

(19)



(10) **LT 5177 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5177**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>: **A61K 47/48**

(21) Paraiškos numeris: **2003 071**

(22) Paraiškos padavimo data: **2003 07 23**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2004 08 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2004 11 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US02/01963**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2002 01 22**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2003 07 23**

(30) Prioritetas: **60/263,435, 2001 01 23, US**

(72) Išradėjas:

**Robert P. RYALL, US**

(73) Patent savininkas:

**AVENTIS PASTEUR, 1 Discovery Drive, PA 18370-0187 Swiftwater, US**

(74) Patentinis patikėtinis:

**Rita LAURINAVIČIŪTĖ, UAB „Metida“, Gedimino pr. 45-6, LT-01109 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

**Daugiavalentė meningokokinio polisacharido-baltymo konjugato vakcina**

(57) Referatas:

Šiame išradime aprašoma kombinuota vakcina, kuri siūlo plačią apsaugą nuo meningokokinės ligos, kurią sukelia patogeninė bakterija *Neisseria meningitidis*. Ši vakcina susideda iš keturių atskirų polisacharido-baltymo konjugatų, kurie yra sukomponuoti kaip viena vakcinos dozė. Išgryninti kapsuliniai polisacharidai iš *Neisseria meningitidis* A, C, W-135 ir Y serogrupių yra chemiškai aktyvuojami ir selektyviai prijungiami prie baltymo-nešiklio kovalentiniu cheminiu ryšiu, sudarant polisacharido-baltymo konjugatus, galinčius išgauti ilgalaikį imunitetą prieš įvairius *N. meningitidis* kamienus vaikams bei suaugusiems.

## IŠRADIMO KILMĖ

### Išradimo sritis

Bendrai imant, šis išradimas yra susijęs su medicinos sritimi, o konkrečiau su mikrobiologija, imunologija, vakcinomis ir apsisaugojimu nuo bakterinio patogeno sukeltos infekcijos imunizuojant.

### Giminingų darbų santrauka

Visame pasaulyje pagrindinė meningito ir sepsio priežastis yra *Neisseria meningitidis*. Meningokokinės ligos paplitimo dažnis pastarųjų trisdešimties metų laikotarpiu yra 1-5 atvejai 100000 gyventojų išsivysčiusiose šalyse ir 10-25 atvejai 100000 gyventojų besivystančiose šalyse. (Reido, F.X., Plikaytis, B.D. and Broome, C.V. (1995) *Pediatric Infectious Disease Journal* 14, pp. 643-657.). Epidemijų metu meningokokinės ligos paplitimo dažnis pasiekia 1000 atvejų 1000000 gyventojų. Jungtinėse Valstijose per metus pasitaiko apie 2600 bakterinio meningito atvejų ir vidutiniškai 330000 atvejų besivystančiose šalyse. Mirtingumo nuo jo dažnis yra 10-20 %.

Patogeniniai meningokokai yra įvynioti į polisacharidinę kapsulę, kuri yra pririta prie organizmo membranos išorinio paviršiaus. Remiantis kapsulinio polisacharido imunologiniu specifiškumu buvo identifikuota trylika skirtingų meningokokų serograpių (Frasch, C.E., Zollenger, W.D. and Poolman, J.T. (1985) *Review of Infectious Diseases* 7, pp. 504-510). Penkios iš šių trylikos serograpių sukelia daugumą meningokokinių ligų; šios serogrupės yra A, B, C, W135 ir Y. A serogrupė yra atsakinga už daugelį epideminių ligų. B, C ir Y serogrupės sukelia daugumą endeminių ligų ir lokalizuotus ligos protrūkius.

Vienintelis žinomas gamtinis *Neisseria meningitidis* šaltinis yra žmogaus nosiaryklės gleivinė. Kolonizacija vyksta ir išoriniame gleivinės ląstelių paviršiuje, ir nosiaryklės subepitelininiame audinyje. Meningokokai gali

būti nešiojami mėnesius. Meningokokai gali būti išplatunami arba per tiesioginį kontaktą, arba oro lašelių pavidalu. Meningokokai įsiskverbia pereidami per gleivinės epitelį per fagocitines vakuoles kaip endocitozės išdava. Šeimininko gynyba nuo meningokokų įsiskverbimo priklauso nuo bakteriolizės, kurioje tarpininkauja komplementas. Serumo antikūnai, kurie yra atsakingi už šią komplemento tarpininkaujamą bakteriolizę, yra nukreipti didžiąja dalimi prieš išorinį kapsulinį polisacharidą.

Buvo aprašytos vakcinos meningokokinio polisacharido pagrindu, kurios išgauna imuninį atsaką prieš kapsulinį polisacharidą. Šie antikūnai gali vykdyti serogrupei specifinio meningokoko komplemento tarpininkaujamą bakteriolizę. Buvo parodyta, kad meningokokinio polisacharido vakcinos yra veiksmingos vaikams ir suaugusiems (Peltola, H., Mäkelä, H., Käyhty, H., Jousimies, H., Herva, E., Hällström, K., Sivonen, A., Renkonen, O.V., Pettay, O., Karanko, V., Ahvonen, P., Sarna, S. (1997) *The New England Journal of Medicine* 297, pp. 686-691, ir Artenstein, M.S., Gold, R., Zimmerly, J.G., Wyle, F.A., Schneider, H., Harkins, C. (1970) *The New England Journal of Medicine* 282, pp. 417-420), bet efektyvumas yra ribotas kūdikiams ir mažiems vaikams (Reingold, A.L., Broome, C.V., Hightower, A.W., Ajello, G.W., Bolan, G.A., Adamsbaum, C., Jones, E.E., Philips, C., Tiendrebeogo, H., Yada, A. (1985) *The Lancet* 2, pp. 114-118). Paskesnės šio polisacharido dozės jaunesniems populiacijos atstovams sukelia silpną arba ir visai nesukelia stimuliuojančio atsako (Goldschneider, I., Lepow, M.L., Gotschlich, E.C., Mauck, F.T., Bachl, F., Randolph, M. (1973) *The Journal of Infectious Diseases* 128, pp. 769-776, ir Gold, R., Lepow, M.L., Goldschneider, I. bei Gotschlich, E.C. (1977) *The Journal of Infectious Diseases* 136, S31-S35). Meningokokinio polisacharido vakcinų sukelta apsauga yra neilgalaikė; buvo nustatyta, kad suaugusiems ir vaikams virš keturių metų amžiaus ji trunka 3-5 metus (Brandt, B.L., Artenstein, M.S. (1975) *The Journal of Infectious Diseases* 131, pp. S69-S72, Käyhty, Karanko, V., Peltola, H., Sarna, S., Mäkelä, H. (1980) *The Journal of Infectious Diseases* 142, pp. 861-868, ir Cessey, S.J., Allen, S.J., Menon, A., Todd, J.E., Cham, K., Carlone, G.M., Turner, S.H., Gheesling, L.L., DeWitt, W., Plikaytis, B.D., Greenwood, B. (1993) *The Journal of Infectious Diseases* 167, pp. 1212-1216). Vaikams nuo

vienerių iki keturių metų apsaugos trukmė yra mažesnė nei 3 metai (Reingold, A.L., et al. 1985).

Polisacharidai negali prisijungti prie daugumos histosuderinamumo komplekso molekulių, o tai yra būtina sąlyga antigeno pasireiškimui ir T-pagalbinių limfocitų stimuliavimui, t.y. jie yra nuo T-ląstelių nepriklausantys antigenai. Polisacharidai gali stimuliuoti B limfocitus antikūnų produkcijai be T-pagalbinių limfocitų pagalbos. B limfocitų T-nepriklausomos stimuliacijos pasėkoje po imunizacijos šiais antigenais atsiranda indukcijos atminties trūkumas. Polisacharidiniai antigenai gali iššaukti labai efektyvius T-nepriklausomus atsakus suaugusiems, bet šie T-nepriklausomi atsakai yra silpni kūdikių ir mažų vaikų nesubrendusioje imuninėje sistemoje.

T-nepriklausomi polisacharidiniai antigenai gal būti paversti T-priklausomais antigenais kovalentiškai prijungiant polisacharidus prie baltymų molekulių ("nešiklių" arba "baltymų-nešiklių"). B ląsteles, kurios prijungia konjugato vakcinos polisacharidinį komponentą, gali aktyvuoti peptidams, kurie yra konjuguoto baltymo-nešiklio dalis, specifinės pagalbinės T ląstelės. T-pagalbininkų atsakas į baltymą-nešiklį padidina antikūnų prieš polisacharidą produkciją.

Buvo parodyta, kad B serogrupės polisacharidas yra silpnai imunogeninis arba neimunogeninis žmonių populiacijos atveju (Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, G.L., Tramont, E.C., Kasper, D.L., Altieri, P.L., Berman, S.L., Lowenthal, J.P. (1972) *The Journal of Infectious Diseases*, 126, pp. 514-522). Šios serogrupės polisacharido cheminis prijungimas prie baltymų nežymiai pakeitė laboratorinių gyvūnų imuninį atsaką (Jennings, H.J. and Lugowski, C. (1981) *The Journal of Immunology* 127, pp. 1011-1018). Manoma, kad šios serogrupės polisacharido imuninio atsako nebuvimas atsiranda dėl struktūrinių panašumų tarp B serogrupės polisacharido ir polisialilintų šeimininko glikoproteinų, tokių kaip nervinių ląstelių adhezijos molekulės.

Buvo aprašyta meningokokinė konjuguota vakcina C serogrupės polisacharido pagrindu. Ši viervalentė vakcina išgauna stiprų funkcinį antikūnų atsaką į kapsulinį polisacharidą, esantį ant C serogrupę atitinkančių *N. meningitidis* kamienų. Tokia vakcina gali apsaugoti tik nuo C serogrupės bakterijų sukeltos ligos.

Dabar esančios vakcinos meningokokinio polisacharido pagrindu yra riboto naudojimo vakcinos mažiems vaikams ir neduoda ilgalaikės apsaugos suaugusiems. Vienintelė meningokokinė vakcina, kuri, kaip buvo parodyta, gali duoti ilgalaikę apsaugą nuo meningokokinės infekcijos rizikos visoms grupėms, įskaitant vaikus, remiasi polisacharidu iš vienos *N. meningitidis* serogrupės ir neduoda apsaugos nuo infekcijos kitomis serogrupėmis. Taigi, egzistuoja poreikis meningokokinės konjuguotos vakcinos, galinčios suteikti plačią, ilgalaikę apsaugą nuo meningokokinės ligos vaikams ir suaugusiems, susijusiems su meningokokinės infekcijos rizika. Šio išradimo daugiavalenčiai meningokokiniai polisacharidai išsprendžia šį poreikį, pateikiant vakcinos kompozicijas, kuriose imunogeniniai polisacharidai iš daugumos *N. meningitidis* patogeninių serogrūpių buvo paversti T-priklausomais antigenais sujungiant juos su baltymais-nešikliais.

#### IŠRADIMO SANTRAUKA

Šiame išradime yra pateikiamos meningokokinio polisacharido-baltymo konjugato imunologinės kompozicijos gydymui ligų, kurias sukelia patogeninis *Neisseria meningitidis*.

Šiame išradime yra pateikiamos imunologinės kompozicijos, turinčios du arba daugiau baltymo-polisacharido konjugatų, kur kiekviename konjugate yra kapsulinis polisacharidas iš skirtingos *N. meningitidis* serogrupės, sujungtas su baltymu-nešikliu.

Šiame išradime yra pateikiamos imunologinės kompozicijos, turinčios du arba daugiau atskirų baltymo-polisacharido konjugatų, kur kiekviename konjugate yra kapsulinis polisacharidas iš skirtingos *N. meningitidis* serogrupės, sujungtas su baltymu-nešikliu.

Šiame išradime yra pateikiamos meningokokinio polisacharido-baltymo konjugato vakcinos nuo patogeninio *Neisseria meningitidis*. Šiame išradime yra pateikiamos daugiavalentės meningokokinės vakcinos, sudarytos iš imunologiškai efektyvių kiekių 2-4 atskirų baltymo-polisacharido konjugatų, kur kiekvienas konjugatas turi skirtingą kapsulinį polisacharidą, sujungtą su baltymu-nešikliu, ir kur kiekvienas kapsulinis polisacharidas yra pasirinktas iš grupės, kurią sudaro kapsuliniai polisacharidai iš A, C, W-135 ir Y serogrūpių.

Šiame išradime taip pat yra pateikiami daugiavalentės meningokokinio polisacharido-baltymo kompozicijos pagaminimo būdai, susidedantys iš dviejų arba daugiau kapsulinių polisacharidų iš patogeninių *Neisseria meningitidis* išskyrimo; išskirtų polisacharidų prijungimo prie vieno arba daugiau baltymų-nešiklių ir konjugatų sumaišymo pagaminant daugiavalentę meningokokinio polisacharido-baltymo kompoziciją.

Šiame išradime taip pat yra pateikiamas imunologinio atsako į *N. meningitidis* kapsulinį polisacharidą indukavimo būdas, apimantis šio išradimo imunologinės kompozicijos imunologiškai aktyvaus kiekio įvedimą žmogui arba gyvūnui.

Šiame išradime yra pateikiama daugiavalentė meningokokinė vakcina, sudaryta iš imunologiškai efektyvių kiekių 2-4 atskirų baltymo-polisacharido konjugatų, kur kiekvienas konjugatas turi skirtingą kapsulinį polisacharidą, sujungtą su baltymu-nešikliu, ir kur kiekvienas kapsulinis polisacharidas yra pasirinktas iš grupės, kurią sudaro kapsuliniai polisacharidai iš A, C, W-135 ir Y serograpių.

Šiame išradime yra pateikiamas žmogaus arba gyvūno, imlaus užkrėtimui *N. meningitidis*, apsaugojimo būdas, apimantis šio išradimo vakcinos imunologiškai efektyvios dozės įvedimą žmogui arba gyvūnui.

Visi patentai, patentinės paraiškos ir kitos čia cituojamos publikacijos yra pridamos kaip literatūros šaltiniai.

## SMULKUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Šis išradimas apima dviejų arba daugiau atskirų baltymo-polisacharido konjugatų imunologinę kompoziciją, kurioje kiekvienas iš konjugatų turi kapsulinį polisacharidą, sujungtą su baltymu-nešikliu. Taigi, šis išradimas apima kompozicijas, kurios susideda iš dviejų arba daugiau kapsulinių polisacharidų, sujungtų su vienu arba daugiau baltymų-nešiklių.

Kapsuliniai polisacharidai gali būti pagaminti pagal standartines specialistams žinomas metodikas. Šiame išradime pirmenybė teikiama kapsuliniams polisacharidams iš *N. meningitidis* A, C, W-135 ir Y serograpių.

Tinkamiausiame įgyvendinimo variante šių meningokokinių serograpių konjugatai yra pagaminti atskirais būdais ir sukomponuoti į vienos dozės

vaisto formą. Pavyzdžiui, kapsuliniai polisacharidai iš *N. meningitidis* A, C, W-135 ir Y serograpių yra atskirai išgryninti.

Tinkamiausiame šio išradimo įgyvendinimo variante išgrynintas polisacharidas, prieš prijungiant jį prie baltymo, yra depolimerizuojamas ir aktyvuojamas. Tinkamiausiame šio išradimo įgyvendinimo variante kapsulinis polisacharidas iš *N. meningitidis* A, C, W-135 ir Y serograpių yra dalinai depolimerizuojamas naudojant švelnias oksidacines sąlygas.

Po šios polisacharidų depolimerizacijos arba dalinės depolimerizacijos gali eiti aktyvacijos stadija. Terminas "aktyvacija" reiškia cheminį polisacharido apdorojimą taip, kad būtų gaunamos cheminės grupės, galinčios reaguoti su baltymu-nešikliu. Tinkamiausiais aktyvacijos metodais yra veikimas adipo rūgšties dihidrazidu fiziologiniame tirpale pH  $5,0 \pm 0,1$  maždaug dvi valandas 15-30 °C temperatūroje. Vienas aktyvacijos būdas yra aprašytas JAV patente 5965714.

Po aktyvacijos kapsuliniai polisacharidai gali būti sujungiami su vienu arba daugiau baltymų-nešiklių. Tinkamiausiame šio išradimo įgyvendinimo variante kiekvienas kapsulinis polisacharidas yra atskirai sujungiamas su vienu baltymu-nešikliu. Tinkamiausiame įgyvendinimo variante kapsuliniai polisacharidai iš *N. meningitidis* A, C, W-135 ir Y serograpių yra kiekvienas atskirai sujungiami su tuo pačiu baltymu-nešikliu.

Baltymais-nešikliais gali būti inaktyvuoti bakteriniai toksinai, tokie kaip difterito toksoidas CRM197, stabligės toksoidas, kokliušo toksoidas, *E. coli* LT, *E. coli* ST ir egzotoksinas A iš *Pseudomonas aeruginosa*. Taip pat gali būti naudojami bakterijų išorinių membranų baltymai, tokie kaip išorinių membranų c kompleksas (OMPC), porinai, transferiną rišantys baltymai, pneumolizės, pneumokokinis paviršiaus A baltymas (PspA) arba pneumokokinis adhezinis baltymas (PsaA). Baltymais-nešikliais taip pat gali būti naudojami kiti baltymai, tokie kaip ovalbuminas, sraigės limfos hemocianinas (KLH), jaučio serumo albuminas (BSA) arba tuberkulino išgrynintas tuberkulino baltymo darinys (PPD). Pageidautina, kad baltymais-nešikliais būtų baltymai, kurie yra netoksiški ir nesukelia reakcijos ir kad būtų galima gauti jų pakankamus kiekius ir pakankamo grynumo. Baltymai-nešikliai turėtų būti tinkami naudoti standartinio sujungimo metodikose. Tinkamiausiame šio išradimo įgyvendinimo variante baltymu-nešikliu yra

naudojamas difterito toksinas, išskirtas iš *Corynebacteria diphtheriae* kultūrų ir chemiškai detoksikuotas naudojant formaldehidą.

Po kapsulinio polisacharido sujungimo su baltymu-nešikliu polisacharido-baltymo konjugatai gali būti gryninami (praturtinami polisacharido-baltymo konjugato požiūriu) panaudojant įvairias metodikas. Vienas gryninimo stadijos tikslas yra pašalinti nesurištą polisacharidą iš polisacharido-baltymo konjugato. Vienas gryninimo būdas, į kurį įeina ultrafiltracija esant amonio sulfato, yra aprašytas JAV patente 6146902. Kitu atveju, konjugatai gali būti išgryninami nuo nesureagavusio baltymo ir polisacharido panaudojant daugelį standartinių metodikų, įskaitant, tarp kitų, molekulinę sietų chromatografiją, centrifugavimą tankio gradientu, hidrofobinės sąveikos chromatografiją arba frakcionavimą su amonio sulfatu. Žr., pvz., P.W. Anderson, et al. (1986) J. Immunol. 137: 1181-1186. Žr. taip pat H.J. Jennings and C. Lugowski (1981) J. Immunol. 127: 1011-1018.

Po polisacharido ir baltymo nešiklio sujungimo šio išradimo imunologinė kompozicija yra pagaminama sumaišant įvairius polisacharido-baltymo konjugatus. Šio išradimo imunologinė kompozicija susideda iš dviejų arba daugiau skirtingų kapsulinių polisacharidų, sujungtų su vienu arba daugiau baltymų-nešiklių. Tinkamas šio išradimo įgyvendinimo variantas yra divalentė imunologinė kompozicija, susidedanti iš kapsulinių polisacharidų iš *N. Meningitidis* A ir C serograpių, sujungtų su difterito toksoidu. Dar tinkamesnis šio išradimo variantas yra keturvalentė imunologinė kompozicija, susidedanti iš kapsulinių polisacharidų iš *N. Meningitidis* A, C, W-135 ir Y serograpių, sujungtų su difterito toksoidu.

Baltymų-nešiklių pagaminimas ir panaudojimas bei įvairios galimos sujungimo metodikos yra gerai žinomos specialistams. Tokie patyrę asmenys gali pagaminti šio išradimo konjugatus, naudodami šiame išradime esančias metodikas bei informaciją, nesunkiai randamą bendroje literatūroje. Patarimų taip pat galima rasti bet kuriame arba ir visuose šiuose JAV patentuose: U.S. 4356170; U.S. 4619828; U.S. 5153312; U.S. 5422427 ir U.S. 5445817.

Šio išradimo imunologinės kompozicijos yra padaromos atskirai pagaminant polisacharido-baltymo konjugatus iš skirtingų meningokokinių serograpių ir po to sumaišant šiuos konjugatus. Šio išradimo imunologinės kompozicijos gali būti naudojamos kaip vakcinos. Šių vakcinų

sukomponavimas gali būti atliekamas naudojant šioje srityje pripažintus būdus. Šio išradimo vakcinų kompozicijose taip pat gali būti vienas arba daugiau adjuvantų. Adjuvantais yra (kaip pavyzdžiai, bet jais neapsiribojama) aliuminio adjuvantai, Froindo adjuvantas, BAY, DC-cholis, pcpp, monofosforil-lipidas A, CpG, QS-21, choleros toksinas ir formilmetionilpeptidas. Žr., pvz., Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, 1995 (M.F. Powell and M.J. Newman, eds., Plenum Press, NY). Tinkamiausias adjuvantas yra aliuminio adjuvantas, toks kaip aliuminio hidroksidas arba aliuminio fosfatas.

Kaip parodyta toliau, šio išradimo vakcinos ir imunologinės kompozicijos iššaukia panašų į T-priklausomą imuninį atsaką įvairiuose gyvūnų modeliuose, tuo tarpu kai polisacharidinė vakcina iššaukia panašų į T-nepriklausomą imuninį atsaką. Taigi, šio išradimo kompozicijos yra taip pat naudingos tyrimo priemonės tiriant biologinius kelius ir procesus, susijusius su panašiu į T-priklausantį imuninį atsaką į *N. meningitidis* antigenus.

Šio išradimo vakcinos tam tikras kiekis gali būti įvedamas žmogui arba gyvūnui, o įvedimo režimas gali būti nustatytas pagal gerai žinomas farmacijoje ir veterinarijoje standartines metodikas, atsižvelgiant į tokius faktorius kaip konkretus antigenas, adjuvantas (jeigu yra), konkretaus gyvūno arba paciento amžius, lytis, svoris, rūšis ir būklė bei įvedimo būdas. Šiame išradime polisacharido-baltymo-nešiklio kiekis efektyviai vakcinacijos prieš *N. meningitidis* dozei pateikti gali būti tarp maždaug 0,02 µg iki maždaug 5 µg kilogramui kūno masės. Tinkamiausios šio išradimo kompozicijos ir būdo atveju dozė yra tarp maždaug 0,1 µg ir 3 µg kilogramui kūno masės. Pavyzdžiui, efektyviai dozei reikės mažiau antikūnų, jeigu praėjo mažiau laiko po infekcijos, nes buvo mažiau laiko bakterijų proliferacijai įvykti. Panašiu būdu efektyvi dozė priklausys nuo bakterijų kiekio diagnozės metu. Terapiniam naudojimui gali reikėti daugelio injekcijų, leidžiamų keletą dienų.

Šio išradimo daugiavalenčiai konjugatai gali būti įvedami kaip vienkartinė dozė arba serijomis (t.y. kaip "pakartotinis skiepijimas" arba "pakartotiniai skiepijimai"). Pavyzdžiui, vaikas gali gauti vienkartinę dozę gyvenimo pradžioje, po to pakartotiną dozę po iki 10 metų, kaip dabar yra rekomenduojama kitų vakcinų atveju vaikiškų ligų prevencijai.

Pakartotina dozė generuos antikūnus iš primuotų B-ląstelių, t.y. anamnezinį atsaką. Tai yra daugiavalentė konjugatinė vakcina iššaukia aukštą pirminį (t.y. po vienkartinio vakcinos įvedimo) funkcinį antikūnų atsaką jaunesnėje populiacijoje, lyginant su licenzijuota polisacharidine vakcina ir gali iššaukti anamnezinį atsaką (t.y. po papildomo įvedimo), kas rodo, kad daugiavalentės konjugatinės vakcinos iššauktas apsauginis imuninis atsakas yra ilgalaikis.

[ Šio išradimo kompozicijas gali įeiti skysti preparatai vartojimui per organizmo angas, t.y. oraliniu, nosiniu, analiniu, vaginaliniu, peroraliniu, įvedant į skrandį, per gleivinę (pvz. liežuvio, alveolių, dantenu, uodžiamąją arba respiratorinę gleivinę) ir t.t., tokie kaip suspensijos, sirupai arba eleksyrai; ir preparatai parenteriniam, poodiniam, intraderminiam, intraraumeniniam, intraperitoniniam arba intraveniniam vartojimui (pvz. vartojimui injekcijų pavidalu), tokie kaip sterilios suspensijos arba emulsijos. Tinkamiausias vartojimo būdas yra intraveninis arba parenterinis. Į tokias kompozicijas gali būti pridėta tinkamo nešiklio, skiediklio arba pagalbinės medžiagos, tokios kaip sterilus vanduo, fiziologinis druskos tirpalas, gliukozė ir panašių. Šios kompozicijos taip pat gali būti liofilizuotos. Kompozicijose gali būti papildomų medžiagų, tokių kaip drėkinantys arba emulguojantys agentai, pH buferinantys agentai, gelį sudarantys arba klampumą padidinantys priedai, apsaugančios medžiagos, skonį suteikiantys agentai, spalvą suteikiančios medžiagos ir panašios, priklausomai nuo vartojimo būdo ir norimo preparato. Norint pagaminti tinkamus preparatus per daug neeksperimentuojant, patarimų galima rasti standartiniuose tekstuose, kaip antai "Remington's Pharmaceutical Science", 17<sup>th</sup> edition, 1985, kuris duodamas kaip literatūros šaltinis.

Šio išradimo kompozicijas yra patogų pateikti kaip skystus preparatus, pvz., izotoninius vandeninius tirpalus, suspensijas, emulsijas arba klampias kompozicijas, kurios gali būti buferuojamos iki pasirinkto pH. Jeigu pirmenybė yra teikiama virškinimo traktui, šio išradimo kompozicijos gali būti "kietoje" piliulių, tablečių, kapsulių, kaplečių ir pan. formoje, įskaitant "kietus" preparatus, kurie yra prolanguoti arba kurie turi skystą užpildą, pvz. želatina padengtas skystis, kur skrandyje želatina ištirpsta ir paduodama į žarnyną. Jeigu yra pageidautinas vartojimas per nosį arba kvėpavimo traktą (per

gleivinę), kompozicijos gali būti tokios formos, kad būtų išskiriama panaudojant slėgiu išpurškiantį dispenserį, siurblinį dispenserį arba aerosolinį dispenserį. Aerosoliai yra paprastai suslėgti panaudojant angliavandenilį. Siurbliniai dispenseriai gali paduoti matuojamą dozę arba dozę, kuri turi konkretų dalelių dydį.

Paprastai yra lengviau pagaminti skystus preparatus nei gelius, kitas klampus kompozicijas ir kietas kompozicijas. Be to, skystas kompozicijas yra šiek tiek patogiau įvesti, ypač mažiems vaikams ir kitiems, kurie turi sunkumų praryti piliulę, tabletę, kapsulę ir panašias, arba situacijose, kai reikia daug dozių. Antra vertus, gali būti pagamintos tam tikro klampumo klampios kompozicijos, kad būtų galima gauti ilgesnius kontaktus su gleivine, pavyzdžiui, padengiant skrandį arba nosies gleivinę.

Suprantama, kad tinkamų nešiklių ir kitų priedų pasirinkimas priklausys nuo tikslaus vartojimo būdo ir konkrečios dozuotos formos prigimties, pvz., skystos dozuotos formos (pvz., kur kompozicija yra paruošta tirpalo, suspensijos, gelio arba kitos skystos formos pavidalu) arba kietos dozuotos formos (pvz., kur kompozicija yra paruošta piliulės, tabletės, kapsulės, kapletės, prolanguoto veikimo formos arba skysčiu užpildytos formos pavidalu).

Tirpalai, suspensijos ir geliai, apart veikliojo ingrediento, paprastai turi didelį kiekį vandens (pageidautina išgryninto vandens). Taip pat juose gali būti nedideli kiekiai kitų ingredientų, tokių kaip pH reguliuojančių medžiagų (pvz. bazės, tokios kaip NaOH), emulsiklių arba disperguojančių agentų, buferinančių agentų, apsaugančių medžiagų, drėkinančių medžiagų, gelį sudarančių medžiagų (pvz., metilceliuliozės), spalvą ir/arba skonį suteikiančių medžiagų. Šios kompozicijos gali būti izotoninės, t.y. jos gali turėti tą patį osmoso slėgį kaip kraujas ir ašarų skystis.

Šio išradimo kompozicijų norimas izotoniškumas gali būti pasiekiamas naudojant natrio tartrata, propilenglikolį arba kitus neorganinius arba organinius tirpinius. Tinkamiausias yra natrio chloridas, ypač natrio jonų turinčių buferių atveju.

Pasirinkto lygio kompozicijos klampumas gali būti išlaikomas naudojant farmaciškai priimtina tirštinantį agentą. Tinkamiausia yra metilceliuliozė, nes ji

nesunkiai ir ekonomiškai prieinama ir su ja lengva dirbti. Kitais tinkamais tirštinančiais agentais yra, pavyzdžiui, ksantano derva, karboksimetilceliuliozė, hidroksipropilceliuliozė, karbomeras ir panašios medžiagos. Tinkamiausia tirštinančio agento koncentracija priklausys nuo pasirinkto agento. Svarbu naudoti tokį kiekį, kuris duos pasirinktą klampumą. Klampios kompozicijos paprastai yra pagaminamos iš tirpalų, pridedant tokių tirštinančių agentų.

Farmaciškai priimtinos apsaugančios medžiagos gali būti naudojamos kompozicijos laikymo laikui pailginti. Tinkama medžiaga gali būti benzilo alkoholis, tačiau taip pat gali būti naudojama daug įvairiausių kitų apsaugančių medžiagų, įskaitant, pavyzdžiui, parabenus, timerosalį, chlorbutanolį arba benzalkonio chloridą. Tinkama apsaugančios medžiagos koncentracija bus nuo 0,02 % iki 2 % skaičiuojant nuo bendros masės, nors gali būti pastebimų nukrypimų priklausomai nuo pasirinkto agento.

Specialistai pripažins, kad kompozicijos komponentai turi būti pasirinkti taip, kad jie būtų chemiškai inertiški *N. meningitidis* polisacharido-baltymo-nešiklio konjugato požiūriu.

Toliau šis išradimas bus aprašomas remiantis toliau duodamais iliustraciniais, neapribojančiais pavyzdžiais, smulkiai parodančiais keletą tinkamiausių šio išradimo įgyvendinimo variantų. Kiti šio išradimo pavyzdžiai bus aiškūs specialistams nenukrypstant nuo išradimo esmės.

## PAVYZDŽIAI

### 1 pavyzdys

***Neisseria meningitidis A, C, W-135 ir Y serogrupių išgrynintų kapsulinių polisacharidų miltelių pagaminimas***

#### Negrynintos pastos preparatas

Atskiros *Neisseria meningitidis* A, C, W135 ir Y drėgnai užšaldytos sėklinės kultūros buvo atšildytos, išimtos panaudojant skystą Watson Scherp terpę ir pasėtos į Blake butelius, kuriuose yra Mueller Hinton agaro terpės. Blake buteliai buvo inkubuojami 35-37 °C temperatūroje CO<sub>2</sub> atmosferoje 15-

19 valandų. Po inkubacijos laikotarpio išaugusios kultūros buvo išimtos iš Blake butelių ir sudėtos į 4 l talpos kolbas su Watson Scherp terpe. Kolbos buvo inkubuojamos 35-37 °C temperatūroje 3-7 valandas ant platforminės purtyklės. Keturių litrų talpos kolbų turinys buvo perkeltas į fermentacijos indą su Watson Scherp terpe. Fermentacijos indas buvo inkubuojamas 35-37 °C temperatūroje 7-12 valandų, kontroliuojant ištirpusio deguonies kiekį ir pH pridedant papildomo maisto ir putas naikinančių priedų. Po inkubacijos laikotarpio fermentacijos indo turinys buvo perkeltas į 500 l talpos baką, pridedama Cetavlon'o ir medžiaga maišoma 1 valandą. Cetavlon'u paveikta išaugusi kultūra buvo centrifuguojama esant apie 15000-17000xg ir maždaug 30-70 litrų per valandą srauto greičiui. Negrynas polisacharidas buvo nusodintas iš nuopilo antra Cetavlon'o porcija. Į šį nuopilą pridedama Cetavlon'o ir medžiaga maišoma mažiausiai 1 valandą kambario temperatūroje. Ši medžiaga laikoma 1-5 °C temperatūroje 8-12 valandų. Nusėdęs polisacharidas surenkamas centrifuguojant esant apie 45000-50000xg ir 300-400 ml per minutę srauto greičiui. Surinkta pasta laikoma –60 °C arba žemesnėje temperatūroje iki tolesnio apdorojimo.

#### Išgrynintų polisacharido miltelių preparatas

Inaktyvuota pasta atšildoma ir perkeliama į maišyklę. Pasta maišoma su 0,9 M kalcio chloridu pagaminant homogeninę suspensiją. Ši suspensija centrifuguojama esant maždaug 10000xg 15 minučių. Nuopilas nudekantuojamas per medvilnės išklotą padėklą į konteinerį kaip pirmasis ekstraktas. Į pastą įpilamas antras 0,9 M kalcio chlorido tūris ir maišoma pagaminant homogeninę suspensiją. Ši suspensija centrifuguojama, kaip aprašyta aukščiau, ir nuopilas sumaišomas su nuopilu iš pirmosios ekstrakcijos. Atliekamos iš viso keturios ekstrakcijos ir supilami nuopilai kartu. Šie supilti ekstraktai koncentruojami ultrafiltracijos būdu naudojant 10-30 kDa MWCO spiralinius ultrafiltracijos elementus.

Į koncentratą pridedama magnio chlorido ir naudojant natrio hidroksidą pH sureguliuojamas iki 7,2-7,5. Į šį koncentratą pridedama DNazės ir RNazės ir inkubuojama maišant 25-28 °C temperatūroje 4 valandas. Pridedama etanolio iki 30-50 % koncentracijos. Nusėdusi nukleorūgštis ir baltymas

pašalinami centrifuguojant esant 10000xg 2 valandas. Išskiriamas nuopilas ir polisacharidas nusodinamas pridedant etanolio iki 80 % ir paliekant stovėti per naktį 1-5 °C temperatūroje. Alkoholis ištraukiamas ir polisacharido nuosėdos centrifuguojamos 5 minutes esant 10000xg. Nusodintas polisacharidas plaunamas alkoholiu. Polisacharidas plaunamas acetonu ir centrifuguojamas 15-20 minučių esant 10000xg. Polisacharidas išdžiovinamas vakuume. Pradiniai polisacharido milteliai ištirpinamai natrio acetato tirpale. Pridedama magnio chlorido ir naudojant natrio hidroksidą pH sureguliuojamas iki 7,2-7,5. Į šį tirpalą pridedama DNazės ir RNazės ir inkubuojama 25-28 °C temperatūroje maišant 4 valandas likusioms nukleorūgštims pašalinti. Po inkubavimo su šiais fermentais į polisacharido-fermento mišinį pridedamas toks pat tūris natrio acetato-fenolio tirpalo ir palaikoma ant platforminės purtyklės 1-5 °C temperatūroje apytikriai 30 minučių. Mišinys centrifuguojamas esant 10000xg 15-20 minučių. Nuimamas ir saugomas viršutinis vandeninis sluoksnis. Į šį vandeninį sluoksnį pridedamas toks pats tūris natrio acetato-fenolio tirpalo ir ekstrahuojama kaip aprašyta aukščiau. Atliekamos iš viso keturios ekstrakcijos baltymui ir endotoksinui pašalinti iš polisacharido tirpalo. Sumaišyti vandeniniai ekstraktai praskiedžiami iki 10 kartų vandeniu injekcijoms ir diafiltruojami prieš 10 tūrių vandens injekcijoms. Į diafiltruotą polisacharidą pridedama kalcio chlorido. Polisacharidas nusodinamas per naktį 1-5 °C temperatūroje pridedant etanolio iki 80 %. Alkoholinis nuopilas nupilamas ir surinktas polisacharidas surenkamas centrifuguojant 15 minučių esant 10000xg. Išgrynintas polisacharidas plaunamas du kartus etanolio ir vieną kartą acetonu. Perplauti milteliai džiovinami vakuume eksikatoriuje. Išdžiovinti milteliai laikomi -30 °C arba žemesnėje temperatūroje iki pavertimo konjugatu.

## 2 pavyzdys

### ***Neisseria meningitidis A, C, W-135 ir Y serogrupių išgrynintų kapsulinių polisacharidų miltelių depolimerizacija***

Šiam preparatui gauti naudojamos medžiagos yra išgryninti kapsulinio polisacharido iš *Neisseria meningitidis A, C, W-135 ir Y* serogrupių milteliai (pagaminti pagal 1 pavyzdį), sterilus 50 mM natrio acetato buferis, pH 6,0,

sterili 1N hidrochlorido rūgštis, sterilus 1N natrio hidroksidas, 30 % vandenilio peroksidas ir sterilus fiziologinis druskos tirpalas (0,85 % natrio chloridas).

Kiekvienos serogrupės polisacharidas yra depolimerizuojamas atskiroje reakcijoje. Į nerūdijančio plieno baką įdedama iki 60 g išgryninto kapsulinio polisacharido miltelių. Į šį polisacharidą pridedama sterilaus 50 mM natrio acetato buferio, pH 6,0, kad polisacharido koncentracija būtų 2,5 g litre. Polisacharido tirpalas maišomas 1-5 °C temperatūroje 12-24 valandas, kad ištirptų. Reakcijos indas prijungiamas prie šilumokaičio elemento. Dar pridedama 50 mM natrio acetato buferio, pH 6,0, kad polisacharido koncentracija reakcijai vykdyti pasidarytų 1,25 g litre. Šis polisacharido tirpalas kaitinamas  $55 \pm 0,1$  °C temperatūroje. Į reakcijos mišinį dedamos 30 % vandenilio peroksido alikvotos, kad koncentracija reakcijos mišinyje būtų 1 % vandenilio peroksido.

Reakcijos eiga kontroliuojama sekant polisacharido molekulės dydžio pasikeitimą laikui bėgant. Kas 15-20 minučių iš reakcijos mišinio paimamos alikvotos ir suleidžiamos į HPSEC kolonėlę polisacharido molekulės dydžiui matuoti. Kai polisacharido molekulės dydis pasiekia tikslinį molekulės dydį, šildymo elementas išjungiamas ir polisacharido tirpalas greitai atšaldomas iki 5 °C leidžiant cirkuliuoti ledinį vandenį iš vonios. Depolimerizuoto polisacharido tirpalas sukonzentruojamas iki 15 g/litre prijungiant reakcijos baką prie ultrafiltracijos elemento su 3000 MWCO regeneruotos celiuliozės patronų. Sukonzentruotas depolimerizuoto polisacharido tirpalas diafiltruojamas prieš 10 tūrių sterilaus fiziologinio druskos tirpalo (0,85 % natrio chlorido). Depolimerizuotas polisacharidas laikomas 1-5 °C temperatūroje iki kitos proceso stadijos.

Depolimerizuoto polisacharido molekulės dydis buvo nustatomas perleidžiant per gel-filtracijos chromatografijos kolonėlę, parduodamą pagal prekės vardą "Ultrasphacel<sup>TM</sup> 250", kuri buvo kalibruota naudojant dekstraninius molekulių dydžio standartus ir pagal daugiakampę lazerio šviesos sklaidą. Polisacharido kiekis buvo nustatytas pagal fosforo kiekį A serogrupei naudojant Bartlett, G.R.J. (1959) Journal of Biological Chemistry, 234, pp. 466-468 aprašytą metodą, ir pagal sialo rūgšties kiekį C, W135 ir Y serogrupėms naudojant Svennerholm, L. (1955) Biochimica Biophysica Acta 24, pp. 604-611 aprašytą metodą. O-acetilo kiekis buvo nustatytas pagal

Hesterin, S. (1949) Journal of Biological Chemistry 180, p. 249 aprašytą metodą. Redukcijos aktyvumas buvo nustatytas pagal Park, J.T. and Johnson, M.J. (1949) Journal of Biological Chemistry 181, pp. 149-151 aprašytą metodą. Depolimerizuoto polisacharido struktūrinis vientisumas buvo nustatytas pagal baltymų  $^1\text{H}$  ir  $^{13}\text{C}$  BMR. Depolimerizuoto polisacharido grynumas buvo nustatytas matuojant LAL (endotoksino) kiekį ir liekamojo vandenilio peroksido kiekį.

### 3 pavyzdys

#### ***Neisseria meningitidis A, C, W-135 ir Y serogrupių depolimerizuoto polisacharido darinių gavimas***

Šiam preparatui gauti naudojamos medžiagos yra vandenilio peroksidu depolimerizuotas kapsulinis polisacharidas iš *Neisseria meningitidis* A, C, W-135 ir Y serogrupių (pagamintas pagal 2 pavyzdį), adipo rūgšties dihidrazidas, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidazas (EDAC) tik A serogrupei, natrio cianborhidridas, sterili 1N hidrochlorido rūgštis, sterilus 1N natrio hidroksidas, sterilus 1M natrio chloridas ir sterilus fiziologinis druskos tirpalas (0,85 % natrio chloridas).

Kiekvienos serogrupės polisacharido darinys buvo gaminamas atskiroje reakcijoje. Į nerūdijančio plieno baką buvo pridedama išgryninto depolimerizuoto polisacharido ir praskiedžiama steriliu 0,85 % fiziologiniu druskos tirpalu, kad galutinė polisacharido koncentracija būtų 6 g/litre. Į šį tirpalą pridedama alikvota koncentruoto adipo rūgšties dihidrazido, ištirpinto steriliame 0,85 % fiziologiniame tirpale, kad reakcijos mišinio koncentracija būtų 1 g litre. Tik A serogrupės atveju pridedama alikvota koncentruoto EDAC, ištirpinto steriliame 0,85 % fiziologiniame tirpale, gaunant reakcijos mišinio koncentraciją 1 g litre. pH sureguliuojamas iki  $5,0 \pm 0,1$  ir šis pH buvo palaikomas 2 valandas, naudojant sterilią 1N hidrochlorido rūgštį ir sterilų 1N natrio hidroksidą kambario temperatūroje ( $15-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Po 2 valandų į reakcijos mišinį pridedama alikvota koncentruoto natrio cianoborhidrido, ištirpinto 0,85 % fiziologiniame tirpale, kad reakcijos mišinio koncentracija būtų 2 g litre. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje ( $15-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ )  $44 \pm 4$  valandas, pH palaikant  $5,5 \pm 0,5$ . Praėjus šiam reakcijos laikui, pH

sureguliuojamas iki  $6,0 \pm 0,1$  ir polisacharido darinys sukonzentruojamas iki 12 g polisacharido litre, prijungiant reakcijos baką prie ultrafiltracijos elemento su 3000 MWCO regeneruotos celiuliozės patronų. Sukonzentruotas polisacharido darinys dializuojamas prieš 30 tūrių 1M natrio chlorido, po to 10 tūrių 0,15 M natrio chlorido. Bakas atjungiamas nuo ultrafiltracijos elemento ir laikomas 1-5 °C temperatūroje 7 dienas. Bakas vėl prijungiamas prie ultrafiltracijos elemento su 3000 MWCO regeneruotos celiuliozės patronų ir diafiltruojama prieš 30 tūrių 1M natrio chlorido, o po to prieš 10 tūrių 0,15 M natrio chlorido.

Polisacharido darinio molekulinis dydis, polisacharido kiekis ir O-acetilo kiekis buvo matuojami tais pačiais metodais, kaip ir naudoti depolimerizuotam polisacharidui. Hidrazido kiekis buvo matuojamas panaudojant 2,4,6-trinitrobenzensulfonrūgšties metodą, kurį aprašė Snyder, S.L. and Sobocinski, P.Z. (1975) *Analytical Biochemistry* 64, pp. 284-288. Polisacharido darinio struktūrinis vientisumas buvo nustatytas protonų  $^1\text{H}$  ir  $^{13}\text{C}$  BMR. Polisacharido darinio grynumas buvo nustatytas matuojant neprijungto hidrazido kiekį, LAL (endotoksino) kiekį ir likusio cianborhidrido kiekį.

#### 4 pavyzdys

##### *Baltymo-nešiklio pagaminimas*

##### Negryninto difterito toksoido baltymo pagaminimas

Liofilizuotos sėklinės kultūros buvo praskiestos ir inkubuotos 16-18 valandų. Šios kultūros alikvota buvo įdėta į 0,5 litro talpos kolbą su auginimo terpe ir ši kolba buvo inkubuota 34,5-36,5 °C temperatūroje rotorinėje purtyklėje 7-9 valandas. Alikvota iš šios kolbos su kultūra buvo įdėta į 4 litrų talpos kolbą su auginimo terpe ir ši kolba buvo inkubuota 34,5-36,5 °C temperatūroje rotorinėje purtyklėje 14-22 valandas. Kultūros iš 4 litrų kolbos buvo naudojamos fermentatoriui su auginimo terpe inokuliuoti. Fermentatorius buvo inkubuojamas 34,5-36,5 °C temperatūroje 70-144 valandas. Fermentatoriaus turinys buvo nufiltruotas per giluminius filtrus į surinkimo indą. Į išaugintą medžiagą buvo pridėta formaldehido tirpalo (37 %) alikvota, kad koncentracija būtų 0,2 %. pH buvo sureguliuotas iki 7,4-7,6. Išauginta

medžiaga buvo nufiltruota per 0,2 mikronų filtrinį patroną į sterilius 20 litrų butelius. Buteliai buvo inkubuoti 34,5-36,5 °C temperatūroje 7 dienas. Į kiekvieną 20 litrų butelį buvo pridėta formaldehido tirpalo (37 %) alikvota, kad koncentracija būtų 0,4 %. Mišinių pH buvo sureguliuotas iki 7,4-7,6. Buteliai buvo inkubuoti 34,5-36,5 °C temperatūroje 7 dienas purtyklėje. Į kiekvieną 20 litrų butelį buvo pridėta formaldehido tirpalo (37 %) alikvota, kad koncentracija būtų 0,5 %. Mišinių pH buvo sureguliuotas iki 7,4-7,6. Buteliai buvo inkubuoti 34,5-36,5 °C temperatūroje 8 savaites. Buvo tikrinta negryno toksoido detoksifikacija. Tyrimo laikotarpiu buteliai buvo laikomi 1-5 °C temperatūroje.

#### Negryno difterito toksoido baltymo gryninimas

Negrynas toksoidas buvo paliktas atšilti iki kambario temperatūros ir 20 litrų buteliai buvo supilti į gryninimo baką. Toksoido pH buvo sureguliuojamas iki 7,2-7,4, į negryną toksoidą pridedama aktyvuotos anglies ir maišoma 2 minutes. Aktyvuotos anglies ir toksoido mišinys paliekamas stovėti 1 valandą, po to nufiltruojamas per giluminį filtrinį patroną į antrą gryninimo baką. Į filtratą pridedama kieto amonio sulfato, kad būtų gaunamas 70 % įsisotinimas. pH sureguliuojamas iki 6,8-7,2 ir tirpalas paliekamas stovėti 16 valandų. Nusėdęs baltymas nufiltruojamas ir plaunamas 70 % prisotinimo amonio sulfato tirpalu, pH 7,0. Nuosėdos ištirpinamos steriliame distiliuotame vandenyje ir baltymo tirpalas nufiltruojamas į nerūdijančio plieno surinkimo indą. pH sureguliuojamas iki 6,8-7,2 ir pridedama amonio sulfato iki 40 % įsisotinimo. Tirpalo pH sureguliuojamas iki 7,0-7,2 ir tirpalas paliekamas stovėti 16 valandų. Nuosėdos nufiltruojamos ir atmetamos. Į filtratą pridedama amonio sulfato iki 60 % įsisotinimo ir pH sureguliuojamas iki 7,0-7,2. Mišinys paliekamas stovėti 16 valandų ir nusėdęs baltymas nufiltruojamas. Nuosėdos ištirpinamos steriliame distiliuotame vandenyje, nufiltruojamos neištirpusiam baltymui pašalinti ir diafiltruojamos prieš 0,85 % fiziologinį druskos tirpalą.

#### Išgryninto difterito toksoido baltymo koncentracija ir sterilus filtravimas

Baltymo tirpalas sukonzentruojamas iki 15 g baltymo litre ir diafiltruojamas prieš 10 tūrių 0,85 % fiziologinio tirpalo naudojant 10000

MWCO regeneruotos celiuliozės filtro patroną. Koncentruotas baltymo tirpalas sterilizuojamas filtruojant per 0,2 mikronų membraną. Baltymo tirpalas laikomas 1-5 °C temperatūroje iki jo pavertimo konjugatu.

Baltymo koncentracija buvo nustatyta Lowry, O.H. et al. (1951) Journal of Biological Chemistry 193, p. 265-275 metodu. Baltymo grynumas buvo išmatuotas pagal sterilumą, LAL (endotoksino) kiekį ir liekamojo formaldehido kiekį.

### 5 pavyzdys

#### ***Vienvalenčių neisseria meningitidis A, C, W-135 ir Y polisacharidų konjugatų su difterito toksoido baltymu pagaminimas***

Šiems preparatams gauti naudojamos medžiagos yra polisacharido iš *Neisseria meningitidis* A, C, W-135 ir Y adipo rūgšties darinys (pagamintas pagal 3 pavyzdį), sterilus difterito toksoido baltymas (pagamintas pagal 4 pavyzdį), EDAC, amonio sulfatas, sterili 1N hidrochlorido rūgštis, sterilus 1N natrio hidroksidas ir sterilus fiziologinis druskos tirpalas (0,85 %).

Kiekvienos serogrupės polisacharido konjugatas buvo pagamintas atskiroje reakcijoje. Visi keturi konjugatai buvo pagaminti tokiu būdu: į nerūdijančio plieno baką pridedama polisacharido adipo rūgšties darinio, imant reakcijos koncentraciją 700-1000  $\mu$ molių litrai reaktingo hidrazido, ir išgryninto difterito toksoido baltymo, imant reakcijos koncentraciją 3,8-4,0 g baltymo litrai. Pradinėms medžiagos praskiesti iki norimos koncentracijos buvo naudojamas fiziologinis druskos tirpalas (0,85 %) ir pH buvo sureguliuojamas iki  $5,0 \pm 0,1$ . Į polisacharido ir baltymo mišinį buvo pridedama EDAC alikvota, kad reakcijos koncentracija būtų 2,28-2,4 g/l. Reakcijos pH buvo laikomas  $5,0 \pm 0,1$  2 valandas 15-30 °C temperatūroje. Po 2 valandų pH buvo sureguliuojamas iki  $7,0 \pm 0,1$  naudojant sterilų 1N natrio hidroksidą ir reakcijos mišinys laikomas 1-5 °C temperatūroje 16-20 valandų.

Reakcijos mišiniui leidžiama sušilti iki 15-30 °C ir reakcijos indas prijungiamas prie ultrafiltravimo elemento su 30000 MWCO regeneruotos celiuliozės patronu. Pridedama kieto amonio sulfato iki 60 % įsisotinimo (A, W-135 ir Y serogrupių atveju) ir 50 % įsisotonimo (C serogrupės atveju).

Konjugato reakcijos mišinys diafiltruojamas prieš 20 tūrių 60 % įsisotinimo amonio sulfato tirpalą (A, W-135 ir Y serogrupių atveju) ir 50 % įsisotinimo amonio sulfato tirpalą (C serogrupės atveju), o po to 20 tūrių fiziologinio druskos tirpalo (0,85 %). Šis diafiltruotas konjugatas pirmiausia filtruojamas per filtro kapsulę, turinčią 1,2 mikronų ir 0,45 mikronų filtrus ir po to per antrą filtro kapsulę, turinčią 0,22 mikronų filtrą.

Polisacharido ir O-acetilo kiekis buvo matuojamas tais pačiais metodais, kaip ir naudoti depolimerizuoto polisacharido ir polisacharido darinio atveju. Baltymo kiekis buvo nustatytas Lowry metodu. Konjugato molekulės dydis buvo nustatytas perleidžiant per gel-filtracijos chromatografijos kolonėlę, kuri parduodama pagal prekės ženklą "TSK6000PW", kuri naudoja DNR kaip tuščio tūrio žymeklį, ATP kaip bendro tūrio žymeklį ir jaučio tiroglobuliną kaip etaloninį žymeklį. Be to, konjugato, eliuoto iš TSK6000PW kolonėlės, molekulės dydis buvo matuojamas daugiakampės lazerio šviesos sklaidos metodu. Konjugato antigeninis charakteris buvo matuojamas pagal susirišimą su anti-polisacharido serogrupei specifiniais antikūnais, naudojant dvigubo sumuštinio ELISA metodą. Konjugatų grynumas buvo nustatytas matuojant nesurišto (nekonjuguoto) polisacharido kiekį eliuuojant per hidrofobinės sąveikos chromatografijos kolonėlę, nekonjuguoto baltymo - kapiliarinės elektroforezės metodu, nustatant sterilumą, LAL (endotoksino) kiekį, liekamąjį EDAC kiekį ir liekamąjį amonio jonų kiekį.

## 6 pavyzdys

### ***Daugiavalentės meningokokinio A, C, W-135 ir Y polisacharido ir difterito toksoido konjugato vakcinos kompozicija***

Šiam preparatui gauti naudojamos medžiagos yra A, C, W-135 ir Y serogrupių polisacharido-difterito toksoido konjugatas (pagamintas pagal 5 pavyzdį), sterilus 100 mM natrio fosfatu buferintas fiziologinis druskos tirpalas (0,85 % natrio chlorido).

[ fiziologinį tirpalą (0,85 %) nerūdijančio plieno pagrindinės masės konteineryje įpilama alikvota sterilaus 100-500 mM natrio fosfatu buferinto fiziologinio tirpalo, kad galutinėje vakcinos koncentracijoje būtų 10 mM natrio

fosfato. Į šį pagrindinės masės konteinerį, kuriame yra 10 mM sterilus natrio fosfato fiziologinis druskos tirpalas, pridedama alikvota kiekvieno iš 2-4 sterilių vienvalečių meningokokinio polisacharido-difterito toksoido konjugatų, kad kiekvienos serogrupės polisacharido koncentracija būtų 8 µg mililitre buferio. Sukomponuotas keturvalentis konjugatas sumaišomas ir nufiltruojamas per 0,2 µm filtrą į antrąjį pagrindinės masės baką.

Kiekvienos daugiavalentėje kompozicijoje esančios serogrupės polisacharido kiekis buvo nustatytas pagal komponentinę sacharidų analizę, naudojant aukšto pH anijonų mainų chromatografiją su pulsiniu amperometrinio detektavimu. Baltymo kiekis buvo išmatuotas Lowry metodu. Vakcinų pH buvo išmatuotas naudojant kombinuotą elektrodą, sujungtą su pH-metru. Daugiavalentės konjugatinės vakcinų antigeninis charakteris buvo matuojamas pagal susirišimą su anti-polisacharido serogrupei specifiniais antikūnais, naudojant dvigubo sumuštinio ELISA metodą. Daugiavalentinės konjugatinės vakcinų imunogeniškumas buvo matuojamas pagal kiekvieno vakcinoje esančio konjugato sugebėjimą iššaukti ir pirminį, ir pakartotinį anti-polisacharidinį IgG imuninį atsaką gyvūnų modelyje. Daugiavalentės konjugatinės vakcinų grynumas buvo nustatomas matuojant nesurišto (nekonjuguoto) polisacharido kiekį, naudojant aukšto pH anijonų mainų chromatografiją su pulsiniu amperometrinio detektavimu, sterilumą, LAL (endotoksino) kiekį, pirogenų kiekį ir bendrąjį saugumą.

## **7 pavyzdys**

### ***Daugiavalenčio meningokokinio A, C, W-135 ir Y polisacharido ir difterito toksoido baltymo konjugato su aliuminio hidroksido adjuvantu pagaminimas***

Adsorbuoto ant aliuminio hidroksido konjugato pagaminimas. Šiam preparatui gauti naudojamos medžiagos apima 5 pavyzdyje aprašytus A, C, W-135 ir Y serogrupių polisacharido-difterito toksoido konjugatus, sterilų fiziologinį druskos tirpalą (0,85 % natrio chloridas) ir sterilų aliuminio hidroksidą fiziologiniame druskos tirpale (0,85 % natrio chloridas).

Į pagrindinės masės konteinerį su fiziologiniu druskos tirpalu įdedama alikvota kiekvieno sterilaus vienvalenčio meningokokinio polisacharido-difterito toksoido konjugato, kad kiekvienos serogrupės polisacharido galutinė koncentracija būtų 8  $\mu$ g mililitre buferio. Į šią daugiavalentę konjugatinę vakciną pridedama alikvota sterilaus aliuminio hidroksido fiziologiniame tirpale (0,85 % natrio chloridas), kad galutinė koncentracija būtų 0,44 mg aliuminio jonų mililitre vakcinos.

### 8 pavyzdys

#### *Konjugato su aliuminio fosfato adjuvantu pagaminimas*

Šiam preparatui gauti naudojamos medžiagos apima 5 pavyzdyje aprašytus A, C, W-135 ir Y serogrupių polisacharido-difterito toksoido konjugatus, sterilų fiziologinį druskos tirpalą (0,85 % natrio chloridas) ir sterilų aliuminio fosfatą fiziologiniame druskos tirpale (0,85 % natrio chloridas).

Į pagrindinės masės konteinerį su fiziologiniu druskos tirpalu įdedama kiekvieno sterilaus vienvalenčio meningokokinio polisacharido-difterito toksoido konjugato alikvota, kad kiekvienos serogrupės polisacharido galutinė koncentracija būtų 8  $\mu$ g mililitre buferio. Į šią daugiavalentę konjugatinę vakciną pridedama alikvota sterilaus aliuminio fosfato fiziologiniame tirpale (0,85 % natrio chloridas), kad galutinė koncentracija būtų 0,44 mg aliuminio jonų mililitre vakcinos.

### 9 pavyzdys

#### *Keturavalentės konjugatinės vakcinos imunogeniškumas*

Prieš klinikinį įvertinimą buvo tiriamas keturvalentinės konjugatinės vakcinos sugebėjimas iššaukti imuninį atsaką mažiems laboratoriniams gyvūnams. Konjugatinių vakcinų imunogeniškumo, lyginant su polisacharidinėmis vakcinomis, įvertinimui buvo naudojamos pelės, žiurkės ir triušiai. Šie gyvūnų modeliai yra tinkami, nes jie gali atskirti konjugatinę vakciną nuo atitinkamo polisacharido pagal jų imuninio atsako charakterį. Konjugatinė vakcina šiuose modeliuose iššaukia panašų į T-priklausomą

imuninį atsaką, tuo tarpu kai polisacharidinė vakcina iššaukia T-nepriklausomą imuninį atsaką.

Pelių imunogeniškumo tyrimuose konjugatas buvo praskiestas fiziologiniu druskos tirpalu (0,85 % natrio chloridu) ir įvedama maždaug nuo vienos ketvirtosios iki vienos šešioliktosios žmogaus dozės. Pelėms įvedama viena arba dvi vakcinos dozės (konjugatas arba polisacharidas) ir praėjus dviem savaitėms po skiepijimo imami kraujo mėginiai. Viena grupė buvo neimunizuota kontrolinė grupė. Kiekvienos serogrupės polisacharidų antikūnai buvo matuojami ELISA metodu. Serumo mėginiai buvo inkubuojami su kiekvieno kapsulinio polisacharido, kuris buvo prijungtas prie ELISA mikrotitro plokštelių duobučių, pertekliumi. Kiekvienos serogrupės polisacharidui prijungti prie mikrotitro duobučių buvo naudojamas metilintas žmogaus serumo albuminas. Po inkubavimo mikrotitro duobutės buvo plaunamos buferiu ir į antikūno-polisacharido kompleksą buvo pridedama antrinio antikūno-fermento konjugato, kuris jungiasi su anti-meningokokinio polisacharido antikūnu. Mikrotitro plokštelė plaunama ir į polisacharido-meningokokinio antikūno-antrinio antikūno-fermento konjugatą pridedama cheminio substrato. Fermentas hidrolizuoja dalį cheminio substrato, kuris duoda spalvotą medžiagą. Susidariusios spalvotos medžiagos kiekis yra proporcingas polisacharido-meningokokinio antikūno-antrinio antikūno-fermento konjugato, kuris yra prijungtas prie mikrotitro duobutės, kiekiui. Vakcinos veiksmingumas buvo nustatytas palyginant su kiekvienos serogrupės etaloniniais antiserumais, kurie buvo matuojami toje pačioje mikrotitro plokštelėje, skaičiuojant pagal lygiagretes tieses, naudojant keturių parametrų atitikimą. Pelės etaloniniai antiserumai buvo gauti iš to paties kamieno pelių, kurios buvo atskirai imunizuotos kiekvienos serogrupės konjugato vakcinos trimis dozėmis. Pelės etaloniniais antiserumams buvo priskirti titrai remiantis atvirkštiniu praskiedimu, duodančiu optinį tankį, lygų 1,0.

1 lentelėje pateikta anti-polisacharido IgG titrų kiekvienai serogrupei, gautų Swiss-Webster pelėms, kurios buvo vakcinuotos dviem dozėmis arba keturvalentės konjugatinės vakcinos (skystos ir kompozicijoje su aliuminio hidroksidu), arba atitinkamos keturvalentės polisacharidinės vakcinos, suvestinė. IgG titrai buvo matuoti naudojant sumaišytą serumą iš dešimties

peliių grupės. Dvi grupės po 10 peliių buvo naudojamos imuniniam atsakui į kiekvieną vakcinos kompoziciją matuoti. Abi grupės buvo skiepytos 1-ą dieną. 15-tą dieną (praėjus 2 savaitėms po skiepavimo) iš vienos 10 peliių grupės buvo imami kraujo mėginiai, o antroji 10 peliių grupė 15-tą dieną buvo skiepyta antra vakcinos doze. Po 2 savaičių 29-tą dieną buvo paimti kraujo mėginiai iš antrosios 10 peliių grupės ir iš neimunizuotos kontrolinės grupės. Visi antikūnai buvo titruoti tuo pačiu metu, tai yra 15-tos ir 29-tos dienos kraujo mėginiai buvo matuoti tuo pačiu laiku kartu su neimunizuotomis kontrolėmis ir peliių etaloniniais serumais.

1 lentelė

*Swiss-Webster peliių, skiepytų keturavalenčiu konjugatu arba polisacharidu, sumaišyto serumo anti-polisacharidinio IgG titrai*

| Vakcinos grupė                | Dozė, $\mu\text{g}$ ps | Anti-žmogaus A |       | Anti-žmogaus C |       | Anti-žmogaus W135 |       | Anti-žmogaus Y |        |
|-------------------------------|------------------------|----------------|-------|----------------|-------|-------------------|-------|----------------|--------|
|                               |                        | 15 d.          | 29 d. | 15 d.          | 29 d. | 15 d.             | 29 d. | 15 d.          | 29 d.  |
| konjugatas (be adjuvanto)     | 0,25                   | 131            | 2640  | 250            | 1510  | 1350              | 6100  | 5660           | 4830   |
| konjugatas (be adjuvanto)     | 0,50                   | 171            | 6220  | 416            | 2050  | 849               | 26000 | 5980           | 112000 |
| konjugatas (be adjuvanto)     | 1,0                    | 249            | 4500  | 525            | 2740  | 1450              | 16600 | 11300          | 59100  |
| konjugatas (aluminio hidr.)   | 0,25                   | 2920           | 4500  | 1010           | 2980  | 2300              | 33700 | 11600          | 124000 |
| konjugatas (aluminio hidr.)   | 0,50                   | 5800           | 9550  | 2280           | 1010  | 4810              | 71900 | 26400          | 330000 |
| konjugatas (aluminio hidr.)   | 1,0                    | 6210           | 9350  | 2630           | 12800 | 7870              | 94000 | 32700          | 302000 |
| polisacharidas (be adjuvanto) | 1,0                    | 136            | 173   | 184            | 205   | 612               | 608   | 4470           | 3910   |
| neimunizuota                  | nėra                   | -              | 110   | -              | 145   | -                 | 623   | -              | 777    |

Keturvalentė vakcina (be adjuvanto ir su aliuminio hidroksido adjuvantu) gali iššaukti stiprų anti-polisacharidinį IgG imuninį atsaką šiame peliių modelyje. Aliuminio hidroksido adjuvantas pagerina ir pirminį, ir pakartotinį atsaką į kiekvieną iš keturių serograpių polisacharidinius konjugatus. Keturvalentė polisacharidinė vakcina iššaukia nežymų imuninį atsaką į A, C ir W135 serogrupes šiame peliių modelyje, lyginant su neimunizuota kontrole, tuo tarpu Y serogrupė iššaukia pastebimą atsaką, tačiau neduoda pakartotino atsako. Šiame modelyje keturvalentė

polisacharidinė vakcina nesukelia pakartotino atsako visų keturių serogrupių polisacharidams. Šis modelis gali nesunkiai parodyti skirtumus tarp polisacharidinės vakcinos ir konjugatinės vakcinos ir pagal imuninio atsako dydį, ir pagal pakartotinio atsako charakterį kiekvienos serogrupės konjugatinei vakcinai.

Keturvalentės konjugatinės vakcinos beadjuvantinė forma buvo tirta klinikoje, nustatant jos saugumą ir imunogeniškumą jauniems sveikiems suaugusiems ir mažiems sveikiems vaikams. Tyrimuose su suaugusiais subjektai buvo skiepyti viena vakcinos doze, sukomponuota taip, kad joje būtų po 4 µg kiekvieno iš keturių konjugatų kaip polisacharido. Kraujo mėginiai buvo imami prieš pat skiepijimą ir praėjus 28 dienoms po skiepijimo. Antikūnai prieš kiekvienos serogrupės konjugatą buvo matuojami ELISA metodu, kuris leido nustatyti anti-polisacharidinio IgG kiekį. ELISA metodas yra labai panašus į metodą, kuriuo buvo nustatoma, ar yra ir koks kiekis IgG antikūno yra pelės serume.

Trumpai tariant, serumo mėginiai buvo inkubuojami ELISA mikrotitro duobutėse, kurios buvo padengtos pertekliumi meningokokinio polisacharido, kuris buvo surištas su plokštele panaudojant metilintą žmogaus serumo albuminą. Surišto antikūno kiekis buvo nustatomas panaudojant peroksidaze žymėto pelės anti-žmogaus IgG specifinio monokloninio antikūno reakciją. Paskesnė reakcija, naudojanti peroksidazės substratą, generuoja chromogeninį produktą, kuris buvo matuojamas spektrofotometriškai. Gauta chromoforo optinis tankis koreliuojasi su IgG antikūno, kuris yra prijungtas prie meningokokinio polisacharido ant mikrotitro plokštelės, kiekiu serume. Antikūno kiekis buvo apskaičiuotas lyginant žmogaus etaloninį serumą (CDC 1922) su priskirta reikšme, naudojant 4-parametrinės logistinės kreivės metodą. Be to, buvo matuojama antikūnų geba lizuoti serogrupei būdingas bakterijas. Serumo mėginiai pirmiausia buvo inaktyvuojami šiluma, kad būtų suardomas komplementas. Serumo mėginiai praskiedžiami du kartus sterilioje 96 duobučių mikrotitro plokštelėje. Serogrupei būdingos bakterijos kartu su tik ką gimusio triušio komplementu pridedamos į praskiestus serumus ir paliekama inkubuotis. Po inkubacijos periodo į serumo/komplemento/bakterijų mišinį pridedama padengiančios agaru terpės. Padengiančiai agaru terpei

leidžiama sukietėti ir tada inkubuojama per naktį 37 °C temperatūroje esant 5 % anglies dioksido. Kitą dieną suskaičiuojamos duobutėse esančios bakterijos. Titro galinis taškas nustatomas pagal atvirkštinį serumo praskiedimą, duodantį didesnę nei 50 % bakterijų sunaikinimą, lyginant su komplemento kontrolinių duobučių vidurkiu.

2 lentelėje pateikta anti-polisacharido vidutinių IgG koncentracijų kiekvienai serogrupei ir vidutinių serumo baktericidinių antikūnų (SBA) titrų, suaugusiųjų serume prieš ir po skiepavimo keturvalente konjugatine vakcina, sukomponuota taip, kad būtų 4 µg polisacharido dozei. Imuninis atsakas į visų keturių serogrūpių konjugatus buvo patenkinamas, kuris yra palyginamas su imuniniu atsaku, gautu panaudojant licenzijuotą polisacharidinę vakciną atsižvelgiant į abu IgG antikūnus ir funkcinis baktericidinius antikūnų atsakus. Buvo rasta, kad vakcina yra saugi šiai amžiaus grupei ir saugumo rodikliai yra panašūs į licenzijuotos polisacharidinės vakcinos rodiklius.

2 lentelė

*Jaunų sveikų suaugusiųjų, skiepytų keturvalente meningokokine konjugatine vakcina, turinčia 4 µg/dozei polisacharido, anti-polisacharidinio IgG GMC (grupės vidutinė koncentracija) ir serumo baktericidinių antikūnų GMT (grupės vidutiniai titrai)*

| Imuninis atsakas pagal serogrupę | N <sub>prieš</sub> /N <sub>po</sub> | IgG GMC (µg/ml)<br>[95 % PI] |                     | SBA GMT<br>[95 % PI] |                      |
|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
|                                  |                                     | prieš                        | po                  | prieš                | po                   |
| A                                | 28/28                               | 3,3<br>[2,3-4,8]             | 38,4<br>[22,2-66,4] | 487<br>[231-1027]    | 6720<br>[4666-15428] |
| C                                | 28/28                               | 0,4<br>[0,2-0,7]             | 5,5<br>[3,0-10,1]   | 16,4<br>[7,1-37,7]   | 1560<br>[800-4042]   |
| W-135                            | 28/28                               | 0,6<br>[0,3-1,0]             | 5,8<br>[2,9-11,7]   | 10,0<br>[5,9-16,9]   | 609<br>[250-1481]    |
| Y                                | 28/28                               | 1,3<br>[0,7-2,5]             | 6,8<br>[3,2-14,6]   | 19,0<br>[8,0-41,2]   | 39,<br>[143-1061]    |

Jaunesnio amžiaus grupėse (mažesni nei 2 metų vaikai) imuninis atsakas į polisacharidinę vakciną yra silpnas, ir buvo nustatyta, kad imunitetas po vienerių metų išnyksta. 12-15 mėnesių amžiaus vaikams buvo įvedama viena keturvalentės konjugatinės vakcinos dozė, kurioje yra po 4 µg kiekvienos serogrupės polisacharido dozėje, ir praėjus dviem mėnesiams po

pirmosios dozės yra įvedama antroji keturvalentės konjugatinės vakcinos dozė. Kraujo mėginiai buvo imami prieš pirmąjį ir antrąjį skiepijimus ir praėjus mėnesiui po antrojo skiepijimo. Antikūniniai atsakai į šių keturių serogrupių konjugatus yra susumuoti 3 lentelėje. Kiekvienai serogrupei pakartotinis atsakas IgG antikūnui ir funkciniam-baktericidiniam antikūnui buvo stebimas po antrosios keturvalenčio konjugato dozės. Konjugatinės vakcinos išgautų IgG antikūnų kiekis yra palyginamas su kiekiu, kurį išgauna licenzijuotas polisacharidas šio amžiaus grupėje: 3,64 µg/ml [2,96-4,49] IgG antikūnų atsakas į C serogrupės polisacharidą po 6 savaičių. Tačiau konjugatinės vakcinos išgauto baktericidinio antikūno kiekis yra daug didesnis nei kiekis, kurį išgauna licenzijuota polisacharidinė vakcina šio amžiaus grupėje: SBA titras yra 7,2 [5,0-10,4] po 6 savaičių. Manoma, kad šis neatitikimas tarp IgG antikūno ir baktericidinio antikūno jaunesnėje populiacijoje atsiranda dėl didesnės dalies mažos traukos antikūnų jaunesnėje populiacijoje. Priešingai, atrodo, kad konjugatas išgauna daug didesnę dalį didelės traukos antikūnų. Laikoma, kad didesnės traukos antikūnas yra atsakingas už baktericidinį aktyvumą.

### 3 lentelė

*Mažų sveikų vaikų (1-2 metų amžiaus), skiepytų dviem keturvalentės meningokokinės konjugatinės vakcinos dozėmis, turinčiomis po 4 µg dozėje polisacharido, anti-polisacharidinių IgG GMC (grupės vidutinė koncentracija) ir serumo baktericidinio antikūno GMT (grupės vidutiniai titrai)*

| Imuninis atsakas pagal serogrupę | N <sub>1</sub> /N <sub>2</sub> /N <sub>3</sub> | IgG GMC (µg/ml)<br>[95 % PI] |                  |                  | SBA GMT<br>[95 % PI] |                    |                     |
|----------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------|------------------|------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
|                                  |                                                | prieš 1<br>dozę              | Prieš 2<br>dozę  | po 2<br>dozės    | prieš 1<br>dozę      | prieš 2<br>dozę    | po 2<br>dozės       |
| A                                | 8/8/8                                          | 0,2<br>[0,1-0,4]             | 2,1<br>[0,9-4,8] | 4,4<br>[2,1-9,1] | 8,7<br>[1,4-55,1]    | 1328<br>[179-9871] | 3158<br>[1857-5371] |
| C                                | 8/8/8                                          | 0,2<br>[0,0-0,7]             | 1,0<br>[0,3-3,1] | 1,5<br>[0,6-3,6] | 6,7<br>[2,0-23,0]    | 117<br>[37,7-365]  | 304<br>[128-721]    |
| W-135                            | 8/8/8                                          | 0,1<br>[0,1-0,2]             | 0,6<br>[0,2-1,9] | 1,5<br>[0,8-3,1] | 6,2<br>[2,2-17,2]    | 22,6<br>[2,8-185]  | 430<br>[172-1076]   |
| Y                                | 8/8/8                                          | 0,3<br>[0,2-0,4]             | 1,2<br>[0,5-2,8] | 4,5<br>[2,7-7,6] | 5,7<br>[3,7-8,8]     | 98,7<br>[20,4-478] | 304<br>[101-920]    |

Apart keturvalentės konjugatinės vakcinos sugebėjimo išgauti didelį funkcinį antikūninį atsaką jaunoje populiacijoje, lyginant su licenzijuota polisacharidine vakcina, keturvalentė konjugatinė vakcina gali išgauti anamnezinį atsaką, rodantį kad šio išradimo keturvalentės vakcinos duodama apsauga yra ilgalaikė. Tobulinat keturvalentę konjugatinę vakciną, pirmiausia buvo atliekami tyrimai su dvalente AC konjugato kompozicija. Ši vakcina turi platesnį veikimą nei dabartinis licenzijuotas vienvaleintis C konjugatas, bet neapsaugo nuo ligų, kurias sukelia W-135 ir Y serogrupės.

Buvo atliktas klinikinis tyrimas su kūdikiais, kuriame buvo lyginamas imuninis atsakas į dvalentę AC polisacharido vakciną su atsaku į dvalentę AC konjugatinę vakciną. Šiame tyrime buvo įvesta trečioji kūdikių grupė, kuri buvo kontrolinė grupė ir ji gavo *Haemophilus influenzae* b tipo konjugatą. Visų trijų vakcinų grupės gavo tas pačias pediatriškas vakcinas. Dvalenčio AC konjugato grupė gavo tris konjugatinės vakcinos dozes (4 µg polisacharido dozei) 6-tą, 10-tą ir 14-tą amžiaus savaitę. Dvalenčio AC polisacharido grupė gavo dvi dvalenčio AC polisacharido vakcinos dozes (50 µg polisacharido dozei) 10-tą ir 14-tą amžiaus savaitę. *Haemophilus influenzae* b tipo konjugato grupė gavo tris konjugatinės vakcinos dozes 6-tą, 10-tą ir 14-tą amžiaus savaitę. Kraujo mėginiai buvo imami 6-tą savaitę (prieš skiepijimą) ir 18-tą savaitę (praėjus 4 savaitėms po skiepijimo). Kai vaikai buvo 11-12 mėnesių amžiaus, buvo paimti kraujo mėginiai ir vaikai, gavę arba dvalentę AC konjugatinę, arba dvalentę AC polisacharidinę vakciną, gavo pakartotiną AC polisacharido dozę. Pakartotinės polisacharido dozės davimo prasmė buvo noras įvertinti, ar subjektams bus ar nebus sukeliamas anamnezinis atsakas.

Šio tyrimo rezultatai (pirminis ir polisacharido pakartotinas imuninis atsakas) yra pateikti 4 lentelėje IgG antikūninio atsako atveju ir 5 lentelėje SBA antikūninio atsako atveju. IgG antikūninis atsakas po pirminės serijos buvo maždaug toks pats ir polisacharido, ir konjugatinės vakcinos atveju. Tačiau konjugatu skiepytų subjektų baktericidinis antikūninis atsakas buvo daug didesnis nei polisacharidu skiepytų subjektų. Kaip buvo stebėta vienerių metų subjektų atveju, kūdikių skiepijimas polisacharidu iššaukia labai nedaug funkcionalių baktericidinių antikūnų. Atrodo, kad kūdikių pagaminami antikūnai

prieš polisacharidinę vakciną turi mažesnę trauką, tuo tarpu kai konjugatinė vakcina iššaukia didesnės traukos antikūnus, ir tai paaiškina didesnį baktericidinių antikūnų titrą. Didelis funkcinų antikūnų, kuriuos išgauna pakartotina polisacharidinės vakcinos dozė subjektams, gavusiems konjugatinę vakciną pirminėse skiepavimo serijose, kiekis rodo, kad šie subjektai buvo primuoti atsiminimui arba nuo T-ląstelių priklausančiam imuniniam atsakui išgauti. Subjektai, kurie gavo polisacharidinę vakciną, pirminėse skiepavimo serijose davė vidutinį atsaką į polisacharido pakartotinę dozę, kas rodo, kad tai yra nuo T-ląstelių nepriklausantis atsakas.

## 4 lentelė

*Kūdikių, skiepytų prieš A ir C serogrupes prieš ir po pirminių imunizacijos serijų (6, 10 ir 14 savaičių amžiaus) ir gavusių pakartotinę skiepimą divalenciu AC polisacharidu 11-tą ir 12-tą jų amžiaus mėnesį, anti-polisacharidinių IgG GMC (grupės vidutinė koncentracija)*

| Imuninis atsakas pagal vakcinos grupę | Pirminio skiepavimo GMC [95 % PI] |                  |                  | PS papildomo skiepavimo GMC [95 % PI] |                  |                   |
|---------------------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|-------------------|
|                                       | N                                 | Prieš            | Po               | N                                     | Prieš            | Po                |
| <b>A serogrupė:</b>                   |                                   |                  |                  |                                       |                  |                   |
| AC konjugatas                         | 34                                | 3,4<br>[2,2-5,4] | 5,8<br>[4,3-8,0] | 31                                    | 0,2<br>[0,1-0,3] | 7,0<br>[4,0-12,0] |
| AC polisacharidas                     | 35                                | 3,0<br>[1,7-5,3] | 5,5<br>[4,1-7,3] | 30                                    | 0,9<br>[0,5-1,4] | 3,1<br>[2,0-4,7]  |
| HIB konjugatas                        | 36                                | 3,2<br>[2,2-4,5] | 0,6<br>[0,4-0,8] | NN                                    | NN               | NN                |
| <b>C serogrupė:</b>                   |                                   |                  |                  |                                       |                  |                   |
| AC konjugatas                         | 31                                | 1,6<br>[0,9-2,8] | 2,8<br>[2,0-3,9] | 31                                    | 0,1<br>[0,1-0,2] | 8,1<br>[4,5-14,5] |
| AC polisacharidas                     | 35                                | 2,3<br>[1,4-3,9] | 5,3<br>[3,8-7,4] | 30                                    | 0,6<br>[0,3-1,0] | 2,8<br>[1,7-4,7]  |
| HIB konjugatas                        | 36                                | 2,0<br>[1,2-3,5] | 0,5<br>[0,3-0,7] | NN                                    | NN               | NN                |

## 5 lentelė

*Kūdikių, skiepytų prieš A ir C serogrupes prieš ir po pirminių imunizacijos serijų (6, 10 ir 14 savaičių amžiaus) ir gavusių pakartotinę skiepimą divalenciu AC polisacharidu 11-tą ir 12-tą jų amžiaus mėnesį, SBA antikūnų GMT (grupės vidutiniai titrai)*

| Imuninis atsakas pagal vakcinos grupę | Pirminio skiepavimo GMC [95 % PI] | PS papildomo skiepavimo GMC [95 % PI] |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|

|                   | N  | Prieš              | Po                  | N  | Prieš              | Po                 |
|-------------------|----|--------------------|---------------------|----|--------------------|--------------------|
| A serogrupė:      |    |                    |                     |    |                    |                    |
| AC konjugatas     | 34 | 11,8<br>[7,2-19,3] | 177<br>[101-312]    | 24 | 10,1<br>[5,6-18,0] | 373<br>[162-853]   |
| AC polisacharidas | 32 | 14,7<br>[8,5-25,4] | 7,0<br>[4,7-10,5]   | 26 | 6,1<br>[3,9-9,5]   | 24,1<br>[11-53]    |
| HIB konjugatas    | 35 | 11,2<br>[6,8-18,3] | 6,7<br>[4,3-10,5]   | NN | NN                 | NN                 |
| C serogrupė:      |    |                    |                     |    |                    |                    |
| AC konjugatas     | 34 | 50,8<br>[24-107]   | 189<br>[128-278]    | 27 | 4,6<br>[3,5-5,6]   | 287<br>[96,2-858]  |
| AC polisacharidas | 32 | 62,7<br>[29-131]   | 25,4<br>[14,4-44,6] | 36 | 4,1<br>[3,9-4,3]   | 14,4<br>[7,9-26,1] |
| HIB konjugatas    | 36 | 45,3<br>[21,9-133] | 7,3<br>[4,7-11,3]   | NN | NN                 | NN                 |

Apart šio išradimo siūlomų privalumų, pagerinant apsaugą prieš meningokokinę ligą jaunų asmenų populiacijoje ir duodant platesnę apsaugą prieš A, C, W-135 ir Y serogrupes, šis keturvalentis konjugatas gali apsaugoti nuo kitų patogenų, indukuojant antikūninį atsaką į baltymą-nešiklį. Kai kūdikiams yra įvedama keturvalentė konjugatinė vakcina, kurioje naudojamas difterito toksoido konjugatas, šie subjektai taip pat gauna įprastą pediatrinę imunizaciją, į kurią įeina difterito toksoidas. Todėl, šiems subjektams nėra antikūninio atsako į difterito toksoidą pastebimo pagerėjimo. Tačiau, kai difterito toksoido konjugatas yra įvedamas subjektams, kurie negavo kartu esančio difterito toksoido turinčios vakcinos, stebimas stiprus pakartotinas atsakas į difterito toksoidą. Šie subjektai gavo trijų dozių DTP režimą būdami 2, 3 ir 4 mėnesių amžiaus. Šiame tyrime subjektai gavo arba vieną divalenčio AC konjugato dozę, arba vieną divalentės polisacharidinės vakcinos dozę būdami tarp 2 ir 3 metų amžiaus. Kraujo mėginiai buvo imami skiepijimo metu arba praėjus 30 dienų po skiepijimo. Divalentčiame AC konjugate baltymu-nešikliu buvo naudojamas difterito toksoidas.

Difterito toksoido imuninis atsakas abiejų vakcinų grupėse yra parodytas 6 lentelėje. Kaip ir laukiama, polisacharidas nestimuliavo anti-difteritinio imuninio atsako, tačiau stiprus anti-difteritinis imuninis atsakas buvo stebimas subjektams, kurie gavo AC konjugatą. Taigi, meningokokinė

konjugatinė vakcina gali duoti papildomą naudą, stimuliuojant imuninį atsaką į baltymą-nešiklį, tokiu būdu duodama apsaugą nuo ligų, kurias sukelia *Corynebacteria diphtheriae*, kai baltymu-nešikliu yra naudojamas difterito toksoidas.

6 lentelė

*Mažų sveikų vaikų, skiepytų arba dvivalente difterito toksoido konjugatine vakcina, kurioje yra 4 µg polisacharido dozei, arba dvivalente AC polisacharidine vakcina, kurioje yra 50 µg polisacharido dozei, anti-difteritinių antikūnų pagal ELISA GMT (grupės vidutinis titras) IU/ml*

| Imuninis atsakas<br>pagal vakcinos<br>grupę | N <sub>prieš</sub> /N <sub>po</sub> | Anti-difteritiniai antikūnai (ELISA – IU/ml)<br>[95 % PI] |                        |
|---------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------|
|                                             |                                     | prieš                                                     | Po                     |
| AC konjugatas                               | 104/103                             | 0,047<br>[0,036-0,060]                                    | 21,2<br>[11,6-38,6]    |
| AC polisacharidas                           | 103/102                             | 0,059<br>[0,045-0,076]                                    | 0,059<br>[0,045-0,077] |

## Išradimo apibrėžtis

1. Imunologinė kompozicija, sudaryta iš dviejų, trijų arba keturių atskirų baltymo-polisacharido konjugatų, besiskirianti tuo, kad kiekvienas konjugatas susideda iš kapsulinio polisacharido iš dviejų arba daugiau *N. meningitidis* serograpių, sujungto su vienu arba daugiau baltymų-nešiklių.
2. Imunologinė kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad kapsuliniai polisacharidai yra pasirinkti iš grupės, susidedančios iš *N. meningitidis* A, C, W-135 ir Y serograpių kapsulinių polisacharidų.
3. Imunologinė kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad kapsuliniai polisacharidai yra iš *N. meningitidis* A ir C serograpių.
4. Imunologinė kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad kapsuliniai polisacharidai yra iš *N. meningitidis* A, C, W-135 ir Y serograpių.
5. Imunologinė kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad baltymas-nešiklis yra difterito toksoidas.
6. Imunologinė kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad į ją įeina dar ir adjuvantas.
7. Imunologinė kompozicija pagal 5 punktą, besiskirianti tuo, kad adjuvantas yra aliuminio hidroksidas.
8. Imunologinė kompozicija pagal 5 punktą, besiskirianti tuo, kad adjuvantas yra aliuminio fosfatas.
9. Imunologinė kompozicija pagal 1 punktą, skirta panaudoti imuninio atsako indukavimui į *N. meningitidis* kapsulinį polisacharidą, įvedant minėtos kompozicijos imunologiškai efektyvų kiekį žmogui arba gyvūnui.
10. Daugiavalentė meningokokinė vakcina, turinti imunologiškai efektyvius kiekius nuo dviejų iki keturių atskirų baltymo-polisacharido konjugatų, besiskirianti tuo, kad kiekvienas konjugatas turi skirtingą kapsulinį polisacharidą, sujungtą su baltymu-nešikliu, ir kurioje kiekvienas kapsulinis polisacharidas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš A, C, W-135 ir Y serograpių kapsulinių polisacharidų.
11. Daugiavalentė meningokokinė vakcina pagal 9 punktą, besiskirianti tuo, kad kapsuliniai polisacharidai yra pagaminti iš *N. meningitidis* A ir C serograpių.

12. Daugiavalentė meningokokinė vakcina pagal 9 punktą, besiskirianti tuo, kad kapsuliniai polisacharidai yra pagaminti iš *N. meningitidis* A, C, W-135 ir Y serogrupių.
13. Daugiavalentė meningokokinė vakcina pagal 9 punktą, besiskirianti tuo, kad baltymas-nešiklis yra difterito toksoidas.
14. Daugiavalentė meningokokinė vakcina pagal 9 punktą, besiskirianti tuo, kad į ją įeina dar ir adjuvantas.
15. Daugiavalentė meningokokinė vakcina pagal 13 punktą, besiskirianti tuo, kad adjuvantas yra aliuminio hidroksidas.
16. Daugiavalentė meningokokinė vakcina pagal 13 punktą, besiskirianti tuo, kad adjuvantas yra aliuminio fosfatas.
17. Imunologinė kompozicija pagal 9 punktą, skirta panaudoti žmogaus arba gyvūno, imlaus *N. meningitidis* infekcijai, apsaugojimui, įvedant minėtos kompozicijos imunologiškai efektyvų kiekį žmogui arba gyvūnui.