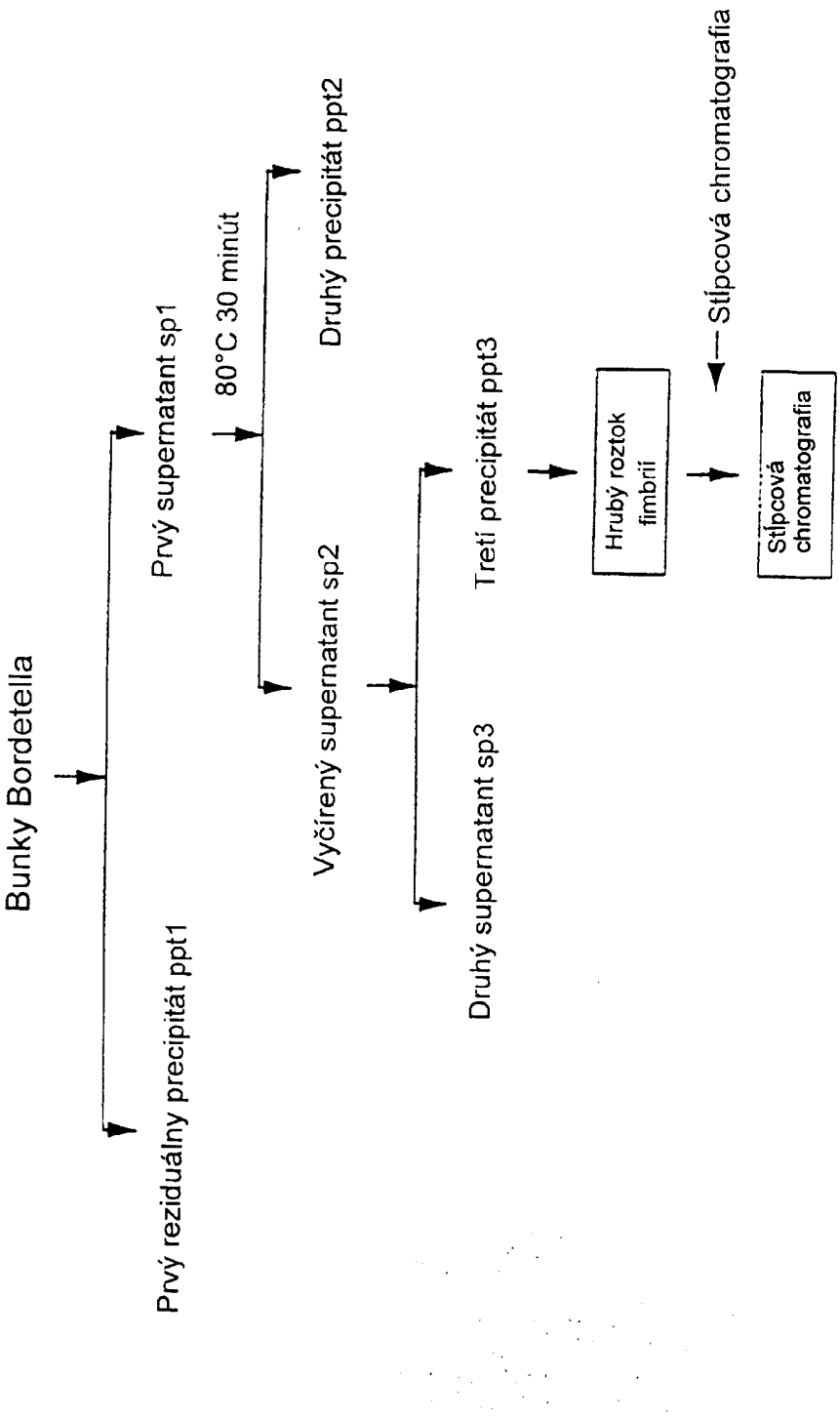
17. Kompozícia podľa patentového nároku 16, **vyznačujúca sa tým**, že ďalej obsahuje v 0,5 mililitrovej dávke, 10 µg purifikovaného kapsulárneho polysacharidu polyribózoribitolfosfátu (PRP) z *Haemophilus influenzae* typ b kovalentne naviazaného k 20 µg toxoidu tetanusu.

18. Kompozícia podľa patentového nároku 16 alebo 17, **vyznačujúca sa tým,** že ďalej obsahuje v 0,5 mililitrovej dávke 0,6 % hmotn. 2-fenoxyetanolu.

19. Imunogénna kompozícia podľa niektorého z nárokov 1 až 18 na výrobu vakcíny na účinnú imunizáciu hostiteľa proti chorobe.

1 výkres

Obr. 1



Koniec dokumentu