

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 163176 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3207/86 (51) Int.Cl.5 A 61 K 39/02
(22) indleveringsdag: 04 jul 1986 A 61 K 39/104
(41) Alm. tilgængelig: 28 mar 1987 A 61 K 39/108
(44) Fremlagt: 03 feb 1992 A 61 K 39/116
(86) International ansøgning nr.: - A 61 K 39/395
(30) Prioritet: 27 sep 1985 CH 04199/85

(71) Ansøger: *SCHWEIZERISCHES SERUM- UND IMPFINSTITUT UND INSTITUT ZUR ERFORSCHUNG DER
INFEKTIONSKRANKHEITEN; Rehhagstrasse 79; 3018 Bern, CH
(72) Opfinder: Stanley J. *Cryz; CH, Emil *Fuerer; CH

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau A/S

(54) Ugiftig konjugatvaccine mod infektioner af *Pseudomonas aeruginosa*- og *Escherichia coli*- bakterier, fremgangsmåde til fremstilling heraf og anvendelse af vaccinen.

(56) Fremdragne publikationer

EP off.g.skrift nr. 118831
US pat. nr. 4356170
Andre publikationer: Chemical Abstracts, vol 95 (1981)113.154 h.

(57) Sammendrag

3207-86

En ugiftig konjugatvaccine mod infektioner forårsaget af gramnegative bakterier består af et artsspecifikt polysaccharid og et protein, som er kovalent forbundne, idet polysaccharidet stammer fra bakteriens endotoxin, og proteinet er et exoprotein. Vaccinerne anvendes fortrinsvis mod infektioner forårsaget af *Pseudomonas aeruginosa* eller *Escherichia coli*. Exoproteinet er især et exotoxin eller exotoxoid, fortrinsvis toxin A fra *Pseudomonas aeruginosa* eller tetanustoxoid eller differitoxoid. Konjugatvaccinen består af en blanding af 3-15 konjugater, hvis polysaccharid fremstilles ud fra 3-15 forskellige serotyper af den samme bakterieart. En polyvalent vaccine fås ud fra en blanding af konjugatvacciner, hvis enkelte bestanddele hver især fremkalder antistoffer mod en bestemt bakterieart. Konjugatvaccinerne kan anvendes til fremstilling af hyperimmunsæra, ud fra hvilke der kan fremstilles immunoglobulin til intravenøs eller intramuskulær indgift.

DK 163176 B

Den foreliggende opfindelse angår ugiftige konjugatvacciner mod infektioner forårsaget af *Pseudomonas aeruginosa*- eller *Escherichia coli*-bakterier, en fremgangsmåde til fremstilling af en konjugatvaccine, en konjugatvaccine, en polyvalent vaccine og anvendelse af konjugatvacciner til fremstilling af hyperimmunsera, som på deres side anvendes ved fremstilling af immunoglobulin.

Infektioner forårsaget af *Pseudomonas aeruginosa* eller *Escherichia coli* optræder især hos hospitalspatienter, brandsårspatienter og kræftpatienter, der behandles med immunosuppressiva. De er en af hovedårsagerne til livstruende nosokomiale infektioner, der forekommer, når flere mennesker er anbragt (hospitaliserede) i et lille værelse. H.Y. Reynolds et al., "*Pseudomonas aeruginosa* infections: persisting problems and current research to find new therapies", *Annals Internal Medicine* 82, 1975, s. 819-831. Hyppigheden af sådanne infektioner er tiltaget drastisk i de sidste 30 år parallelt med den udbredte anvendelse af antibiotika.

Pseudomonas aeruginosa og *Escherichia coli* er også hyppigt årsag til urinvejsinfektioner, otitis, sinusitis og meningitis.

Antistoffer mod en række somatiske antigener fra *Pseudomonas aeruginosa* (jfr. fx H.E. Gilleland et al., "Use of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice", *Infection Immunity* 44, 1984, s. 49-54) og mod ekstracellulært protein (O.R. Pavlovskis et al., "Protection against experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice by active immunization with exotoxin A toxoids", *Infection Immunity* 32, 1981, s. 681-689) har i dyreforsøg vist sig at være virksomme som beskyttelse mod infektion.

Toxin A er det giftigste stofskifteprodukt fra *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.). Det forhindrer den eukaryote proteinsyntese. Mutanter af P.a. med specifikt toxin A-mangel er mindre virulente end deres forældre-stammer (D.E. Ohman et al., "Corneal infections in mice with toxin A og elastase mutants of P.a.", *J. Infectious Diseases* 142, 1980, s. 547-555). Passivt indgivne eller ved aktiv vaccination fremkaldte antitoxin A-antistoffer udøver en påviselig beskyttelse mod eksperimentelt fremkaldte P.a. infektioner (jfr. O.R. Pavlovskis et al.,

loc. cit. og *Infection Immunity* 18, 1977, s. 596-602). Videre undersøgelser har vist en direkte sammenhæng mellem indhold af antitoxinantistoffer og overlevelsesrate hos patienter, som lider af *P.a.*-infektion (M.S. Pollack et al., "Protective activity of antibodies to exotoxin A and lipopolysaccharide at the onset of *P.a.* septicemia in man," *J. Clinical Investigation* 63, 1979, s. 276-286).

Virulensen af *P.a.* hos forbrændingstraumatiserede mus afhænger af tilstedeværelsen af et fuldstændigt "smooth-type" lipopolysaccharidmolekyle (S.J. Cryz et al., *Infection Immunity* 44, 1984, s. 508-513).

10 Beskyttelsesvirkningen af serotypespecifikke anti-lipopolysaccharidantistoffer mod eksperimentelle *P.a.*-infektioner er tilstrækkeligt dokumenteret (jfr. fx S.J. Cryz et al., *Infection Immunity* 43, 1984, s. 795-799).

Forhøjede anti-lipopolysaccharid-antistoftitre forøger betydeligt overlevelsestiden hos patienter, der lider af *P.a.*-sepsis (A.S. Cross et al., *J. Infectious Diseases* 142, 1980, s. 538-546). Kliniske forsøg med vacciner på basis af *P.a.*-lipopolysaccharid gav meget lovende resultater (J.W. Alexander et al., *J. Infectious Diseases* 130 (Suppl.) 1974, s. S152-S158). Selv om *P.a.*-lipopolysaccharid (LPS) 20 indeholder beskyttende serotypespecifikke antigen-determinanter, egner det sig ikke i den praktiske anvendelse til parenteral vaccine som følge af dets for høje toxicitet for mennesker (J.E. Pennington, *J. Infectious Diseases* 130 (Suppl.), 1974, s. S159-S162; M.D. Haghbin et al., *Cancer* 32, 1973, s. 761-762).

25 *P.a.*'s serotypespecifikke antigen-determinanter findes i LPS-molekylets O-polysaccharid (PS)-del (O-polysaccharid: oxideret polysaccharid). Polysaccharidet (PS) kan adskilles fra lipopolysaccharidets (LPS) toksiske lipid-A-halvdel og isoleres. Selv om PS'et indeholder antigen-determinanterne, kan PS ikke anvendes som vaccine, da PS ikke 30 er immunogent. (G.B. Pier et al., *Infection Immunity* 22, 1978, s. 919-925).

Hidtil har der ikke fandtes nogen virksom vaccine til beskyttelse mod

P.a.-infektioner og infektioner forårsaget af lignende gramnegative bakterier såsom *Escherichia coli* (*E.c.*).

I betragtning af den relative hyppighed af infektioner forårsaget af *P.a.* eller *E.c.* og deres farlighed er dette en betydelig mangel.

- 5 Bortset fra nødvendigheden af at fremstille en virksom vaccine til aktiv immunisering mod sådanne infektioner er der også et stort behov for immunoglobuliner fremstillet ud fra specifikke hyperimmunsera, der indeholder et højt antistoftiter mod gramnegative bakterier, især *P.a.* og *E.c.*. Disse sera eller immunoglobuliner alene kan i tilfælde
10 af bakterieinfektioner eller sepsis bringe redning.

Antibiotika svigter ofte som følge af resistens hos bakterierne.

- Et formål med den foreliggende opfindelse er at lukke disse grave-
rende lakuner i den medicinske behandling af infektionssygdomme.
Dette er tydeligvis kun muligt med en konjugatvaccine. Konjugatvac-
15 ciner, der især er fremstillet ved kovalent binding og lipopolysac-
charider med menneskeligt serumalbumin, kendes fx fra USA patent-
skrift nr. 4.185.090.

Virkningseffektiviteten af de hidtil kendte konjugatvacciner er
beskeden og er ikke afprøvet klinisk.

- 20 Fremgangsmåder til kovalent binding af artsspecifikke polysaccharider
med artspecifikke proteiner er velkendte og udbredt.

- Patentskrift EP-A-0.118.831 beskriver vacciner, der som proteiner
udelukkende anvender membranproteiner fra den ydre membran fra gram-
negative bakterier. I modsætning hertil anvendes der ved den fore-
25 liggende opfindelse som protein udelukkende exotoxiner, nemlig toxin
A fra en *Pseudomonas aeruginosa* stamme, et tetanustoxoid eller et
difteritoxoid.

- Ifølge EP-A-0.118.831 kobles endoproteiner altid kovalent med poly-
saccharider fra den samme bakterieart, medens ved den foreliggende
30 opfindelse et O-polysaccharid fra een bakterieart også kobles med

exoproteinet (toxin eller toxoid) fra en anden bakterieart, jf. eksemplerne nedenfor. Derved rettes virkningen hos konjugatvaccinen ifølge opfindelsen såvel mod bakterie som mod de toksiske exoprodukter. Disse toksiske exoprodukter spiller en vigtig rolle som patogene faktorer. Et særligt kendetegn ved konjugatvaccinen ifølge opfindelsen i forhold til kendte vacciner er således, at vaccinerne ifølge opfindelsen har et bredere virkningsspektrum.

I US patentskrift nr. 4.356.170 benyttes kapsel-polysaccharider (det vil sige bestanddele af den ydre membran fra en bakterie) fra *Haemophilus influenzae*, pneumokokker, beta-hæmolytiske streptokokker og *Escherichia coli*, medens der ifølge den foreliggende opfindelse som polysaccharid anvendes O-polysaccharidet, der stammer fra lipopolysacchariderne fra *Pseudomonas aeruginosa* og *Escherichia coli*, hvor de toksiske lipid-A-dele fraspaltes og fraskilles.

Ifølge US patentskrift nr. 4.356.170 bindes polysaccharidet kovalent ved hjælp af en reducerende sukkerdel såsom for eksempel N-acetylmannosaminitol, medens den kovalente binding ifølge den foreliggende opfindelse effektueres ved reaktiv aminering, hovedsagligt af den oxiderede sukkerart glukose og ramnose, med den på proteinet bundne adipinsyre-dihydrazids frie hydrazid gruppe.

I Seid et al., J. Biol. 258, 7305-7310 benyttes lipopolysaccharider, der er blevet afgiftet ved behandling med natriumhydroxid. I modsætning hertil anvendes der ved den foreliggende opfindelse et O-polysaccharid, som er blevet spaltet fra lipopolysaccharidet ved sur hydrolyse, hvorved den uopløselige toksiske lipid-A-del er blevet skilt fra ved centrifugering.

Det har nu vist sig, at der kan fås ugiftige og samtidig højaktive konjugatvacciner, når LPS isoleret fra *P.a.* omdannes til PS og kobles kovalent til et exoprotein bestående enten af et *P.a.* toxin A, et tetanustoxoid eller et difteritoxoid. De vundne PS-toxin A-, PS-tetanustoxoid- og PS-difteritoxoid-konjugatvacciner har vist sig at være ugiftige og immunogene. De fremkalder en aktiv beskyttelse mod eksperimentelle *P.a.*-infektioner.

Det har endvidere vist sig, at det nye princip med kovalent binding af PS til exoproteiner kan generaliseres og derved udnyttes til fremstilling af vacciner også mod infektioner forårsaget af andre gramnegative bakterier, især *Escherichia coli* (E.c)-infektioner.

- 5 Opfindelsen angår således en ugiftig konjugatvaccine mod infektioner forårsaget af *Pseudomonas aeruginosa*- eller *Escherichia coli*-bakterier, hvilken vaccine består af et arts- og serotypespecifikt lipid A-frit polysaccharid eller O-polysaccharid fra endotoxinet fra *Pseudomonas aeruginosa* eller *Escherichia coli* og et protein, som er
- 10 forbundet kovalent med hinanden, idet vaccinen er karakteriseret ved, at proteinet er et bakterielt exoprotein eller exotoxoid bestående af toxin A fra *Pseudomonas aeruginosa* eller et tetanus- eller difteritoxoid.

- 15 Fremgangsmåden til fremstilling af den hidtil ukendte konjugatvaccine ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at et lipid A-frit O-polysaccharid fra endotoxinet fra *Pseudomonas aeruginosa* eller *Escherichia coli* bindes kovalent til et exoprotein bestående af toxin A fra *Pseudomonas aeruginosa* eller af et tetanus- eller difteritoxoid.

- 20 Opfindelsen angår endvidere en konjugatvaccine bestående af en blanding af 3-15 konjugater dannet ud fra 3-15 serotypespecifikke lipid A-frie O-polysaccharider fra endotoxinet fra forskellige stammer af *Pseudomonas aeruginosa* eller *Escherichia coli*, som hver for sig er kovalent bundet til et exoprotein eller exotoxoid bestående af toxin A fra *Pseudomonas aeruginosa* eller af et tetanus- eller difteritoxoid.
- 25 id.

- Opfindelsen angår endvidere en polyvalent vaccine, der består af en blanding, som indeholder flere konjugater af serotype-specifikke O-polysaccharider fra *Pseudomonas aeruginosa* og fra *Escherichia coli* sammen med et exoprotein bestående af toxin A fra *Pseudomonas aeruginosa* eller af et tetanustoxoid eller difteritoxoid, og at den fremkalder antistoffer med de tilsvarende serotyper af *Pseudomonas aeruginosa* og *Escherichia coli*.
- 30

Opfindelsen angår endvidere anvendelsen af de hidtil ukendte konjugatvacciner til fremstilling af hyperimmunsera, der på deres side anvendes ved fremstilling af immunoglobulin til intravenøs eller intramuskulær indgift.

- 5 Beskrivelse af vaccinefremstilling med en *Pseudomonas aeruginosa*-vaccine som eksempel.

Fremstilling af endotoxin (PS):

Til fremstilling af vaccinen ifølge opfindelsen mod *P.a.* anvendes en ganske bestemt serotype af *P.a.* som kilde til fremstilling af endotoxinet. Lipopolysaccharidet (LPS) udvindes fra bakterierne fx ved
10 phenol/vand-ekstraktion som beskrevet af O. Westphal et al., *Zeitschr. Naturforschung* 1952, s. 148-155. Det vundne LPS indeholder mindre end 1 vægtprocent protein og nucleinsyrer. O-Polysaccharidet (PS) frigives fra LPS ved hydrolyse med fortyndet eddikesyre ved
15 100°C som beskrevet af I.R. Chester et al., *J. General Microbiology* 78, 1973, s. 305-318. Den uopløselige, toksiske lipid A-del fraskilles ved centrifugering. Supernatanten ekstraheres med en chloroform/-methanolopløsning for at fjerne rester af lipid A. Den vandige fase, som indeholder PS, koncentrerer i vakuum og oprenses derefter chroma-
20 tografisk, hvorved polysaccharid (PS) med en molekylvægt på 10.000-75.000 indsamles og lyofiliseres.

Oxidation af PS:

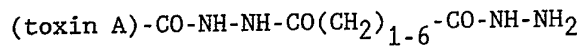
Det vundne polysaccharid (PS) oxideres i vand ved tilsætning af natriumperiodat ved stuetemperatur, hvorved der opstår koblingsdygtige
25 aldehydgrupper. Efter tilsætning af ethylenglycol oprenses materialet ved dialyse og lyofiliseres derefter.

Fremstilling af exoprotein (toxin A):

Toxin A med et indhold på over 95% fremstilles ud fra en *Pseudomonas aeruginosa*-stamme, der danner særlig meget toxin A, som beskrevet af
30 S.J. Cryz et al., *Infection Immunity* 43, 1984, s. 795-799.

Syntese af toxin A-kobling:

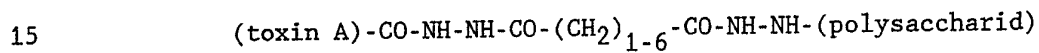
Til fortyndet toxin A sættes et alifatisk dicarboxylsyredihydrazid og et carbodiimid som fx 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid. Ved denne operation kobles frie carboxylgrupper på toxin A med
5 dicarboxylsyredihydrazidet. Det vundne produkt kan omtrent vises ved følgende formel:



Syntese af Pseudomonas-polysaccharid-toxin A-konjugat:

Den vundne toxin A-kobling forbindes med det oxiderede PS, der indeholder aldehydgrupper, idet ækvivalente mængder af toxin A-kobling og
10 oxideret PS blandes, og den vundne Schiff'ske base (hydrazon) reduceres med et alkalimetallborhydrid, fx natriumborhydrid eller NaBH_3CN .

Derved dannes et stabilt konjugat, hvis uopklarede struktur bl.a. kan vises skematisk omtrent som følger:



Konjugatet renses ved dialyse, uopløseligt materiale fraskilles ved centrifugering, og den vundne blanding separeres ved chromatografi på en agarosesøjle. Materiale med en molekylvægt på over 350.000, der tydeligvis overstiger molekylvægten af PS og toxin A, og som udgør
20 PS-toxin A-konjugatet, skilles fra og lyofiliseres.

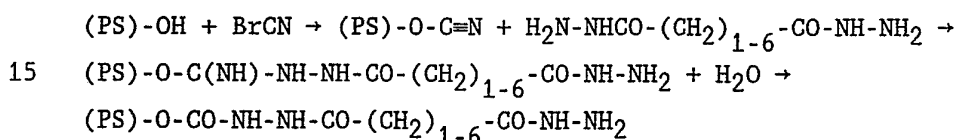
Syntese af polysaccharid-tetanustoxoid-konjugat

Tetanustoxoid

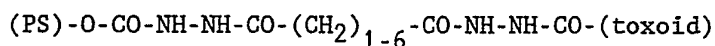
Et tetanustoxoid, der er bestemt for anvendelse til mennesker, fx TE Anatoxin® fra Schweiz. Serum- und Impfinstitut, oprenses ved ionbytningschromatografi på cellulose og gelfiltrering på agarose,
25 således at det består af 90% tetanustoxoid.

Kobling

Denne udføres her fx ved den af Jerker Porath, *Methods in Enzymo logy* Vol. 34, s. 21 ff, beskrevne generelle metode. Polysaccharid (PS), som vindes ud fra LPS ved hydrolyse, oxideres ikke til denne kobling, men omsættes i vandig opløsning på i og for sig kendt måde i et basisk miljø med bromcyanid ved stuetemperatur. Bromcyanid (BrCN) reagerer derved med frie -OH-grupper på polysaccharidet, hvilket i det følgende er vist skematisk som (PS)-OH. De således vundne aktiverede polysaccharider lades reagere med et alkylendicarboxylsyredi-
 10 hydrazid (fx $\text{H}_2\text{NNHCO}-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{CONH-NH}_2$), som fx adipinsyredihydrazid (ADH). Derved bindes dihydrazidet kovalent med polysaccharidet. De reaktioner, der foregår under koblingen, kan bl.a. vises fx som følger:



Det derved vundne PS-dihydrazid-konjugat renses ved grundig dialyse. Ved tilsætning af en fortyndet mineralsyre syrnes opløsningen svagt, der tilsættes en ækvivalent mængde tetanustoxoid og et carbodiimid, og der omrøres i nogle timer ved stuetemperatur. Ved omsætningen med
 20 toxoidet (skematisk formuleret som $\text{HOCO}-(\text{toxoid})$) i nærværelse af carbodiimid, hvorved frie carboxylgrupper på toxoidet kondenseres med frie hydrazidgrupper på PS-dihydrazid-konjugatet, fås det ønskede PS-dihydrazid-toxoid-konjugat, hvis uopklarede struktur kan frem-
 25 stilles skematisk omtrent som følger:



Den vundne blanding dialyseres mod en fosfatpuffer og chromatograferes over en agarosesøjle. Materiale med en molekylvægt på over 350.000, der tydeligt overstiger molekylvægten af udgangskomponenterne, skilles fra og lyofiliseres.
 30

I den ovenstående syntese kan tetanustoxoidet erstattes med difteritoxoid.

På analog måde som beskrevet ovenfor kan også fremstilles vacciner mod andre gramnegative bakterier som fx mod infektioner forårsaget af *Escherichia coli*.

5 Påvisning af sikkerheden og aktiviteten af konjugatvaccinerne ifølge opfindelsen

Egenskaber ved *Pseudomonas* (PS-toxin A)-, (PS-tetanustoxoid)- og (PS-difteritoxoid)-konjugater ifølge opfindelsen

10 Af de i tabel I viste data fremgår det, at konjugaterne har en molekylvægt på over 350.000, og at de derved langt overstiger udgangsmaterialernes molekylvægt. Ved den kovalente binding af toxin A, afgiftes dette stærkt giftige reagens. Den letale dosis stiger derved mindst 1000 gange fra 0,2 $\mu\text{g}/\text{mus}$ til over 200 $\mu\text{g}/\text{mus}$. Pyrogeniciteten er praktisk talt forsvundet fra konjugaterne sammenlignet med pyrogeniciteten af naturligt *Pseudomonas aeruginosa* PA 220 LPS
15 (0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{kg}$ legemsvægt).

Konjugaterne inducerer specifikke antistofreaktioner såvel mod polysaccharidet som mod proteinbæreren, dvs. mod toxin A, tetanustoxin eller difteritoxin. Ved den kovalente binding af toxin A til polysaccharidet detoxificeres toxin A fuldstændigt uden derved at miste
20 sin immunogene aktivitet.

(PS-toxin A)-konjugatet = (PS-toxin A)-konjugatvaccinens evne til at beskytte mus mod dødelige forgiftninger med oprenset toxin A kunne fx påvises på følgende måde:

25 Grupper af mus modtog intramuskulært ved forsøgets begyndelse og den 14. forsøgsdag enten 10 μg protein i form af tilsvarende mængder af (PS-toxin A)-konjugat eller en puffer (kontrolgruppe). På den 28. forsøgsdag fik musene gradvis stigende doser af toxin A. Den gennemsnitlige letale dosis for kontroldyrene var 0,2 μg , hvorimod den gennemsnitlige letale dosis for dyr, der forinden var blevet behandlet
30 med (PS-toxin A)-konjugat, var 4,7 $\mu\text{g}/\text{mus}$.

Tabel I

Pseudomonas (PS-toxin A)- og (PS-tetanustoxoid)-konjugatets egenskaber

	PS	Tetanus- toxoid	Toxin A	PS-toxin A konjugat	PS-teta- nustoxoid- konjugat	
5						
	Molekyl vægt ¹⁾	<70.000	150.000	66.000	>350.000	>350.000
10	Toxicitet ²⁾	ugiftig	ugiftig	0,2 µg	ugiftig	ugiftig
	Pyrogenici- tet ³⁾	50 µg	50 µg	-	50 µg	85 µg
15	Immunoge- nicitet ⁴⁾	ikke-immu- nogen	immunogen (anti-te- tanus IgG)	immunogen (anti-to- xin A IgG)	immunogen (anti-PS og anti- toxin A IgG)	immunogen (anti-PS- og anti- tetanus- toxin IgG)

20 1) Bestemt ved gelfiltrering på en AcA34-søjle.

2) Bestemt ved intraperitoneal injektion i hunmus med en vægt på 18-20 g, udtrykt som den gennemsnitlige dødelige dosis pr. mus. Ugiftig betyder, at et minimum på 50 µg intraperitonealt indgivet antigen ikke forårsager nogen dødsfald.

25 3) Den højeste antigendosis, som er indgivet intravenøst i kani-
ner, hvilken dosis forårsager en stigning i legemstemperaturen
på højst 0,3°C, udtrykt som µg/ml/kg legemsvægt.

4) Bestemt ved immunisering af grupper på hver 3 kaniner med 50 μ g antigen pr. kanin. Dyrenes sera blev analyseret for tilstedeværende specifikt IgG (immunoglobulin)-antistof ved hjælp af den enzytbundne immunosorbent-assayteknik (ELISA).

5 (PS-Tetanustoxoid)- og (PS-toxin A)-konjugaternes aktivitet som vaccine

Evnen hos nativt lipopolysaccharid (LPS fra *Pseudomonas aeruginosa*), (PS-tetanustoxoid)-konjugat og (PS-toxin A)-konjugat til at beskytte forsøgsdyr mod eksperimentelt fremkaldt *Pseudomonas aeruginosa*-
10 brandsårssepsis er vist i tabel II.

Tabel II

Beskyttelse mod dødelig brandsårssepsis forårsaget af *Pseudomonas aeruginosa* PA 220 ved immunisering med LPS fra PA 220, (PS-tetanustoxoid)-konjugat og (PS-toxin A)-konjugat

15	Immunogen ¹⁾	LD ₅₀ ²⁾
	Intet (kontroller)	20
	LPS	10 ⁶
20	PS-tetanustoxoid-konjugat	10 ⁶
	PS-toxin A-konjugat	10 ⁶

1) Mus fik 1 μ g intramuskulært før forsøgets begyndelse og på den 14. forsøgsdag. De blev derefter underkastet et forbrændings-
25 traume (som beskrevet i I.A. Holder et al., *Infection Immunity* 35, 1982, s. 276-280) og blev på den 28. dag inficeret med stigende doser *P. aeruginosa* PA 220.

2) LD₅₀ = den gennemsnitlige letale dosis af *P. aeruginosa* PS 220, beregnet ved den af L.J. Reed og H.A. Muench, *American J. Hygiene* 27, 1938, s. 493-497 beskrevne metode.
30

Disse data viser, at immuniseringen med LPS, (PS-tetanustoxoid)-konjugat og (PS-toxin A)-konjugat udviser en omtrent lige stærk beskyttelsesvirkning mod fatal *P.a.* sepsis. Den letale dosis for *P. aeruginosa* PA 220 forhøjes derved 50.000 gange i forhold til den ikke
5 immuniserede kontrolgruppe.

(PS-tetanustoxoid)-konjugatvaccinens sikkerhed og immunogenicitet hos mennesker

Sunde 16-59 årige voksne frivillige forsøgspersoner af begge køn fik ved forsøgets begyndelse og efter 14 dage indgivet 100 µg af konjugatvaccinen i 0,5 ml subcutant i overarmen.
10

Alle reaktioner fra forsøgspersonerne blev registreret. Bivirkninger var sjældne, svage og forbigående.

Prøver af veneblod blev taget ved forsøgets begyndelse og 14 og 28 dage efter vaccinationen. De sera, der blev vundet fra blodprøverne, blev samlet og opbevaret ved -20°C. Immunoglobulin G (IgG)-antistoftiteret blev bestemt.
15

Immuniseringen med (PS-tetanustoxoid)-konjugat førte til en signifikant stigning af det gennemsnitlige anti-PA220 LPS IgG-titer efter 14 og 28 dage efter vaccinationen sammenlignet med udgangstiteret, jfr. tabel III nedenfor.
20

Over 80% af forsøgspersonerne reagerede med et fire gange eller derover forhøjet antistoftiter. Immuniseringen med denne konjugatvaccine førte også til et tetanustoxinneutraliserende anti-tetanus-antistoftiter.

Tabel III

Anti-PA220 LPS IgG-antistofreaktion efter immunisering med (PS-tetanustoxoid)-konjugat

5	Præ-immun ¹⁾	Gennemsnitligt ELISA titerområde		≥ 4 gang forhøjet titer ³⁾ %
		14 dage	28 dage	
10	43 (14-28)	652 (39-3.200) ⁴⁾	823 (47-4.400) ⁴⁾	13/16 (82)

- 1) Præ-immun = op til tidspunktet for immunisering.
 2) Post-immun = 14 eller 28 dage efter immunisering.
 15 3) Kvotient af post- og præ-immuntiter
 4) Det gennemsnitlige post-immuntiter var signifikant forhøjet (p<0,01).

Serumpuljer fås ved kombination af en ækvivalent mængde serum fra hver forsøgsperson ved forsøgets begyndelse (præ-immunpulje) og efter
 20 28 dage (immunpulje).

Præ-immunpuljen indeholdt 2,7 internationale tetanustoxinneutraliserende enheder pr. ml, hvorimod immunpuljen udviste 6,2 enheder pr. ml.

Anti-PA220-LPS-IgG-antistoffer, som blev fremstillet ved vaccination
 25 af mennesker med (PS-tetanustoxoid)-konjugatet ifølge opfindelsen, viste sig at være særdeles virksomme mod fatal eksperimentel fremkaldt sepsis forårsaget af *P. aeruginosa*. Passivt overført post-immun IgG var signifikant mere effektiv til forebyggelse af dødsfald end passivt overført præ-immun-IgG. Den målte beskyttelse korrelerer med
 30 anti-PA220 LPS IgG-titeret i IgG-præparaterne. Resultaterne er vist i tabel IV.

Tabel IV

Passivt overført IgG's evne til at beskytte mus mod fatal *P. aeruginosa* PA 220-brandsårssepsis

5	Overført IgG ¹⁾	Anti-LPS IgG ELISA titer	LD ₅₀
	Intet ²⁾	-	1,3 x 10 ¹
	Præ-immun ³⁾	73	1,3 x 10 ³
10	Post-immun ⁴⁾	1065	6,7 x 10 ⁵

1) Hver mus fik intravenøst indgivet ca. 160 µg humant IgG i 0,2 ml 24 timer før infektion med *P. aeruginosa* PA 220.

2) Kontrollerne indeholdt 0,2 ml steril saltopløsning.

15 3) Fremstillet ud fra alikvote dele af sera fra alle frivillige forsøgspersoner før immunisering.

4) Fremstillet ud fra alikvote dele af sera fra alle frivillige forsøgspersoner 28 dage efter immunisering.

20 (PS-tetanustoxoid)-konjugat er således en vaccine, der kan anvendes til mennesker uden risiko, og som udviser et signifikant forhøjet anti-PA220-LPS-IgG-titer hos mere end 80% af de vaccinerede personer. Det herved i mennesker frembragte anti-PA220-LPS-immunoglobulin viste sig at være særdeles virksomt mod fatal *P. aeruginosa*-sepsis.

Analoge resultater blev også opnået med
 25 *P.a.*(PS)-toxin A-,
P.a.(PS)-difteritoxoid-,
E.c.(PS)-toxin A-,
E.c.(PS)-tetanustoxoid- og
E.c.(PS)-difteritoxoid-konjugatvaccinerne ifølge opfindelsen.

(PS-tetanustoxoid)-, (PS-difteritoxoid)- og (PS-toxin A)-konjugatvacciner

Disse konjugater viste sig i talrige tests at være ugiftige, ikke-pyrogene og højaktive vacciner. Denne type vacciner er hidtil ukendte. Til den praktiske anvendelse er det ønskeligt at kunne tilbyde en vaccine, der udviser en bredspektret virkning mod infektioner forårsaget af forskellige serotyper af fx *Pseudomonas aeruginosa*.

Det viste sig, at denne bredspektrede virkning kan opnås, når der anvendes et præparat af (PS-tetanustoxoid)-, (PS-difteritoxoid)- eller (PS-toxin A)-konjugater, hvis PS (polysaccharid)-del stammer fra flere af de serotyper af *Pseudomonas aeruginosa* (P.a), der hovedsageligt optræder ved infektioner. Dertil kræves 3-15 forskellige serotyper af *Pseudomonas aeruginosa*.

Koblingen af polysaccharidet (PS) fra de forskellige serotyper til PS-proteinkonjugat skal udføres separat for at opnå brugbare præparater. Dette betyder, at de enkelte LPS'er isoleres fra 3-15 rene stammer af P.a., og at PS'et og de enkelte PS'er individuelt bindes kovalent til proteindelen (toxin A, tetanustoxoid eller difteritoxoid), de vundne konjugater afprøves for deres tolerabilitet og aktivitet, og at de 3-15 enkeltkonjugater blandes sammen til det færdige kombinationspræparat.

Den samme procedure anvendes også til fremstilling af kombinationsvacciner mod infektioner forårsaget af andre gramnegative bakterier som fx *Escherichia coli*.

Vacciner, der er aktive mod infektioner forårsaget af forskellige gramnegative bakteriearter

Det er særdeles ønskeligt at kunne fremkalde antistoffer mod forskellige gramnegative bakteriearter ved hjælp af en enkelt vaccination. Dette er især vigtigt, når antistofferne høstes og oparbejdes til specifikke immunoglobuliner, som er aktive mod infektion forårsaget af gramnegative bakterier.

Det har vist sig, at dette mål kan nås, når en vaccine, som er specifik over for en bakterieart, blandes med én eller flere konjugatvacciner, som er specifikke over for andre bakteriearter.

Anvendelsen af konjugatvacciner ifølge opfindelsen til fremstilling
5 af specifikke immunoglobuliner

Som vist ovenfor fremkalder konjugatvaccinerne ifølge opfindelsen hos mennesker dannelsen af specifikke antistoffer mod den pågældende bakterieart. Den antistoftiter, der på denne måde fremkaldes i serum hos frivillige vaccinerede personer, er så højt, at disse sera kan
10 anvendes som udgangsmateriale til fremstilling af specifikke immunoglobuliner. Derved har lægen et middel til sin rådighed, hvormed han med held kan behandle ikke-vaccinerede patienter, der lider af den tilsvarende bakterieinfektion.

Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler.

15 EKSEMPEL 1

Pseudomonas aeruginosa-vaccine: PS-toxin A-konjugat

A. Isolering af LPS (IT-5 = Habs 10)

500 ml 3%'s trypticase-sojavæske (TSB) (Becton, Dickinson and Company, USA) indeholdende 1% glycerin blev podet med en lyofiliseret kultur af *Pseudomonas aeruginosa* (IT-5 = Habs 10) og
20 inkuberet ved 37°C og 150 omdrejninger pr. minut. 50 liter 3%'s TSB-medium indeholdende 1% glycerin blev podet med denne forkultur og inkuberet i en fermenter i 16 timer ved 37°C. Cellerne blev skilt fra ved hjælp af en gennemløbscentrifuge
25 (fx fra Westfalia) og vasket to gange med Tris-NaCl-puffer, pH 9. Cellerne blev derefter suspenderet i Tris-NaCl-puffer, pH 9, og åbnet mekanisk, fx ved hjælp af glaskugler (Dyno-Mill, W.A. Bachhofer AG, Basel, Schweiz). Cellerne skilles fra ved centrifugering af cytoplasma, som kasseres. Cellerne opslættes på ny i Tris-NaCl-puffer og sedimenteres i en køle-
30

centrifuge ved 23.500 x g i 30 minutter. Cellevæggene suspenderes derefter i 1000 ml vand, hvortil sættes 1280 ml 80%'s phenol som beskrevet i O. Westphal, *Z. Naturforsch.* 7, 1952, s. 148-155. Blandingen opvarmes til 68-70°C og omrøres i 5
5 minutter ved denne temperatur. Derefter afkøles ekstraktionsblandingen i isbad til 4-10°C og centrifugeres derefter til adskillelse af faserne i 15 minutter ved 23.500 x g i en kølecentrifuge. Den øverste fase udgør vandfasen og indeholder lipopolysaccharidet (LPS). Vandfasen adskilles omhyggeligt fra
10 phenolfasen, hvortil der på ny sættes 1 liter destilleret vand, og det hele på ny omrøres ved 68-70°C i 5 minutter. Der afkøles igen i isbad til 4-10°C, og faserne adskilles som ovenfor beskrevet. De vandige faser kombineres og dialyseres med vand, til de er fri for phenol. Phenolfaserne kasseres. De
15 vandige faser centrifugeres derefter i ultracentrifugen til sedimentering af LPS ved 100.000 x g i 3 timer. Sedimentet opløses i 0,05M tris-puffer, pH 7,2, der indeholder 0,05M NaCl, og behandles med RNase, DNase og pronase (Boehringer, Mannheim, Vesttyskland) som følger: Der tilsættes RNase til en
20 slutkoncentration på 20 µg/ml og inkuberes i 3 timer ved 37°C. Derefter tilføjes DNase til en slutkoncentration på 20 µg/ml og magnesiumsulfat til en slutkoncentration på 0,1M, og der inkuberes ligeledes i 3 timer ved 37°C. Derefter tilsættes
25 pronase til en koncentration på 200 µg/ml, der inkuberes i 2-3 timer ved 37°C og dialyseres derpå mod vand ved 4°C natten over. LPS'et oprensnes yderligere ved to ganges ultracentrifugering og lyofiliseres derefter. Det således oprensede LPS indeholder mindre end 1% nucleinsyrer og protein som forurening.

30 B. Isolering af det serotypespecifikke polysaccharid

Det oprensede LPS suspenderes i en koncentration på 3 mg/ml i 1%'s eddikesyre og hydrolyseres i 30 minutter ved 100°C som beskrevet af G. Schmidt et al., *Eur. J. Biochem.* 10, 1969, s. 501-510. Herved adskilles polysacchariddelen fra den toksiske lipiddel (lipid A). Lipid A er uopløseligt og fjernes ved
35 centrifugering fra det opløselige polysaccharid. Den vandige

polysaccharidopløsning ekstraheres til fjernelse af spor af lipid A tre gange med et lige så stort volumen chloroform/methanol (3:1) og koncentrerer i vandstrålevakuum. Den koncentrerede PS-opløsning chromatograferes på en agarosegel, fx
5 ACA34-gel (LKB-produkter AB, Bromma, Sverige; søjle 5 x 40 cm, gennemløbshastighed 1,7 ml/minut, fraktionsstørrelse 17 ml). Polysaccharid bestemmes i enkelte fraktioner. Fraktionerne, der indeholder PS med en molekylvægt på 10.000-75.000, samles i puljer og lyofiliseres.

10 C. Oxidation af PS

De lyofiliserede PS'er blev opløst i destilleret vand i en koncentration på 5 mg/ml. Dertil sættes NaIO_4 (natriumperiodat) til en slutkoncentration på 0,1M. Opløsningen lades
15 henstå i mørke i 2 timer ved stuetemperatur. Overskydende oxidationsmiddel inaktiveres ved tilsætning af ethylenglycol til en koncentration på 0,2M. De oxiderede PS'er dialyseres grundigt mod vand og lyofiliseres.

D. Toxin A

Toxin A isoleres fra supernatanten af *P. aeruginosa* stamme PA
20 103 (fået fra Dr. B. Wretling, Karolinska Institute, Stockholm, Sverige) ved følgende kendte metode: Ultrafiltrering, DEAE-cellulose-chromatografi, hydroxylapatit-chromatografi (beskrevet af Cryz et al., *Infect. Immun.* 39, 1983, s. 1072-1079). Renheden af det således isolerede toxin A er over 95%.

25 E. Fremstilling af toxin A-ADH (ADH = adipinsyredihydrazid)

ADH som "spacer"-molekyle og til indføring af reaktionsdygtige aminogrupeer kobles kovalent med toxin A som følger: rent
toxin A indstilles til en koncentration på 5 mg/ml i 0,05N Naphosphatpuffer, pH 7,2. Der tilsættes ADH (adipinsyredihydrazid) og 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid i fast
30 form til en koncentration på 10 mg/ml af hver. pH-Værdien indstilles til 4,8 med fortyndet saltsyre. Opløsningen omrøres

forsigtigt i 2 timer ved 22°C, og pH-værdien holdes konstant ved 4,8 ved tilsætning af yderligere 1N saltsyre. Efter endt reaktion dialyseres blandingen grundigt mod 0,05M Na-phosphatpuffer, pH 8,0, ved 4°C. Uopløseligt materiale fjernes ved centrifugering. Toxin A-ADH-opløsningen indstilles til en koncentration på 5 mg/ml.

F. Fremstilling af polysaccharid-toxin A-konjugat

Toxin A-ADH-opløsningen dialyseres i 2 timer ved stuetemperatur mod 0,5M Na-phosphatpuffer, og toxin A-ADH-opløsningen indstilles til en koncentration på 5 mg/ml. Til denne opløsning sættes et lige så stort volumen af en opløsning af 5 mg/ml oxideret PS, der ligeledes er opløst i 0,5M Na-phosphatpuffer, pH 8,0. Opløsningen lades henstå i 6 timer ved stuetemperatur, hvorefter der tilsættes NaBH₃CN fra en 10 gange koncentreret (0,5M) opløsning til en koncentration på 0,05M. Blandingen lades derefter henstå i 5-7 dage ved stuetemperatur. Derefter dialyseres der grundigt mod phosphatpuffer (PBS) pH 7,4, der indeholder 0,02% merthiolat.

Uopløseligt materiale fjernes ved centrifugering, og den opløste reaktionsblanding chromatograferes over en agarosegel, fx AcA34-gel. Af fraktionerne måles absorptionen ved 280 og 220 nm. Materiale, som elueres med dødvolumenet (v_0), og derfor har en molekylvægt på over 350.000, hvilket ligger langt over reaktionspartnernes molekylvægte, indsamles og sterilfiltreres. Materialet fortyndes således, at 0,5 ml svarer til en human dosis, og således at den færdige opløsning indeholdt 5% lactose i 50% PBS og 0,01% merthiolat, og lyofiliseres derefter.

Vaccinen blev underkastet følgende analyser:

Analyse	Metode
5 Polysaccharidindhold	phenol-svovlsyre ¹ under anvendelse af det rene udgangs-PS som standard
Proteinindhold	Lowry et al. ² under anvendelse af bovint serumalbumin som standard
Sterilitet	
Pyrogenicitet	Kaniner
10 Tolerabilitet	2 humandoser intraperitonealt på hver 2 marsvin og 1 humandosis på hver 5 mus.
Toxicitet	200 µg (protein) i 0,5 ml intraperitonealt i 6 mus.
15	

Resultaterne fremgår af tabel I.

¹ M. Dubois et al., "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Anal. Chem.* 28, s. 350-356.

20 ² O. H. Lowry et al., "Protein measurement with the Folin-phenol reagent", *J. Biol. Chem.* 193, 1951, s. 265-275.

EKSEMPEL 2

Pseudomonas aeruginosa-vaccine: PS-tetanustoxoid-konjugat

100 mg PS, der er fremstillet som beskrevet i eksempel 1 A/B, opløses
 25 i 9,2 ml destilleret vand. Dertil sættes forsigtigt 0,44 ml af en opløsning af bromcyanid. pH-Værdien indstilles til 10,5 i løbet af 6 minutter med 1N NaOH. Derefter sænkes pH-værdien til 8,6 ved tilsætning af fast NaHCO₃. Der tilsættes 0,4 g adipinsyredihydrazid (ADH), og opløsningen omrøres forsigtigt i 16 timer ved 4°C. Efter
 30 grundig dialyse mod vand tilsættes 100 mg koncentreret eller lyofileret tetanustoxoid, der fx er oprenset ved ionbytnings- og gelchromatografi, og 3,3 ml 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-

opløsning (20 mg/ml). pH-Værdien indstilles til 4,8 med 0,1N saltsyre, og holdes konstant i 4 timer ved stuetemperatur under let omrøring. Reaktionsblandingen dialyseres derefter grundigt mod PBS-merthiolat 0,02%. Derefter chromatograferes blandingen på en agarosegel (søjle 5 x 40 cm, gennemløbshastighed 1,1 ml pr. minut) med PBS-merthiolat-puffer. Der indsamles fraktioner på 11 ml, og protein- og PS-indholdet bestemmes. Materiale, der blev elueret med dødvolumenet og derfor har en molekylvægt på over 350.000, samles i pulje og lyofiliseres som beskrevet i eksempel 1. PS-tetanus-konjugatet analyseres analogt med PS-toxin A-konjugatet (jfr. eksempel 1).

EKSEMPEL 3

Pseudomonas aeruginosa-vaccine: PS-difteritoxid-konjugat

Som beskrevet i eksempel 2 forbindes polysaccharidet, der indeholder de serotypespecifikke determinanter, kovalent med et oprenset og koncentreret eller lyofiliseret difteritoxid.

Den vundne vaccine er ugiftig og fremkalder serotypespecifikke antistoffer mod *Pseudomonas aeruginosa* samt antitoxiske antistoffer mod difteritoxid.

EKSEMPEL 4

Escherichia coli - PS-toxin A-konjugatvaccine

Som beskrevet i eksempel 1 isoleres polysaccharidet, der indeholder de serotypespecifikke determinanter, fra endotoxinet fra *E. coli*-fermentorkulturer. Som beskrevet i eksempel 1 oxideres polysaccharidet med natriumperiodat og bindes kovalent med toxin A ved hjælp af "spacer"-molekylet adipinsyredihydrazid. Konjugatvaccinen lyofiliseres og analyseres. Den er ugiftig, har en god tolerabilitet og inducerer dannelsen af serotypespecifikke antistoffer mod *E. coli*.

EKSEMPEL 5

Escherichia coli: PS-tetanustoxoid-konjugatvaccine

E. coli-polysaccharid, der indeholder de serotypespecifikke determinanter, aktiveres med bromcyanid og bindes kovalent med spacermolekylet adipinsyre-dihydrazid (ADH) analogt med eksempel 2. Polysaccharid-ADH'et bindes kovalent ved hjælp af et vandopløseligt carbodiimid med tetanustoxoidets carboxylgrupper.

Den vundne vaccine er ugiftig, har en god tolerabilitet og inducerer dannelsen af serotypespecifikke antistoffer mod *E. coli* samt antitoxiske antistoffer mod tetanustoxoid.

EKSEMPEL 6-8

Polyvalente *Pseudomonas aeruginosa*-konjugatvacciner

6. 8-valent *P. aeruginosa*-P.a. toxin A-vaccine

50-100 µg af hver af 9 serotypespecifikke enkeltkonjugater pr. dosis forenes ved blanding til en polyvalent *Pseudomonas aeruginosa*-konjugatvaccine.

Konjugatets polysaccharidkomponenter blev først isoleret enkeltvis ud fra endotoxinet af følgende 8 *Pseudomonas aeruginosa*-stammer:

PA 220 (Habs serotype 6d); 8505 (Habs serotype 3);
6511 (Habs serotype 4); IT-2 (Habs serotype 11);
E 576 (Habs Serotype 2ab), PA 53 (Habs serotype 1);
W 18 (Habs serotype 10); IT 6 (Habs serotype 8).

De 8 forskellige PS'er bindes derefter kovalent enkeltvis med proteindelen af *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A ifølge eksempel 1, og de 8 konjugater blandes derpå til den 8-valente vaccine.

Den vundne 8-valente vaccine har følgende egenskaber:

- 1) Den er ugiftig for dyr og ikke-pyrogen for kaniner.
- 2) Dens molekylvægt overstiger 350.000.
- 3) Vaccinen beskytter mod et bredt spektrum af *P. aeruginosa*-
5 · infektioner.

7. 8-valent *P. aeruginosa*-tetanustoxoidvaccine

Fremstillingen foregår analogt med eksempel 6.

De 8 forskellige PS'er bindes enkeltvis kovalent med humant tetanustoxoid ifølge eksempel 2 og blandes derefter til en
10 polyvalent vaccine.

Den vundne vaccine inducerer dannelsen af serotypespecifikke antistoffer mod *P. aeruginosa* samt antitoxiske antistoffer mod tetanustoxin.

8. 8-valent *P. aeruginosa*-difteritoxoid-vaccine

15 De 8 PS'er, der er angivet i eksempel 6, blev enkeltvis bundet kovalent med difteritoxoid ifølge eksempel 3 og derefter blandet til en polyvalent vaccine.

Den vundne vaccine inducerer dannelsen af serotypespecifikke antistoffer mod *P. aeruginosa* samt antitoxiske antistoffer mod
20 difteritoxin.

EKSEMPEL 9-13

Polyvalente *Escherichia coli*-konjugatvacciner

9. 13-valent *E. coli*-P.a.-toxin vaccine

25 50-100 µg af hver af 14 enkeltkonjugater, hvis polysaccharid-del stammer fra endotoxinet af *E. coli*-serotyperne 1, 2, 4, 6,

7, 8, 11, 16, 18, 22, 25, 62, 75 og deres proteindiel fra exotoxin A fra *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.), blandes.

Den vundne vaccine inducerer dannelsen af serotypespecifikke antistoffer mod *Escherichia coli* samt antitoxiske antistoffer mod P.a.-toxin.

10. 13-valent *E. coli*-tetanustoxoid-vaccine

13 enkeltkonjugater af de i eksempel 9 nævnte *E. coli*-PS'er og humant tetanustoxoid blev fremstillet analogt med eksempel 1-3 og blandet analogt med eksempel 6 og 7. Den vundne vaccine inducerer dannelsen af specifikke antistoffer mod *E. coli* og antitoxiske antistoffer mod tetanustoxin.

11. 13-valent *E. coli*-difteritoxoid-konjugatvaccine

13 enkeltkonjugater af de i eksempel 9 nævnte *E. coli*-PS'er og difteritoxoid blev fremstillet analogt med eksempel 1-3 og blandet analogt med eksempel 6 og 7.

Den vundne vaccine inducerer dannelsen af specifikke antistoffer mod *E. coli* og antitoxiske antistoffer mod difteritoxin.

12. 10-valent *E. coli*-konjugatvaccine

50-100 μg pr. dosis af hver af 10 enkeltkonjugater, hvis polysacchariddel stammer fra endotoxin af O-serotypen 1, 2, 4, 6, 7, 8, 18, 22, 25, 75 og hvis proteindiel stammer fra exotoxin A fra *P. aeruginosa* eller fra et humant tetanustoxoid, blandes.

13. 3-valent *E. coli*-konjugatvaccine

50-100 μg pr. dosis af hver af 3 enkeltkonjugater, hvis polysacchariddel stammer fra endotoxin af O-serotypen a) 1, b) 2 og c) 4, og hvis proteindiel stammer fra a) exotoxin A fra *P.*

aeruginosa, b) humant tetanustoxoid eller c) difteritoxoid, blandes.

EKSEMPEL 14

Polyvalent konjugatvaccine mod *P. aeruginosa* og *E. coli*-infektioner

- 5 Denne vaccine fås ved blanding af 8 enkeltkonjugater (50-100 µg), hvis polysacchariddel stammer fra *Pseudomonas aeruginosa* endotoxin, samt 13 enkeltkonjugater, hvis polysacchariddel stammer fra *E. coli*-endotoxin. Enkeltkonjugaternes proteindel stammer i hvert tilfælde enten fra exotoxin A fra *P. aeruginosa* eller et humant tetanustoxoid.
- 10 Den vundne vaccine er i stand til at inducere stereotypespecifikke antistoffer mod *P. aeruginosa* samt *E. coli*. Endvidere inducerer denne vaccine også antitoxiske antistoffer, der er rettet mod såvel exotoxin A som tetanustoxin.

EKSEMPEL 15

- 15 Anvendelse af den polyvalente konjugatvaccine til fremstilling af specifikt immunoglobulin

Frivillige forsøgspersoner blev immuniseret med den polyvalente vaccine ifølge eksempel 14 i deltamusklen. 4 uger efter følger en forstærket vaccination med den samme vaccine og dosering i deltamusklen.

20 1 uge senere tages der en blodprøve fra de frivillige forsøgspersoners armvene, og antistoftiteret bestemt mod serotyper (af *P. aeruginosa* og *E. coli*), som er indeholdt i vaccinen, samt mod exotoxin A og tetanustoxin. Hvis titertilvæksten mod alle de nævnte antigener som følge af vaccinationerne er 4 gange eller mere, tages der ca. 240 ml

25 blod fra de vaccinerede personer. Seraene samles i pulje, og der fremstilles et gammaglobulinpræparat til intravenøs anvendelse (IVIG) ved følgende kendte trin, fx som beskrevet i europæisk offentliggørelsesskrift nr. 85.747: fraktioneret alkoholudfældning ved Cohn's metode, ionbytningschromatografi, ultrafiltrering og diafiltrering.

Proteinindholdet indstilles til 5% og lyofiliseres i et stabiliserende medium.

PATENTKRAV

1. Ugiftig konjugatvaccine mod infektioner forårsaget af *Pseudomonas aeruginosa*- eller *Escherichia coli*-bakterier, hvilken vaccine består af et arts- og serotypespecifikt lipid A-frit polysaccharid eller O-polysaccharid fra endotoxinet fra *Pseudomonas aeruginosa* eller *Escherichia coli* og et protein, som er forbundet kovalent med hinanden, k e n d e t e g n e t ved, at proteinet er et bakterielt exoprotein eller exotoxoid bestående af toxin A fra *Pseudomonas aeruginosa* eller et tetanus- eller difteritoxoid.
5
2. Fremgangsmåde til fremstilling af en konjugatvaccine ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at et lipid A-frit O-polysaccharid fra endotoxinet fra *Pseudomonas aeruginosa* eller *Escherichia coli* bindes kovalent til et exoprotein bestående af toxin A fra *Pseudomonas aeruginosa* eller af et tetanus- eller difteritoxoid.
15
3. Konjugatvaccine ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den består af en blanding af 3-15 konjugater dannet ud fra 3-15 serotypespecifikke lipid A-frie O-polysaccharider fra endotoxinet fra forskellige stammer af *Pseudomonas aeruginosa* eller *Escherichia coli*, som hver for sig er kovalent bundet til et exoprotein eller exotoxoid bestående af toxin A fra *Pseudomonas aeruginosa* eller af et tetanus- eller difteritoxoid.
20
4. Konjugatvaccine ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at der til dens fremstilling er anvendt O-polysacchariderne fra i det mindste serotyperne PA 220 (Habs serotype 6d); E 576 (Habs Serotype 2ab); 6511 (Habs serotype 4); W 18 (Habs serotype 10); IT 2 (Habs serotype 11); 8505 (Habs serotype 3); PA 53 (Habs serotype 1); og IT 6 (Habs serotype 8) fra *Pseudomonas aeruginosa*.
25
30

5. Konjugatvaccine ifølge krav 3,
k e n d e t e g n e t ved, at der til dens fremstilling er anvendt
O-polysaccharider fra i det mindste O-serotyperne 1,2,4,6,7,8,11,16,
18,22,25,62 og 75 fra *Escherichia coli*.
- 5 6. Polyvalent vaccine ifølge krav 3,
k e n d e t e g n e t ved, at den består af en blanding, som inde-
holder flere konjugater af serotype-specifikke O-polysaccharider fra
Pseudomonas aeruginosa og fra *Escherichia coli* sammen med et exopro-
tein bestående af toxin A fra *Pseudomonas aeruginosa* eller af et
10 tetanustoxoid eller difteritoxoid, og at den fremkalder antistoffer
med de tilsvarende serotyper af *Pseudomonas aeruginosa* og *Escherichia*
coli.
7. Anvendelse af konjugatvacciner ifølge et hvilket som helst af
kravene 1,3,4, 5 og 6 til fremstilling af hyperimmune sera, som på
15 deres side anvendes til fremstilling af immunoglobulin, der kan
administreres intravenøst eller intramuskulært.