

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **323616**(13) **B1****NORGE**

(51) Int Cl.

*A61K 39/095 (2006.01)**A61K 39/385 (2006.01)**A61K 39/40 (2006.01)**C07H 1/00 (2006.01)***Patentstyret**

(21)	Søknadsnr	19950739	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1993.08.30 PCT/US93/08155
(22)	Inng.dag	1995.02.27	(85)	Videreføringsdag	1995.02.27
(24)	Løpedag	1993.08.30	(30)	Prioritet	1992.08.31, US, 938367 1993.05.19, US, 64501
(41)	Alm.tilgj	1995.04.26			
(45)	Meddelt	2007.06.18			
(73)	Innehaver	Baxter Healthcare SA, Hertistrasse 2, Wallisellen Kanton, 8306 ZÜRICH, Sveits			
(72)	Oppfinner	Joseph Y. Tai, Port Washington, PA, USA Lucjan J. Hronowski, Laurel, MD, USA Sharon Mates, Chevy Chase, MD, USA Francis Michon, 4401 Rosedale Avenue, MD20814 BETHESDA, USA Harold Jennings, 2049 Woodglen Crescent, ONK1Y6G6 GLOUCESTER, Canada			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO			

(54)	Benevnelse	Immunogent konjugat av gruppe C meningokokkisk polysakarid anvendelig i vaksiner mot <i>Neisseria Meningitidis</i>, samt fremstilling derav			
(56)	Anførte publikasjoner	Ashton et al., "Protective efficacy of ...", 1989, Micro. Pathogenesis, 6,s 455-458. Beuvery et al., " Characteristics of two types...", 1986, Dev., biol.standard, vol 65, s 197-204. Costantino et al., 1992, "Development and phase 1...", Vaccine, vol 10, 10,s 691-698. Frasch,C.E., "Vaccines for prevention of...",1989, Clin. Microbiol.rev.,vol 2, s S134-S138. Harold et al., " Immunochemistry of groups...",1981, Journ.of imm., vol 127, nr. 3,s 1011-1017. US 5097020 WO 9307178			
(57)	Sammendrag				

Immunogent konjugat omfattende et modifisert gruppe C meningokokkisk polysakkarid (GCMP) koblet til et bærermolekyl. Dette GCMP er modifisert ved 0-deacetylering i varierende grad. Dette -modifiserte GCMP-konjugat stimulerer en sterk immunogenrespons.

Antiserumet som dannes ved immunisering med dette konjugat, er kryss-reaktivt med det native polysakkarid. I tillegg danner disse antisera en klasse av antistoffer som har en kraftig baktericid aktivitet.

Foreliggende oppfinnelse angår et immunogent konjugat omfattende et gruppe C meningokokkisk polysakkarid som angitt i krav 1, en fremgangsmåte til fremstilling derav som angitt i krav 8, samt en vaksine omfattende slike konjugater som angitt i krav 18 og anvendelse av konjugatet til fremstilling av slike vaksiner som angitt i krav 23 - 26.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Gruppe C *Neisseria meningitidis* er årsaken til en stor prosentdel av bakteriell meningitidis på verdensbasis. Nåværende tiltak for å forhindre denne sykdom består av vaksiner som omfatter rensset gruppe C kapsulært polysakkarid. Disse vaksiner er effektive på voksne, men er dårlig immunogene hos barn. De dårlige resultater hos barn er meget uønsket, siden denne del av befolkningen har den høyeste hyppighet av disse infeksjoner.

Gruppe C meningokokkisk polysakkarid (GCMP) er et dårlig immunogen, og det har følgelig vært gjort forsøk for å øke immunogenisiteten av disse polysakkarider for å utvide deres anvendelighet som vaksiner. En mulig metode for å oppnå dette mål, som har vist seg å være noe løfterik, er ved konjugering av disse polysakkarider til et bærermateriale, så som et protein.

Forskjellige forskere har isolert og rensset intakte kapsulære polysakkarider og har bundet dem kovalent til bærerproteiner. Disse konjugater er mer immunogene enn polysakkaridet alene. Det kan finnes mange eksempler i litteraturen som illustrerer suksessen av disse konjugerte antigener. Ett slikt eksempel, US patent nr. 4.673.574, beskriver bruken av bakterielle kapsulære polysakkarider konjugert til bærerproteiner for å danne immunogene forbindelser. Et annet eksempel, US patent nr. 4.356.170, beskriver immunogenisiteten av konjugater bestående av et spesifikt polysakkarid gruppe A meningokokkisk polysakkarid (GAMP) koblet

til et bærerprotein. Disse konjugater gir en forbedret metode for å avlevere effektive nivåer av antigen til en vertsorganisme.

En annen metode for å øke immunogenisiteten har vist seg
 5 løfterik med gruppe B meningokokkisk polysakkarid (GBMP) antigenene, som vist i US patent nr. 4.727.136. Denne metode består i å erstatte N-acetylgrupper av sialylenheten av polysakkaridet med N-propenylgrupper, fulgt av konjugering av det modifiserte polysakkarid til et bærerprotein.
 10 Disse konjugater er gode immunogener og kryssreagerer effektivt med det native GBMP. Dette funn viser at tilføringen av substituenten på polysakkarid-antigenet kan danne ytterligere immunogene områder eller epitoper for gjenkjennelse av antistoffer.

15 Andre eksempler på dokumenter og artikler som omhandler immunogene konjugater er US patent 5 097 020, Harold et al. "Immunochemistry of groups A, B and C meningococcal Disease", 1989, Clin. Microbiol. Rev., vol. 2, p.S134-S138; Ashton et al., "Protective efficacy of mouse serum to the
 20 N-propionyl derivative of meningococcal group B polysaccharide", 1989, Micro. Pathogenesis, 6, p.455 - 458; Beuvery et al., "Characteristics of two types of meningococcal group C polysaccharide conjugates using tetanus toxoid as carrier protein", 1986, Dev. Biol. Standard, vol. 65, p.
 25 197 - 204; Constantino et al., 1992, "Development and phase 1 clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C", Vaccine, vol. 10, 10, p. 691 - 698 samt WO 9307178.

Vaksiner som for tiden blir fremstilt fra O-acetyl-positiv
 30 gruppe C Neisseria meningitidis er kjent for å være dårlig immunogene. Det har vært rapporter om at vaksiner avledet fra en O-acetyl-negativ variant er immunogen. Se Glode et al., The Journal of Infectious Disease, bind 139, nr. 1, januar 1979, s. 52-59; Steinkoff et al., Infection and

Immunity, oktober 19981, s. 144-145; og Arakere et al.,
Infection and Immunity, desember 1991, s. 4349-4356.

De fleste gruppe C N. meningitidis-stammer danner et O-acetylpositivt (OAc⁺) polysakkarid, hvor O-acetylgruppene
5 er fordelt utelukkende mellom C-7 og C-8 av dets sialinsyreresiduer. Blant de kjente OAc-negative (OAc⁻)-stammer er N. meningitidis gruppe C MC 19-bakterier.

Det er et mål for foreliggende oppfinnelse å fremskaffe en sterkt immunogen vaksine omfattende et modifisert gruppe C
10 meningitidis O-deacetylert O-acetylpositivt polysakkarid konjugert til et bærermateriale og også å fremskaffe en sterkt immunogen vaksine inneholdende konjugatet av et bærermateriale og et slikt modifisert polysakkarid.

Oppsummering av oppfinnelsen

15 Konjugatet ifølge foreliggende oppfinnelse er kjemisk modifisert O-deacylert av Neisseria meningitidis gruppe C polysakkarid (GCMP) avledet fra OAc⁺-stammer hvor det deacetylerte polysakkarid er konjugert til et bærermateriale for å gi et sterkere immunogent materiale.

20 Oppfinnelsen angår videre en fremgangsmåte for å fremstille det immunogene konjugat ved aktivering av gruppe C meningo-kokkisk polysakkarid eller et fragment derav ved deacetylering av polysakkarider som angitt i krav 8.

På denne måten blir det dannet et residuum innen det deacetylerte polysakkarid fra Oac⁺-stammer som gir et reaktivt område for kobling enten direkte til et bærermateriale eller til bærer materialet via et sammenbindende molekyl.

Foreliggende oppfinnelse angår videre bruken av konjugatet av det O-acetylerte gruppe C-polysakkarid til fremstilling
30 av en kraftig baktericidisk vaksine i pattedyr som er

utsatt for bakteriell meningitidis. Vaksinen kan innbefatte en adjuvant, så som aluminiumhydroksyd eller stearisk tyrosin.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

5 For å øke immunogenisiteten av det gruppe C meningokokkiske polysakkarid (GCMP) blir et modifisert GCMP dannet og kovalent bundet til et bærermolekyl. Polysakkaridkonjugatet kan dannes ved en mengde kjemiske, fysiske eller enzymatiske koblingsreaksjoner. Koblingsteknikken som benyttes, er avhengig av bindingsmidlene som kan anvendes og av de reaktive grupper på bærermaterialet eller molekylet. En mengde koblingsprosedyrer er kjent for fagmannen og kan lett bli anvendt.

Bærermaterialet eller -molekylet er definert heri som et
15 hvilket som helst materiale eller molekyl som har grupper som er i stand til å bli koblet til polysakkaridenheter. Polymere bærermaterialer kan være et naturlig eller et syntetisk materiale, og kan være vannoppløselig eller vannuoppløselig. Bærermaterialer eller -molekyler er vanligvis
20 proteinaktige av natur. Når det gjelder et proteinbærermateriale, kan proteinet være ethvert fysiologisk tolerert protein som har en reaktiv gruppe som er tilgjengelig for kobling. Enhver type bærermateriale kan brukes som inneholder en primær eller en sekundær aminogruppe. De reaktive
25 frie aminogrupper kan passende kobles til polysakkaridet via enheter så som hydroksyler, aldehyder, karboksylsyrer og lignende. Egnede proteiner innbefatter naturlige peptider og proteiner, så som bovin serumalbumin, bakterielle toksoider avledet fra bakterielle toksiner ved deres syntetiske modifisering, f.eks. difteritoksoid, tetanustoksoid,
30 Pertussis toksin eller Pertussis toksoid, Pseudomonas aeruginosa rekombinant eksoprotein A og Clostridium perfringens eksotoksiner. Andre proteiner avledet fra bakterier kan også anvendes. Den bakterielle kilde kan f.eks.

være Hemophilus influenza, meningokokker, pneumokokker, β -hemolytiske streptokokker og E. coli. Andre proteiner inneholdende lysinresiduer, så som et syntetisk polylysin, kan også være anvendelige. Andre proteinbærere, såvel som andre
 5 ikke-proteinholdige bærermolekyler, er velkjent for fagmannen, og kan bli brukt som bærermolekyl i foreliggende oppfinnelse. Eksempler på vannuoppløselige bærermaterialer er aminoalkyl-sefaroer, f.eks. aminopropyl- eller aminoheksyl-sefaroer, og aminopropyl-glass. Andre bærermaterialer kan også brukes, som er modifisert til å inneholde en
 10 kjemisk bundet aminogruppe. Slike bærermaterialer kan være avledet fra polysakkarider til hvilke en aminoalkylgruppe er festet via en kovalent binding.

I en utførelsesform blir O-acetylgruppene på posisjonene 7 og/eller 8 av sialylenhetene i gruppe C polysakkaridet fra OAc⁺-stammer selektivt fjernet til mer enn 80 % fra det meningokokkiske gruppe C polysakkarid ved behandling med et passende reagens. Mange deacetyleringsreagenser er kjent for fagmannen. Foretrukket blir deacetyleringen utført
 20 under milde basiske betingelser i vandig medium, så som i omkring 0,01 til 0,5 N natriumhydroksid, fortrinnsvis 0,1 N natriumhydroksid, ved omkring 0 til 50°C, fortrinnsvis 25°C. Andre basiske oppløsninger, så som kaliumhydroksid, ammoniumhydroksid og lignende, kan også bli brukt for denne
 25 reaksjon. Deacetyleringsreaksjonstemperaturen og basekonsentrasjonen benyttet i reaksjonen, kan varieres ved å ha i tankene at kun milde betingelser bør opprettholdes. Det er foretrukket at reaksjonsbetingelsene bør kontrolleres slik at kun deacetylering av gruppe C polysakkaridet blir oppnådd i ønsket grad. O-deacetyleringen blir utført inntil
 30 den ønskede grad av deacetylering er oppnådd, f.eks. i omkring 1 til 25 timer, fortrinnsvis omkring 16 timer i 0,1 N NaOH.

Utbyttet at det O-deacetylte polysakkarid fra deacetyleringsreaksjonen under anvendelse av milde betingelser er
 35

typisk i overkant av 80%. Graden av O-deacetylering kan variere fra omkring 30% til 100%, avhengig av de anvendte betingelser. Typisk tillater variering av temperatur og reaksjonstid å variere graden av O-deacetylering på polysakkaridet. Det er foretrukket at O-deacetylering er i området større enn 80% og mest foretrukket blir 100% deacetylering.

Det kan også være ønskelig å fragmentere eller depolymerisere polysakkaridkjeden (før eller etter deacetylering) før konjugering til bærer-molekylet. Polysakkarider er følsomme overfor mange reagenser og kan bli hydrolysert med svake syrer så som eddiksyre, eller oksydert med reagenser så som metaperiodat. Deacetylert polysakkarid kan bli både fragmentert og aktivert for konjugering ved metaperiodatoksidering. Fagmannen vil ha kunnskap om andre metoder for å gjennomføre dette trinn av reaksjonen.

De immunogene konjugater ifølge oppfinnelsen blir fremstilt ved først å danne reduserende endegrupper på fragmenter av det O-deacetylerte GCMP og så omsette de reduserende endegrupper med amingrupper av bærer-materiale eller -molekyl ved hjelp av reduktiv aminering. De reduserende endegrupper kan bli dannet ved enhver egnet metode, innbefattende selektiv hydrolyse, dvs. ved syrer eller enzymer, eller ved oksydativ spaltning, dvs. med metaperiodat. Konjugeringen blir fortrinnsvis oppnådd ved reduktiv aminering i en vandig oppløsning inneholdende et reduksjonsmiddel så som cyanoborhydridanioner. Andre metoder for kobling av et polysakkarid til bærer-molekyler er kjent for fagmannen.

En foretrukket metode for kobling innbefatter en totrinns-reaksjon. Polysakkaridet er metaperiodat-oksydert for å danne aldehydenheter og blir så omsatt i nærvær av triaminogrupeer på bærer-molekylet og i nærvær av et egnet reduksjonsmiddel. Passende reduksjonsmidler vil typisk innbefatte cyanoborhydrid, natriumborhydrid og andre reduk-

sjonsmidler, som ikke vil redusere de reduserende ender av
 interessse og heller ikke på ugunstig måte påvirke bærer-
 molekylet eller -materialet. Reduksjonsmidlet virker som et
 mildt selektivt reduserende middel av Schiff's base-interme-
 5 diatet, dannet mellom karbonylgruppene av det hydrolyserte
 GCMP-fragment og aminogruppene av bærermolekylet eller -
 materialet. Typiske reaksjonsbetingelser for denne type
 konjugering er gitt i Jennings et al. US patent 4.356.170,
 som i sin helhet er innbefattet heri pr. referanse.

10 Det skal imidlertid forstås at konjugatvaksinene ifølge
 oppfinnelsen ikke er begrenset til dem som er fremstilt via
 reduktiv aminering. Således kan vaksinene også bli dannet
 ved å konjugere polysakkaridet med bærerproteinet ved å
 bruke en adipin dihydrazid avstandsgruppe, som beskrevet av
 15 Schneerson, R., et al., Preparation, Characterization and
 Immunogenicity of Haemophilus Influenza Type B Polysaccha-
 ride-Protein Conjugates, J. Exp. Med., 1952, 361-476 (1980)
 og i US patent 4.644.059 til Lance K. Gordon. Alternativt
 kan den binære avstandsgruppeteknologi anvendes, som er
 20 beskrevet av Marburg, S., et al., "Biomolecylar Chemistry
 of Macromolecules: Synthesis of Bacterial Polysaccharide
 Conjugates with Neisseria meningitides Membrane Protein",
J.Am.Chem. Soc., 108, 5282-5287 (1986) eller eventuelt
 reduserende endemetoden, som referert til av Anderson i US
 25 patent 4.673.574.

De immunogene konjugater ifølge forbindelsen kan formuleres
 med en eller flere farmasøytisk akseptable eksipienter og
 eventuelt andre ingredienser. De farmasøytisk akseptable
 eksipient(er) må være "akseptable" i den forstand at de er
 30 kompatible med de andre bestanddeler av formuleringen og
 ikke skadelige for mottakeren derav. Formuleringene kan
 passende presenteres i enhetsdoseform og kan fremstilles
 ved enhver metode som er velkjent innen det farmasøytiske
 fag.

Fremstilling av vaksiner som inneholder polysakkaridkonjugater som aktive bestanddeler, er godt forstått innen faget. Typisk blir slike vaksiner fremstilt som injiserbare materialer, enten som flytende oppløsninger eller suspensjoner. Faste former, egnet for oppløsning i eller suspensjon i væske før injeksjonen, kan også bli fremstilt. Preparatet kan også bli emulgert. Den aktive immunogene bestanddel blir ofte blandet med en eksipient som er farmasøytisk akseptabel og kompatibel med den aktive bestanddel. Passende eksipienter er f.eks. vann, fysiologisk saltvann, dekstrose, glycerol, etanol eller lignende, og kombinasjoner derav. I tillegg kan vaksinen øm ønsket inneholde mindre mengder hjelpesubstanser, så som fuktende eller emulgerende midler, pH-bufrende midler, eller adjuvanter som øker effektiviteten av vaksinen. Enhver passende adjuvant kjent for fagmannen kan brukes. Egnede adjuvanter innbefatter bl.a. stearyltyrosin, aluminiumhydroksyd, aluminiumfosfat og aluminiumsulfat. Det er blitt funnet at vaksiner dannet med aluminiumhydroksidadjuvant er spesielt effektive. Vaksinene blir konvensjonelt tilført parenteralt, ved injeksjon, f.eks. enten subkutan eller intramuskulært.

Vaksinene blir tilført på en måte som er kompatibel med doseformuleringen og i en slik mengde som vil være terapeutisk effektiv og immunogen. Mengden som skal tilføres, avhenger av pasienten som skal behandles, evnen av pasientens immunsystem til å syntetisere antistoff og den ønskede grad av beskyttelse. Nøyaktige mengder aktiv bestanddel som det er nødvendig å tilføre, avhenger av legens vurdering og er spesielle for hvert individ. Passende doseringsområder er imidlertid i størrelsesorden flere hundre µg aktiv bestanddel pr. individ. Passende metoder for opprinnelig tilførsel og forsterkningsinjeksjoner er også variable, men er typisk én initial tilførsel, etterfulgt i én eller to ukers intervaller med en påfølgende injeksjon, eller annen tilførsel.

Vaksinen ifølge foreliggende oppfinnelse gir effektive nivåer av anti-GCMP antistoff i pattedyr. Denne vaksine kan bli gitt til pattedyr av enhver alder, og kan bli anvendt til å indusere aktiv immunisering mot systemisk infeksjon forårsaket av *Neisseria meningitidis* ved å tilføre en immu-
 5 nogen mengde av konjugatet til pattedyr som er mottakelige for sykdommen.

Generelt er vaksiner inneholdende fra omkring 5 til omkring 100 µg, fortrinnsvis omkring 10 til 50 µg, egnede for å gi
 10 effektive nivåer av antistoff mot GCMP i unge pattedyr. Den nøyaktige dosering vil bli bestemt ved forsøk. Det ventes at flere små doser gitt sekvensielt vil være overlegne samme mengde konjugat gitt som en enkelt injeksjon.

Det kan med konjugatet ifølge oppfinnelsen fremskaffes en
 15 gamma globulinfraksjon som er i stand til å beskytte mot meningitidis forårsaket av gruppe C N. meningitidis. Fraksjonen blir dannet ved å immunisere et pattedyr med vaksinen ifølge foreliggende oppfinnelse. Fraksjonen blir så tilført til et individ for å gi beskyttelse mot eller for å
 20 behandle pågående infeksjon forårsaket av de ovennevnte organismer. Utfra dette vil det bli forstått at de immunogene konjugater ifølge oppfinnelsen vil utgjøre en kilde for terapeutisk antiserum i betraktning av deres gunstige immunogenisitet. Konjugatene ifølge oppfinnelsen vil også
 25 være anvendelige for å fremskaffe monoklonale antistoffer og eventuelt anti-idiotype antistoffer.

O-deacetylering av det meningokokke gruppe C polysakkarid kan utføres ved å behandle med en mild base, så som 0,01 til 0,5 N NaOH, fortrinnsvis 0,1 N NaOH, ved omkring 0 til
 30 50°C, fortrinnsvis 25°C, i omkring 1 til 25 timer, fortrinnsvis omkring 16 timer. Fjerningen av acetylgruppene fra 7- og/eller 8-posisjonene blir bekreftet ved NMR-spektroskopi.

I de påfølgende trinn blir polysakkaridet renset ved gelfiltrering, så som på Superdex 200 prep grad. Reduktiv delvis depolymerisering under anvendelse av natriumperiodat blir utført på det deacetylerede polysakkarid fra OAc⁺-
 5 stammer, for å gi et aktivert polysakkarid som har den optimale størrelse for å gi den maksimale immunrespons. Polysakkaridet blir renset ved gelfiltrering, dialysert for å fjerne salter og frysetørket. Det blir deretter koblet
 10 til et passende proteinbæreremateriale, så som tetanus-toksoid, ved den reduktive amineringsreaksjon. De resulterende konjugater blir renset ved gelfiltrering og analysert for immunogenisitet i FRW fullt utviklede Swiss Webster mus, innkjøpt fra Charles Rivers.

Kort beskrivelse av figurene

15 Fig. 1. Effekten av polysakkarid O-acetylering i GCMP-TT-konjugatene på serum ELISA-titerne. ELISA-platene var belagt med O-acetyl-negativt GCMP-HSA-konjugat.

Fig. 2. Effekten av polysakkarid O-acetylering i GCMP-TT-konjugatene på serum ELISA-titerne. ELISA-platene var
 20 belagt med O-acetyl-positivt GCMP-BSA-konjugat.

Fig. 3. Effekten av polysakkarid O-acetylering i GCMP-TT-konjugatene på den komplementavhengige baktericide aktivitet. Den baktericide aktivitet mot **N. meningitidis** gruppe C-stamme C11, en O-acetylpositiv stamme, ble bestemt.

25 Fig. 4. Effekten av polysakkaridstørrelse i GCMP-TT-konjugatene på serum ELISA-titerne. ELISA-platene var belagt med O-acetyl-negativt GCMP-HSA-konjugat.

Fig. 5. Effekten av polysakkaridstørrelse i GCMP-TT-konjugatene på serum ELISA-titerne. ELISA-platene var belagt med
 30 O-acetyl-positivt GCMP-BSA-konjugat.

Fig. 6. Effekten av polysakkaridstørrelse i GCMP-TT-konjugatene på komplementavhengige baktericide aktiviteter. Baktericid aktivitet mot **N. meningitidis** gruppe C stamme C11, en O-acetyl-positiv stamme, ble bestemt.

5 Eksempel 1

O-deacetylering av gruppe C meningokokkisk polysakkarid (GCMP)

Nativt meningokokkisk gruppe C polysakkarid (188 mg) ble oppløst i 0,1 N natriumhydroksidoppløsning (30 ml). Blendingen ble omrørt ved 25°C i 16 timer. Den ble så dialysert ved 4°C mot vann og frysetørket. Det ble påvist ved ¹H NMR-spektroskopi (500 MHz) at polysakkaridet (144 mg, 77%), som ble beholdt som et hvitt bomullsaktig fast stoff, var O-deacetyllert.

15 Eksempel 2

Rensing av O-acetyllert gruppe C polysakkarid (GCMP)-(-)

Det O-acetyllerte polysakkarid (141 mg) ble oppløst i Dulbecco's PBS (10 ml) og renset ved gelfiltrering på en Superdex 200 kolonne (2,6 x 200 cm) av prep grad. Kolonnen ble eluert ved 100 ml/time, og 5,0 ml fraksjoner ble samlet opp. Eluatet ble overvåket med et differensielt refraktometer og en UV (280 nm) detektor. Fraksjonene inneholdende den første hovedtopp som ble påvist med det differensielle refraktometer og som var i hovedsak fritt for UV-absorberende materiale, ble slått sammen. Etter dialyse mot vann og frysetørking ble renset GCMP-(-) (108 mg, 77%) beholdt som et hvitt bomullsaktig fast stoff. Det faste materiale ble analysert for protein med Bradfordmetoden og for nukleinsyrer med UV-absorbens ved 260 nm. Som vist i Tabell 1 ble disse forurensninger i vesentlig grad fjernet ved dette opprensningstrinn. I tillegg viste analyse av GCMP-(-) ved HPLC under anvendelse av Superose 12 gelfiltreringskolonnen

(Pharmacia) at det eluerer som en skarp nullvolumstopp, slik det også ble observert for det opprinnelige native polysakkarid (GCMP), noe som indikerer at det rensede polysakkarid er tilstede i en høy molekylvekts form.

5 Eksempel 3

Oksidasjon og størrelsesbestemmelse av rensset GCMP-(-)

Oksideringen av polysakkaridet med natriummetaperiodat tjener det doble formål å aktivere polysakkaridet for etterfølgende kobling til proteiner og å spalte polysakkaridet i mindre fragmenter som tidligere har vist seg å gi den optimale immunrespons. Siden det på forhånd også har blitt vist at forskjellige typer polysakkarid krever forskjellige periodatoksideringsbetingelser for å oppnå de optimale polysakkaridkjedelengder, blir disse betingelser først bestemt ved småskalareaksjoner (5 mg), hvorefter reaksjonen i stor skala blir utført. Normalt blir reaksjonstiden og temperaturen holdt konstant ved hhv 2 timer og 25°C, og konsentrasjonen av natriummetaperiodatet blir variert mellom 3 og 12 millimolar i avionisert vann. Konsentrasjonen av polysakkaridet i små- og storskalareaksjonene blir også holdt konstant ved 6-10 mg/ml. Ved slutten av 2 timers perioden blir et overskudd (inntil 10 ganger) av en 1,0 M etylenglykoloppløsning tilsatt til reaksjonsoppløsningen for å ødelegge uomsatt natriummetaperiodat. Etter minst 30 minutters reaksjon blir oppløsningene analysert med HPLC under anvendelse av en kalibrert Superose-12-kolonne for å bestemme den gjennomsnittlige molekylvekt av det oksiderte polysakkarid. Reaksjonsbetingelsene, som ga polysakkarid som har en gjennomsnittlig molekylvekt på 12.000-16.000 Dalton, blir brukt i storskalareaksjonen, som illustrert ved den følgende reaksjon.

Renset GCMP-(-) (63 mg) ble oppløst i avionisert vann (4,81 ml). Til denne oppløsning ble det tilsatt en 21 mmol natriummetaperiodatoppløsning (4,81 ml) for å gi en reaksjons-

blanding i avionisert vann som har polysakkaridet ved 6,55 mg/ml og NaIO₄ ved 10,5 mmol. Reaksjonen fikk fortsette ved 25°C i 2 timer i mørke, og ble deretter behandlet med 1 M etylenglykol (0,96 ml) i 30 min. Dette materiale eluerer på
 5 Superose-12-kolonnen som en bred topp med en gjennomsnittlig molekyllvekt på 12.800 Dalton. Volumet av oppløsningen ble redusert til omkring 5 ml på frysetørkermaskinen, og materialet ble rensset ved gelfiltrering på en Superdex 200 prep grad kolonne (2,6 x 100 cm) under anvendelse av Dul-
 10 beccos PBS som elueringsbuffer, og 5 ml fraksjoner ble samlet opp. De fraksjoner som inneholdt materiale med en gjennomsnittlig molekyllvekt mellom 10.000 og 18.000 ble slått sammen. Etter dialyse mot avionisert vann og fryse-
 tørking ble oksidert og størrelsesbestemt polysakkarid[o]-
 15 GCMP-(-) (16,0 mg, 23%) erholdt som et hvitt, bomullsaktig fast stoff som ved FPLC på Superose 12 viste seg å ha en gjennomsnittlig molekyllvekt på 14.500 Dalton.

Tabell 1

Protein- og nukleinsyreinnhold av gruppe C meningokokkiske
 20 polysakkaridpreparater

Polysakkarid% Protein% Nukleinsyre

GCMP	8,3	2,7	
Renset GCMP-(-)		0,61	0,12
[o]-GCMP-(-)		0,06	0,31

25 Eksempel 4

Fremstilling av [o]-GCMP-(+)

Nativt GCMP (350 mg) ble oppløst i 0,02 N NaOH (36 ml) og inkubert ved 25°C i 3 timer. Til denne oppløsning ble det tilsatt 0,1 M NaIO₄ (36 ml), og innholdet ble inkubert ved
 30 25°C i ytterligere 50 min. Reaksjonen ble så behandlet med 50% etylenglykol (5,3 ml) i 20 min, og blandingen ble klargjort ved sentrifugering ved 5000 omdr/min 10 min. Super-

natanten ble dialysert mot avionisert vann og frysetørket for å gi 300 mg av et fast stoff. Materialet ble størrelsesbestemt på en Bio-Gel A-0,5 m kolonne, og gav det oksiderte og størrelsesbestemte polysakkarid {[o]-GCMP-(+)} som har en molekyllvekt på 11.500 Dalton.

Eksempel 5

Rensing av tetanustoksoidproteinmonomeren (TT)

Til en forsiktig omrørt tetanustoksoidoppløsning (Statens Seruminstitut) [inneholdende 2,1 mg/ml protein (Bradford protein assay under anvendelse av human IgG som standard)] (75 ml) ble det tilsatt i små porsjoner over en periode på 45 min ammoniumsulfat (42,1 g) for å gi en 80% mettet oppløsning. Den turbide oppløsning fikk stå ved 4°C over natten for å fullstendiggjøre utfellingen av proteinet.

Presipitatet ble samlet opp ved sentrifugering ved 15.000 omdr/min (23.000 g) i 20 min, og supernatanten som inneholdt mindre enn 10% av det opprinnelige protein ble kastet. Pelleten ble på ny oppløst i Dulbeccos PBS-buffer (10 ml) og fraksjonert ved gelfiltrering på en Bio-Gel A-0,5 m kolonne. Hovedtoppen, som tilsvarer tetanustoksoidmonomeren, ble slått sammen og dialysert mot avionisert vann og frysetørket for å gi TT som et hvitt bomullsaktig fast stoff (65,4 mg, 41%).

Eksempel 6

Kobling av O-deacetyllert gruppe C meningokokkisk polysakkarid {[o]-GCMP-(-)} til tetanustoksoid (TT)

En oppløsning inneholdende [o]-GCMP-(-) (10 mg), TT (3,3 mg) og natriumcyanoborhydrid (6,8 mg) i 0,20 M fosfatbuffer pH 7,5 (0,222 ml) ble holdt ved 37°C over flere døgn. Reaksjonsoppløsningen ble fortynnet med PBS-buffer (0,5 ml), og uoppløselig materiale ble fjernet ved sentrifugering i en Eppendorf sentrifuge ved 10.000 omdr/min i 2 min. Supernatanten ble satt på en 1,6 x 100 cm Bio-Gel A-0,5 m kolonne

og eluert med 0,15 M NaCl + 0,02% thimerosal ved 20 ml/t. Fraksjoner tilsvarende toppen som eluerte ved 0-volumet, ble slått sammen for å gi det O-deacetylerede gruppe C meningokokkiske polysakkarid-tetanustoksoidkonjugat [(GCMP-
 5 (-)-TT]. Den sammenslåtte oppløsning ble analysert for protein ved Bradford-metoden og påvist å inneholde 2,86 mg protein (87% utbytte). Polysakkaridinnholdet i konjugatet ble beregnet fra innholdet av sialinsyre som ble bestemt ved resorcinolassayet for sialinsyre, og viste seg å inne-
 10 holde 0,997 mg polysakkarid (10% utbytte). Særtrekkene for konjugatet er oppsummert i Tabell 2.

Eksempel 7

Kobling av O-acetylerede gruppe C meningokokkisk polysakkarid { [o] }-GCMP-(+) til tetanustoksoid

15 En oppløsning inneholdende [o]-GCMP-(+) (10,2 mg), TT (2,9 mg) og natriumcyanoborhydrid (5,2 mg) i 0,20 M fosfatbuffer pH 7,5 (0,20 ml) ble holdt ved 37°C i 5 dager. Konjugatet ble renset ved gelfiltreringskromatografi og analysert som beskrevet i eksempel 6. Denne konjugatoppløsning inneholder
 20 2,7 mg (93% utbytte) protein og 1,06 mg (10,4% utbytte) polysakkarid. Særtrekkene for dette konjugat er oppsummert i Tabell 2.

Tabell 2

Særtrekk for GCMP-(-)-TT og GCMP-(+)-TT-konjugatene			
Konjugat	Polysakkarid Acetylering Gj.snittlig mol.vekt	Protein PS	% Polysakka- rididkonju-gatet
GCMP-(-)-TT	O-deacetyleret 12.500	2,9:1	26
GCMP-(+)-TT	O-acetyleret 11.500	2,6:1	28

Eksempel 7AFremstilling av (-)-GCMP-TT-vaksine

(-)-GCMP-TT-vaksinene fremstilles på samme måte som GCMP-(-)-TT-vaksinene i de ovennevnte eksempler, bortsett
 5 fra at polysakkaridet blir erholdt fra *N. meningitidis* gruppe C stamme MC 19-bakterier. Dette bakterium danner GCMP som mangler O-acetylenhetene.

Eksempel 8

10 Fremstilling av konjugatvaksineoppløsningene og biologiske studier

Konjugatoppløsningene beskrevet i eksempel 6 og 7 ble for-
 tynnet med fysiologisk saltvann (0,15 M NaCl + 0,02% thimerosal), slik at konsentrasjonen av polysakkarid i alle
 15 vaksiner er 10 µg/ml. Halvparten av disse vaksiner inneholdt også aluminiumhydroksydadjuvant ved en konsentrasjon på 1,0 mg/ml.

Immunogenisiteten av disse vaksiner ble undersøkt i 4-6 uker gamle utvokste Swiss Webster CFW hunnmus. Dyrene ble injisert subkutan med 0,2 ml av vaksiner på dag 0, 14 og
 20 28, og serum for antistoffassay ble samlet opp på dag 38.

Eksempel 9

Enzymtilknyttet immunosorbentassay (ELISA) for museanti-
 stoff til *Neisseria meningitidis* gruppe C polysakkarid

ELISA ble utført ved å belegge mikrotiterplater med det
 25 passende polysakkarid [GCMP-(-) eller GCMP-(+)] human serumalbumin (HSA)-konjugat, fulgt av behandling med BSA blokkeringsbuffer. Fortynninger av serumene i PBS-Tweenbuffer ble så tilført. Platene ble inkubert ved romtemperatur i 1 time, vasket og behandlet med det andre antistoff
 30 [geite antimus IgG (H+L)-peroksydase] ved romtemperatur i 30 minutter. Dette ble etterfulgt av grundig vask med PBS-

Tween og behandling med ferskt preparert TMB peroksydase-substrat. Etter 15 minutter ble enzymreaksjonen stoppet med 1 M fosforsyre tilsatt til hver brønn, og absorbansen ble analysert under anvendelse av en mikroplateavleser.

5 ELISA-titerne er oppsummert i Tabell 3.

Eksempel 10

Baktericidisk assay for Neisseria meningitidis serogruppe C

Den baktericide aktivitet ble undersøkt ved å inkubere Neisseria meningitidis gruppe C (stamme C11) i nærvær av en
10 passende fortynning av forsøksserumet og kaninungeserum (komplementkilde) ved 37°C i 1 time. To negative kontroller ble inkubert på lignende måte, i det ene tilfelle uten forsøksserumet og i det andre tilfelle inneholdende varme-inaktivert komplement. Porsjoner av disse oppløsninger (50
15 µl) ble så påført sjokoladeagarplater i duplikat og inkubert ved 35-37°C i 5% CO₂ over natten for å undersøke om det fantes overlevende. Neste morgen ble antallet kolonier på hver plate telt opp, og gjennomsnittet utregnet for duplikatene. Den serumbaktericide titer blir ansett som
20 serumfortynningen som gav 50% overlevelse. De baktericide aktiviteter for de forskjellige vaksiner er oppsummert i Tabell 3.

Tabell 3

Vaksine	ELISA titer	Baktericid titer

GCMP-(+) i fys. saltvann	230	Ingen respons
GCMP-(+)-TT i fys. saltvann	12.293	Ingen respons
GCMP-(+)-TT i fys. saltvann og alum	27.866	2.800
GCMP-(-)-TT i fys. saltvann	13.127	2.700
30 GCMP-(-)-TT i fys. saltvann og alum	25.537	21.000
(-)-GCMP-TT fys. saltvann	10.867	2.700
(-)-GCMP-TT alum	27.327	>40K

Analyse av de erholdte sera fra grupper av mus immunisert med de to typer konjugat med ELISA viste tilstedeværelse av høye titere av IgG antistoff i begge grupper av mus. Ytterligere analyse av serumene under anvendelse av et
 5 baktericidassay mot den modifiserte stamme, viste et overraskende resultat. Mens ELISA-titeren for sera erholdt fra begge vaksinegrupper var like, hadde sera erholdt fra mus som var immunisert med det modifiserte konjugat overlegne nivåer av baktericid antistoff, sammenlignet med sera fra
 10 mus som hadde fått den native konjugatvaksine. Resultatene av denne studie antyder at foreliggende konjugatvaksine får fram en klasse antistoff som har kraftig baktericidisk aktivitet.

15 Syntese av gruppe C meningokokkisk polysakkaridtetanustoksoid-konjugatene (GCMP-TT)

Gruppe C meningokokkisk polysakkarid isolert fra O-acetylpositive stammer ble rensset og delvis eller fullstendig O-deacetyllert med fortynnet base. Det O-deacetyllerte polysakkarid, så vel som rensede polysakkaridporsjoner ikke be-
 20 handlet med base, ble delvis depolymerisert og aktivert og rensset. Utstrekningen og posisjonen av O-acetylering på det rensede og aktiverte polysakkaridmateriale ble bestemt med høyoppløsnings Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy (600 MHz), og den gjennomsnittlige molekylvekt ved
 25 gelfiltreringskolonnekromatografi. Se Tabell 4 for en oppsummering av disse data. Kobling (4) av disse aktiverte polysakkarider til tetanustoksoidprotein gav GCMP-TT-konjugatene vist i Tabell 5, hvor det også er oppsummert prosent polysakkaridinnhold i GCMP-TT-konjugatene.

30 Fremstilling av vaksineoppløsninger og biologiske studier

GCMP-TT-konjugatoppløsningene ble fortynnet med fysiologisk saltvann inneholdende 0,01% thimerosal og brukt direkte for immunisering av mus (fys. saltvann) eller adsorbert på

aluminiumhydroksid (Al-adjuvant) eller stearyltyrosin (ST-adjuvant). Hver endelige vaksineoppløsning eller blanding inneholdt konjugatet i 10 mg/ml med hensyn til konjugat-polysakkaridinnhold. Alle vaksineformuleringer sammen med
 5 tetanustoksoid- og polysakkaridkontroll ble undersøkt i grupper på 10 hunnmus (4-6 uker gamle) ved subkutan injeksjon av 0,2 ml av vaksineoppløsningene eller blandingene på dag 0, 14 og 28. Serumene ble samlet opp på dag 38 og lagret frosset inntil de ble analysert ved ELISA eller
 10 baktericidisk assay.

Serologiske studier

Immunresponsene mot gruppe C meningokokkisk polysakkarid i konjugatvaksinene er uttrykt som deres ELISA-titere. Hvert serum ble analysert med to metoder. I den første inneholdt
 15 det beleggende antigen [GCMP-Human Serum Albumin-konjugat] O-acetyl-negativt polysakkarid og i den andre inneholdt det beleggende antigen [GCMP-Bovin Serum Albumin-konjugat] det O-acetylpositive polysakkarid. ELISA-dataene er vist i figurene 1, 2, 4 og 5. Serumene fra kontrollene som innbe-
 20 fattet fritt tetanustoksoid-protein, O-acetylpositivt polysakkarid og det O-acetylnegative polysakkarid, ga ingen påviselige ELISA-titere ved de laveste analyserte fortynninger (1/1000). Alle sera ble også analysert for komplementavhengige baktericide aktiviteter mot N. meningitidis
 25 gruppe C stamme C11, en O-acetylpositiv stamme. De baktericide titere vist i fig. 3 og 6 er serumfortynningene som ga 50% overlevelse. Ingen av serumene fra kontrollene viste noen baktericid aktivitet ved de laveste analyserte fortynninger (1/1000).

Resultater og drøfting

Immunresponsen mot alle konjugatene fremstilt i denne studie ble vurdert i tre forskjellige vaksineformer under anvendelse av både ELISA og det komplementavhengige bakteri-

cide assay. Formuleringene innbefatter saltoppløsninger av konjugatet eller som adsorberte blandinger på aluminiumhydroksyd stearyltyrosin. ELISAene av serumene fra alle konjugatene viser vesentlig høyere immunresponser når konjugatene var adsorbent på aluminiumhydroksidet og lavest når de ble injisert som sine saltoppløsninger (se figurene 1, 2, 4 og 5). Konjugater kompleksdannet med stearyltyrosin gav i alle tilfeller høyere immunresponser enn saltoppløsningene, men immunresponsene var også alle tilfeller flere ganger lavere enn for de aluminiumhydroksydsorberte konjugater. Det baktericide assay viste den samme tendens for de tre vaksineformuleringer (se figur 3 og 6). ELISA-titrene for GCMP-TT-konjugatene i hvilke den gjennomsnittlige molekylvekt av konjugat-polysakkaridet er lik (12.000-14.800, se tabell 1), er vist i fig. 1 og 2. I fig. 1 ble ELISA-titrene erholdt med det beleggende antigen (GCMP-BSA) inneholdende det O-acetylnegative polysakkarid. Med dette antigen er det et inverst forhold mellom ELISA-titere og utstrekningen av O-acetylering av konjugatpoly-sakkaridet, slik at de høyeste titere har blitt fremskaffet for det minst O-acetylte polysakkarid. Et fullstendig annerledes mønster kan observeres i figur 2, hvor det er vist titrene erholdt med det beleggende antigen (GCMP-BSA) inneholdende det O-acetylpositive polysakkarid. I dette tilfelle øker ELISA-titerene etter hvert som O-acetylinnholdet øker, men forskjellene i titere mellom konjugatene inneholdende den minste mengde O-acetylering og den største, er ikke så stor som den som ble observert da det O-acetyl-negative beleggende antigen ble anvendt (figur 1).

Forholdet mellom graden av O-acetylering og komplement-avhengig baktericid aktivitet mot meningokokkisk gruppe C stamme C11 (en O-acetylpositiv stamme) er vist i fig. 3. Det er en markert minking i baktericid aktivitet etter som graden av O-acetylering øker. Den baktericide aktivitet samsvarer således nært med ELISA-titerene erholdt med det O-acetyl-negative beleggende antigen (se figur 1). For

konjugatene adsorbert på aluminiumhydroksyd blir det både i ELISA og i det baktericide assay observert omtrent en tre gangers økning i titere, etter hvert som graden av O-acetylering øker fra 5 til 70%. Som vist i figur 1-3, viser de tre formuleringer av vaksinene den samme tendens i alle tre assays. I tillegg har forholdene vist i figur 1-3 blitt observert i gjentatte analyser av serumene.

I tillegg til graden av O-acetylering og typen av formulering har størrelsen av polysakkaridet i konjugatvaksinene en vesentlig effekt på immunresponsen. Dette er vist i figur 4-6 for GCMP-TT-konjugater, hvor polysakkaridet er 61-65% O-acetylert. De samme tendenser er observert i de to ELISAer (figur 4 og 5). De høyeste ELISA-titere blir observert for konjugatvaksinene hvor sakkaridet har en gjennomsnittlig molekylvekt på 12.000 Dalton i aluminiumhydroksid og stearyltyrosinformuleringene, selv om forskjellene er spesielt store for aluminiumhydroksydsorberte konjugater. I motsetning til de to ELISAer er de baktericide titere for aluminiumhydroksid- og stearyltyrosinformuleringene høyest for 6.600 Dalton polysakkaridet og minker etter som størrelse av polysakkaridet øker (se figur 6).

Tabell 4

Gjennomsnittlige molekylvekter og natur av O-acetylering i de rensede og aktiverte polysakkaridprøver

Polysakkarid-prøvenummer	Gjen.snittl.mol. vekt (Dalton)	% O-acetylering		
		7-OAc	8-OAc	(7+8)-OAc
1	6.600	40	23	63
2	12.000	34	27	61
3	12.800	31	4	35
4	13.000	41	27	68
5	14.000	-	-	6
6	14.800	40	26	66
7	40.000	36	29	65

- 5 % O-acetylering bestemmes ved høy oppløsnings NMR-spektroskopi ved å sammenligne integralene av metinprotonene på posisjon 7 og 8 med dem for protonene på posisjon 3 av sialinsyreresiduene.

Tabell 5

- 10 Oppsummering av % polysakkaridinnhold i GCMP-TT-konjugatene

Konjugatnummer	Polysakkarid-prøve nummer	% polysakkarid i konjugatet
1	1	35
2	2	34
15 3	3	41
4	4	48
5	5	38
6	6	40
7	7	30

P a t e n t k r a v

1. Immunogent konjugat omfattende et gruppe C meningokokkisk polysakkarid kovalent bundet til et polymert bæremateriale,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d a t det gruppe C meningokokkiske polysakkarid er et O-deacetyleret O-acetylpositivt gruppe C meningokokkisk polysakkarid eller et fragment derav, hvor graden av deacetylering er større enn 80% og som er egnet til anvendelse som en vaksine mot N-
10 meningitidis-infeksjon.
2. Immunogent konjugat ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t det polymere bærer materialet er et protein.
3. Immunogent konjugat ifølge krav 1 eller 2,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d a t deacetyleringsgraden er 100%.
4. Immunogent konjugat ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t bærer materialet er valgt fra gruppen omfattende tetanustoksoid, difteritoksoid, pertussis toksin, pertussis toksoid og et kryss-
20 reagerende materiale (CRM) samt en bakteriell proteinbærer.
5. Immunogent konjugat ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t den kovalente binding blir fremskaffet ved en reduktiv amineringsreak-
25 sjon.
6. Immunogent konjugat ifølge ethvert av krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t polysakkaridet er fragmentert før konjugering.
7. Immunogent konjugat ifølge krav 1,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d a t det fragmenterte

ikke-deacetylerede gruppe C polysakkarid har en molekylvekt på mellom omkring 5.000 og omkring 20.000 Dalton.

8. Fremgangsmåte ved fremstilling av et immunogent konjugat til innbefattelse i en vaksine mot N. meningitidisinfeksjon, omfattende aktivering av gruppe C meningokokkisk polysakkarid eller et fragment derav for kobling samt kobling av det aktiverte polysakkarid eller fragment derav til et bæremateriale,
karakterisert ved at før aktiveringen
10 blir mer enn 80% av acetylgruppene av polysakkaridet eller fragmentet derav deacetyleret.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8,
karakterisert ved at 100% av acetylgruppene blir deacetyleret.

15 10. Fremgangsmåte ifølge krav 8 eller 9,
karakterisert ved at deacetyleringen utføres under milde basiske betingelser i vandig medium.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 10,
karakterisert ved at deacetyleringen
20 utføres i 0,01 N til 0,5 N ammoniumhydroksid eller natriumhydroksid eller kaliumhydroksid ved en temperatur på 0 til 50°C.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 10,
karakterisert ved at deacetyleringen
25 utføres i 0,01 N til 0,5 N ammoniumoksid ved en temperatur på 0 til 50 °C.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 11,
karakterisert ved at deacetyleringen utføres i 1 til 25 timer i 0,1 N NaOH.

14. Konjugat ifølge krav 11,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t deacetyleringen
utføres i 16 timer i 0,1 N NaOH.
15. Immunogent konjugat ifølge krav 1,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d a t den polymere bærer
er et immunogent protein.
16. Immunogent konjugat ifølge krav 15,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t det immunogene
protein er et protein avledet fra bakterier valgt fra β -
10 hemolytiske streptokokker, Haemophilus influenza, meningo-
kokker, pneumokokker og E. coli.
17. Konjugat ifølge ethvert av kravene 1, 15 eller 16,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t proteinet og poly-
sakkaridet er kovalent bundet via en -CH₂-NH-binding.
- 15 18. Vaksine mot N.meningitidis-infeksjon omfattende en
farmasøytisk akseptabel injiserbar eksipient og eventuelt
en fysiologisk akseptabel adjuvant,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t den inneholder som
en immunogen komponent, en immunogen mengde av et konjugat
20 av et polymert bæremiddel kovalent bundet med et O-deacety-
lert O-acetylpositiv gruppe C meningokokkisk polysakkarid
eller fragment derav, O-deacetylert med en deacetylerings-
grad som er større enn 80 %.
19. Vaksine ifølge krav 18,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d a t den inneholder
nevnte polysakkarid eller fragment derav som er 100 %
deacetylert.
20. Vaksine ifølge krav 18,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t den ytterligere
30 omfatter en fysiologisk akseptabel adjuvant.

21. Vaksine ifølge krav 20,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte adjuvant er
aluminiumhydroksid, aluminiumfosfat, aluminiumsulfat eller
stearyltyrosin.

5 22. Vaksine ifølge krav 21,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t adjuvanten er
aluminiumhydroksid.

23. Anvendelse av immunogent konjugat ifølge krav 1 ved
fremstilling av en vaksine mot N. meningitidisinfeksjon.

10 24. Anvendelse ifølge krav 23 hvor deacetyleringsgraden er
100 %.

25. Anvendelse ifølge krav 23, hvor vaksinen er egnet for
parenteral tilførsel.

15 26. Anvendelse ifølge krav 23, hvor vaksinen er regnet til
å bli tilført i en doseringsmengde på omkring 1 til 25
mikrogram pr. kg kroppsvekt.

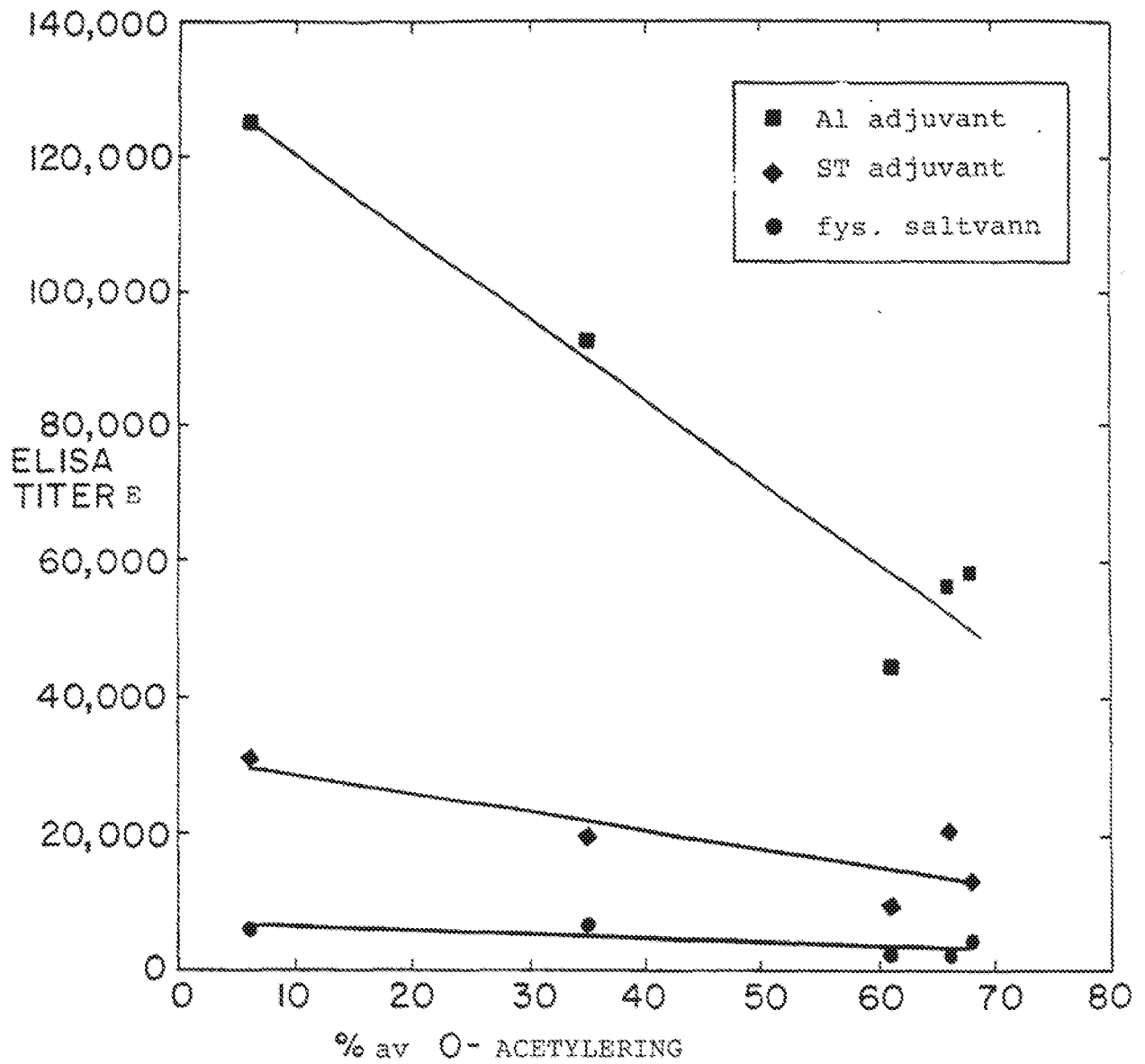


FIG. I

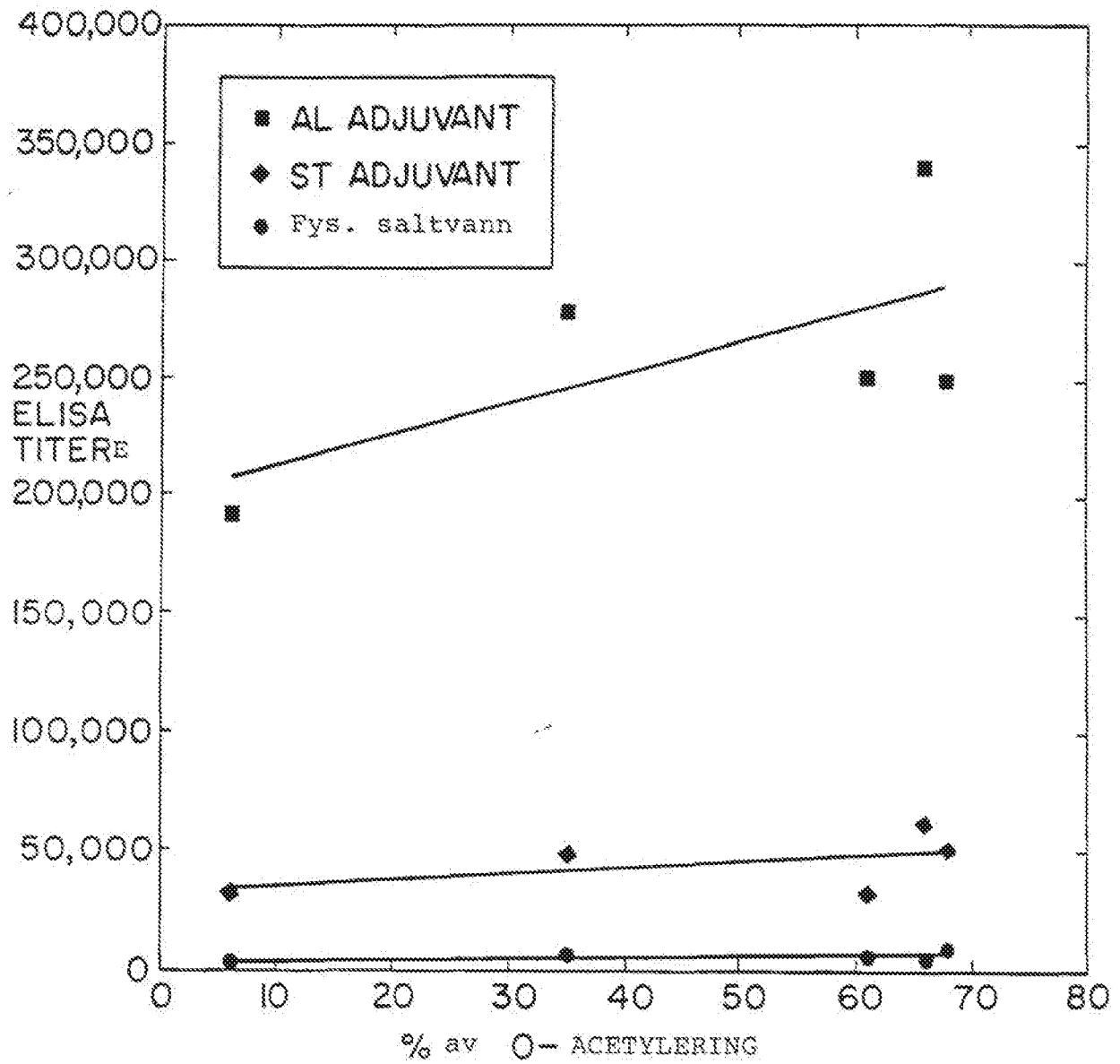


FIG. 2

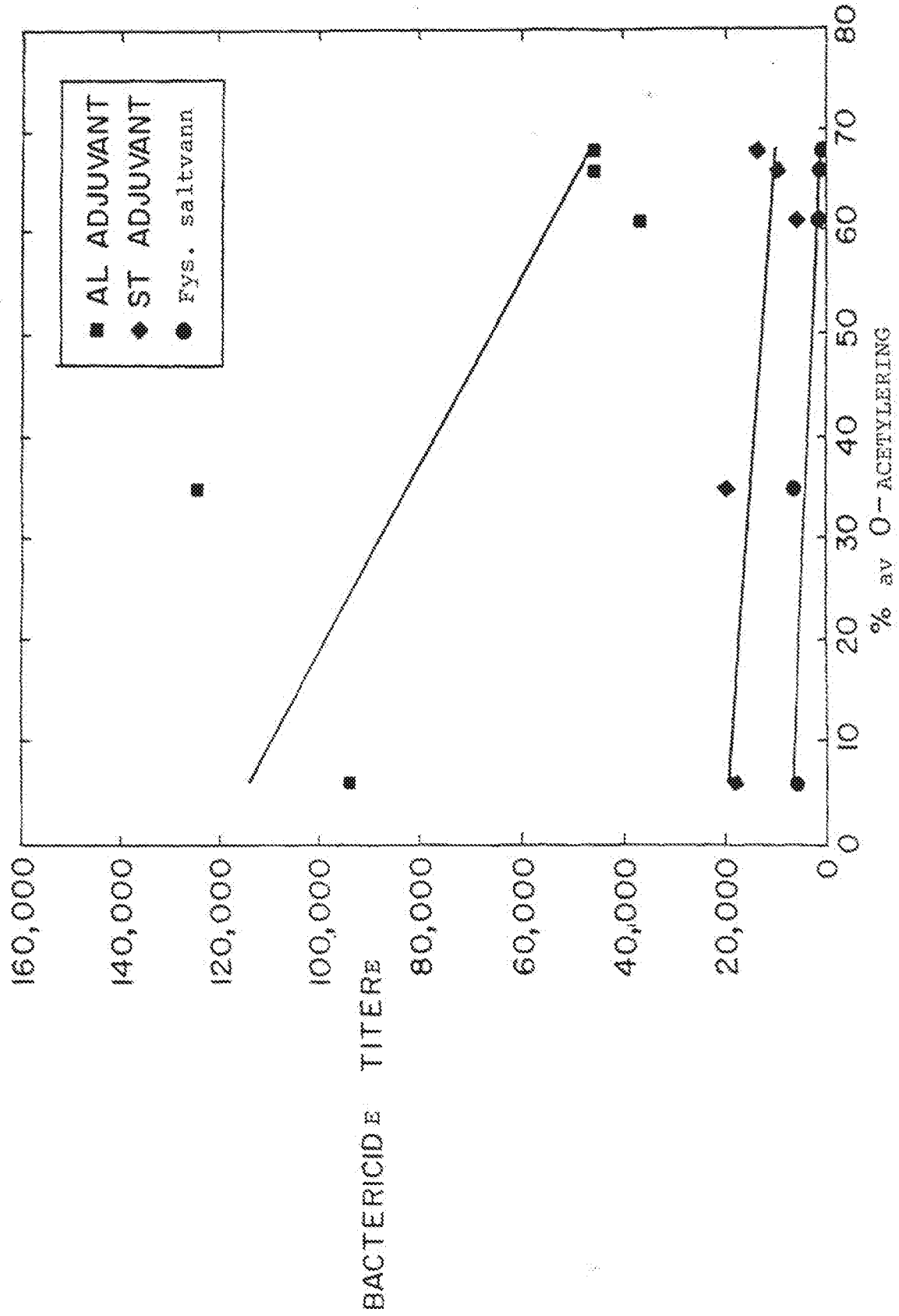


FIG. 3

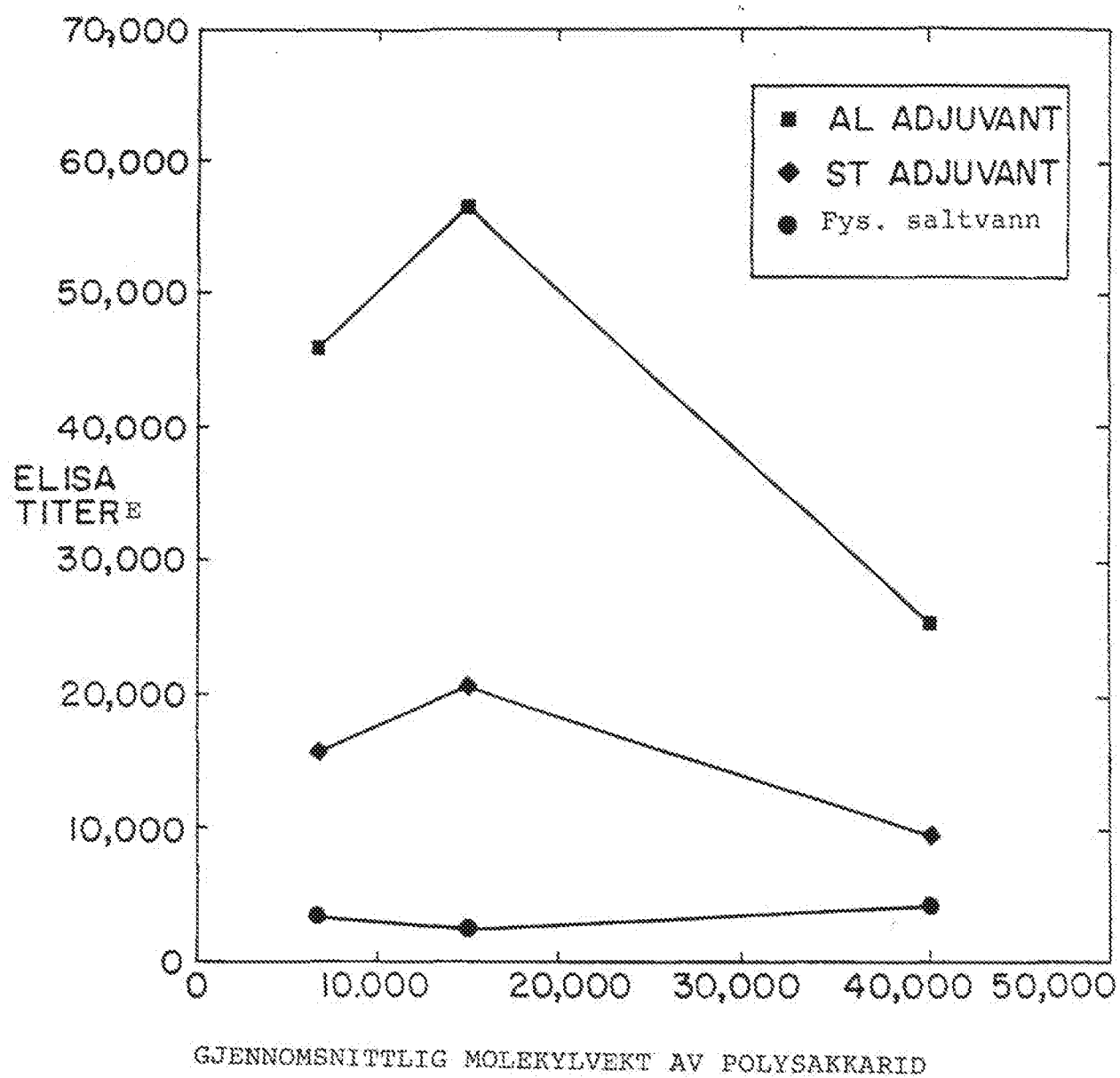


FIG. 4

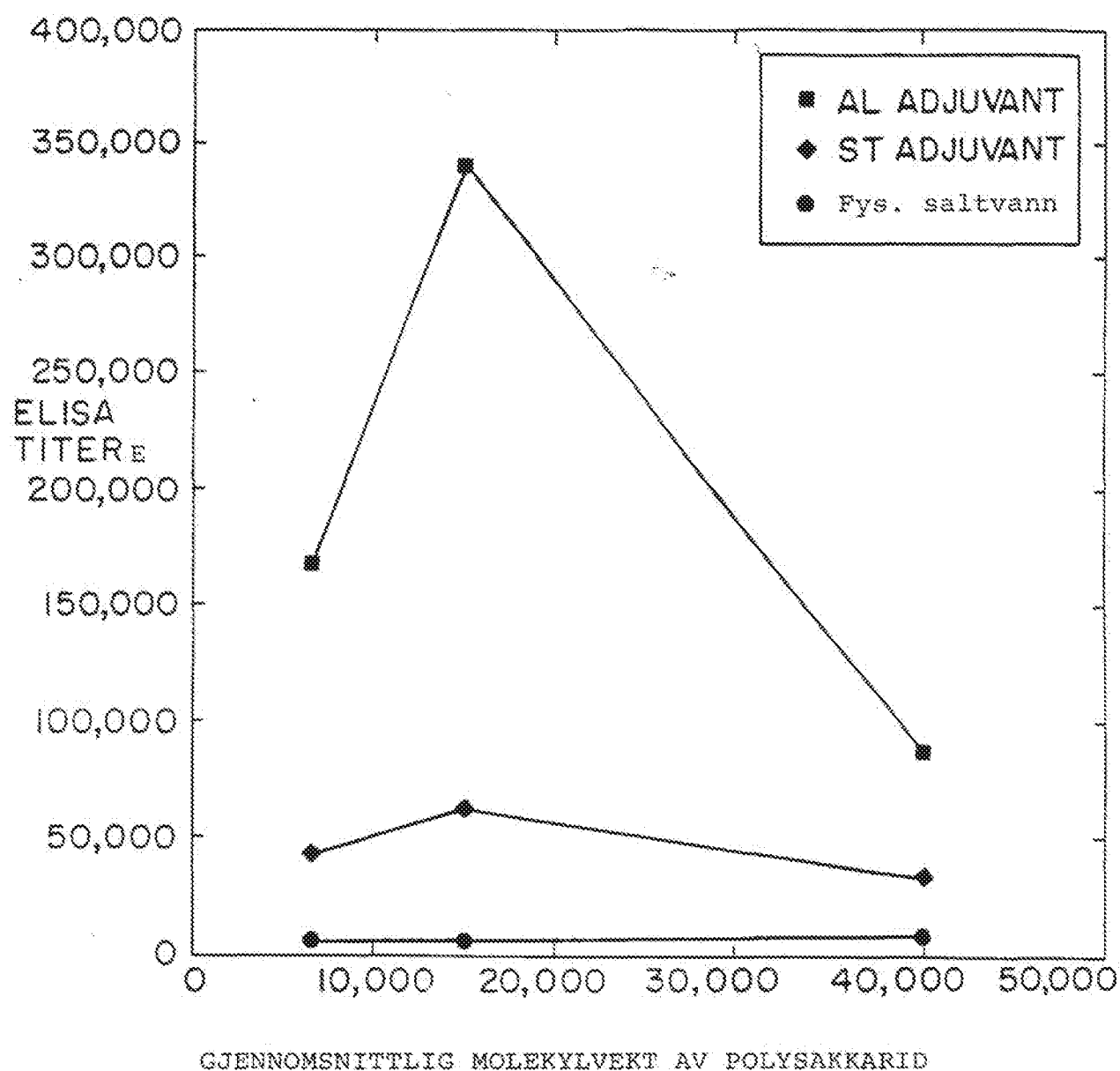


FIG. 5

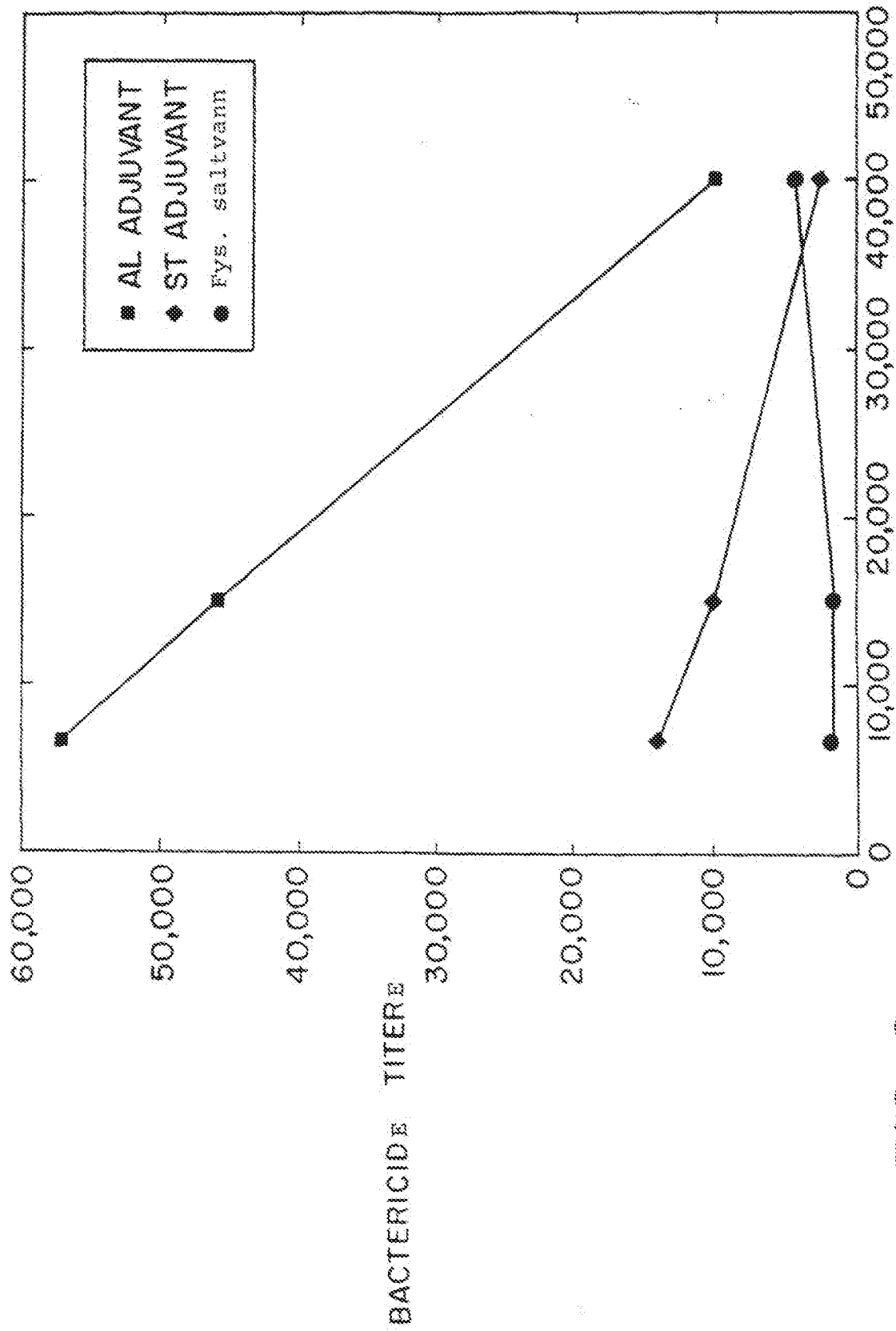


FIG. 6