



(12) PATENT

(11) 346529

(13) B1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 47/61 (2017.01)

A61K 47/64 (2017.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20082718	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.12.20 PCT/EP2006/69979
(22)	Inng.dag	2008.06.13	(85)	Videreføringsdag	2008.06.13
(24)	Løpedag	2006.12.20	(30)	Prioritet	2005.12.22, GB, 0526232 2006.04.07, GB, 0607087 2006.04.07, GB, 0607088 2006.05.18, GB, 0609902 2006.10.12, GB, 0620336 2006.10.12, GB, 0620337 2006.10.19, GB, 0620815 2006.10.19, GB, 0620816 2006.12.12, WO, PCT/GB2006/04634
(41)	Alm.tilgj	2008.09.16			
(45)	Meddelt	2022.09.26			
(73)	Innehaver	GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, 1330 RIXENSART, Belgia			
(72)	Oppfinner	Philippe Vincent Hermand, c/o GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, 1330 RIXENSART, Belgia Jan Poolman, c/o SmithKline Beecham Biologicals SA, 89, Rue de l'Institut, 1330 RIXENSART, Belgia Marcelle Paulette Van Mechelen, c/o GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, 1330 RIXENSART, Belgia Ralph Leon Biemans, c/o GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, 1330 RIXENSART, Belgia Nathalie Marie-Josephe Garcon, c/o GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, 1330 RIXENSART, Belgia			
(74)	Fullmektig	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Bruk av et immunogenpreparat for småbarn, omfattende 22F sakkaridkonjugat			
(56)	Anførte publikasjoner	US 2003099672 A1, WO 0200249 A2, WO 0056360 A2			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse er på området pneumokokk-kapselsakkarid-konjugatvaksiner. Spesifikt er det tilveiebrakt et immunogenpreparat for småbarn omfattende en multivalent *Streptococcus pneumoniae*-vaksine omfattende 2 eller flere kapselsakkaridkonjugater fra forskjellige serotyper, hvor preparatet omfatter et serotype 22F-sakkaridkonjugat. En slik vaksine kan anvendes for populasjoner av barn og for å redusere forekomsten av pneumokokksykdom hos eldre så som forverringer av KOLS og/eller IPD.

Foreliggende oppfinnelse angår en forbedret *Streptococcus pneumoniae*-vaksine.

Hos barn under 2 år fremkalles ikke noen immunrespons overfor de fleste polysakkaridvaksiner, og det har derfor vært nødvendig å gjøre polysakkaridene
5 immunogene ved kjemisk konjugering til en proteinbærer. Kobling av polysakkaridet, et T-uavhengig antigen, til et protein, et T-avhengig antigen, gir polysakkaridet egenskapene T-avhengighet innbefattende isotypeskifting, affinitetsmodning og hukommelsesinduksjon.

Imidlertid kan det være problemer med gjentatt administrering av
10 polysakkarid-protein-konjugater eller en kombinasjon av polysakkarid-protein-konjugater for dannelsen av multivalente vaksiner. For eksempel har det vært rapportert at en *Haemophilus influenzae* type b-polysakkarid-(PRP) vaksine med anvendelse av tetanustoksoid (TT) som proteinbærer er blitt testet i et dose-område med samtidig immunisering med (fritt) TT og en pneumokokk-
15 polysakkarid-TT-konjugatvaksine etter et standard-barneprogram. Etter hvert som dosen av pneumokokkvaksinen ble øket, ble immunresponsen overfor PRP-polysakkarid-delen av Hib-konjugat-vaksinen redusert, noe som indikerer immuninterferens av polysakkaridet, muligens via anvendelse av det samme bærerprotein (Dagan et al., *Infect Immun.* (1998); 66: 2093-2098)

20 Effekten av bærerprotein-dosen på den humorale respons overfor selve proteinet har også vist seg å være allsidig. Hos menneskebarn er det rapportert at en økning i dosen av et tetravalent tetanustoksoid-konjugat har resultert i en redusert respons overfor tetanus-bæreren (Dagan et al. som ovenfor). Klassisk analyse av disse effekter av kombinasjonsvaksiner er beskrevet som
25 bærerfremkalt epitopisk undertrykkelse som ikke helt er forstått, men antas å være et resultat av en overskuddsmengde av bærerprotein (Fattom, *Vaccine* 17: 126 (1999)). Dette ser ut til å resultere i konkurranse med hensyn til Th-celler ved B-cellene overfor bærerprotein og B-cellene overfor polysakkaridet. Hvis B-cellene overfor bærerprotein dominerer, er det ikke nok Th-celler tilgjengelig til å gi den
30 nødvendige hjelp for B-cellene som er spesifikke overfor polysakkaridet. Imidlertid er de observerte immunologiske effekter ikke-konsekvente, idet den totale mengden av bærerprotein i noen tilfeller øker immunresponsen og i andre tilfeller reduserer immunresponsen.

Således er det tekniske vanskeligheter med hensyn til kombinerings av multiple polysakkaridkonjugater til en enkelt effektiv vaksineformulering.

Streptococcus pneumoniae er en grampositiv bakterie som er ansvarlig for betydelig sykdom og dødelighet (spesielt hos unge og eldre), og som forårsaker
5 invasive sykdommer så som pneumoni, bakteriemi og meningitt og sykdommer forbundet med kolonisering, så som akutt mellomørebetennelse. Andelen av pneumokokk-lungebetennelse i USA for personer på over 60 år blir beregnet å være 3 til 8 pr. 100 000. I 20% av tilfellene fører dette til bakteriemi og andre manifestasjoner så som meningitt, med en dødelighetsrate nær 30% selv med
10 antibiotikabehandling.

Pneumokokker er innkapslet med et kjemisk bundet polysakkarid som gir serotyperpesifisitet. Det er 90 kjente serotyper av pneumokokker, og kapselen er hoved-virulensdeterminanten for pneumokokker, siden kapselen ikke bare beskytter den indre overflate av bakteriene mot komplement, men selv er lite
15 immunogen. Polysakkarider er T-uavhengige antigener og kan ikke prosesseres eller presenteres på MHC-molekyler for interagering med T-celler. De kan imidlertid stimulere immunsystemet gjennom en alternativ mekanisme som involverer kryssbinding av overflatereseptorer på B-celler.

Det er vist i mange forsøk at beskyttelse mot invasiv pneumokokksykdom
20 er sterkest i samsvar med antistoff som er spesifikt for kapselen, og beskyttelsen er serotypespesifikk.

Streptococcus pneumoniae er den mest vanlige årsak til invasiv bakteriell sykdom og mellomørebetennelse hos barn og småbarn. Likeledes fremkalles det svake responser hos eldre overfor pneumokokkvaksiner [Roghmann et al., (1987),
25 J. Gerontol. 42:265-270], og følgelig øket forekomst av bakteriell lungebetennelse i denne populasjon [Verghese og Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].

I US 2003099672 A1 beskrives en sammensetning inneholdende et antall n S. pneumoniae kapsulære polysakkarider konjugert til tetanus toksoid og et antall p S. pneumoniae kapsulære polysakkarider konjugert til difteria toksoid for
30 fremstilling av en vaksine mot Clostridium tetani og Corynebacterium diphtheriae infeksjoner. WO 0200249 A2 omhandler kombinasjonsvaksiner som besørger immunitet mot flere forskjellige patogener omfattende et konjugat av et bærerprotein og et kapsulært polysakkarid.

De viktigste kliniske syndromer forårsaket av *S. pneumoniae* er alminnelig kjent og beskrevet i alle medisinske standard-lærebøker (Fedson DS, Muscher DM. I: Plotkin SA, Orenstein WA, red.. Vaccines. 4. utgave. PhiladelphiaWB Saunders Co, 2004a: 529-588). For eksempel er invasiv pneumokokksykdom (IPD) definert som hvilken som helst infeksjon hvor *S. pneumoniae* blir isolert fra blodet eller et annet normalt sterilt sted (Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. I Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (red.). Principles and Practice of Infectious diseases (5. utg). New York, Churchill Livingstone, 2001, s. 2128-2147). Kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS) er kjent for å omfatte flere tilstander (luftveisobstruksjon, kronisk bronkitt, bronkiolitt eller små-luftveis-sykdom og emfysem) som ofte finnes sammen. Pasientene får akutt forverring av sin tilstand som vanligvis er forbundet med øket andpustenhet, og ofte har øket hoste som kan produsere slim eller purulent spytt (Wilson, Eur Respir J 2001 17:995-1007). KOLS er definert fysiologisk ved tilstedeværelse av irreversibel eller delvis reversibel luftveisobstruksjon hos pasienter med kronisk bronkitt og/eller emfysem (Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med. 1995 Nov; 152(5 Pt 2):S77-121). Forverringer av KOLS er ofte forårsaket av bakteriell (f.eks. pneumokokk-) infeksjon (Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. Clin Microbiol Rev. 2001 apr; 14(2):336-63).

Det er således et formål med foreliggende oppfinnelse å utvikle en forbedret formulering av en multippel-serotype-*Streptococcus pneumoniae*-polysakkarid-konjugatvaksine.

25

Det vises nå til figurene

Figur 1 Stavdiagram som viser 11-valent konjugat-immunogenitet hos eldre Rhesus-aper. De lysere staver representerer GMC etter to inokuleringer med 11-valent konjugat i aluminiumfosfat-adjuvans. De mørkere staver representerer GMC etter to inokuleringer med 11-valent konjugat i adjuvans C.

30

Figur 2 Stavdiagram som viser hukommelses-B-celler for PS3 etter inokulering med det 11-valente konjugat i adjuvans C eller aluminiumfosfat-adjuvans.

Figur 3 Stavdiagram som viser anti-polysakkarid 19F-immunogenitet i Balb/C-mus for de 4-valente rene polysakkarider og de 4-valente dPly-konjugater.

5 Figur 4 Stavdiagram som viser anti-polysakkarid 22F-immunogenitet i Balb/C-mus for de 4-valente rene polysakkarider og de 4-valente PhtD-konjugater.

Figur 5 Stavdiagram som viser anti-22F-IgG-respons i Balb/c-mus

10 Figur 6 Stavdiagram som viser anti-22F-opsonofagocytosetitrer i Balb/c-mus.

Figur 7 Stavdiagram som sammenligner IgG-responser fremkalt hos unge C57B1-mus etter immunisering med 13-valent konjugatvaksine formulert i forskjellige adjuvantia.

15

Figur 8 Stavdiagram som viser den beskyttende effektivitet av forskjellige vaksinekombinasjoner i en ape-pneumonimodell.

Figur 9 Stavdiagram som viser anti-PhtD-IgG-respons i Balb/c-mus etter
20 immunisering med 22F-PhtD- eller 22F-AH-PhtD-konjugater.

Figur 10 Beskyttelse mot type 4-pneumokokkangrep hos mus etter immunisering med 22F-PhtD eller 22F-AH-PhtD.

25 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et immunogenpreparat for småbarn omfattende en multivalent *Streptococcus pneumoniae*-vaksine omfattende 10 eller flere kapselsakkaridkonjugater fra forskjellige serotyper omfattende konjugater av *S. pneumoniae* kapsulære sakkarider 4, 6B, 9V, 14, 18C og 23F, hvor preparatet omfatter et serotype 22F sakkaridkonjugat for anvendelse i behandling eller
30 forebygging av sykdom forårsaket av *Streptococcus pneumoniae* infeksjon, hvor sykdommen er minst en av mellomørebetennelse, meningitt, bakteriemi, lungebetennelse eller konjunktivitt hos spedbarn.

Videre omfatter den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av en vaksine omfattende å blande det immunogene preparatet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11 med et farmasøytisk akseptabelt hjelpestoff. Den foreliggende oppfinnelse omfatter også anvendelse av preparatet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11 ved fremstilling av et medikament for behandling av infeksjoner forårsaket av *Streptococcus pneumoniae*.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et immunogent preparat for småbarn, omfattende en multivalent *Streptococcus pneumoniae*-vaksine omfattende 2 eller flere (f.eks. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15) kapsel-sakkarid-konjugater fra forskjellige serotyper, hvor preparatet omfatter et 22F-sakkarid-konjugat.

Selv om barneinfeksjon med pneumokokk-serotype 22F ikke er meget vanlig, antar oppfinnerne at tilstedeværelse av 22F i en barne-pneumokokkvaksine vil være fordelaktig til fremkalling av masseimmunitet i populasjonen slik at angrep av alvorlig sykdom hos eldre forårsaket av denne serotype (så som pneumoni og/eller invasiv pneumokokksykdom (IPD) og/eller forverring av kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS)) kan forhindres eller reduseres med hensyn til alvorlighetsgrad. For formålene ifølge foreliggende oppfinnelse angir "immunisering av en human vert mot forverring av KOLS" eller "behandling eller forebygging av forverring av KOLS" eller "reduksjon i alvorlighetsgraden av KOLS-forverring" en reduksjon i forekomst eller raten av KOLS-forverring (for eksempel en reduksjon i raten på 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20% eller mer) eller en reduksjon i alvorlighetsgraden av KOLS-forverring som definert ovenfor, for eksempel i en pasientgruppe som er immunisert med preparatene eller vaksinene ifølge oppfinnelsen.

Ved én utførelsesform er det tilveiebrakt en metode for forhindring av at en eldre human vert får en pneumokokksykdom forårsaket av *Streptococcus pneumoniae* serotype 22F-infeksjon (eller reduksjon i alvorlighetsgraden av den), som omfatter administrering til en human vert som er et småbarn (eller en human populasjon av småbarn) en immunbeskyttende dose av immunogenpreparatet eller vaksinen ifølge oppfinnelsen, samt anvendelse av immunogenpreparatet eller vaksinen ifølge oppfinnelsen ved fremstilling av et medikament for forebygging eller reduksjon i alvorlighetsgraden av en sykdom forårsaket av serotype 22F

Streptococcus pneumoniae-infeksjon hos eldre humane pasienter, hvor en immunbeskyttende dose av preparatet eller vaksinen blir administrert til et småbarn (eller en populasjon av småbarn).

Ved én utførelsesform omfatter immunogenpreparatet Streptococcus pneumoniae-kapselsakkarid-konjugater fra serogrupper 19A og 19F, eventuelt
5 hvor 19A er konjugert til et første bakterietoksoid og 19F er konjugert til et andre bakterietoksoid.

Betegnelsen kapselsakkarid innbefatter kapsel-polysakkarider og -oligosakkarider som kan fås fra kapsel-polysakkaridet. Et oligosakkarid
10 inneholder minst 4 sukkerrester.

Betegnelsen bakterietoksoid innbefatter bakterietoksiner som er inaktivert enten ved genetisk mutasjon, ved kjemisk behandling eller ved konjugering. Egnede bakterietoksoider innbefatter tetanustoksoid, difteritoksoid, pertussis-toksoid, bakterielle cytolysiner eller pneumolysin. Det er beskrevet mutasjoner av
15 pneumolysin (Ply) som reduserer toksisiteten av pneumolysin (WO 90/06951, WO 99/03884). Tilsvarende er det kjent genetiske mutasjoner av difteritoksin som reduserer toksisiteten av det (se nedenfor). Genetisk detoksifiserte analoger til difteritoksin innbefatter CRM197 og andre mutanter beskrevet i US 4 709 017, US 5 843 711, US 5 601 827 og US 5 917 017. CRM197 er en ikke-toksisk form av
20 difteritoksinet, men er immunologisk ikke skjelnbart fra difteritoksinet. CRM197 produseres av C. diphtheriae infisert ved den ikke-toksogene fase β 197tox- dannet ved nitrosoguanidin-mutagenese av det toksigene carynefag b (Uchida et al Nature New Biology (1971) 233; 8-11). CRM197-proteinet har samme molekylvekt som difteritoksinet, men skiller seg fra det ved en enkelt baseforandring i det
25 strukturelle gen. Dette fører til en glycin- til glutamin-forandring av aminosyre i stilling 52 som gjør fragment A ute av stand til å binde NAD og derfor er ikke-toksisk (Pappenheimer 1977, Ann Rev, Biochem. 46; 69-94, Rappuoli Applied and Environmental Microbiology Sept 1983 s.560-564).

Det første og andre bakterietoksoid kan være like eller forskjellige. Hvor det
30 første og andre bakterietoksoid er forskjellige, menes det at de har en forskjellig aminosyresekvens.

For eksempel kan 19A og 19F være konjugert til henholdsvis tetanustoksoid og tetanustoksoid; difteritoksoid og difteritoksoid; Crm197 og

CRM197, pneumolysin og pneumolysin, tetanustoksoid og difteritoksoid; tetanustoksoid og CRM197; tetanustoksoid og pneumolysin; difteritoksoid og tetanustoksoid; difteritoksoid og CRM197, difteritoksoid og pneumolysin; CRM197 og tetanustoksoid, CRM197 og difteritoksoid; CRM197 og pneumolysin; 5 pneumolysin og tetanustoksoid; pneumolysin og difteritoksoid; eller pneumolysin og CRM197.

Ved en utførelsesform omfatter immunogenpreparatet, i tillegg til S. pneumoniae-sakkarid-konjugat av 22F (og eventuelt 19A og 19F), videre konjugater av S. pneumoniae-kapselsakkarider 4, 6B, 9V, 14, 18C og 23F.

10 Ved en utførelsesform omfatter immunogenpreparatet, i tillegg til S. pneumoniae-sakkarid-konjugat av 22F (og eventuelt 19A og 19F), videre konjugater av S. pneumoniae-kapselsakkarider 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C og 23F.

Ved en utførelsesform omfatter immunogenpreparatet, i tillegg til S. pneumoniae-sakkarid-konjugat av 22F (og eventuelt 19A og 19F), videre 15 konjugater av S. pneumoniae-kapselsakkarider 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F og 23F.

Ved en utførelsesform omfatter immunogenpreparatet, i tillegg til S. pneumoniae-sakkarid-konjugat av 22F (og eventuelt 19A og 19F), videre 20 konjugater av S. pneumoniae-kapselsakkarider 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F og 23F.

Ved en utførelsesform omfatter immunogenpreparatet, i tillegg til S. pneumoniae-sakkarid-konjugat av 22F (og eventuelt 19A og 19F), videre konjugater av S. pneumoniae-kapselsakkarider 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 25 22F og 23F.

Streptococcus pneumoniae-vaksinen ifølge foreliggende oppfinnelse vil typisk omfatte kapselsakkarid-antigener (fortrinnsvis konjugert), hvor sakkaridene er avledet fra minst ti serotyper av S. pneumoniae. Antallet S. pneumoniae-kapselsakkarider kan være i området fra 10 forskjellige serotyper (eller "V", 30 valenser) til 23 forskjellige serotyper (23V). Ved én utførelsesform er det 10, 11, 12, 13, 14 eller 15 forskjellige serotyper. Ved en annen utførelsesform av oppfinnelsen kan vaksinen omfatte konjugerte S. pneumoniae-sakkarider og ukonjugerte S. pneumoniae-sakkarider. Det totale antall sakkarid-serotyper er

fortrinnsvis mindre enn eller likt 23. For eksempel kan oppfinnelsen omfatte 10 konjugerte serotyper og 13 ukonjugerte sakkarider. På liknende måte kan vaksinen omfatte 11, 12, 13, 14 eller 16 konjugerte sakkarider og henholdsvis 12, 11, 10, 9 eller 7 ukonjugerte sakkarider.

5 Ved én utførelsesform vil den multivalente pneumokokkvaksine ifølge oppfinnelsen bli valgt blant følgende serotyper: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F og 33F, selv om det er foretrukket at én eller to andre serotyper kan være substituert avhengig av alderen for mottageren som mottar vaksinen og den geografiske lokasjon hvor vaksinen vil bli administrert. For eksempel kan en 10-valent vaksine omfatte polysakkarider fra 10 serotyper 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F og 23F. En 11-valent vaksine kan også innbefatte sakkarider fra serotype 3. En 12- eller 13-valent pediatriisk (småbarn-) vaksine kan også innbefatte den 10- eller 11-valente formulering supplert med serotypene 6A og 19A eller 6A og 22F eller 19A og 22F eller 6A og 15B eller 19A og 15B eller 22F og 15B, mens en 13-valent vaksine for eldre kan omfatte den 11-valente formulering supplert med serotypene 19A og 22F, 8 og 12F, eller 8 og 15B, eller 8 og 19A, eller 8 og 22F, eller 12F og 15B, eller 12F og 19A, eller 12F og 22F, eller 15B og 19A, eller 15B og 22F. En 14-valent pediatriisk vaksine kan innbefatte den 10-valente formulering beskrevet ovenfor supplert med 20 serotyper 3, 6A, 19A og 22F; serotyper 6A, 8, 19A og 22F; serotyper 6A, 12F, 19A og 22F; serotyper 6A, 15B, 19A og 22F; serotyper 3, 8, 19A og 22F; serotyper 3, 12F, 19A og 22F; serotyper 3, 15B, 19A og 22F; serotyper 3, 6A, 8 og 22F; serotyper 3, 6A, 12F og 22F; eller serotyper 3, 6A, 15B og 22F.

Preparatet innbefatter ved én utførelsesform kapselsakkarider avledet fra 25 serotypene 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F og 23F (fortrinnsvis konjugert). Ved en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er minst 11 sakkarid-antigener (fortrinnsvis konjugert) innbefattet, for eksempel kapselsakkarider avledet fra serotypene 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F og 23F. Ved en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er minst 12 eller 13 sakkarid-antigener innbefattet, 30 for eksempel kan en vaksine omfatte kapselsakkarider avledet fra serotypene 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F og 23F, eller kapselsakkarider avledet fra serotypene 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F og 23F, selv om ytterligere sakkaridantigener, for eksempel 23-valente (så som serotypene 1, 2, 3,

4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F og 33F), også er påtenkt ved oppfinnelsen.

Vaksinen ifølge foreliggende oppfinnelse kan omfatte protein D (PD) fra *Haemophilus influenzae* (se f.eks. EP 0594610). *Haemophilus influenzae* er en
5 forårsakende nøkkelorganisme ved mellomørebetennelse, og de nærværende oppfinnere har vist at innlemming av dette protein i en *Streptococcus pneumoniae*-vaksine vil gi et nivå av beskyttelse mot *Haemophilus influenzae*-relatert mellomørebetennelse (referanse POET-publikasjon). Ved én utførelsesform omfatter vaksinepreparatet protein D. Ved ett aspekt er PD til stede som
10 bærerprotein for ett eller flere av sakkaridene. Ved et annet aspekt kan protein D være til stede i vaksinepreparatet som fritt protein. Ved et ytterligere aspekt er protein D til stede både som bærerprotein og som fritt protein. Protein D kan anvendes som et protein i hel lengde, eller som et fragment (WO0056360). Ved et ytterligere aspekt er protein D til stede som bærerprotein for hovedandelen av
15 sakkaridene, for eksempel kan 6, 7, 8, 9 eller flere av sakkaridene være konjugert til protein D. Ved dette aspekt kan protein D også være til stede som fritt protein.

Vaksinen ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter én, to eller flere forskjellige typer bærerprotein. Hver type bærerprotein kan virke som bærer for mer enn ett sakkarid, hvilke sakkarider kan være like eller forskjellige. For
20 eksempel kan serotypene 3 og 4 være konjugert til det samme bærerprotein, enten til det samme molekyl i et bærerprotein eller til forskjellige molekyler i det samme bærerprotein. Ved én utførelsesform kan to eller flere forskjellige sakkarider være konjugert til det samme bærerprotein, enten til det samme molekyl i bærerproteinet eller til forskjellige molekyler i det samme bærerprotein.

25 Hvilke som helst *Streptococcus pneumoniae*-kapselsakkarider som finnes i immunogenpreparatet ifølge oppfinnelsen, kan være konjugert til et bærerprotein uavhengig valgt fra gruppen bestående av TT, DT, CRM197, fragment C av TT, PhtD, PhtDE-fusjoner (spesielt dem som er beskrevet i WO 01/98334 og WO 03/54007), detoksifisert pneumolysin og protein D. En mer fullstendig liste over
30 proteinbærere som kan anvendes i konjugatene ifølge oppfinnelsen, er presentert nedenfor.

Bærerproteinet konjugert til ett eller flere av *S. pneumoniae*-kapselsakkaridene i konjugatene som finnes i immunogenpreparatene ifølge

oppfinnelsen, er eventuelt et medlem av polyhistidintriadefamilie- (Pht) proteinene, eller fragmenter eller fusjonsproteiner derav. PhtA-, PhtB-, PhtD- eller PhtE-proteinene kan ha en aminosyresekvens som har 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% eller 100% identitet med en sekvens beskrevet i WO 00/37105 eller WO 00/39299 (f.eks. med aminosyresekvens 1-838 eller 21-838 i SEKV ID NR: 4 ifølge WO 00/37105 for PhtD). For eksempel består fusjonsproteiner av fragmenter i hel lengde eller fragmenter med 2, 3 eller 4 av PhtA, PhtB, PhtD, PhtE. Eksempler på fusjonsproteiner er PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E, PhtD/A, PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B og PhtE/D, hvor proteinene er bundet med det førstnevnte i den N-terminale ende (se for eksempel WO01/98334).

Hvor fragmenter av Pht-proteiner blir anvendt (separat eller som en del av et fusjonsprotein), inneholder hvert fragment eventuelt ett eller flere histidintriademønster (-mønstre) og/eller spiralsnodde regioner av slike polypeptider. Et histidintriade-mønster er den del av et polypeptid som har sekvensen HxxHxH hvor H er histidin og x er en annen aminosyre enn histidin. En spiralsnodd region er en region som er forutsett av "Coils"-algorithm Lupus, A et al (1991) Science 252; 1162-1164. Ved en utførelsesform innbefatter fragmentet eller hvert fragment ett eller flere histidintriademønstre samt minst én spiralsnodd region. Ved en utførelsesform inneholder fragmentet eller hvert fragment nøyaktig eller minst 2, 3, 4 eller 5 histidintriade-mønstre (eventuelt med nativ Pht-sekvens mellom de 2 eller flere triader, eller intratriade-sekvens som er mer enn 50, 60, 70, 80, 90 eller 100% identisk med en nativ pneumokokk-intratriade-Pht-sekvens – f.eks. intratriade-sekvensen vist i SEKV ID NR: 4 ifølge WO 00/37105 for PhtD). Ved en utførelsesform inneholder fragmentet eller hvert fragment nøyaktig eller minst 2, 3 eller 4 spiralsnodde regioner. Ved en utførelsesform innbefatter et Pht-protein beskrevet her proteinet i hel lengde med signalsekvensen tilknyttet, det fullstendige protein i hel lengde med signalpeptidet (for eksempel 20 aminosyrer i den N-terminale ende) fjernet, naturlig forekommende varianter av Pht-protein og immunogene fragmenter av Pht-protein (f.eks. fragmenter som beskrevet ovenfor eller polypeptider omfattende minst 15 eller 20 på hverandre følgende aminosyrer fra en aminosyresekvens i WO00/37105 eller WO00/39299 hvor polypeptidet er i

stand til å fremkalle en immunrespons som er spesifikk for nevnte aminosyresekvens i WO00/37105 eller WO00/39299).

Spesielt innbefatter betegnelsen "PhtD", slik den er anvendt her, proteinet i hel lengde med signalsekvensen tilknyttet, det fullstendige protein i hel lengde med signalpeptidet (for eksempel 20 aminosyrer i den N-terminale ende) fjernet, naturlig forekommende varianter av PhtD og immunogene fragmenter av PhtD (f.eks. fragmenter som beskrevet ovenfor eller polypeptider omfattende minst 15 eller 20 på hverandre følgende aminosyrer fra en PhtD-aminosyresekvens i WO00/37105 eller WO00/39299 hvor polypeptidet kan fremkalle en immunrespons spesifikk for PhtD-aminosyresekvensen i WO00/37105 eller WO00/39299 (f.eks. SEKV ID NR: 4 ifølge WO 00/37105 for PhtD).

Hvis proteinbæreren er den samme for 2 eller flere sakkarider i preparatet, kan sakkaridene være konjugert til det samme molekyl i proteinbæreren (bærermolekyler med 2 flere forskjellige sakkarider konjugert til det) [se for eksempel WO 04/083251]. Alternativt kan hvert av sakkaridene være separat konjugert til forskjellige molekyler i proteinbæreren (hvor hvert molekyl i proteinbæreren bare har én type sakkarid konjugert til det).

Eksempler på bærerproteiner som kan anvendes ved foreliggende oppfinnelse, er DT (Difteritoksoid), TT (tetanustoksoid) eller fragment C av TT, DT CRM197 (en DT-mutant), andre DT-punktmutanter, så som CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 og CRM107 og andre mutasjoner beskrevet av Nicholls og Youle i Genetically Engineered Toxins, red: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; delesjon eller mutasjon av Glu-148 til Asp, Gln eller Ser og/eller Ala 158 til Gly og andre mutasjoner beskrevet i US 4709017 eller US 4950740; mutasjon av minst én eller flere rester Lys 516, Lys 526, Phe 530 og/eller Lys 534 og andre mutasjoner beskrevet i US 5917017 eller US 6455673; eller fragment beskrevet i US 5843711, pneumokokk-pneumolysin (Kuo et al (1995) Infect Immun 63; 2706-13) innbefattende ply detoksifisert på en viss måte, for eksempel dPLY-GMBS (WO 04081515, PCT/EP2005/010258) eller dPLY-formol, PhtX, innbefattende PhtA, PhtB, PhtD, PhtE og fusjoner av Pht-proteiner, for eksempel PhtDE-fusjoner, PhtBE-fusjoner (WO 01/98334 og WO 03/54007), (Pht A-E er beskrevet mer detaljert nedenfor) OMPC (meningokokk-ytre membran-protein – vanligvis

ekstrahert fra N. meningitidis serogruppe B – EP0372501), PorB (fra N. meningitidis), PD (Haemophilus influenzae-protein D – se f.eks. EP 0 594 610 B) eller immunologisk funksjonelle ekvivalenter derav, syntetiske peptider (EP0378881, EP0427347), varmesjokkproteiner (WO 93/17712, WO 94/03208),
5 pertussisproteiner (WO 98/58668, EP0471177), cytokiner, lymfokiner, vekstfaktorer eller hormoner (WO 91/01146), kunstige proteiner omfattende multiple humane CD4+ T-celle-epitoper fra forskjellige patogenavlede antigener (Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) så som N19-protein (Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72; 4884-7) pneumokokk-overflateprotein PspA (WO
10 02/091998), jernopptaksproteiner (WO 01/72337), toksin A eller B fra C. difficile (WO 00/61761).

Nurkka et al har i *Pediatric Infectious Disease Journal*. 23(11):1008-14, nov. 2004 beskrevet en 11-valent pneumokokkvaksine med alle serotyper konjugert til PD. Imidlertid har de nærværende oppfinnere vist at
15 opsonofagocytisk aktivitet ble forbedret for antistoffer fremkalt med konjugater som har 19F konjugert til DT sammenlignet med 19F konjugert til PD. I tillegg har de nærværende oppfinnere vist at en større kryssreaktivitet til 19A kan sees med 19F konjugert til DT. Det er derfor et trekk ved preparatet ifølge foreliggende oppfinnelse at serotype 19F er konjugert til et bakterietoksoid, for eksempel TT,
20 pneumolysin, DT eller CRM 197. Ved ett aspekt er serotype 19F konjugert til DT. Det er også et trekk ved oppfinnelsen at serotype 19A er konjugert til et bakterielt toksoid, for eksempel TT, pneumolysin, DT eller CRM 197. De gjenværende sakkarid-serotyper av immunogenpreparatet kan alle være konjugert til ett eller flere bærerproteiner som ikke er DT (dvs. at bare 19F er konjugert til DT), eller de
25 kan være delt mellom ett eller flere bærerproteiner som ikke er DT, og DT selv. Ved én utførelsesform er 19F konjugert til DT eller CRM 197, og alle de gjenværende serotyper er konjugert til PD. Ved en ytterligere utførelsesform er 19F konjugert til DT eller CRM 197 og de gjenværende serotyper er delt mellom PD, og TT eller DT eller CRM 197. Ved en ytterligere utførelsesform er 19F
30 konjugert til DT eller CRM 197, og ikke mer enn ett sakkarid er konjugert til TT. Ved ett aspekt ved denne utførelsesform er det ene sakkarid 18C eller 12F. Ved en ytterligere utførelsesform er 19F konjugert til DT eller CRM 197, og ikke mer enn to sakkarider er konjugert til TT. Ved en ytterligere utførelsesform er 19F

konjugert til DT eller CRM 197, og de gjenværende serotyper er delt mellom PD, TT og DT eller CRM 197. Ved en ytterligere utførelsesform er 19F konjugert til DT eller CRM 197, og de gjenværende serotyper er delt mellom PD, TT og pneumolysin. Ved en ytterligere utførelsesform er 19F konjugert til DT eller CRM 197, og de gjenværende serotyper er delt mellom PD, TT og CRM 197. Ved en ytterligere utførelsesform er 19F konjugert til DT eller CRM197, og de gjenværende serotyper er delt mellom PD, TT, pneumolysin og eventuelt PhtD eller PhtD/E-fusjonsprotein. Ved en ytterligere utførelsesform er 19F konjugert til DT eller CRM197, 19A er konjugert til pneumolysin eller TT og de gjenværende serotyper er delt mellom PD, TT, pneumolysin og eventuelt PhtD eller PhtD/E-fusjonsprotein. Ved en ytterligere utførelsesform er 19F konjugert til DT eller CRM197, 19A er konjugert til pneumolysin eller TT, ett ytterligere sakkarid er konjugert til TT, ett ytterligere sakkarid er konjugert til PhtD eller PhtD/E og alle ytterligere sakkarider er konjugert til PD. Ved en ytterligere utførelsesform er 19F konjugert til DT eller CRM197, 19A er konjugert til pneumolysin, ett ytterligere sakkarid er konjugert til TT, ett ytterligere sakkarid er konjugert til pneumolysin, 2 ytterligere sakkarider er konjugert til PhtD eller PhtD/E og alle ytterligere sakkarider er konjugert til PD.

Ved én utførelsesform omfatter immunogenpreparatet ifølge oppfinnelsen protein D fra *Haemophilus influenzae*. Hvis PD ved denne utførelsesform ikke er ett av bærerproteinene som anvendes til konjugering av andre sakkarider enn 19F, for eksempel er 19F konjugert til DT mens de andre serotyper er konjugert til ett eller flere forskjellige bærerproteiner som ikke er PD, vil PD være til stede i vaksinepreparatet som fritt protein. Hvis PD er ett av bærerproteinene som anvendes til konjugering av andre sakkarider enn 19F, kan PD eventuelt være til stede i vaksinepreparatet som fritt protein.

Betegnelsen "sakkarid" i hele denne beskrivelsen kan angi polysakkarid eller oligosakkarid og innbefatter begge. Polysakkarider blir isolert fra bakterier og kan størrelsesreguleres i en viss grad ved kjente metoder (se for eksempel EP497524 og EP497525), og fortrinnsvis ved mikrofluidisering. Polysakkarider kan være størrelsesregulert for å redusere viskositeten i polysakkaridprøver og/eller for å forbedre filtrerbarheten for konjugerte produkter. Oligosakkarider har et lavt

antall gjentatte enheter (typisk 5-30 gjentatte enheter) og er typisk hydrolyserte polysakkarider.

Kapsel-polysakkarider fra *Streptococcus pneumoniae* omfatter repeterende oligosakkarid-enheter som kan inneholde opp til 8 sukkerrester. For en oversikt
5 over oligosakkarid-enhetene for nøkkel-*Streptococcus pneumoniae*-serotypene, se JONES, Christopher. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, juni 2005, vol. 77, nr. 2, s. 293-324. ISSN 0001-3765. Ved én utførelsesform kan et kapselsakkarid-antigen være et polysakkarid i hel lengde; ved andre kan det imidlertid være én oligosakkarid-
10 enhet eller en sakkaridkjede med en lengde som er kortere ennativ lengde, av repeterende oligosakkarid-enheter. Ved én utførelsesform er alle sakkaridene som finnes i vaksinen, polysakkarider. Polysakkarider i hel lengde kan "størrelsesreguleres", dvs. at størrelsen av dem kan reduseres ved forskjellige metoder så som syrehydrolysebehandling, hydrogenperoksidbehandling,
15 størrelsesregulering ved hjelp av emulsiflex®, fulgt av en hydrogenperoksid-behandling for å danne oligosakkaridfragmenter, eller mikrofluidisering.

Oppfinnerne har også merket seg at fokuset på området har vært å anvende oligosakkarider for lettvinatkonjugatproduksjon. Oppfinnerne har funnet at ved anvendelse av native eller lett størrelsesregulerte polysakkaridkonjugater kan
20 én eller flere av de følgende fordeler realiseres: 1) et konjugat som har høy immunogenitet, og som er filtrerbart, 2) forholdet mellom polysakkarid og protein i konjugatet kan endres slik at forholdet mellom polysakkarid og protein (på vektbasis) i konjugatet kan økes (som kan ha en effekt på bærer-suppresjons-effekten), 3) immunogene konjugater som har tilbøyelhet til hydrolyse, kan
25 stabiliseres ved anvendelse av større sakkarider for konjugering. Anvendelse av større polysakkarider kan resultere i mer kryssbinding med konjugatbæreren, og kan redusere frigjøringen av fritt sakkarid fra konjugatet. Konjugatvaksinene beskrevet i tidligere teknikk har tendens til å depolymerisere polysakkaridene før konjugering for å forbedre konjugeringen. De nærværende oppfinnere har funnet
30 at sakkaridkonjugat-vaksiner som bibeholder en større sakkaridstørrelse, kan gi en god immunrespons overfor pneumokokksykdom.

Immunogenpreparatet ifølge oppfinnelsen kan således omfatte ett eller flere sakkaridkonjugater hvor den gjennomsnittlige størrelse (f.eks. vektmidlere

molekylvekt; M_w) av hvert sakkarid før konjugering er over 80kDa, 100kDa, 200kDa, 300kDa, 400kDa, 500kDa eller 1000kDa. Ved én utførelsesform bør ett eller flere sakkaridkonjugater ifølge oppfinnelsen ha en gjennomsnittlig størrelse av sakkarid-prekonjugering på 50-1600, 80-1400, 100-1000, 150-500 eller 200-
5 400 kDa (bemerk at hvor gjennomsnittlig størrelse er M_w , bør "kDa"-enheter erstattes med " $\times 10^3$ " her i dokumentet). Ved én utførelsesform bør konjugatet etter konjugering være lett filtrerbart gjennom et 0,2 mikrometer filter slik at et utbytte på mer enn 50, 60, 70, 80, 90 eller 95% blir oppnådd etter filtrering, sammenlignet med pre-filtreringsprøven.

10 For formålene ifølge oppfinnelsen angir "nativt polysakkarid" et sakkarid som ikke er blitt underkastet en prosess (f.eks. etter rensning) hvor formålet er å redusere størrelsen av sakkaridet. Et polysakkarid kan lett bli redusert i størrelse under normale renseprosedyrer. Et slikt sakkarid er fremdeles nativt. Bare hvis polysakkaridet er blitt underkastet størrelsesreguleringsteknikker, vil
15 polysakkaridet ikke anses som nativt.

For formålene ifølge oppfinnelsen angir "størrelsesregulert med en faktor opp til x^2 " at sakkaridet er blitt underkastet en prosess i den hensikt å redusere størrelsen av sakkaridet, men beholde en størrelse større enn halvdelen av størrelsen av det native polysakkarid. X_3 , x_4 osv. skal tolkes på samme måte, dvs.
20 at sakkaridet underkastes en prosess i den hensikt å redusere størrelsen av polysakkaridet, men å beholde en størrelse større enn en tredjedel, en fjerdedel osv. av størrelsen av det native polysakkarid.

Ved et aspekt ved oppfinnelsen omfatter immunogenpreparatet *Streptococcus pneumoniae*-sakkarider fra minst 10 serotyper konjugert til et bærerprotein, hvor minst 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller hvert *S. pneumoniae*-sakkarid
25 er et nativt polysakkarid.

Ved et aspekt ved oppfinnelsen omfatter immunogenpreparatet *Streptococcus pneumoniae*-sakkarider fra minst 10 serotyper konjugert til et bærerprotein, hvor minst 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller hvert *S. pneumoniae*-sakkarid
30 er størrelsesregulert med en faktor på opp til x_2 , x_3 , x_4 , x_5 , x_6 , x_7 , x_8 , x_9 eller x_{10} . Ved én utførelsesform ved dette aspekt er hovedandelen av sakkaridene, for eksempel 6, 7, 8 eller flere av sakkaridene, størrelsesregulert med en faktor på opp til x_2 , x_3 , x_4 , x_5 , x_6 , x_7 , x_8 , x_9 eller x_{10} .

Molekylvekten eller den gjennomsnittlige molekylvekt (eller størrelse) for et sakkarid angir her i dokumentet den vektmidlere molekylvekt (M_w) for sakkaridet målt før konjugering, og måles ved hjelp av MALLS.

MALLS-teknikken er velkjent på området og blir typisk utført som beskrevet i eksempel 2. For MALLS-analyse av pneumokokk-sakkarider kan det anvendes to kolonner (TSKG6000 og 5000PWxl) i kombinasjon, og sakkaridene blir eluert i vann. Sakkarider blir detektert ved anvendelse av en lysspredningsdetektor (for eksempel Wyatt Dawn DSP utstyrt med en 10mW argon-laser ved 488nm) og et inferometrisk refraktometer (for eksempel Wyatt Otilab DSP utstyrt med en P100-celle og et rødt filter ved 498 nm).

Ved en utførelsesform er *S. pneumoniae*-sakkaridene native polysakkarider eller native polysakkarider som er redusert i størrelse under en normal ekstraksjonsprosess.

Ved en utførelsesform blir *S. pneumoniae*-sakkaridene størrelsesregulert ved hjelp av mekanisk spaltning, for eksempel ved mikrofluidisering eller ultralydbehandling. Mikrofluidisering og ultralydbehandling har den fordel at de reduserer størrelsen av de større native polysakkarider i tilstrekkelig grad til at det fås et filtrerbart konjugat. Størrelsesregulering skjer med en faktor på ikke mer enn x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3 eller x2.

Ved en utførelsesform omfatter immunogenpreparatet *S. pneumoniae*-konjugater som er laget ut fra en blanding av native polysakkarider og sakkarider som er størrelsesregulert med en faktor på ikke mer enn x20. Ved ett aspekt ved denne utførelsesform blir hovedandelen av sakkaridene, for eksempel 6, 7, 8 eller flere av sakkaridene, størrelsesregulert med en faktor på opp til x2, x3, x4, x5 eller x6.

Ved en utførelsesform blir *Streptococcus pneumoniae*-sakkaridet konjugert til bærerproteinet via en linker, for eksempel en bifunksjonell linker. Linkeren er eventuelt heterobifunksjonell eller homobifunksjonell, med for eksempel en reaktiv aminogruppe og en reaktiv karboksylsyregruppe, 2 reaktive aminogrupper eller to reaktive karboksylsyregrupper. Linkeren har for eksempel mellom 4 og 20, 4 og 12, 5 og 10 karbonatomer. En mulig linker er ADH. Andre linkere innbefatter B-propionamido (WO 00/10599), nitrofenyl-etylamin (Gever et al (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), halogenalkylhalogenider (US4057685),

glykosidbindinger (US4673574, US4808700), heksandiamin og 6-aminokapronsyre (US4459286). Ved en utførelsesform anvendes ADH som linker for konjugering av sakkarid fra serotype 18C. Ved en utførelsesform blir ADH anvendt som linker for konjugering av sakkarid fra serotype 22F.

5 Sakkaridkonjugatene som finnes i immunogenpreparatene ifølge oppfinnelsen, kan fremstilles ved hvilken som helst kjent koblingsteknikk. Konjugeringsmetoden kan være basert på aktivering av sakkaridet med 1-cyano-4-dimetylamino-4-pyridiniumtetrafluorborat (CDAP) under dannelse av en cyanatester. Det aktiverte sakkarid kan således kobles direkte eller via en
10 avstands- (linker) gruppe til en aminogruppe på bærerproteinet. Avstandsstykket kan for eksempel være cystamin eller cysteamin, noe som gir et tiolert polysakkarid som kan kobles til bæreren via en tioeterbinding oppnådd etter omsetning med et maleimid-aktivert bærerprotein (for eksempel ved anvendelse av GMBS) eller et halogenacetylt bærerprotein (for eksempel ved anvendelse av
15 jodacetimid [f.eks. etyljodacetimid-HCl] eller N-suksinimidylbromacetat eller SIAB eller SIA eller SBAP). Fortrinnsvis blir cyanatesteren (eventuelt fremstilt ved hjelp av CDAP-kjemi) koblet med heksandiamin eller ADH, og det amino-derivatiserte sakkarid blir konjugert til bærerproteinet ved anvendelse av karbodiimid- (f.eks. EDAC eller EDC) kjemi via en karboksylgruppe på proteinbæreren. Slike
20 konjugater er beskrevet i publisert PCT-søknad WO 93/15760 Uniformed Services University og WO 95/08348 og WO 96/29094.

Andre egnede teknikker anvender karbodiimider, hydrazider, aktive estere, norboran, p-nitrobenzoesyre, N-hydroksysuksinimid, S-NHS, EDC, TSTU. Mange er beskrevet i WO 98/42721. Konjugering kan innbefatte en karbonyl-linker som
25 kan dannes ved omsetning av en fri hydroksylgruppe i sakkaridet med CDI (Bethell et al J. Biol. Chem. 1979, 254; 2572-4, Hearn et al J. Chromatogr. 1981. 218; 509-18) fulgt av omsetning med et protein under dannelse av en karbamat-binding. Dette kan involvere reduksjon av den anomeriske terminale ende til en primær hydroksylgruppe, eventuell beskyttelse/avbeskyttelse av den primære
30 hydroksylgruppe' omsetning av den primære hydroksylgruppe med CDI under dannelse av et CDI-karbamat-mellomprodukt og kobling av CDI-karbamat-mellomproduktet med en aminogruppe på et protein.

Konjugatene kan også fremstilles ved metoder for direkte reduktiv aminering som beskrevet i US 4365170 (Jennings) og US 4673574 (Anderson). Andre metoder er beskrevet i EP-0-161-188, EP-208375 og EP-0-477508.

En ytterligere metode innbefatter kobling av et cyanogenbromid- (eller
5 CDAP) aktivert sakkarid derivatisert med adipinsyredihydrazid (ADH) til proteinbæreren ved karbodiimid-kondensasjon (Chu C. et al Infect. Immunity, 1983 245 256), for eksempel ved anvendelse av EDAC.

Ved en utførelsesform blir en hydroksylgruppe (fortrinnsvis en aktivert hydroksylgruppe, for eksempel en hydroksylgruppe aktivert under dannelse av en
10 cyanatester [f.eks. med CDAP]) på et sakkarid bundet til en amino- eller karboksylsyregruppe på et protein, enten direkte eller indirekte (gjennom en linker). Hvor en linker er til stede, blir en hydroksylgruppe på et sakkarid fortrinnsvis bundet til en aminogruppe på en linker, for eksempel ved anvendelse av CDAP-konjugering. En ytterligere aminogruppe i linkeren, for eksempel ADH)
15 kan konjugeres til en karboksylsyregruppe på et protein, for eksempel ved anvendelse av karbodiimidkjemi, for eksempel ved anvendelse av EDAC. Ved en utførelsesform blir pneumokokk-kapselsakkaridet (-ene) konjugert til linkeren først, før linkeren konjugeres til bærerproteinet. Alternativt kan linkeren konjugeres til bæreren før konjugering til sakkaridet.

20 En kombinasjon av teknikker kan også anvendes, idet noen sakkarid-protein-konjugater fremstilles ved CDAP og noen ved reduktiv aminering.

Generelt kan følgende typer av kjemiske grupper på en proteinbærer anvendes for kobling / konjugering:

25 A) Karboksyl (for eksempel via asparaginsyre eller glutaminsyre). Ved én utførelsesform blir denne gruppen bundet til aminogrunder på sakkarider direkte, eller til en aminogruppe på en linker ved karbodiimidkjemi, f.eks. med EDAC.

B) Aminogruppe (for eksempel via lysin). Ved én utførelsesform blir denne gruppen bundet til karboksylgrupper på sakkarider direkte eller til en karboksylgruppe på en linker ved karbodiimidkjemi, f.eks. med EDAC. Ved en annen utførelsesform blir denne gruppen bundet til hydroksylgrupper aktivert med CDAP eller CNBr på sakkarider direkte, eller til slike grupper på en linker; til sakkarider eller linkere som har en aldehydgruppe; til sakkarider eller linkere som har en suksinimidestergruppe.

C) Sulfhydryl (for eksempel via cystein). Ved én utførelsesform blir denne gruppen bundet til et brom- eller klor-acetylt sakkarid eller linker ved maleimidkjemi. Ved én utførelsesform blir denne gruppen aktivert/modifisert med bis-diazobenzidin.

D) Hydroksylgruppe (for eksempel via tyrosin). Ved én utførelsesform blir denne gruppen aktivert/modifisert med bis-diazobenzidin.

E) Imidazolygruppe (for eksempel via histidin). Ved én utførelsesform blir denne gruppen aktivert/modifisert med bis-diazobenzidin.

F) Guanidylgruppe (for eksempel via arginin).

G) Indolylgruppe (for eksempel via tryptofan).

På et sakkarid kan følgende grupper generelt anvendes for kobling: OH, COOH eller NH₂. Aldehydgrupper kan dannes etter forskjellige behandlinger kjent på området, så som: perjodat, syrehydrolyse, hydrogenperoksid, osv.

Fremgangsmåter for direkte kobling:

Sakkarid-OH + CNBr eller CDAP -----> cyanatester + NH₂-Prot -----> konjugat
 Sakkarid-aldehyd + NH₂-Prot -----> Schiff-base + NaCNBH₃ -----> konjugat
 Sakkarid-COOH + NH₂-Prot + EDAC -----> konjugat
 Sakkarid-NH₂ + COOH-Prot + EDAC -----> konjugat

Fremgangsmåter for indirekte kobling via avstandsstykke (linker):

Sakkarid-OH + CNBr eller CDAP ---> cyanatester + NH₂----NH₂ ----> sakkarid----
NH₂ + COOH-Prot + EDAC -----> konjugat

5

Sakkarid-OH + CNBr eller CDAP ----> cyanatester + NH₂-----SH -----> sakkarid----
SH + SH-Prot (nativt protein med et eksponert cystein eller oppnådd etter
modifikasjon av aminogrupper i proteinet, for eksempel med SPDP) ----->
sakkarid-S-S-Prot

10

Sakkarid-OH + CNBr eller CDAP ---> cyanatester + NH₂----SH -----> sakkarid----
SH + maleimid-Prot (modifikasjon av aminogrupper) -----> konjugat

Sakkarid-OH + CNBr eller CDAP ---> cyanatester + NH₂-----SH ---> Sakkarid-SH
15 + halogenacetylt-Prot ----> Konjugat

Sakkarid-COOH + EDAC + NH₂-----NH₂ ---> sakkarid-----NH₂ + EDAC + COOH-
Prot ----> konjugat

20 Sakkarid-COOH + EDAC+ NH₂----SH -----> sakkarid----SH + SH-Prot (nativt
protein med et eksponert cystein eller oppnådd etter modifikasjon av
aminogrupper av proteinet for eksempel ved SPDP) -----> sakkarid-S-S-Prot

25 Sakkarid-COOH + EDAC+ NH₂----SH -----> sakkarid----SH + maleimid-Prot
(modifikasjon av aminogrupper) ----> konjugat

Sakkarid-COOH + EDAC + NH₂----SH ---> Sakkarid-SH + halogenacetylt-Prot --
--> Konjugat

30 Sakkarid-aldehyd + NH₂-----NH₂ ----> sakkarid---NH₂ + EDAC + COOH-Prot ---->
konjugat

Bemerk: istedenfor EDAC ovenfor kan hvilket som helst egnet karbodiimid anvendes.

Oppsummert er typene av kjemisk proteinbærergruppe som generelt kan anvendes for kobling med et sakkarid, en aminogrupeer (for eksempel på lysinrester), COOH-grupper (for eksempel på asparaginsyre- og glutaminsyrerester) og SH-grupper (hvis tilgjengelige) (for eksempel på cysteinrester).

Fortrinnsvis er forholdet mellom bærerprotein og *S. pneumoniae*-sakkarid mellom 1:5 og 5:1; f.eks. mellom 1:0,5-4:1, 1:1-3,5:1, 1,2:1-3:1, 1,5:1-2,5:1; f.eks. mellom 1:2 og 2,5:1; 1:1 og 2:1 (på vektbasis). Ved en utførelsesform har hovedandelen av konjugatene, for eksempel 6, 7, 8, 9 eller flere av konjugatene, et forhold mellom bærerprotein og sakkarid som er større enn 1:1, for eksempel 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1 eller 1,6:1.

Ved en utførelsesform blir minst ett *S. pneumoniae*-sakkarid konjugert til et bærerprotein via en linker ved anvendelse av CDAP og EDAC. For eksempel kan 18C eller 22F konjugeres til et protein via en linker (for eksempel slike som har to hydrazinogrupeer i endene, så som ADH) ved anvendelse av CDAP og EDAC som beskrevet ovenfor. Når det anvendes en linker, kan CDAP anvendes til konjugering av sakkaridet til en linker, og EDAC kan deretter anvendes til konjugering av linkeren til et protein, eller alternativt kan EDAC anvendes først til konjugering av linkeren til proteinet, hvorefter CDAP kan anvendes til konjugering av linkeren til sakkaridet.

Generelt kan immunogenpreparatet ifølge oppfinnelsen omfatte en dose av hvert sakkaridkonjugat mellom 0,1 og 20 µg, 1 og 10 µg eller 1 og 3 µg sakkarid.

Ved en utførelsesform inneholder immunogenpreparatet ifølge oppfinnelsen hvert *S. pneumoniae*-kapselsakkarid i en dose på 0,1-20 µg; 0,5-10 µg; 0,5- 5 µg eller 1-3 µg sakkarid. Ved en utførelsesform kan kapselsakkarider være til stede i forskjellige doser, for eksempel kan noen kapselsakkarider være til stede i en dose på nøyaktig 1 µg, eller noen kapselsakkarider kan være til stede i en dose på nøyaktig 3 µg. Ved en utførelsesform er sakkarider fra serotypene 3, 18C og 19F (eller 4, 18C og 19F) til stede i en høyere dose enn andre sakkarider. Ved ett

aspekt ved denne utførelsesform er serotypene 3, 18C og 19F (eller 4, 18C og 19F) til stede i en dose på rundt eller nøyaktig 3 µg, mens andre sakkarider i immunogenpreparatet er til stede i en dose på rundt eller nøyaktig 1 µg.

“Rundt” eller “omtrent” er definert som innenfor 10% mer eller mindre enn
5 det angitte tall for formålene ifølge oppfinnelsen.

Ved en utførelsesform er minst én av *S. pneumoniae*-kapselsakkaridene direkte konjugert til et bærerprotein (f.eks. ved anvendelse av én av kjemiene beskrevet ovenfor). Fortrinnsvis er det minst ene av *S. pneumoniae*-kapselsakkaridene direkte konjugert ved CDAP. Ved en utførelsesform er
10 hovedandelen av kapselsakkaridene, for eksempel 5, 6, 7, 8, 9 eller flere, direkte bundet til bærerproteinet ved CDAP (se WO 95/08348 og WO 96/29094).

Immunogenpreparatet kan omfatte *Streptococcus pneumoniae*-proteiner, her betegnet *Streptococcus pneumoniae*-proteiner ifølge oppfinnelsen. Slike proteiner kan anvendes som bærerproteiner eller være til stede som frie proteiner,
15 eller være til stede både som bærerproteiner og som frie proteiner. *Streptococcus pneumoniae*-proteinene ifølge oppfinnelsen er enten overflateeksponerte, i det minste i løpet av en del av pneumokokkens livssyklus, eller de er proteiner som blir utskilt eller frigjort av pneumokokken. Fortrinnsvis er proteinene ifølge oppfinnelsen valgt blant følgende kategorier, så som proteiner som har et Type II-
20 signalsekvens-mønster LXXC (hvor X er hvilken som helst aminosyre, f.eks. polyhistidintriade-familien (PhtX)), kolinbindende proteiner (CbpX), proteiner som har et type I-signalsekvensmønster (f.eks. Sp101), proteiner som har et LPXTG-mønster (hvor X er hvilken som helst aminosyre, f.eks. Sp128, Sp130) og toksiner (f.eks. Ply). Foretrukne eksempler i disse kategorier (eller mønstre) er følgende
25 proteiner, eller immunologisk funksjonelle ekvivalenter derav.

Ved én utførelsesform omfatter immunogenpreparatet ifølge oppfinnelsen minst 1 protein valgt fra gruppen bestående av polyhistidintriade-familien (PhtX), kolinbindende protein-familien (CbpX), trunkerte CbpX-proteiner, LytX-familien, trunkerte LytX-proteiner, kimæriske trunkerte CbpX - trunkerte LytX-proteiner (eller
30 fusjoner), pneumolysin (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 og Sp133. Ved en ytterligere utførelsesform omfatter immunogenpreparatet 2 eller flere proteiner valgt fra gruppen bestående av polyhistidintriade-familien (PhtX), kolinbindende protein-familie (CbpX), trunkerte CbpX-proteiner, LytX-familien,

trunkerte LytX-proteiner, kimæriske trunkerte CbpX - trunkerte LytX-proteiner (eller fusjoner), pneumolysin (Ply), PspA, PsaA og Sp128. Ved en ytterligere utførelsesform omfatter immunogenpreparatet 2 eller flere proteiner valgt fra gruppen bestående av polyhistidintriade-familien (PhtX), kolinbindende protein-familien (CbpX), trunkerte CbpX-proteiner, LytX-familien, trunkerte LytX-proteiner, kimæriske trunkerte CbpX - trunkerte LytX-proteiner (eller fusjoner), pneumolysin (Ply) og Sp128.

Pht (polyhistidintriade-) familien omfatter proteinene PhtA, PhtB, PhtD og PhtE. Familien er karakterisert ved en lipideringssekvens, to domener separert ved en prolin-rik region og flere histidintriader, muligens involvert i metall- eller nukleosidbinding eller enzymatisk aktivitet, (3-5) spiralsnodde regioner, en konserverv N-terminal ende og en heterogen C-terminal ende. Den er til stede i alle stammer av testede pneumokokker. Homologe proteiner er også funnet i andre streptokokker og neisseriabakterier. Ved én utførelsesform av oppfinnelsen er Pht-proteinet ifølge oppfinnelsen PhtD. Det må imidlertid være klart at betegnelsene Pht A, B, D og E angir proteiner som har sekvenser beskrevet i henvisningene nedenfor så vel som naturlig forekommende (og menneskeskapte) varianter derav som har en sekvenshomologi som er minst 90% identisk med referanseproteinene. Fortrinnsvis er det minst 95% identisk, og mest foretrukket 97% identisk.

Når det gjelder PhtX-proteinene, er PhtA beskrevet i WO 98/18930 og er også omtalt som Sp36. Som angitt ovenfor, er det et protein fra polyhistidintriade-familien og har type II-signalmønsteret LXXC. PhtD er beskrevet i WO 00/37105 og er også omtalt som Sp036D. Som angitt ovenfor, er det også et protein fra polyhistidintriade-familien og har type II LXXC-signalmønsteret. PhtB er beskrevet i WO 00/37105 og er også omtalt som Sp036B. Et annet medlem av PhtB-familien er C3-nedbrytings-polypeptidet, som beskrevet i WO 00/17370. Dette protein er også fra polyhistidintriade-familien og har type II LXXC-signalmønsteret. En foretrukket immunologisk funksjonell ekvivalent er proteinet Sp42 beskrevet i WO 98/18930. Et trunkert PhtB-protein (omtrent 79kD) er beskrevet i WO99/15675 som også er betraktet som et medlem av PhtX-familien. PhtE er beskrevet i WO00/30299 og er omtalt som BVH-3. Hvor hvilket som helst Pht-protein er referert til her, menes det at immunogene fragmenter eller fusjoner derav av Pht-

proteinet kan anvendes. For eksempel innbefatter en referanse til PhtX immunogene fragmenter eller fusjoner derav fra hvilket som helst Pht-protein. En referanse til PhtD eller PhtB er også en referanse til PhtDE- eller PhtBE-fusjoner som for eksempel finnes i WO0198334.

5 Pneumolysin er et multifunksjonelt toksin med en distinkt cytolytisk (hemolytisk) og komplementaktiverende aktivitet (Rubins et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 153:1339-1346 (1996)). Toksinet utskilles ikke av pneumokokker, men det frigjøres ved lyse av pneumokokker under innvirkning av autolysin. Dets effekter innbefatter f.eks. stimulering av humane monocytters produksjon av
10 inflammatoriske cytokiner, hemning av cilienes slag på humant respiratorisk epitel, og reduksjon av baktericid aktivitet og migrering av nøytrofile celler. Den mest åpenbare effekt av pneumolysin er ved lyse av røde blodceller, som involverer binding til kolesterol. På grunn av at det er et toksin, trengs det å detoksifiseres (dvs. gjøres ikke-toksisk for et menneske ved tilføring i en dose egnet for
15 beskyttelse) før det kan administreres in vivo. Ekspresjon og kloning av villtype- eller nativt pneumolysin er kjent på området. Se for eksempel Walker et al. (*Infect Immun.*, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell et al. (*Biochim Biophys Acta*, 1007:67-72 (1989) og Mitchell et al (*NAR*, 18:4010 (1990)). Detoksifisering av ply kan utføres ved kjemiske midler, f.eks. ved utsettelse for formalin- eller glutaraldehyd-
20 behandling eller en kombinasjon av disse (WO 04081515, PCT/EP2005/010258). Slike metoder er velkjente på området for forskjellige toksiner. Alternativt kan ply detoksifiseres genetisk. Således omfatter oppfinnelsen derivater av pneumokokk-proteiner som for eksempel kan være muterte proteiner. Betegnelsen "mutert" blir anvendt her for et molekyl som har gjennomgått delesjon, addisjon eller
25 substitusjon av én eller flere aminosyrer ved anvendelse av velkjente teknikker for setedirigert mutagenese eller hvilken som helst annen konvensjonell metode. For eksempel som beskrevet ovenfor, kan et mutant ply-protein endres slik at det er biologisk inaktivt, mens dets immunogene epitoper fremdeles bevares, se for eksempel WO90/06951, Berry et al. (*Infect Immun.*, 67:981-985 (1999)) og
30 WO99/03884.

Slik betegnelsen "Ply" er anvendt her, vil det være klart at den angir mutert eller detoksifisert pneumolysin egnet for medisinsk anvendelse (dvs. ikke-toksisk).

Med hensyn til kolinbindende protein-familien (CbpX), ble medlemmer av denne familien opprinnelig identifisert som pneumokokkproteiner som kunne renses ved kolin-affinitetskromatografi. Alle de kolinbindende proteiner er ikke-kovalent bundet til fosforylkoligrupper i cellevegg-teikoinsyre og membran-assosiert lipoteikoinsyre. Strukturelt har de flere regioner til felles på tvers av hele familien, selv om proteinenes nøyaktige beskaffenhet (aminosyresekvens, lengde, osv.) kan variere. Generelt omfatter kolinbindende proteiner en N-terminal region (N), konserverte gjentatte regioner (R1 og/eller R2), en prolinrik region (P) og en konservert kolinbindende region (C), som utgjøres av multiple repetisjoner, som omfatter omtrent halvdelen av proteinet. Slik betegnelsen "kolinbindende protein-familie (CbpX)" er anvendt i denne patentsøknad, er den valgt fra gruppen bestående av kolinbindende proteiner som identifisert i WO97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD og CbpG. CbpA er beskrevet i WO97/41151. CbpD og CbpG er beskrevet i WO00/29434. PspC er beskrevet i WO97/09994. PbcA er beskrevet i WO98/21337. SpsA er et kolinbindende protein beskrevet i WO 98/39450. Fortrinnsvis er de kolinbindende proteiner valgt fra gruppen bestående av CbpA, PbcA, SpsA og PspC.

En annen foretrukket utførelsesform er trunkerte CbpX-proteiner hvor "CbpX" er definert ovenfor, og "trunkerte proteiner" angir CbpX-proteiner som mangler 50% eller mer av den kolinbindende region (C). Fortrinnsvis mangler slike proteiner hele den kolinbindende region. Mer foretrukket mangler slike trunkerte proteiner (i) den kolinbindende region og (ii) også en del av den N-terminale halvdelen av proteinet, men beholder likevel minst én gjentatt region (R1 eller R2). Enda mer foretrukket har det trunkerte protein 2 gjentatte regioner (R1 og R2). Eksempler på slike foretrukne utførelsesformer er NR1xR2 og R1xR2 som illustrert i WO99/51266 eller WO99/51188; imidlertid er andre kolinbindende proteiner som mangler en liknende kolinbindende region, også påtenkt innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse.

LytX-familien er membrantilknyttede proteiner knyttet til cellelyse. Det N-terminale doméne omfatter kolinbindende doméne(r), imidlertid har ikke LytX-familien alle trekkene som finnes i CbpA-familien angitt ovenfor, og således anses LytX-familien for foreliggende oppfinnelse som forskjellig fra CbpX-familien. I motsetning til CbpX-familien, inneholder det C-terminale doméne det katalytiske

doméne av LytX-proteinfamilien. Familien omfatter LytA, B og C. Når det gjelder LytX-familien, er LytA beskrevet i Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). LytB er beskrevet i WO 98/18930 og er også referert til som Sp46. LytC er også beskrevet i WO 98/18930 og er også referert til som Sp91. Et foretrukket medlem av denne familien er LytC.

En annen foretrukket utførelsesform er trunkerte LytX-proteiner hvor "LytX" er definert ovenfor, og "trunkerte proteiner" angir LytX-proteiner som mangler 50% eller mer av den kolinbindende region. Fortrinnsvis mangler slike proteiner hele den kolinbindende region. Enda en annen foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er kimæriske trunkerte CbpX - trunkerte LytX-proteiner (eller fusjoner). Fortrinnsvis omfatter dette NR1xR2 (eller R1xR2) av CbpX og den C-terminale delen (Cterm, dvs. som mangler de kolinbindende doméner) av LytX (f.eks. LytCCterm eller Sp91Cterm). Mer foretrukket er CbpX valgt fra gruppen bestående av CbpA, PbcA, SpsA og PspC. Enda mer foretrukket er det CbpA. LytX er fortrinnsvis LytC (også omtalt som Sp91). En annen utførelsesform av oppfinnelsen er et trunkert PspA-protein eller trunkert PsaA-protein som mangler det kolinbindende doméne (C) og er uttrykt som et fusjonsprotein med LytX. LytX er fortrinnsvis LytC.

Når det gjelder PsaA og PspA, er begge kjent på området. For eksempel er PsaA og transmembran-delesjonsvarianter derav beskrevet av Berry & Paton, Infect Immun des. 1996; 64(12):5255-62. PspA og transmembran-delesjonsvarianter derav er beskrevet for eksempel i US 5804193, WO 92/14488 og WO 99/53940.

Sp128 og Sp130 er beskrevet i WO00/76540. Sp125 er et eksempel på et pneumokokk-overflateprotein med det celleveggforankrede mønster LPXTG (hvor X er hvilken som helst aminosyre). Hvilket som helst protein i denne klassen av pneumokokk-overflateprotein med dette mønster er funnet å være anvendelig i forbindelse med foreliggende oppfinnelse og anses derfor som et ytterligere protein ifølge oppfinnelsen. Selve Sp125 er beskrevet i WO 98/18930 og er også kjent som ZmpB – en sinkmetallproteinase. Sp101 er beskrevet i WO 98/06734 (hvor det har referansen nr. y85993). Det er kjennetegnet ved en type I-signalsekvens. Sp133 er beskrevet i WO 98/06734 (hvor det har referansen nr. y85992). Det er også karakterisert ved en type I-signalsekvens.

Eksempler på foretrukne *Moraxella catarrhalis*-protein-antigener som kan innbefattes i en kombinasjonsvaksine (spesielt for forhindring av mellomørebetennelse) er: OMP106 [WO 97/41731 (Antex) og WO 96/34960 (PMC)]; OMP21 eller fragmenter derav (WO 0018910); LbpA og/eller LbpB [WO 98/55606 (PMC)]; TbpA og/eller TbpB [WO 97/13785 og WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, *et al.* (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 og/eller UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824); PilQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); lipo06 (GB 9917977.2); lipo10 (GB 9918208.1); lipo11 (GB 9918302.2); lipo18 (GB 9918038.2); P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); OmpIA1 (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257); og OmpE. Eksempler på ikke-typebestembare *Haemophilus influenzae*-antigener eller fragmenter derav som kan innbefattes i en kombinasjonsvaksine (spesielt for forhindring av mellomørebetennelse), innbefatter: Fimbrinprotein [(US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] og fusjoner omfattende peptider fra dette [f.eks. LB1(f)-peptidfusjoner; US 5843464 (OSU) eller WO 99/64067]; OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [EP 281673 (State University of New York)]; TbpA og/eller TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (WO 94/12641); P2; og P5 (WO 94/26304).

Proteinene ifølge oppfinnelsen kan også med fordel kombineres. Med kombineres menes at immunogenpreparatet omfatter alle proteinene fra følgende kombinasjoner, enten som bærerproteiner eller som frie proteiner eller en blanding av disse to. I en kombinasjon av to proteiner som angitt nedenfor, kan for eksempel begge proteiner anvendes som bærerproteiner, eller begge proteiner kan være til stede som frie proteiner, eller begge kan være til stede som bærer og som fritt protein, eller ett kan være til stede som bærerprotein og fritt protein, mens det andre er til stede bare som bærerprotein eller bare som fritt protein, eller ett kan være til stede som bærerprotein og det andre som fritt protein. Hvor en kombinasjon av tre proteiner er angitt, finnes liknende muligheter. Foretrukne kombinasjoner innbefatter, men er ikke begrenset til, PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91Cterm kimæriske eller fusjonsproteiner, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2-Sp91Cterm kimæriske eller fusjonsproteiner, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128,

R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. NR1xR2 (eller R1xR2) er fortrinnsvis fra CbpA eller PspC. Mer foretrukket er det fra CbpA. Andre kombinasjoner innbefatter 3 protein-kombinasjoner så som PhtD + NR1xR2 + Ply, og PhtA + NR1xR2 + PhtD. Ved én utførelsesform omfatter vaksinepreparatet detoksifisert pneumolysin og PhtD eller PhtDE som bærerproteiner. Ved en ytterligere utførelsesform omfatter vaksinepreparatet detoksifisert pneumolysin og PhtD eller PhtDE som frie proteiner.

Ved et uavhengig aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et immunogenpreparat omfattende minst fire *S. pneumoniae*-kapsel-sakkarid-konjugater inneholdende sakkarider fra forskjellige *S. pneumoniae*-serotyper hvor minst ett sakkarid er konjugert til PhtD eller fusjonsprotein derav, og immunogenpreparatet er i stand til å fremkalle en effektiv immunrespons overfor PhtD.

En effektiv immunrespons overfor PhtD eller fusjonsprotein derav blir målt for eksempel ved et beskyttelsesforsøk så som det beskrevet i eksempel 15. En effektiv immunrespons tilveiebringer minst 40%, 50%, 60%, 70%, 80% eller 90% overlevelse 7 dager etter tilføring av en heterolog stamme. På bakgrunn av at den tilførte stamme er heterolog, skyldes den tilveiebrakte beskyttelse immunresponsen overfor PhtD eller fusjonsprotein derav.

Alternativt måles en effektiv immunrespons overfor PhtD ved ELISA som beskrevet i eksempel 14. En effektiv immunrespons gir en anti-PhtD IgG-respons på minst 250, 300, 350, 400, 500, 550 eller 600 µg/ml GMC.

For eksempel omfatter immunogenpreparatet minst 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 *S. pneumoniae*-kapselsakkarider fra forskjellige serotyper konjugert til PhtD eller fusjonsprotein derav. For eksempel er serotyper 22F og 1, 2, 3, 4, 5, 6 eller 7 videre valgt blant serotyper 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 23F og 33F, konjugert til PhtD. Ved en utførelsesform er to eller tre av serotyper 3, 6A og 22F konjugert til PhtD eller fusjonsprotein derav.

Ved en utførelsesform omfatter immunogenpreparatet ifølge oppfinnelsen minst ett *S. pneumoniae*-kapselsakkarid konjugert til PhtD eller fusjonsprotein derav via en linker, for eksempel ADH. Ved en utførelsesform anvendes én av konjugeringskjemiene oppført nedenfor.

Ved en utførelsesform omfatter immunogenpreparatet ifølge oppfinnelsen minst ett *S. pneumoniae*-kapselsakkarid konjugert til PhtD eller fusjonsprotein derav, hvor forholdet mellom PhtD og sakkarid i konjugatet er mellom 6:1 og 1:5, 6:1 og 2:1, 6:1 og 2,5:1, 6:1 og 3:1, 6:1 og 3,5:1 (på vektbasis) eller høyere (dvs. inneholder en større andel av PhtD) 2,0:1, 2,5:1, 3,0:1, 3,5:1 eller 4,0:1 (på vektbasis).

Ved en utførelsesform omfatter immunogenpreparatet ifølge oppfinnelsen pneumolysin.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en vaksine inneholdende immunogenpreparatene ifølge oppfinnelsen og et farmasøytisk akseptabelt tilsetningsmiddel.

Vaksinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan være understøttet, spesielt når de er ment for anvendelse i en populasjon av eldre, men også for anvendelse i populasjoner av småbarn. Egnede adjuvantia innbefatter et aluminiumsalt så som aluminiumhydroksid-gel eller aluminiumfosfat eller alun, men kan også være andre metallsalter så som av kalsium, magnesium, jern eller sink, eller en uoppløselig suspensjon av acylert tyrosin, eller acylerte sukkerarter, kationisk eller anionisk derivatiserte sakkarider, eller polyfosfazener.

Det er foretrukket at adjuvansen er valgt til å være en preferensiell induktor for en TH1-responstype. Slike høye nivåer av Th1-cytokintyper har tendens til å begunstige induksjon av cellemedierte immunresponser overfor et gitt antigen, mens høye nivåer av Th2-cytokintyper har tendens til å begunstige induksjon av humorale immunresponser overfor antigenet.

Distinksjonen mellom Th1- og Th2-immunresponstype er ikke absolutt. I realiteten vil et individ støtte en immunrespons som er beskrevet å være overveiende Th1 eller overveiende Th2. Det er imidlertid ofte hensiktsmessig å betrakte cytokinfamiliene på bakgrunn av det som er beskrevet i murine CD4 +ve T cell clones av Mosmann og Coffman (Mosmann, T.R. og Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. (Annual Review of Immunology, 7, s.145-173). Tradisjonelt er Th1-responstyper forbundet med produksjon av INF- γ - og IL-2-cytokinene ved T-lymfocytter. Andre cytokiner som ofte er direkte forbundet med induksjon av Th1-immunresponstyper, dannes ikke av T-celler, så som IL-12. I motsetning til

dette er Th2-responstyper forbundet med sekresjon av IL-4, IL-5, IL-6, IL-10.

Egnede adjuvanssystemer som fremmer en overveiende Th1-respons, innbefatter:

Monofosforyl-lipid A eller et derivat derav (eller detoksifisert lipid A generelt – se for eksempel WO2005107798), spesielt 3-de-O-acylert monofosforyl-lipid A (3D-

5 MPL) (for fremstilling av det, se GB 2220211 A); og en kombinasjon av monofosforyl-lipid A, fortrinnsvis 3-de-O-acylert monofosforyl-lipid A, sammen med enten et aluminiumsalt (for eksempel aluminiumfosfat eller aluminiumhydroksid) eller en olje-i-vann emulsjon. I slike kombinasjoner finnes antigen og 3D-MPL i de samme partikkelformige strukturer, hvorved det muliggjøres mer effektiv avgivelse
10 av antigene og immunstimulerende signaler. Undersøkelser har vist at 3D-MPL ytterligere kan forsterke immunogeniteten av et alun-adsorbert antigen [Thoelen et al. Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454-B1].

Et forbedret system innbefatter kombinasjonen av et monofosforyl-lipid A og et saponinderivat, spesielt kombinasjonen av QS21 og 3D-MPL som beskrevet
15 i WO 94/00153, eller et mindre reaktogent preparat hvor QS21 blir behandlet med kolesterol som beskrevet i WO 96/33739. En spesielt kraftig adjuvansformulering som innbefatter QS21, 3D-MPL og tokoferol i en olje-i-vann-emulsjon, er beskrevet i WO 95/17210. Ved én utførelsesform omfatter immunogenpreparatet i tillegg et saponin, som kan være QS21. Formuleringen kan også omfatte en olje-i-
20 vann-emulsjon og tokoferol (WO 95/17210). Ikke-metylerte CpG-inneholdende oligonukleotider (WO 96/02555) og andre immunmodulerende oligonukleotider (WO0226757 og WO03507822) er også preferensielle induktorer for en TH1-respons og er egnet for anvendelse ved foreliggende oppfinnelse.

Spesielle adjuvantia er slike som er valgt fra gruppen metallsalter, olje-i-
25 vann-emulsjoner, toll-liknende reseptorer-agonist, (spesielt toll-liknende reseptor 2-agonist, toll-liknende reseptor 3-agonist, toll-liknende reseptor 4-agonist, toll-liknende reseptor 7-agonist, toll-liknende reseptor 8-agonist og toll-liknende reseptor 9-agonist) og saponiner, eller kombinasjoner av disse.

En adjuvans som kan anvendes med vaksinepreparatene ifølge
30 oppfinnelsen, er blære- eller ytremembranvesikkel-preparater fra gramnegative bakteriestammer så som dem beskrevet i WO02/09746 – spesielt N. meningitidis-blærer. Adjuvansegenskaper hos blærer kan forbedres ved bibeholdelse av LOS (lipooligosakkarid) på overflaten av dem (f.eks. gjennom ekstraksjon med lave

konsentrasjoner av detergent [for eksempel 0-0,1% deoksykolat]). LOS kan detoksifiseres gjennom msbB(-) eller htrB(-) mutasjonene beskrevet i WO02/09746. Adjuvansegenskapene kan også forbedres ved bibeholdelse av PorB (og eventuelt fjerning av PorA) fra meningokokkblærer. Adjuvans-
5 egenskapene kan også forbedres ved trunkering av den ytre kjerne-sakkarid-struktur av LOS på meningokokkblærer – for eksempel via lgtB(-)-mutasjonen beskrevet i WO2004/014417. Alternativt kan ovennevnte LOS (f.eks. isolert fra en msbB(-)- og/eller lgtB(-)-stamme) renses og anvendes som adjuvans i preparatene ifølge oppfinnelsen.

10 En ytterligere adjuvans som kan anvendes med preparatene ifølge oppfinnelsen, kan velges fra gruppen: et saponin, lipid A eller et derivat derav, et immunstimulerende oligonukleotid, et alkylglukosaminidfosfat, en olje-i-vann-emulsjon eller kombinasjoner av disse. En ytterligere foretrukket adjuvans er et metallsalt i kombinasjon med en annen adjuvans. Det er foretrukket at
15 adjuvansen er en toll-liknende reseptor-agonist, spesielt en agonist til en toll-liknende reseptor 2, 3, 4, 7, 8 eller 9, eller et saponin, spesielt Qs21. Det er videre foretrukket at adjuvans-systemet omfatter to eller flere adjuvantia fra ovenstående liste. Spesielt inneholder kombinasjonene fortrinnsvis en saponin- (spesielt Qs21) adjuvans og/eller en toll-liknende reseptor 9-agonist så som et CpG-inneholdende
20 immunstimulerende oligonukleotid. Andre foretrukne kombinasjoner omfatter et saponin (spesielt QS21) og en toll-liknende reseptor 4-agonist så som monofosforyl-lipid A eller dets 3-deacylerte derivat, 3 D – MPL, eller et saponin (spesielt QS21) og en toll-liknende reseptor 4-ligand så som et alkylglukosaminidfosfat.

25 Spesielt foretrukne adjuvantia er kombinasjoner av 3D-MPL og QS21 (EP 0 671 948 B1), olje-i-vann-emulsjoner omfattende 3D-MPL og QS21 (WO 95/17210, WO 98/56414) eller 3D-MPL formulert med andre bærere (EP 0 689 454 B1). Andre foretrukne adjuvanssystemer omfatter en kombinasjon av 3 D MPL, QS21 og et CpG-oligonukleotid som beskrevet i US6558670, US6544518.

30 Ved en utførelsesform er adjuvansen (eller omfatter) en toll-liknende reseptor (TLR) 4-ligand, fortrinnsvis en agonist så som et lipid A-derivat, spesielt monofosforyl-lipid A eller mer spesielt 3-deacylert monofosforyl-lipid A (3 D – MPL).

3 D – MPL er tilgjengelig fra GlaxoSmithKline Biologicals North America og fremmer primært CD4+ T-celle-responser med en IFN- γ (Th1)-fenotype. Det kan produseres i henhold til metodene beskrevet i GB 2 220 211 A. Kjemisk er det en blanding av 3-deacylert monofosforyl-lipid A med 3, 4, 5 eller 6 acylerte kjeder.

5 Fortrinnsvis anvendes det i preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse små-partikkel- 3 D - MPL. Småpartikkel -3 D - MPL har en partikkelstørrelse slik at det kan sterilfiltreres gjennom et 0,22 μm filter. Slike preparater er beskrevet i internasjonal patentsøknad nr. WO 94/21292. Syntetiske derivater av lipid A er kjent og antatt å være TLR 4-agonister, innbefattende, men ikke begrenset til:

10

OM174 (2-deoksy-6-o-[2-deoksy-2-[(R)-3-dodekanoyloksytetra-dekanoylamino]-4-o-fosfono- β -D-glukopyranosyl]-2-[(R)-3-hydroksytetradekanoylamino]- α -D-glukopyranosyldihydrogenfosfat), (WO 95/14026)

15 OM 294 DP (3S, 9 R) –3 -[(R)-dodekanoyloksytetradekanoylamino]-4-okso-5-aza-9(R)-[(R)-3-hydroksytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol,1,10-bis(dihydrogenofosfat) (WO99 /64301 og WO 00/0462)

20 OM 197 MP-Ac DP (3S-, 9R) -3-[(R) -dodekanoyloksytetradekanoylamino]-4-okso-5-aza-9-[(R)-3-hydroksytetradekanoylamino]dekan-1,10-diol,1-dihydrogenfosfat 10-(6-aminoheksanoat) (WO 01/46127)

Andre TLR4-ligander som kan anvendes, er alkylglukosaminidfosfater (AGP) så som dem beskrevet i WO9850399 eller US6303347 (prosesser for fremstilling av AGP er også beskrevet), eller farmasøytisk akseptable salter av AGP som 25 beskrevet i US6764840. Noen AGP er TLR4-agonister, og noen er TLR4-antagonister. Begge antas å være anvendelige som adjuvantia.

Et annet foretrukket immunstimulerende middel for anvendelse ved foreliggende oppfinnelse er Quil A og derivater derav. Quil A er et saponin- 30 preparat isolert fra det sydamerikanske tre Quilaja Saponaria Molina og ble først beskrevet å ha adjuvansaktivitet av Dalsgaard et al. i 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, s. 243-254). Rensede fragmenter av Quil A er blitt isolert ved HPLC som bibeholder

adjuvans-aktivitet uten toksisiteten som er forbundet med Quil A (EP 0 362 278), for eksempel QS7 og QS21 (også kjent som QA7 og QA21). QS-21 er et naturlig saponin som fås fra barken av *Quillaja saponaria* Molina som fremkaller CD8+-cytotoksiske T-celler (CTL), Th1-celler og en dominerende IgG2a-antistoff-respons, og er et foretrukket saponin i forbindelse med foreliggende oppfinnelse.

Det er beskrevet spesielle formuleringer av QS21 som er spesielt foretrukket; disse formuleringer omfatter videre en sterol (WO96/33739). Saponinene som utgjør en del av foreliggende oppfinnelse, kan være separate i form av miceller, blandede miceller (fortrinnsvis, men ikke utelukkende med gallesaltene), eller de kan være i form av ISCOM-matrikser (EP 0 109 942 B1), liposomer eller beslektede kolloidale strukturer så som orm-liknende eller ring-liknende multimere komplekser eller lipidiske/laglagte strukturer og lameller når de er formulert med kolesterol og lipid, eller i form av en olje-i-vann-emulsjon (for eksempel som i WO 95/17210). Saponinene kan fortrinnsvis være forbundet med et metallsalt, så som aluminiumhydroksid eller aluminiumfosfat (WO 98/15287). Saponinet er fortrinnsvis presentert i form av et liposom, ISCOM eller en olje-i-vann-emulsjon.

Et forbedret system innbefatter kombinasjonen av et monofosforyl-lipid A (eller detoksifisert lipid A) og et saponinderivat, spesielt kombinasjonen av QS21 og 3D-MPL som beskrevet i WO 94/00153, eller et mindre reaktogent preparat hvor QS21 blir behandlet med kolesterol som beskrevet i WO 96/33739. En spesielt kraftig adjuvansformulering som involverer tokoferol med eller uten QS21 og/eller 3D-MPL i en olje-i-vann-emulsjon, er beskrevet i WO 95/17210. Ved én utførelsesform omfatter immunogenpreparatet i tillegg et saponin, som kan være QS21.

Immunstimulerende oligonukleotider eller hvilken som helst annen toll-liknende reseptor (TLR) 9-agonist kan også anvendes. De foretrukne oligonukleotider for anvendelse i adjuvantia eller vaksiner ifølge foreliggende oppfinnelse er CpG-inneholdende oligonukleotider, fortrinnsvis inneholdende to eller flere dinukleotid-CpG-mønstre separert ved minst tre, mer foretrukket minst seks eller flere nukleotider. Et CpG-mønster er et cytosin-nukleotid fulgt av et guanin-nukleotid. CpG-oligonukleotidene ifølge foreliggende oppfinnelse er typisk deoksynukleotider. Ved en foretrukket utførelsesform er internukleotidet i

oligonukleotidet fosforditioat, eller mer foretrukket en fosfortioatbinding, selv om fosfodiester- og andre internukleotidbindinger er innenfor omfanget av oppfinnelsen. Også innbefattet innenfor omfanget av oppfinnelsen er oligonukleotider med blandede internukleotidbindinger. Metoder for å produsere fosfortioat-oligonukleotider eller fosforditioat er beskrevet i US 5 666 153, US 5278 302 og WO95/26204.

Eksempler på foretrukne oligonukleotider har følgende sekvenser. Sekvensene inneholder fortrinnsvis fosfortioat-modifiserte internukleotidbindinger.

OLIGO 1 (SEKV ID NR:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2 (SEKV ID NR:2): TCT CCC AGC GTG CGC KATT (CpG 1758)

OLIGO 3 (SEKV ID NR:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4 (SEKV ID NR:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEKV ID NR:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

OLIGO 6 (SEKV ID NR:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)

Alternative CpG-oligonukleotider kan omfatte de foretrukne sekvenser ovenfor ved at de har inkonsekvante delesjoner eller addisjoner til disse.

CpG-oligonukleotidene som anvendes ved foreliggende oppfinnelse, kan syntetiseres ved hvilken som helst metode kjent på området (se for eksempel EP 468520). Slike oligonukleotider kan hensiktsmessig syntetiseres ved anvendelse av et automatisert syntetiseringsapparat.

Adjuvansen kan være en olje-i-vann-emulsjon eller kan omfatte en olje-i-vann-emulsjon i kombinasjon med andre adjuvantia. Oljefasen av emulsjonssystemet omfatter fortrinnsvis en metaboliserbar olje. Betydningen av betegnelsen metaboliserbar olje er velkjent på området. Metaboliserbar kan defineres som "å være i stand til å kunne transformeres ved metabolisme" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25. utgave (1974)). Oljen kan være hvilken som helst vegetabilsk olje, fiskeolje, animalsk eller syntetisk olje, som ikke er toksisk for mottakeren og kan omdannes ved metabolisme. Nøtter, frø og korn er vanlige kilder til vegetabilske oljer. Syntetiske oljer er også en del av foreliggende oppfinnelse og kan innbefatte kommersielt tilgjengelige oljer så som NEOBEE® og andre. Squalen (2,6,10,15,19, 23-heksametyl-2,6,10,14,18,22-tetrakosaheksaen) er en umettet olje som finnes i store mengder i haileverolje og i mindre mengder i olivenolje, hvetekimolje,

riskliolje og gjær, og er en spesielt foretrukket olje for anvendelse ved foreliggende oppfinnelse. Squalen er en metaboliserbar olje på basis av det faktum at den er et mellomprodukt i biosyntesen av kolesterol (Merck Index, 10. utgave, oppslagsord nr. 8619).

5 Tokoler (f.eks. vitamin E) blir også ofte anvendt i oljeemulsjonsadjuvantia (EP 0 382 271 B1; US 5667784; WO 95/17210). Tokoler som anvendes i oljeemulsjoner (fortrinnsvis olje-i-vann-emulsjoner) ifølge oppfinnelsen, kan formuleres som beskrevet i EP 0 382 271 B1, ved at tokolene kan være dispersjoner av tokol-smådråper, eventuelt omfattende et emulgeringsmiddel, med
10 en diameter fortrinnsvis mindre enn 1 mikrometer. Alternativt kan tokolene anvendes i kombinasjon med en annen olje, under dannelse av oljefasen av en olje-emulsjon. Eksempler på olje-emulsjoner som kan anvendes i kombinasjon med tokolet, er beskrevet her i dokumentet, så som de metaboliserbare oljer beskrevet ovenfor.

15 Olje-i-vann-emulsjon-adjuvantia er per se foreslått å være anvendelige som adjuvanspreparater (EP 0 399 843B); kombinasjoner av olje-i-vann-emulsjoner og andre aktive midler er også beskrevet som adjuvantia for vaksiner (WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Andre oljeemulsjonsadjuvantia er beskrevet, så som vann-i-olje-emulsjoner (US 5 422 109; EP 0 480 982 B2) og
20 vann-i-olje-i-vann-emulsjoner (US 5 424 067; EP 0 480 981 B). Alle disse danner foretrukne oljeemulsjonssystemer (spesielt når de omfatter tokoler) under dannelse av adjuvantia og preparater ifølge foreliggende oppfinnelse.

Mest foretrukket omfatter oljeemulsjonen (for eksempel olje-i-vann-emulsjoner) videre et emulgeringsmiddel så som TWEEN 80, og/eller en sterol så
25 som kolesterol.

En foretrukket oljeemulsjon (fortrinnsvis olje-i-vann-emulsjon) omfatter en metaboliserbar, ikke-toksisk olje, så som squalan, squalen eller en tokoferol så som alfa-tokoferol (og fortrinnsvis både squalen og alfa-tokoferol) og eventuelt et emulgeringsmiddel (eller overflateaktivt middel) så som Tween 80. En sterol
30 (fortrinnsvis kolesterol) kan også være innbefattet.

Metoden for fremstilling av olje-i-vann-emulsjoner er velkjent for fagfolk på området. Vanligvis omfatter metoden blanding av den tokol-inneholdende oljefase med et overflateaktivt middel så som en PBS/TWEEN80™-løsning, fulgt av

homogenisering med anvendelse av en homogenisator. Det vil være klart for en fagperson på området at en metode som omfatter at blandingen to ganger ledes gjennom en sprøytenål, vil være egnet for homogenisering av små volumer væske. Likeledes kan emulgeringsprosessen i mikrofluidiseringsapparat (M110S
5 Mikrofluidics-maskin, maksimum 50 omganger, i en periode på 2 minutter ved maksimal trykktilføring på 0,6 MPa (utgangstrykk på ca. 85 MPa)) tilpasses av fagfolk på området for frembringelse av mindre eller større volumer av emulsjon. Tilpasningen kunne oppnås ved rutinemessig eksperimentering omfattende måling av den resulterende emulsjon til et preparat ble oppnådd med olje-smådråper med
10 den nødvendige diameter.

I en olje-i-vann-emulsjon bør oljen og emulgeringsmidlet være i en vandig bærer. Den vandige bærer kan for eksempel være fosfatbufret saltløsning.

Størrelsen av olje-smådråpene som finnes i den stabile olje-i-vann-emulsjonen, har fortrinnsvis en diameter på mindre enn 1 mikrometer, eventuelt i
15 området hovedsakelig 30-600 nm, fortrinnsvis hovedsakelig rundt 30-500 nm, og mest foretrukket hovedsakelig 150-500 nm, og spesielt ca. 150 nm, målt ved foton-korrelasjonsspektroskopi. I denne henseende bør 80% av olje-smådråpene i antall være innenfor de foretrukne områder; mer foretrukket er mer enn 90%, og mest foretrukket mer enn 95% av olje-smådråpene i antall innenfor de definerte
20 størrelsesområder. Mengdene av komponentene som finnes i olje-emulsjonene ifølge foreliggende oppfinnelse, er konvensjonelt i området 0,5-20% eller 2-10% olje (av det totale dosevolum), så som squalen; og når til stede, fra 2 til 10% alfa-tokoferol; og fra 0,3 til 3% overflateaktivt middel, så som polyoksyetylen-sorbitan-monooleat. Fortrinnsvis er forholdet olje (fortrinnsvis squalen) : tokol (fortrinnsvis
25 α -tokoferol) likt eller mindre enn 1, siden dette gir en mer stabil emulsjon. Et emulgeringsmiddel, så som Tween 80 eller Span 85, kan også være til stede i et nivå på ca. 1%. I noen tilfeller kan det være fordelaktig at vaksinene ifølge foreliggende oppfinnelse videre vil inneholde en stabilisator.

Eksempler på foretrukne emulsjonssystemer er beskrevet i WO 95/17210,
30 WO 99/11241 og WO 99/12565, som beskriver emulsjonsadjuvantia basert på squalen, α -tokoferol og TWEEN 80, eventuelt formulert med de immunstimulerende midler QS21 og/eller 3D-MPL. Således kan, ved en spesielt foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, adjuvansen ifølge oppfinnelsen i tillegg

omfatte ytterligere immunstimulerende midler, så som LPS eller derivater derav, og/eller saponiner. Eksempler på ytterligere immunstimulerende midler er beskrevet her og i "Vaccine Design – The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, volum 6, red. Powell, M.F. og Newman, M.J.,
5 Plenum Press, New York og London, ISBN 0-306-44867-X.

Ved et foretrukket aspekt omfatter adjuvansen og immunogenpreparatene ifølge oppfinnelsen et saponin (fortrinnsvis QS21) og/eller et LPS-derivat (fortrinnsvis 3D-MPL) i en olje-emulsjon beskrevet ovenfor, eventuelt med en sterol (fortrinnsvis kolesterol). I tillegg kan olje-emulsjonen (fortrinnsvis olje-i-
10 vann-emulsjon) inneholde span 85 og/eller lecitin og/eller tricaprylin. Adjuvantia omfattende en olje-i-vann-emulsjon, en sterol og et saponin er beskrevet i WO 99/12565.

For administrering til mennesker vil saponinet (fortrinnsvis QS21) og/eller LPS-derivatet (fortrinnsvis 3D-MPL) typisk være til stede i en human dose av
15 immunogenpreparatet i området 1µg – 200µg, så som 10-100µg, fortrinnsvis 10µg - 50µg pr. dose. Olje-emulsjonen (fortrinnsvis olje-i-vann-emulsjonen) vil typisk omfatte fra 2 til 10% metaboliserbar olje. Fortrinnsvis vil den omfatte fra 2 til 10% squalen, fra 2 til 10% alfa-tokoferol og fra 0,3 til 3% (fortrinnsvis 0,4 – 2%) emulgeringsmiddel (fortrinnsvis tween 80 [polyoksyetylen-sorbitanmonooleat]).
20 Hvor både squalen og alfa-tokoferol er til stede, er forholdet squalen : alfa-tokoferol fortrinnsvis likt eller lavere enn 1, siden dette gir en mer stabil emulsjon. Span 85 (Sorbitantriroleat) kan også være til stede i et nivå på 0,5 til 1% i emulsjonene som anvendes ved oppfinnelsen. I noen tilfeller kan det være fordelaktig at immunogenpreparatene og vaksinene ifølge foreliggende
25 oppfinnelse videre vil inneholde en stabilisator, for eksempel andre emulgeringsmidler/overflateaktive midler, innbefattende kaprylsyre (Merck Index 10. utgave, oppslagsord nr. 1739), hvorav Tricaprylin er spesielt foretrukket.

Hvor squalen og et saponin (fortrinnsvis QS21) er innbefattet, er det fordelaktig også å innlemme en sterol (fortrinnsvis kolesterol) i formuleringen,
30 siden dette muliggjør en reduksjon i det totale nivå av olje i emulsjonen. Dette fører til reduserte fremstillingsomkostninger, forbedring av den totale bekvemmelighet ved vaksinasjonen, og også kvalitative og kvantitative forbedringer av de resulterende immunresponser, så som forbedret IFN-γ-

produksjon. Følgelig omfatter adjuvantssystemet ifølge foreliggende oppfinnelse typisk et forhold mellom metaboliserbar olje og saponin (på vektbasis) i området 200:1 til 300:1; foreliggende oppfinnelse kan også anvendes i en "lav-olje"-form hvis foretrukne område er 1:1 til 200:1, fortrinnsvis 20:1 til 100:1 og mest foretrukket hovedsakelig 48:1; denne vaksinen bibeholder de fordelaktige adjuvansegenskaper hos alle komponentene, med en meget redusert reaktogenitetsprofil. Følgelig har de spesielt foretrukne utførelsesformer et forhold mellom squalen og QS21 (på vektbasis) i området 1:1 til 250:1; et foretrukket område er 20:1 til 200:1, fortrinnsvis 20:1 til 100:1, og mest foretrukket hovedsakelig 48:1. En sterol (mest foretrukket kolesterol) er fortrinnsvis også innbefattet til stede i et forhold mellom saponin og sterol som beskrevet her.

Emulsjonssystemene ifølge foreliggende oppfinnelse har fortrinnsvis en liten oljedråpestørrelse i submikrometer-området. Mest foretrukket vil oljedråpestørrelsene ha en diameter i området 120 til 750 nm, og mest foretrukket fra 120 til 600 nm.

En spesielt kraftig adjuvansformulering (for endelig kombinasjon med AlPO₄ i immunogenpreparatene ifølge oppfinnelsen) innbefatter et saponin (fortrinnsvis QS21), et LPS-derivat (fortrinnsvis 3D-MPL) og en oljeemulsjon (fortrinnsvis squalen og alfa-tokoferol i en olje-i-vann-emulsjon) som beskrevet i WO 95/17210 eller i WO 99/12565 (spesielt adjuvansformulering 11 i eksempel 2, tabell 1).

Eksempler på en TLR 2-agonist innbefatter peptidoglykan eller lipoprotein. Imidazokinoliner, så som Imiquimod og Resiquimod, er kjente TLR7-agonister. Enkelttrådet RNA er også en kjent TLR-agonist (TLR8 hos mennesker og TLR7 hos mus), mens dobbelttrådet RNA og poly-IC (polyinosin-polycytidylsyre - et kommersielt syntetisk mimetikum for virus-RNA) er eksempler på TLR 3-agonister. 3D-MPL er et eksempel på en TLR4-agonist, mens CPG er et eksempel på en TLR9-agonist.

Immunogenpreparatet kan omfatte et antigen og et immunstimulerende middel adsorbert på et metallsalt. Aluminiumbaserte vaksineformuleringer hvor antigenet og det immunstimulerende middel 3-de-O-acylert monofosforyl-lipid A (3D-MPL) er adsorbert på samme partikkel, er beskrevet i EP 0 576 478 B1, EP 0 689 454 B1 og EP 0 633 784 B1. I disse tilfeller blir antigen først adsorbert på

aluminiumsaltet, fulgt av adsorpsjon av det immunstimulerende middel 3D-MPL på de samme aluminiumsaltpartikler. Slike prosesser innbefatter først oppslemming av 3D-MPL ved ultralydbehandling i et vannbad inntil partiklene når en størrelse på mellom 80 og 500 nm. Antigenet blir typisk adsorbert på aluminiumsalt i én
5 time ved romtemperatur under agitering. 3D-MPL-suspensjonen blir deretter tilsatt til det adsorbte antigen, og formuleringen blir inkubert ved romtemperatur i 1 time og deretter holdt ved 4°C inntil anvendelse.

Ved en annen prosess er det immunstimulerende middel og antigenet på separate metallpartikler, som beskrevet i EP 1126876. Den forbedret prosess
10 omfatter adsorpsjon av immunstimulerende middel på en metallsaltpartikkel, fulgt av adsorpsjon av antigenet på en annen metallsaltpartikkel, fulgt av blanding av de adskilte metallpartikler under dannelse av en vaksine. Adjuvansen for anvendelse ved foreliggende oppfinnelse kan være et adjuvanspreparat omfattende et immunstimulerende middel, adsorbert på en metallsaltpartikkel,
15 kjennetegnet ved at metallsaltpartikkelen er hovedsakelig fri for annet antigen. Videre er det tilveiebrakt vaksiner ved foreliggende oppfinnelse som er kjennetegnet ved at det immunstimulerende middel er adsorbert på partikler av metallsalt som er hovedsakelig fri for annet antigen, og ved at partiklene av metallsalt som er adsorbert til antigenet, er hovedsakelig fri for annet
20 immunstimulerende middel.

Følgelig tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en adjuvansformulering omfattende immunstimulerende middel som er adsorbert på en partikkel av et metallsalt, kjennetegnet ved at preparatet er hovedsakelig fritt for annet antigen. Videre kan denne adjuvansformulering være et mellomprodukt som, hvis en slik
25 adjuvans anvendes, er nødvendig for fremstilling av en vaksine. Følgelig er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for fremstilling av en vaksine, som omfatter blanding av et adjuvanspreparat som er ett eller flere immunstimulerende midler adsorbert på en metallpartikkel med et antigen. Fortrinnsvis er antigenet for-adsorbert på et metallsalt. Metallsaltet kan være identisk med eller likne
30 metallsaltet som er adsorbert på det immunstimulerende middel. Metallsaltet er fortrinnsvis et aluminiumsalt, for eksempel aluminiumfosfat eller aluminiumhydroksid.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre et vaksinepreparat omfattende immunstimulerende middel adsorbert på en første partikkel av et metallsalt, og antigen adsorbert på et metallsalt, kjennetegnet ved at den første og andre partikkel av metallsalt er separate partikler.

5 LPS- eller LOS-derivater eller mutasjoner eller lipid A-derivater beskrevet her er utformet for å være mindre toksiske (f.eks. 3D-MPL) enn native lipopolysakkarider, og er innbyrdes ombyttbare ekvivalenter med hensyn til hvilke som helst anvendelser av disse grupper beskrevet her. De kan være TLR4-ligander som beskrevet ovenfor. Andre slike derivater er beskrevet i
10 WO020786737, WO9850399, WO0134617, WO0212258, WO03065806.

Ved én utførelsesform omfatter adjuvansen som anvendes for preparatene ifølge oppfinnelsen, en liposombærer (laget ved kjente teknikker ut fra et fosfolipid (så som dioleoylfosfatidylkolin [DOPC]) og eventuelt en sterol [så som kolesterol]). Slike liposombærere kan bære lipid A-derivater [så som 3D-MPL – se ovenfor]
15 og/eller saponinene (så som QS21 – se ovenfor). Ved én utførelsesform omfatter adjuvansen (pr. 0,5 ml dose) 0,1-10 mg, 0,2-7, 0,3-5, 0,4-2 eller 0,5-1 mg (f.eks. 0,4-0,6, 0,9-1,1, 0,5 eller 1 mg) fosfolipid (for eksempel DOPC), 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3 eller 0,125-0,25 mg (f.eks. 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 eller 0,125 mg), sterol (for eksempel kolesterol), 5-60, 10-50 eller 20-30 µg (f.eks. 5-15,
20 40-50, 10, 20, 30, 40 eller 50 µg) lipid A-derivat (for eksempel 3D-MPL) og 5-60, 10-50 eller 20-30 µg (f.eks. 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 eller 50 µg) saponin (for eksempel QS21).

Denne adjuvans er spesielt egnet for vaksineformuleringer for eldre. Ved én utførelsesform omfatter vaksinepreparatet omfattende denne adjuvans sakkarid-
25 konjugater avledet fra minst alle de følgende serotyper: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (og kan også omfatte én eller flere fra serotypene 3, 6A, 19A og 22F), hvor GMC-antistofftitrene fremkalt mot én eller flere (eller alle) vaksinekomponentene 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F og 23F ikke er signifikant lavere enn dem som fremkalles av Prevnar®-vaksinen hos vaksinerte mennesker.

30 Ved én utførelsesform omfatter adjuvansen som anvendes for preparatene ifølge oppfinnelsen, en olje-i-vann-emulsjon fremstilt ut fra en metaboliserbar olje (så som squalen), et emulgeringsmiddel (så som Tween 80) og eventuelt en tokol (så som alfa-tokoferol). Ved én utførelsesform omfatter adjuvansen (pr. 0,5 ml

dose) 0,5-15, 1-13, 2-11, 4-8 eller 5-6 mg (f.eks. 2-3, 5-6 eller 10-11 mg) metaboliserbar olje (så som squalen), 0,1-10, 0,3-8, 0,6-6, 0,9-5, 1-4 eller 2-3 mg (f.eks. 0,9-1,1, 2-3 eller 4-5 mg) emulgeringsmiddel (så som Tween 80) og eventuelt 0,5-20, 1-15, 2-12, 4-10, 5-7 mg (f.eks. 11-13, 5-6 eller 2-3 mg) tokol (så
5 som alfa-tokoferol).

Denne adjuvans kan eventuelt videre omfatte 5-60, 10-50 eller 20-30 µg (f.eks. 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 eller 50 µg) lipid A-derivat (for eksempel 3D-MPL).

Disse adjuvantia er spesielt egnet for vaksineformuleringer for småbarn
10 eller eldre. Ved én utførelsesform omfatter vaksinepreparatet omfattende denne adjuvans sakkaridkonjugater avledet fra minst alle følgende serotyper: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (og kan også omfatte én eller flere fra serotypene 3, 6A, 19A og 22F), hvor GMC-antistofftitret fremkalt mot én eller flere (eller alle) vaksinekomponentene 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F og 23F ikke er signifikant lavere
15 enn dem som fremkalles ved Prevnar®-vaksinen hos vaksinerte mennesker.

Denne adjuvans kan eventuelt inneholde 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3 eller 0,125-0,25 mg (f.eks. 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 eller 0,125 mg) sterol (for eksempel kolesterol), 5-60, 10-50 eller 20-30 µg (f.eks. 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 eller 50 µg) lipid A-derivat (for eksempel 3D-MPL), og 5-60, 10-50 eller 20-
20 30 µg (f.eks. 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 eller 50 µg) saponin (for eksempel QS21).

Denne adjuvans er spesielt egnet for vaksineformuleringer for eldre. Ved én utførelsesform omfatter vaksinepreparatet omfattende denne adjuvans sakkaridkonjugater avledet fra minst alle de følgende serotyper: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (og kan også omfatte én eller flere fra serotypene 3, 6A, 19A og
25 22F), hvor GMC-antistofftitrene fremkalt overfor én eller flere av (eller alle) vaksine-komponentene 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F og 23F ikke er signifikant lavere enn dem som fremkalles ved Prevnar®-vaksinen hos vaksinerte mennesker.

Ved én utførelsesform omfatter adjuvansen som anvendes for preparatene ifølge oppfinnelsen, aluminiumfosfat og et lipid A-derivat (så som 3D-MPL). Denne
30 adjuvans kan omfatte (pr. 0,5 ml dose) 100-750, 200-500 eller 300-400 µg Al som aluminiumfosfat, og 5-60, 10-50 eller 20-30 µg (f.eks. 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 eller 50 µg) lipid A-derivat (for eksempel 3D-MPL).

Denne adjuvans er spesielt egnet for vaksineformuleringer for eldre eller småbarn. Ved én utførelsesform omfatter vaksinepreparatet omfattende denne adjuvans sakkaridkonjugater avledet fra minst alle følgende serotyper: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (og kan også omfatte én eller flere fra serotyper 3, 6A, 19A og 22F), hvor GMC-antistofftitrene fremkalt mot én eller flere (eller alle) vaksinekomponentene 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F og 23F ikke i noen betydelig grad er lavere enn dem som fremkalles av Prevnar®-vaksinen hos vaksinerte mennesker.

Vaksinepreparatene inneholdende immunogenpreparater ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes til å beskytte eller behandle et pattedyr som er mottakelig for infeksjon, ved hjelp av administrering av vaksinen systemisk eller mukosalt. Disse administreringer kan innbefatte intramuskulær, intra-peritoneal, intradermal eller subkutan injeksjon; eller mukosal administrering til oral-/fordøyelses-, respiratorisk eller genitourinarsystemene. Intranasal administrering av vaksiner for behandling av lungebetennelse eller mellomørebetennelse er foretrukket (siden nasofaryngeal transport av pneumokokker mer effektivt kan forhindres, hvorved infeksjon i det tidligste stadium svekkes). Selv om vaksinen ifølge oppfinnelsen kan administreres som en enkelt dose, kan komponenter av denne også administreres sammen samtidig eller på forskjellige tidspunkter (for eksempel kan pneumokokk-sakkarid-konjugater administreres separat, samtidig eller 1-2 uker etter administrering av den eventuelle bakterielle proteinkomponent av vaksinen for optimal koordinering av immunresponsene med hensyn til hverandre). For sam-administrering kan den eventuelle Th1-adjuvans være til stede i noen av, eller alle, de forskjellige administreringer. I tillegg til en enkelt administreringsvei, kan det anvendes 2 forskjellige administreringsmetoder. For eksempel kan sakkarider eller sakkaridkonjugater administreres IM (eller ID), og bakterieproteiner kan administreres IN (eller ID). I tillegg kan vaksinene ifølge oppfinnelsen administreres IM for primingdoser og IN for forsterkningsdoser.

Innholdet av proteinantigener i vaksinen vil typisk være i området 1-100µg, fortrinnsvis 5-50 µg, mest typisk i området 5-25 µg. Etter en innledende vaksinasjon kan individene motta én eller flere forsterkningsimmuniseringer med tilstrekkelig avstand mellom.

Vaksinefremstilling er generelt beskrevet i Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (red. Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). Innkapsling i liposomer er beskrevet av Fullerton, US-patent 4 235 877.

5 Vaksinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan lagres i løsning eller lyofiliseres. Fortrinnsvis blir løsningen lyofilisert i nærvær av en sukkerart så som sakkarose eller laktose. Det er enda ytterligere foretrukket at de blir lyofilisert og på improvisert måte rekondisjonert før anvendelse. Lyofilisering kan resultere i et mer stabilt preparat (vaksine) og kan muligens føre til høyere antistofftitre i
10 nærvær av 3D-MPL og i fravær av en aluminiumbasert adjuvans.

 Ved ett aspekt ved oppfinnelsen er det tilveiebrakt et vaksinesett, omfattende et medisinglass inneholdende et immunogenpreparat ifølge oppfinnelsen, eventuelt i lyofilisert form, og videre omfattende et medisinglass inneholdende en adjuvans som beskrevet her i dokumentet. Det er forutsett at
15 ved dette aspekt ved oppfinnelsen vil adjuvansen bli anvendt til rekondisjonering av det lyofiliserte immunogenpreparat.

 Selv om vaksinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres på hvilken som helst måte, utgjør administrering av de beskrevne vaksiner i huden (ID) én utførelsesform av oppfinnelsen. Human hud omfatter et ytre "horn"-lag, betegnet stratum corneum, som dekker epidermis. Under denne epidermis er et
20 lag betegnet dermis, som i sin tur dekker det subkutane vev. Forskere har vist at injeksjon av en vaksine i huden, og spesielt dermis, stimulerer en immunrespons, som også kan være forbundet med en rekke ytterligere fordeler. Intradermal vaksinasjon med vaksinene beskrevet her i dokumentet utgjør et foretrukket trekk
25 ved foreliggende oppfinnelse.

 Den konvensjonelle teknikk med intradermal injeksjon, "mantoux-prosedyren", omfatter trinn for rengjøring av huden og deretter strekking med én hånd, og med skråkanten av en smal nål (nr. 26-31) vendt oppover, innføres nålen i en vinkel på 10-15°. Straks nålens skråkant er innført, senkes nålsylindren og
30 føres lenger inn mens det påføres et lett trykk for å løfte den under huden. Væsken blir deretter injisert meget langsomt, hvorved det dannes en blære eller kul på hudoverflaten, fulgt av langsom uttrekking av nålen.

I den senere tid er det beskrevet anordninger som er spesifikt utformet for administrering av flytende midler inn i eller gjennom huden, for eksempel anordningene beskrevet i WO 99/34850 og EP 1092444, også injektor-anordningene beskrevet for eksempel i WO 01/13977; US 5 480 381, US

5 5 599 302, US 5 334 144, US 5 993 412, US 5 649 912, US 5 569 189, US 5 704 911, US 5 383 851, US 5 893 397, US 5 466 220, US 5 339 163, US 5 312 335, US 5 503 627, US 5 064 413, US 5 520 639, US 4 596 556, US 4 790 824, US 4 941 880, US 4 940 460, WO 97/37705 og WO 97/13537.

Alternative metoder for intradermal administrering av vaksinepreparatene kan innbefatte konvensjonelle sprøyter og nåler, eller anordninger utformet for

10 ballistisk avgivelse av faste vaksiner (WO 99/27961), eller transdermale plastre (WO 97/48440; WO 98/28037); eller påført på overflaten av huden (transdermal eller transkutan avgivelse WO 98/20734 ; WO 98/28037).

Når vaksinene ifølge foreliggende oppfinnelse skal administreres til huden,

15 eller mer spesifikt i dermis, er vaksinen i et lite væskevolum, spesielt et volum på mellom ca. 0,05 ml og 0,2 ml.

Innholdet av antigener i hud- eller intradermal-vaksinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan likne konvensjonelle doser som finnes i intramuskulære vaksiner (se ovenfor). Det er imidlertid et trekk ved hud- eller intradermalvaksiner at

20 formuleringene kan være "lavdose-formuleringer". Følgelig er proteinantigenene i "lav dose"-vaksiner fortrinnsvis til stede i så lite som 0,1 til 10 µg, fortrinnsvis 0,1 til 5 µg pr. dose; og sakkarid- (fortrinnsvis konjugerte) antigenene kan være til stede i området 0,01-1 µg, og fortrinnsvis mellom 0,01 og 0,5 µg sakkarid pr. dose.

Slik betegnelsen "intradermal avgivelse" er anvendt her i dokumentet, angir

25 den avgivelse av vaksinen til dermisregionen i huden. Imidlertid vil vaksinen ikke nødvendigvis være lokalisert utelukkende i dermis. Dermis er det laget i huden som er lokalisert mellom ca. 1,0 og ca. 2,0 mm fra overflaten i menneskehuden, men det er en visse mengde variasjon mellom individer og i forskjellige deler av kroppen. Generelt kan man forvente å nå dermis ved at man går 1,5 mm under

30 hudoverflaten. Dermis er lokalisert mellom stratum corneum og epidermis på overflaten og det subkutane lag under. Avhengig av avgivelsesmåten kan vaksinen til slutt befinne seg utelukkende eller primært i dermis, eller den kan til slutt være fordelt i epidermis og dermis.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en forbedret vaksine for forebygging eller forbedring av mellomørebetennelse forårsaket av *Haemophilus influenzae* ved tilsetning av *Haemophilus influenzae*-proteiner, for eksempel protein D i fri eller konjugert form. I tillegg tilveiebringer foreliggende oppfinnelse

5 videre en forbedret vaksine for forebygging eller forbedring av pneumokokk-infeksjon hos barn (f.eks. mellomørebetennelse), ved at den baseres på tilsetning av ett eller to pneumokokkproteiner som fritt eller konjugert protein til *S. pneumoniae*-konjugat-preparater ifølge oppfinnelsen. De pneumokokkfrie proteiner kan være de samme som, eller forskjellige fra, hvilke som helst *S. pneumoniae*-proteiner som anvendes som bærerproteiner. Ett eller flere

10 *Moraxella catarrhalis*-proteinantigener kan også være innbefattet i kombinasjons-vaksinen i fri eller konjugert form. Således er foreliggende oppfinnelse en forbedret metode til å fremkalle en (beskyttende) immunrespons overfor mellomørebetennelse hos barn.

15 Ved en annen utførelsesform er foreliggende oppfinnelse en forbedret metode til å fremkalle en (beskyttende) immunrespons hos barn (definert som 0-2 år gamle i forbindelse med foreliggende oppfinnelse) ved administrering av en sikker og effektiv mengde av vaksinen ifølge oppfinnelsen [en pediatrik vaksine]. Ytterligere utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse innbefatter tilveiebringelse

20 av antigene *S. pneumoniae*-konjugat-preparater ifølge oppfinnelsen for anvendelse i medisinen, og anvendelse av *S. pneumoniae*-konjugatene ifølge oppfinnelsen ved fremstilling av et medikament for forebygging (eller behandling) av pneumokokksykdom.

Ved enda en annen utførelsesform er foreliggende oppfinnelse en forbedret

25 metode til fremkalling av en (beskyttende) immunrespons hos den eldre populasjon (i forbindelse med foreliggende oppfinnelse anses en pasient som eldre hvis han/hun er i en alder av 50 år eller mer, typisk over 55 år, og mer generelt over 60 år) ved administrering av en sikker og effektiv mengde av vaksinen ifølge oppfinnelsen, fortrinnsvis sammen med ett eller to *S. pneumoniae*-proteiner som finnes som fritt eller konjugert protein, hvilke frie *S. pneumoniae*-proteiner kan være de samme som, eller forskjellige fra, hvilke som helst *S. pneumoniae*-proteiner som anvendes som bærerproteiner.

30

Et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen er en metode for immunisering av en human vert mot sykdom forårsaket av *S. pneumoniae*- og eventuelt *Haemophilus influenzae*-infeksjon, omfattende administrering til verten av en immunbeskyttende dose av immunogenpreparatet eller vaksinen eller utstyrssettet ifølge

5 oppfinnelsen.

Et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen er et immunogenpreparat ifølge oppfinnelsen for anvendelse ved behandling eller forebygging av sykdom forårsaket av *S.pneumoniae*- og eventuelt *Haemophilus influenzae*-infeksjon.

Et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen er anvendelse av immunogen-
10 preparatet eller vaksinen eller utstyrssettet ifølge oppfinnelsen ved fremstilling av et medikament for behandling eller forebygging av sykdommer forårsaket av *S. pneumoniae*- og eventuelt *Haemophilus influenzae*-infeksjon.

Betegnelsene “omfattende”, “omfatte” og “omfatter” her i dokumentet er av oppfinnerne tilsiktet eventuelt å kunne erstattes med henholdsvis betegnelse
15 “bestående av”, “bestå av” og “består av”, i hver tilfelle.

Utførelsesformer her i dokumentet i forbindelse med “vaksinepreparater” ifølge oppfinnelsen er også anvendbare for utførelsesformer som gjelder “immunogenpreparater” ifølge oppfinnelsen, og vice versa.

Alle referanser eller patentsøknader angitt i denne patentspesifikasjon er
20 medtatt her som referanse.

For at foreliggende oppfinnelse bedre skal kunne forstås, er følgende eksempler angitt. Disse eksempler er kun for illustrasjonsformål og må ikke oppfattes som begrensende for omfanget av oppfinnelsen på noen som helst måte.

25 Eksempler

Eksempel 1: EKSPRESJON AV PROTEIN D

Haemophilus influenzae-protein D

Genetisk konstruksjon for protein D-ekspresjon

30 **Utgangsmaterialer**

Det protein D-kodende DNA

Protein D er høyt konserververt blant *H. influenzae* av alle serotyper og ikke-typebestembare stammer. Vektoren pHIC348 inneholdende DNA-sekvensen som

koder for hele protein D-genet, er levert av Dr. A. Forsgren, Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi, Universitetet i Lund, Malmö General Hospital, Malmö, Sverige. DNA-sekvensen for protein D er publisert av Janson et al. (1991) Infect. Immun. 59: 119-125.

5

Ekspresjonsvektoren pMG1

Ekspresjonsvektoren pMG1 er et derivat av pBR322 (Gross et al., 1985) hvor bakteriofag λ -avledede kontrollelementer for transkripsjon og translasjon av fremmede innsatte gener ble innført (Shatzman et al., 1983). I tillegg ble
10 ampicillinresistensgenet skiftet ut med kanamycinresistensgenet.

E. coli-stammen AR58

E. coli-stammen AR58 ble frembrakt ved transduksjon av N99 med et P1 fag-forrådsmateriale på forhånd dyrket på et SA500-derivat (galE::TN10,
15 lambdaKil⁻ cl857 Δ H1). N99 og SA500 er E. coli K12-stammer avledet fra Dr. Martin Rosenberg's laboratorium ved National Institute of Health.

Ekspresjonsvektoren pMG 1

For fremstilling av protein D er DNA som koder for proteinet, klonet inn i
20 ekspresjonsvektoren pMG 1. Dette plasmid anvender signaler fra lambdafag-DNA for styring av transkripsjonen og translasjonen av innsatte fremmede gener. Vektoren inneholder promoteren PL, operatoren OL og to utnyttelsesseter (NutL og NutR) for å mildne transkripsjonspolaritetseffekter når N-protein er tilveiebrakt (Gross et al., 1985). Vektorer inneholdende PL-promoteren innføres i en E. coli
25 lysogen vert for stabilisering av plasmid-DNA. Lysogene vertsstammer inneholder replikasjonsdefekt lambdafag-DNA integrert i genomet (Shatzman et al., 1983). Det kromosomale lambdafag-DNA styrer syntesen av cl-repressorproteinet som bindes til OL-repressoren hos vektoren og forhindrer binding av RNA-polymerase til PL-promoteren og derved transkripsjon av det innsatte gen. cl-genet for
30 ekspresjonsstammen AR58 inneholder en temperatursensitiv mutant slik at PL-styrt transkripsjon kan reguleres ved temperaturskift, dvs. at en økning i dyrknings-temperatur inaktiverer repressoren, og syntese av det fremmede proteinet blir initiert. Dette ekspresjonssystem muliggjør kontrollert syntese av fremmede

proteiner, spesielt av dem som kan være toksiske for cellen (Shimatoka & Rosenberg, 1981).

E. coli-stammen AR58

5 Den AR58-lysogene E. coli-stamme som anvendes for fremstilling av protein D-bæreren, er et derivat av standard-NIH E. coli K12-stammen N99 (F^- su $^-$ galK2, lacZ $^-$ thr $^-$). Den inneholder en defekt lysogen lambdafag (galE::TN10, lambdaKil $^-$ cl857 Δ H1). Kil-fenotypen forhindrer avstenging av makromolekylær syntese hos verten. cl857-mutasjonen tilfører en temperaturfølsom lesjon til cl-

10 repressoren. Δ H1-delesjonen fjerner det høyre lambdafag-operon og vertens bio-, uvr3- og chlA-loci. AR58-stammen ble frembrakt ved transduksjon av N99 med et P1 fag-forrådsmateriale på forhånd dyrket på et SA500-derivat (galE::TN10, lambdaKil $^-$ cl857 Δ H1). Innføring av det defekte lysogen i N99 ble utvalgt med tetracyklin i kraft av tilstedeværelsen av et TN10-transposon som koder for

15 tetracyklinresistens i det nabostilte galE-gen.

Konstruksjon av vektor pMGMDPPrD

pMG 1-Vektoren som inneholder genet som koder for det ikke-strukturelle S1-protein i influensavirus (pMGNSI), ble anvendt til å konstruere pMGMDPPrD.

20 Protein D-genet ble amplifisert ved PCR fra pHIC348-vektoren (Janson et al. 1991 Infect. Immun. 59:119-125) med PCR-primere inneholdende NcoI- og XbaI-restriksjonssteder i henholdsvis 5'- og 3'-endene. NcoI/XbaI-fragmentet ble deretter innført i pMGNS1 mellom NcoI og XbaI under frembringelse av et fusjonsprotein inneholdende de N-terminale 81 aminosyrer av NS1-proteinet, fulgt av PD-

25 proteinet. Denne vektor ble merket pMGNS1PrD.

Basert på konstruksjonen beskrevet ovenfor ble den endelige konstruksjon for protein D-ekspresjon frembrakt. Et BamHI/BamHI-fragment ble fjernet fra pMGNS1PrD. Denne DNA-hydrolyse fjerner den NS1-kodende region, bortsett fra når det gjaldt de første tre N-terminale rester. Ved re-ligering av vektoren er et gen

30 som koder for et fusjonsprotein med følgende N-terminale aminosyresekvens, blitt frembrakt:

-----MDP SSHSSNMANT-----

NS1

Protein D

Protein D inneholder ikke et lederpeptid eller det N-terminale cystein til hvilket lipidkjeder normalt tilknyttes. Proteinet blir derfor verken utskilt i periplasma
5 eller lipidert, og forblir i cytoplasmaet i en oppløselig form.

Sluttkonstruksjonen pMG-MDPPrD ble innført i AR58-vertsstammen ved varmesjokk ved 37°C. Plasmidinnholdende bakterier ble utvalgt i nærvær av kanamycin. Tilstedeværelse av den protein D-kodende DNA-insersjon ble påvist ved digereringsav isolert plasmid-DNA med valgte endonukleaser. Den
10 rekombinante E. coli-stamme er referert til som ECD4.

Ekspresjon av protein D er under kontroll av lambda P_L-promoterens / O_L-operatoren. Vertsstammen AR58 inneholder et temperatursensitivt cl-gen i genomet som blokkerer ekspresjon fra lambda P_L ved lav temperatur ved binding til O_L. Straks temperaturen er forhøyet, frigjøres cl fra O_L, og protein D uttrykkes.
15

Småskalafremstilling

Ved slutten av fermenteringen blir cellene konsentrert og frosset.

Ekstrahering fra høstede celler og rensing av protein D ble utført som følger. Den frosne cellekultur-pellet tines og gjenoppslemmes i en
20 celleoppbrytningsløsning (citratbuffer pH 6,0) til en endelig OD₆₅₀ = 60. Suspensjonen ledes to ganger gjennom en høytrykkshomogenisator ved P = 100 MPa. Celledyrknings-homogenisatet klarnes ved sentrifugering, og cellebrokker fjernes ved filtrering. I det første rensetrinn påsettes det filtrerte lysat på en kationebytter-kromatografikolonne (SP Sepharose hurtigstrømning). PD bindes til
25 gelmatriken ved ionisk interaksjon og elueres ved en trinnvis økning av elueringsbufferens ionestyrke.

I et andre rensetrinn bibeholdes forurensninger på en anionebyttermatriks (Q Sepharose hurtigstrømning). PD bindes ikke på gelen, og kan oppsamles gjennom hele strømmen.

30 I begge kolonnekromatografitrinn overvåkes fraksjonsoppsamlingen ved OD. Gjennomstrømningen av den anioniske utvekslings-kolonnekromatografi inneholdende det rensede proteinet D blir konsentrert ved ultrafiltrering.

Det protein D-inneholdende ultrafiltreringsretentat blir til slutt ført gjennom en 0,2 µm membran.

Storskalafremstilling

5 Ekstraksjonen fra høstede celler og rensingen av protein D ble utført som følger. Det høstede medium avkjøles og ledes direkte to ganger gjennom en høytrykkshomogenisator ved et trykk på rundt 80 MPa.

I det første rensetrinn fortynnes cellekultur-homogenisatet og påsettes på en kationebytterkromatografi-kolonne (SP Sepharose store kuler). PD bindes til
10 gelmatriksen ved ionisk interaksjon og elueres ved trinnvis økning av ionestyrken av elueringsbufferen, og filtreres.

I et andre rensetrinn bibeholdes forurensninger på en anionebyttermatriks (Q Sepharose hurtigstrømning). PD bindes ikke på gelen og kan oppsamles i den gjennomstrømmende væske.

15 I begge kolonnekromatografitrinn overvåkes fraksjonsoppsamlingen ved OD. Gjennomstrømningen ved anionebytter-kolonnekromatografien inneholdende det rensede protein D blir konsentrert og diafiltrert ved ultrafiltrering.

Det protein D-inneholdende ultrafiltrerings-retentat blir til slutt ført gjennom en 0,2 µm membran.

20

Eksempel 1b: EKSPRESJON AV PhtD

PhtD-proteinet er et medlem av pneumokokk-histidin-triade- (Pht) proteinfamilien som er kjennetegnet ved tilstedeværelse av histidin-triader
25 (HXXHXXH-mønster). PhtD er et 838 aa-molekyl og bærer 5 histidintriader (se MedImmune WO00/37105 SEKV ID NR: 4 med hensyn til aminosyresekvens, og SEKV ID NR: 5 med hensyn til DNA-sekvens). PhtD inneholder også en prolin-rik region i midten (aminosyrestilling 348-380). PhtD har en 20 aa-N-terminal signalsekvens med et LXXC-mønster.

30 Genetisk konstruksjon

Gensekvensen for det fullstendige MedImmune PhtD-protein (fra aa 21 til aa 838) ble overført rekombinant til *E. coli* ved anvendelse av den interne pTCMP14-vektor som bærer pλ-promoteren. *E. coli*-vertsstammen er AR58, som

bærer den varmfølsomme cl857-repressor, idet det muliggjøres varme-induksjon av promoteren.

Polymerasekjedereaksjon ble utført for amplifisering av phtD-genet fra et MedImmune-plasmid (som bærer phtD-genet fra *Streptococcus pneumoniae*-stamme Norway 4 (serotype 4) – SEKV ID NR: 5 som beskrevet i WO 00/37105). Primere, spesifikke kun for phtD-genet, ble anvendt til amplifisering av phtD-genet i to fragmenter. Primere bærer enten NdeI- og KpnI- eller KpnI- og XbaI-restriksjonssetene. Disse primere hybridiserer ikke med noe nukleotid fra vektoren, men bare med phtD-spesifikke gensekvenser. Et kunstig ATG-startkodon ble innsatt ved anvendelse av den første primer som bærer NdeI-restriksjonssettet. De dannede PCR-produkter ble deretter innsatt i pGEM-T-kloningsvektoren (Promega), og DNA-sekvensen ble bekreftet. Subkloning av fragmentene i TCMP14-ekspresjonsvektoren ble deretter gjennomført ved anvendelse av standardteknikker, og vektoren ble transformert i AR58 *E. coli*.

15 PhtD-rensning

PhtD-rensning fås som følger:

- 20
□ Dyrkning av *E.coli*-celler i nærvær av kanamycin: dyrkning i 30 timer ved 30°C, deretter induksjon i 18 timer ved 39,5 °C
- 25
□ Oppbrytning av *E.coli*-cellene fra hele kulturen ved OD ±115 i nærvær av EDTA 5 mM og PMSF 2 mM som proteaseinhibitorer: Rennie, 2 gjennomkjøringer, 100 MPa.
- 30
□ Antigenoppfanging og cellebrokkfjerning på ekspandert sjikt-modus Streamline Q XL-kromatografi ved romtemperatur (20°C); kolonnen vaskes med NaCl 150 mM + Empigen 0,25% pH 6,5 og elueres med NaCl 400 mM + Empigen 0,25% i 25 mM kaliumfosfatbuffer pH 7,4.
- 35
□ Filtrering på Sartobran 150-patron (0,45 + 0,2 µm)
- Antigenbinding på Zn⁺⁺ Chelaterende Sepharose FF IMAC-kromatografi ved pH 7,4 i nærvær av 5 mM imidazol ved 4°C; kolonnen vaskes med Imidazol 5 mM og Empigen 1% og elueres med 50 mM imidazol, begge i 25 mM kaliumfosfatbuffer pH 8,0.
- Svak anionebytterkromatografi i positiv modus på Fractogel EMD DEAE ved pH 8,0 (25 mM kaliumfosfat) ved 4°C; kolonnen vaskes med 140 mM NaCl og elueres ved 200 mM NaCl, mens forurensninger (proteiner og DNA) forblir adsorbert på ionebytteren.

- 5

□ Konsentrering og ultrafiltrering med 2 mM Na/K-fosfat pH 7,15 på 50 kDa membran.

□ Sterilfiltrering av den rensede masse på en Millipak-20 0,2 µm filterpatron.

Eksempel 1c: EKSPRESJON AV PNEUMOLYSIN

Pneumokokk-pneumolysin ble fremstilt og detoksifisert som beskrevet i
 10 WO2004/081515 og WO2006/032499.

Eksempel 2:

Fremstilling av konjugater

Det er velkjent på området hvordan rensede pneumokokk-polysakkarider
 15 lages. For formålene ved disse eksempler ble polysakkaridene laget i det vesentlige som beskrevet i EP072513 eller ved nær beslektede metoder. Før konjugering kan polysakkaridene størrelsesreguleres ved mikrofluidisering som beskrevet nedenfor.

Aktiverings- og koblingsbetingelsene er spesifikke for hvert polysakkarid.
 20 Disse er oppført i tabell 1. Størrelsesregulert polysakkarid (bortsett fra når det gjelder PS5, 6B og 23F) ble oppløst i NaCl 2M, NaCl 0,2M eller i vann for injeksjon (WFI). Den optimale polysakkaridkonsentrasjon ble evaluert for alle serotypene. Alle serotyper bortsett fra serotype 18C ble konjugert direkte til bærerproteinet som beskrevet detaljert nedenfor. To alternative serotype 22F-konjugater ble
 25 laget; ett konjugert direkte, ett gjennom en ADH-linker.

Fra en 100 mg/ml stamløsning i acetonitril eller acetonitril/vann 50%/50% løsning ble CDAP (CDAP/PS-forhold 0,5-1,5 mg/mg PS) tilsatt til polysakkarid-løsningen. 1,5 minutt senere ble 0,2M-0,3M NaOH tilsatt under oppnåelse av den spesifikke aktiverings-pH. Aktivering av polysakkaridet ble utført ved denne pH i
 30 løpet av 3 minutter ved 25°C. Renset protein (protein D, PhtD, pneumolysin eller DT) (mengden avhenger av begynnelsesforholdet mellom PS og bærerprotein) ble tilsatt til det aktiverte polysakkarid, og koblingsreaksjonen ble utført ved den spesifikke pH i opp til 2 timer (avhengig av serotype) under pH-regulering. For å nøytralisere ikke-omsatte cyanatestergrupper ble det deretter tilsatt 2M glycin-
 35 løsning til blandingen. pH ble justert til nøytraliserings-pH (pH 9,0). Løsningen ble

omrørt i 30 minutter ved 25°C og deretter natten over ved 2-8°C med kontinuerlig langsom omrøring.

Fremstilling av 18C:

18C ble bundet til bærerproteinet via en linker – Adipinsyredihydrazid

5 (ADH)

Polysakkarid-serotype 18C ble mikrofluidisert før konjugering.

Derivatisering av tetanustoksoid med EDAC

For derivatisering av tetanustoksoidet ble rensset TT fortynnet til 25 mg/ml i 0,2M NaCl, og ADH-spaceren ble tilsatt for oppnåelse av en endelig konsentrasjon på 0,2 M. Når oppløsningen av spaceren var fullstendig, ble pH regulert til 6,2. 10 EDAC (1-etyl-3-(3-dimetyl-aminopropyl)karbodiimid) ble deretter tilsatt under oppnåelse av en endelig konsentrasjon på 0,02M, og blandingen ble omrørt i 1 time under pH-regulering. Kondensasjonsreaksjonen ble stanset ved øking av pH opp til 9,0 i minst 30 minutter ved 25°C.

15 Derivatisert TT ble deretter diafiltrert (10 kDa CO-membran) for fjerning av gjenværende ADH- og EDAC-reagens.

TT_{AH}-masse ble til slutt steriltfiltrert til koblingstrinnet og oppbevart ved -70°C.

Kjemisk kobling av TT_{AH} til PS 18C

Detaljer om konjugeringsparametrene kan finnes i tabell 1.

20 2 gram mikrofluidisert PS ble fortynnet til den definerte konsentrasjon i vann og justert til 2M NaCl ved NaCl-pulvertilsetning.

CDAP-løsning (100 mg/ml nyfremstilt i 50/50 (på volumbasis) acetonitril/WFI) ble tilsatt under oppnåelse av det passende CDAP/PS-forhold.

pH ble øket opp til aktiverings-pH 9,0 ved tilsetning av 0,3M NaOH og ble 25 stabilisert ved denne pH inntil tilsetning av TT_{AH}.

Etter 3 minutter ble derivatisert TT_{AH} (20 mg/ml i 0,2 M NaCl) tilsatt under oppnåelse av et forhold mellom TT_{AH} og PS på 2; pH ble regulert til koblings-pH 9,0. Løsningen fikk stå i én time under pH-regulering.

For nøytralisering ble en 2M glycinløsning tilsatt til blandingen PS/TT_{AH}/CDAP.

30 pH ble justert til nøytraliserings-pH (pH 9,0).

Løsningen ble omrørt i 30 min ved 25°C, og fikk deretter stå natten over ved 2-8°C med kontinuerlig langsom omrøring.

PS22F_{AH}-PhtD-konjugat

Ved en andre konjugeringsmetode for dette sakkarid (det første var den direkte PS22-PhtD-konjugeringsmetode vist i tabell 1) ble 22F bundet til bærerproteinet via en linker – Adipinsyre-dihydrazid (ADH). Polysakkarid-serotype 22F ble mikrofluidisert før konjugering.

PS 22F-derivatisering

Aktivering og kobling utføres ved 25°C under kontinuerlig omrøring i et temperaturregulert vannbad. Mikrofluidisert PS22F ble fortynnet under oppnåelse av en endelig PS-konsentrasjon på 6 mg/ml i 0,2M NaCl, og løsningen ble justert til pH 6,05 ± 0,2 med 0,1N HCl. CDAP-løsning (100 mg/ml nyfremstilt i acetonitril/WFI, 50/50) ble tilsatt under oppnåelse av det passende CDAP/PS-forhold (1,5/1 på vektbasis). pH ble øket opp til aktiverings-pH 9,00 ± 0,05 ved tilsetning av 0,5M NaOH, og ble stabilisert ved denne pH inntil tilsetning av ADH. Etter 3 minutter ble ADH tilsatt under oppnåelse av det passende ADH/PS-forhold (8,9/1 på vektbasis); pH ble regulert til koblings-pH 9,0. Løsningen fikk stå i 1 time under pH-regulering. PS_{AH}-derivatet ble konsentrert og diafiltrert.

Kobling

PhtD med 10 mg/ml i 0,2M NaCl ble tilsatt til PS22F_{AH}-derivatet for oppnåelse av et PhtD/PS22F_{AH}-forhold på 4/1 (på vektbasis). pH ble justert til 5,0 ± 0,05 med HCl. EDAC-løsningen (20 mg/ml i 0,1M Tris-HCl pH 7,5) ble tilsatt manuelt i 10 min (250 µl / min) under oppnåelse av 1 mg EDAC/mg PS22F_{AH}. Den resulterende løsningen ble inkubert i 150 min (skjønt 60 minutter også ble anvendt) ved 25°C under omrøring og pH-regulering. Løsningen ble nøytralisert ved tilsetning av 1M Tris-HCl pH 7,5 (1/10 av det endelige volum) og fikk stå i 30 min ved 25°C.

Før elueringen på Sephakryl S400HR ble konjugatet klaret ved anvendelse av et 5µm Minisart-filter.

Det resulterende konjugat har et endelig PhtD/PS-forhold på 4,1 (på vektbasis), et innhold av fritt PS på under 1% og en antigenisitet (α-PS/α-PS) på 36,3% og anti-PhtD-antigenisitet på 7,4%.

Rensning av konjugatene:

Konjugatene ble renset ved gelfiltrering ved anvendelse av en Sephacryl S400HR-gelfiltreringskolonne ekvilibrert med 0,15M NaCl (S500HR i 18°C) under fjerning av små molekyler (innbefattende DMAP) og ukonjugert PS og protein. Basert på de forskjellige molekylstørrelser av reaksjonskomponentene blir PS-PD-, PS-TT-, PS-PhtD-, PS-pneumolysin- eller PS-DT-konjugatene eluert først, fulgt av fritt PS, deretter av fritt PD eller fritt DT og til slutt DMAP og andre salter (NaCl, glycin). Fraksjoner inneholdende konjugatene blir detektert ved UV_{280 nm}. Fraksjonene samles i henhold til sin K_d, sterilfiltreres (0,22µm) og lagres ved +2-8°C. PS/Protein-forholdene i konjugatpreparatene ble bestemt.

Spesifikke aktiverings/koblings/nøytraliseringsbetingelser for PS S. pneumoniae-Protein D/TT/DT/PhtD/Ply-konjugater

Hvor “µfluid” fremkommer i en rekkeoverskrift, indikerer det at sakkaridet ble størrelsesregulert ved mikrofluidisering før konjugering. Størrelsene av sakkarider etter mikrofluidisering er angitt i tabell 2.

Tabell 1 Spesifikke aktiverings-/koblings-/nøytraliseringsbetingelser for PS S. pneumoniae-Protein D/TT/DT/PhtD/Ply-konjugater

Serotype	1 µfluid	4 µfluid	5	6A	6B	7F µfluid
PS-kons.(mg/ml)	2,5	2,5	7,1	5,0	5,0	5,0
PS-oppløsning	WFI	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD kons.(mg/ml)	10,0	10,0	5,0	5,0	5,0	10,0
Begynnelses-PD/PS-forhold (på vektbasis)	1,5/1	1,5/1	1/1	1/1	1,1/1	1,2/1
CDAP-kons. (mg/mg PS)	0,50	0,50	0,79	0,83	0,83	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0

Serotype	9V µfluid	14 µfluid	18C µfluid	19A µfluid	19F µfluid	22F µfluid	23F
PS-kons.(mg/ml)	5,0	5,0	4,5	15,0	9,0	6,0	2,38
PS-oppløsning	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 0,2M	NaCl 2M
Bærer-protein-kons.(mg/ml)	10,0	10,0	20,0 (TT)	10,0 (Ply)	20,0 (DT)	10,0 (PhtD)	5,0
Begynnelses-bærerprotein/PS-forhold (på vetkbasis)	1,2/1	1,2/1	2/1	2,5/1	1,5/1	3/1	1/1
CDAP-kons. (mg/mg PS)	0,50	0,75	0,75	1,5	1,5	1,5	0,79
pH_a=pH_c=pH_q	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0

Bemerk: pH_a,c,q svarer til pH for henholdsvis aktivering, kobling og nøytralisering

5 **Karakterisering:**

Hvert konjugat ble karakterisert og oppfylte spesifikasjonene beskrevet i tabell 2. Polysakkaridinnholdet (µg/ml) ble målt ved resorcinoltesten og proteininnholdet (µg/ml) ved Lowry-testen. Det endelige PS/PD-forhold (på vektbasis) bestemmes ved forholdet mellom konsentrasjonene.

10

Innhold av fritt polysakkarid (%):

Innholdet av fritt polysakkarid i konjugater holdt ved 4°C eller lagret 7 dager ved 37°C ble bestemt for supernatanten oppnådd etter inkubering med α-bærerprotein-antistoffer og mettet ammoniumsulfat, fulgt av sentrifugering.

15

En α-PS/α-PS-ELISA ble anvendt for kvantifisering av fritt polysakkarid i supernatanten. Fravær av konjugat ble også kontrollert ved en α-bærerprotein/α-PS-ELISA.

Antigenisitet:

Antigenisiteten for de samme konjugater ble analysert i en sandwich-ELISA-type hvor oppfangning og deteksjon av antistoffer var henholdsvis α -PS og α -Protein.

5

Innhold av fritt protein (%):

Ukonjugert bærerprotein kan separeres fra konjugatet under rensetrinnet. Innholdet av fritt gjenværende protein ble bestemt ved anvendelse av størrelseseksklusjonskromatografi (TSK 5000-PWXL) fulgt av UV-deteksjon (214 nm). Elueringsbetingelsene muliggjorde separering av det frie bærerprotein og konjugatet. Innhold av fritt protein i konjugatmassene ble deretter bestemt etter en kalibreringskurve (fra 0 til 50 $\mu\text{g/ml}$ av bærerprotein). Fritt bærerprotein i % ble oppnådd som følger: % fri bærer = (fri bærer ($\mu\text{g/ml}$) / (Total konsentrasjon av tilsvarende bærerprotein målt ved Lowry ($\mu\text{g/ml}$) * 100%).

10

15

Stabilitet:

Molekylvektfordeling (K_{av}) og stabilitet ble målt på en HPLC-SEC-gelfiltrering (TSK 5000-PWXL) for konjugater holdt ved 4°C og lagret i 7 dager ved 37°C.

20

Den 10/11/13/14-valente karakterisering er oppført i tabell 2 (se kommentar under denne).

Proteinkonjugatene kan adsorberes på aluminiumfosfat og samles under dannelse av den endelige vaksine.

25

Konklusjon:

Det er produsert immunogenkonjugater som siden er blitt vist å være komponenter i en lovende vaksine.

TABELL 2 – Konjugatenes karakteristika

Konjugater	PS-størrelse (Da x10 ³)	Bærer/PS-Forhold	Fritt PS (Elisa)	Fri Bærer	PS-antigenisitet (Elisa)	Konj.-Størrelse (kDa)
PS1-PD	349-382*	1,5-1,6	1,0%-1,2%	3,9%-4,8%	87%-95%	1499 - 1715
PS4-PD	93-100*	1,5-1,6	4,7-6,5%	3,2%-4,0%	90%-96%	1303 - 1606
PS5-PD***	367-443	0,80	8,7-11,2%	2,2%-3,8%	93%-108%	1998-2352
PS6A-PD	1100-1540	0,61	4,5%	Ikke utført	45,9%	Ikke utført
PS6B-PD***	1069-1391	0,7-0,8	1,3-1,6%	<2,0%	68%-75%	4778-5235
PS7F-PD	255-264*	1,1-1,2	<1%	<1,4%	58%	3907-4452
PS9V-PD	258-280*	1,3-1,5	<1%	<1,3%	67%-69%	9073-9572
PS14-PD	232-241*	1,4	<1%	<1,5%	70%	3430-3779
PS18C-TT"	89-97*	2,2-2,4	1,5-2,2%	<4%	46%-56%	5464-6133
PS19A-Ply*	151	3,2	<1%		29%	
PS19F-DT	133-143*	1,4-1,5	4,1%-5,9%	<1,2%-<1,3%	82%-88%	2059-2335
PS22F-PhtD*	159-167	2,17	5,8	Ikke don	37%	Ikke don
PS22F-AHPhtD*159-167		3,66-4,34	<1%	Ikke don	28-31%	Ikke don
PS23F-PD***	914-980	0,5	1,4-1,9%	3,7%-4,9%	137%-154%	2933-3152

* PS-størrelse etter mikrofluidisering av det native PS

En 10-valent vaksine ble laget ved blanding av serotype 1-, 4-, 5-, 6B-, 7F-, 9V-, 14-, 18C-, 19F- og 23F-konjugater (f.eks. i en dose på henholdsvis 1, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1 µg sakkarid pr. human dose). En 11-valent vaksine ble laget ved ytterligere tilsetning av serotype 3-konjugatet fra tabell 5 (f.eks. med 1 µg sakkarid pr. human dose). En 13-valent vaksine ble laget ved ytterligere tilsetning av serotype 19A- og 22F-konjugatene ovenfor (med 22F enten direkte bundet til PhtD eller alternativt gjennom en ADH-linker) [f.eks. i en dose på 3 µg av hvert sakkarid pr. human dose]. En 14-valent vaksine kan fremstilles ved ytterligere tilsetning av serotype 6A-konjugatet ovenfor [f.eks. i en dose på 1 µg sakkarid pr. human dose].

Eksempel 3: Bevis for at innlemming av Haemophilus influenzae-protein D i et immunogenpreparat ifølge oppfinnelsen kan gi forbedret beskyttelse mot akutt mellomørebetennelse (AOM).

5 Undersøkelsesutformning.

- Ved undersøkelsen ble det anvendt en 11Pn-PD-vaksine – omfattende serotypene 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F og 23F, hver konjugert til protein D fra H. influenzae (refererer til tabell 5 i eksempel 4). Individene ble randomisert i to grupper til å motta fire doser av enten 11Pn-PD-vaksinen eller Havrix i alderen omtrent 3, 4, 5 og 12-15 måneder. Alle individene fikk GSK Biologicals' Infanrix-hexa- (DTPa-HBV-IPV/Hib) vaksine samtidig i alderen 3, 4 og 5 måneder. Infanrix-hexa er en kombinasjon av Pediarix og Hib blandet før administrering. Effektivitetsoppfølging for "Ifølge protokoll"-analysen startet 2 uker etter administrering av den tredje vaksinedose og fortsatte inntil 24-27 måneders alderen. Nasofaryngeal transport av S. pneumoniae og H. influenzae ble evaluert hos en valgt underklasse av individer.
- Foreldre ble rådet til å konsultere undersøkeren hvis barnet deres ble sykt, hadde øresmerte, spontan perforering av den tympaniske membran eller spontan øreutflod. Hvis undersøkeren hadde mistanke om en episode av AOM, ble barnet umiddelbart henvist til en øre-nese-hals- (ENT) spesialist for bekreftelse av diagnosen.
- En klinisk diagnose av AOM var basert på enten det visuelle utseende av den tympaniske membran (dvs. rødhet, opphovning, tap av lysrefleks) eller tilstedeværelse av fluideffusjon fra mellomøret (påvist ved enkel eller pneumatisk otoskopi eller ved mikroskopering). I tillegg måtte minst to av de følgende tegn eller symptomer være til stede: øresmerte, øreutflod, hørselstap, feber, døsighet, irritabilitet, anoreksi, oppkast eller diaré. Hvis ØNH-spsialisten bekreftet den kliniske diagnose, ble en prøve av mellomørefluid oppsamlet ved tympanocentese for bakteriologisk testing.
- 30 For individer med gjentatte sykebesøk anså man at en ny AOM-episode hadde startet hvis mer enn 30 dager hadde gått siden begynnelsen av den forutgående episode. I tillegg ble en AOM-episode ansett for å være en ny bakteriell episode

hvis den isolerte bakterie/serotype var forskjellig fra det tidligere isolat hvor langt enn intervallet var mellom de to på hverandre følgende episoder.

Forsøksresultater

5 Totalt 4968 småbarn ble medtatt, 2489 i 11Pn-PD-gruppen og 2479 i kontrollgruppen. Det var ingen viktige forskjeller i de demografiske karakteristika eller risikofaktorene mellom de to grupper.

Kliniske episoder og definisjon av AOM-tilfelle

10 Under oppfølgingstidsrommet pr. protokoll ble totalt 333 episoder med klinisk AOM registrert i 11Pn-PD-gruppen og 499 i kontrollgruppen.

15 Tabell 3 presenterer den beskyttende effektivitet av 11Pn-PD-vaksinen og begge 7-valente vaksiner tidligere testet i Finland (Eskola et al N Engl J Med 2001; **344**: 403 – 409 og Kilpi et al Clin Infect Dis 2003 **37**:1155-64) overfor en hver episode av AOM og AOM forårsaket av forskjellige pneumokokk-serotyper, H. influenzae, NTHi og M. catarrhalis.

Statistisk signifikant og klinisk relevant reduksjon med 33,6% av den totale AOM-sykdomsbelastning ble oppnådd med 11Pn-PD, uavhengig av etiologien (tabell 3).

20 Den totale effektivitet mot AOM-episoder på grunn av hvilken som helst av de 11 pneumokokk-serotyper som fantes i 11Pn-PD-vaksinen, var 57,6% (tabell 3).

25 Et annet viktig funn i den aktuelle undersøkelse er 35,6%-beskyttelsen tilveiebrakt ved 11Pn-PD-vaksinen mot AOM forårsaket av H. influenzae (og spesifikt 35,3% beskyttelse tilveiebrakt ved NTHi). Dette funn er av vesentlig klinisk betydning, på bakgrunn av den økte betydning av H. influenzae som en hovedårsak til AOM i pneumokokk-konjugatvaksine-perioden. På linje med beskyttelsen tilveiebrakt mot AOM reduserte 11Pn-PD-vaksinen også nasofaryngeal transport av H. influenzae etter forsterkningsdosen i det andre leveår. Disse funn er i motsetning til tidligere observasjoner i Finland, hvor, for
30 begge de 7-valente pneumokokk-konjugat-vaksiner, en økning i AOM-episoder på grunn av H. influenzae ble observert, (Eskola et al og Kilpi et al) som bevis på etiologisk utskifting.

En klar korrelasjon mellom beskyttelse mot AOM-episoder på grunn av Hi- og antistoffnivåer mot bærerproteinet D kunne ikke fastslås, siden post-primære anti-PD IgG-antistoffkonsentrasjoner i 11Pn-PD-vaksinerte personer, som forble Hi AOM episode-fri, var i det vesentlige de samme som post-primære anti-PD IgG-antistoffnivåer målt hos personer som var vaksinert med 11Pn-PD, og som utviklet minst én Hi AOM-episode under effektivitetsoppfølgingstidsrommet. Selv om det ikke kunne påvises noen korrelasjon mellom den biologiske virkning av vaksinen og den post-primære IgG anti-PD-immunogenitet, er det rimelig å anta at PD-bærerproteinet, som er sterkt konserverert blant H. influenzae-stammer, har bidradd til en stor grad av induksjon av beskyttelsen mot Hi.

Effekten på AOM-sykdom ble ledsaget av en effekt på nasofaryngeal transport som var av liknende størrelsesorden for vaksine-serotype-pneumokokker og H. influenzae (figur 1). Denne reduksjonen av den nasofaryngeale transport av H. influenzae hos personer som hadde fått PD-konjugatvaksine, underbygger hypotesen om en direkte beskyttende effekt av PD-konjugatvaksinen mot H. influenzae, selv om den beskyttende virkning ikke kunne korreleres til anti-PD IgG-immunresponsene målt ved ELISA.

I et følgende forsøk ble det anvendt en chinchilla-mellomørebetennelse-modell med serumsamlinger fra småbarn immunisert med den 11-valente formulering ifølge dette eksemplet, eller med den 10-valente vaksine ifølge eksempel 2 (se også tabell 1 og 2 og kommentarer under disse). Begge samlinger fremkaller en betydelig reduksjon i prosentandelen av dyr med mellomørebetennelse sammenstilt med pre-immun-serumsamlingen. Det er ingen signifikant forskjell mellom den 10- og 11-valente immunsamling. Dette viser at begge vaksiner har et liknende potensiale for å fremkalle beskyttelse mot mellomørebetennelse forårsaket av ikke typebestembar H. influenzae i denne modellen.

Tabell 3

Type av AOM-episode	11Pn-PD					Prevnar i FinOM (Eskola et al)					7v-OMP i FinOM (Kilip et al)				
	n		VE			n		VE			n		VE		
	11Pn-PD	Kontroll	%	95%CI		7v-CRM	Kontroll	%	95%CI		7v-OMP	Kontroll	%	95%CI	
				LL	UL				LL	UL				LL	UL
N	2455	2452				786	794				805	794			
Hvilken som helst AOM	333	499	33,6	20,8	44,3	1251	1345	6	-4	16	1364	1345	-1	-12	10
Hvilken som helst AOM med MEF	322	474	32,4	19,0	43,6	1177	1267	7	-5	17	1279	1267	0	-12	10
Dyrkningsbekreftet pneumokokk	92	189	51,5	36,8	62,9	271	414	34	21	45	314	414	25	11	37
Vaksine -pneumokokk-serotyper(*)	60	141	57,6	41,4	69,3	107	250	57	44	67	110	250	56	44	66
Andre bakterielle patogener															
H. influenzae	44	68	35,6	3,8	57,0	315	287	-11	-34	8	315	287	-9	-32	10
Ikke-typebestembar H. influenzae (NTHi)	41	63	35,3	1,8	57,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NC	NP	NP
M. catarrhalis	31	34	9,4	-52,5	46,1	379	381	-1	-19	15	444	381	-16	-36	2

NP = Ikke publisert; N = antall individer i ATP- effektivitetsgruppe; n = antall episoder

*Vaksine-pneumokokk-serotyper: for 11Pn-PD = 11 serotyper, for Prevnar og 7v-OMP = 7 serotyper

MEF = Mellomørefluid

Eksempel 4:**Seleksjon av bærerprotein for serotype 19F****ELISA-forsøk anvendt**

22F-hemnings-ELISA-metoden var i det vesentlige basert på et forsøk foreslått i 2001 av Concepcion og Frasch, og ble rapportert av Henckaerts et al., 2006, *Clinical and Vaccine Immunology* 13:356-360. Kort angitt ble rensede pneumokokk-polysakkarider blandet med metylert humant serumalbumin og adsorbert på Nunc Maxisorp™ (Roskilde, DK) høybindings-mikrotiterplater natten over ved 4°C. Platene ble blokkert med 10% føtalt bovint serum (FBS) i PBS i 1 time ved romtemperatur med agitering. Serumprøver ble fortynnet i PBS inneholdende 10% FBS, 10 µg/ml cellevegg-polysakkarid (SSI) og 2 µg/ml pneumokokk-polysakkarid av serotype 22F (ATCC) og videre fortynnet på mikrotiterplatene med den samme buffer. En indre referanse kalibrert mot standard-serum 89-SF ved anvendelse av de serotypespesifikke IgG-konsentrasjoner i 89-SF ble behandlet på samme måte og medtatt på hver plate. Etter vasking ble de bundne antistoffer detektert ved anvendelse av peroksidase-konjugert monoklonalt anti-humant IgG-antistoff (Stratech Scientific Ltd., Soham, UK) fortynnet i 10% FBS (i PBS) og inkubert i 1 time ved romtemperatur med agitering. Fargen ble utviklet ved anvendelse av enkeltkomponent-tetrametylbenzidin-peroksidaseenzym-immunanalyse-substratsett (BioRad, Hercules, CA, US) i mørke ved romtemperatur. Reaksjonen ble stanset med H₂SO₄ 0,18 M, og den optiske tettheten ble avlest ved 450 nm. Konsentrasjoner av serotype-spesifikt IgG (i µg/ml) i prøvene ble beregnet ved referering av punkter for optisk tetthet innenfor definerte grenser til intern referanseserum-kurven, som ble modellert ved en 4-parameter logistisk log-likning beregnet med SoftMax Pro™- (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) programvare. Utelukkelsen for ELISA var 0,05 µg/ml IgG for alle serotyper idet man tok hensyn til deteksjonsgrensen og kvantifiseringsgrensen.

Opsonofagocytoseforsøk

På WHO-konsultasjonsmøtet i juni 2003 ble det anbefalt å anvende et OPA-forsøk som angitt i Romero-Steiner et al Clin Diagn Lab Immunol 2003 **10** (6): s.1019-1024. Denne protokollen ble anvendt til testing av OPA-aktiviteten av serotypene i følgende tester.

Fremstilling av konjugater

I undersøkelsene 11Pn-PD&Di-001 og 11Pn-PD&Di-007 ble tre 11-valente vaksineformuleringer (Tabell 4) innbefattet, hvor 3 µg av 19F-polysakkaridet ble konjugert til difteritoksoid (19F-DT) i stedet for 1 µg polysakkarid konjugert til protein D (19F-PD). Konjugeringsparametre for undersøkelsene 11Pn-PD, 11 Pn-PD&Di-001 og 11 Pn-PD&Di-007 er beskrevet i henholdsvis tabeller 5, 6 og 7.

Anti-pneumokokk-antistoffresponser og OPA-aktivitet mot serotype 19F én måned etter primær vaksinasjon med disse 19F-DT-formuleringer er vist i henholdsvis tabell 8 og 9.

Tabell 10 viser 22F-ELISA-antistoffkonsentrasjoner og prosentandeler av individer som nådde 0,2 µg/ml-terskelen før og etter vaksinasjon med 23-valent forsterkningsdose-vaksinasjon med rent polysakkarid.

Den opsonofagocytiske aktivitet ble vist å være klart forbedret for antistoffer fremkalt med disse 19F-DT-formuleringer som vist ved høyere seropositivetsrater (opsonofagocytiske titrer $\geq 1:8$) og OPA GMT én måned etter primær vaksinasjon (tabell 9). Én måned etter 23-valent forsterkningsvaksinasjon med rent polysakkarid forble opsonofagocytisk aktivitet av 19-antistoffer betydelig bedre for barn primet med 19F-DT-formuleringer (Tabell 11).

Tabell 12 viser immunogenitetsdata etter en 11Pn-PD-forsterkningsdose hos smårollinger som på forhånd var primet med 19F-DT- eller 19F-PD-konjugater sammenlignet med en 4. påfølgende dose av Prevnar®. På bakgrunn av den plutselige økning av tilfeller rapportert etter innføring av Prevnar® i USA, kan den forbedrede opsonofagocytiske aktivitet mot serotype 19F ved konjugering til DT-bærerproteinet være en fordel for kandidatvaksinen.

Tabell 13 tilveiebringer ELISA- og OPA-data for 19F-DT-konjugatet med hensyn til den kryssreaktive serotype 19A. Det ble funnet at 19F-DT fremkaller lav, men signifikant, OPA-aktivitet overfor 19A.

Tabell 4 Pneumokokk-konjugatvaksineformuleringer anvendt i kliniske undersøkelser.

Formulering	Pneumokokk-serotype µg/bærerprotein											Al ³⁺ mg
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F	
11Pn-PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	< 0,8
19F-DT Form 1	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	10/DT	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	5/DT	≤ 0,35
19F-DT Form 2	3/PD	2/PD	2/PD	3/PD	5/DT	3/PD	2/PD	2/PD	2/PD	3/DT	5/DT	≤ 0,35
19F-DT Form 3	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	3/PD	= 0,5

Tabell 5 Spesifikke aktiverings-/koblings-/nøytraliseringsbetingelser for PS S.pneumoniae-Protein D/TT/DT-konjugater

Serotype	1 Nativ	3 µfluid	4 Nativ	5 Nativ	6B Nativ	7F Nativ
PS-kons.(mg/ml)	1,5	2	2,0	7,5	5,5	3,0
PS-oppløsning	NaCl 150mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD-kons.(mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Begynnelses-PS/PD-forhold (på vektbasis)	1/0,7	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP-kons. (mg/mg PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	8,8/8,8/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0
Koblingstid	60 minutter	60 minutter	45 minutter	40 minutter	60 minutter	60 minutter

Serotype	9V Nativ	14 Nativ	18C Nativ	19F Nativ	23F Nativ
PS-kons.(mg/ml)	1,75	2,5	1,75	4,0	2,5
PS-oppløsning	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD kons.(mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Innledende PS/PD-forhold (på vektbasis)	1/0,75	1/0,75	1/1,2	1/1	1/1
CDAP-kons. (mg/mg PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	8,5/8,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0
Koblingstid	60 minutter	60 minutter	45 minutter	30 minutter	60 minutter

Tabell 6 Spesifikke aktiverings-/koblings-/nøytraliseringsbetingelser for PS S.pneumoniae-Protein D/DT-konjugater for 11 Pn-PD&Di-001-undersøkelsen

Serotype	1 µfluid	3 µfluid	4 µfluid	5 µfluid	6B µfluid	7F Nativ
PS-kons.(mg/ml)	4	2,0	2,5	7,5	10	3,0
PS-oppløsning	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD-kons.(mg/ml)	10,0	5,0	5,0	5,0 NaCl 2M	20 (DT) NaCl 2M	5,0
Begynnelses-PD/PS-forhold (på vektbasis)	1,2/1	1/1	1/1	1/1	1,5/1	1/1
CDAP-kons. (mg/mg PS)	1,50	0,75	1,5	2	1,5	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9/9/9
Koblingstid	60 minutter	60 minutter	60 minutter	60 minutter	60 minutter	60 minutter

Serotype	9V Nativ	14 Nativ	18C µfluid	19F µfluid	23F µfluid
PS-kons.(mg/ml)	1,75	2,5	5,0	9,0	10
PS-oppløsning	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
Bærerprotein-kons.(mg/ml)	5,0	5,0	5,0	20 (DT)	10 (DT)
Begynnelses-bærerprotein/-PS-forhold (på vektbasis)	0,75/1	0,75/1	1,2/1	1,5/1	1,5/1
CDAP-kons. (mg/mg PS)	0,75	0,75	1,5	1,5	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	8,5/8,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0
Koblingstid	60 minutter	60 minutter	30 minutter	60 minutter	60 minutter

Tabell 7 Spesifikke aktiverings-/koblings-/nøytraliseringsbetingelser for PS S.pneumoniae-Protein D/DT-konjugater for 11 Pn-PD&Di-007-undersøkelsen

Serotype	1 Nativ	3 µfluid	4 Nativ	5 Nativ	6B Nativ	7F µfluid
PS-kons.(mg/ml)	1,5	2,0	2	7,5	5,5	5,0
PS-oppløsning	NaCl 150 mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD-kons.(mg/ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5	10
Begynnelses-PD/PS-forhold (på vektbasis)	0,7/1	1/1	1	1/1	1/1	1,2/1
CDAP-kons. (mg/mg PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	8,8/8,8/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9
Koblingstid	60 minutter	60 minutter	45 minutter	40 minutter	60 minutter	60 minutter

Serotype	9V µfluid	14 µfluid	18C Nativ	19F µfluid	19F µfluid	23F µfluid
PS-kons.(mg/ml)	5,0	5,0	1,75	9,0	10,0	9,5
PS-oppløsning	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
Bærerprotein-kons.(mg/ml)	10	10,0	5,0	20 (DT)	5,0 (PD)	10
Begynnelses-bærerprotein/-PS-forhold (på vektbasis)	1,2/1	1,2/1	1,2/1	1,5/1	1,2/1	1/1
CDAP kons. (mg/mg PS)	0,5	0,75	0,75	1,5	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0
Koblingstid	60 minutter	60 minutter	45 minutter	120 minutter	120 minutter	60 minutter

Tabell 8 Prosentandel av individer med 19F-antistoffkonsentrasjon $\geq 0,20 \mu\text{g/ml}$ og 19F-antistoff Geometrisk middel-antistoff-konsentrasjoner (GMC med 95% CI; $\mu\text{g/ml}$) én måned etter 1 μg 19F-PD-, 3 μg 19F-DT- eller Prevnar- (2 μg 19F-CRM) primærvaksinasjon (total gruppe)

Gruppe	11Pn-PD&Di-001 (22F-ELISA)			11Pn-PD&Di-007 (22F-ELISA)		
	N	% $\geq 0,20 \mu\text{g/ml}$ (95% CI)	GMC ($\mu\text{g/ml}$) (95% CI)	N	% $\geq 0,20 \mu\text{g/ml}$ (95% CI)	GMC ($\mu\text{g/ml}$) (95% CI)
11Pn-PD	152	98,7 (95,3-99,8)	1,93 (1,67-2,22)	50	100 (92,9-100)	2,78 (2,31-3,36)
19F-DT Form 1 [†]	146	99,3 (96,2-100)	2,88 (2,45-3,38)	-	-	-
19F-DT Form 2 [†]	150	96,0 (91,5-98,5)	2,43 (2,01-2,94)	-	-	-
19F-DT Form 3 [†]	-	-	-	50	96,0 (86,3-99,5)	3,70 (2,58-5,30)
Prevnar	148	98,6 (95,2-99,8)	2,98 (2,60-3,41)	41	97,6 (87,1-99,9)	2,91 (2,15-3,94)

[†] Preparatet med de forskjellige formuleringer er vist i tabell 4.

Tabell 9 Prosentandel av individer med 19F OPA-titer $\geq 1:8$ og 19F OPA GMT én måned etter primær vaksinasjon med 1 μg 19F-PD, 3 μg 19F-DT eller Pevnar (2 μg 19F-CRM) (Total gruppe)

Gruppe	11Pn-PD&Di-001			11Pn-PD&Di-007		
	N	$\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)	N	$\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	136	84,6 (77,4-90,2)	77,8 (58,1-104,4)	46	95,7 (85,2-99,5)	167,8 (118,1-238,6)
19F-DT Form 1 [†]	137	95,6 (90,7-98,4)	263,2 (209,4-330,7)	-	-	-
19F-DT Form 2 [†]	139	92,1 (86,3-96,0)	218,9 (166,5-287,9)	-	-	-
19F-DT Form 3 [†]	-	-	-	49	91,8 (80,4-97,7)	403,1 (225,7-719,9)
Pevnar	131	86,3 (79,2-91,6)	82,6 (61,1-111,6)	38	81,6 (65,7-92,3)	65,0 (37,7-112,2)

[†] Preparatet med de forskjellige formuleringer er vist i tabell 4.

Tabell 10 Prosentandel av individer med 19F-antistoffkonsentrasjon $\geq 0,20 \mu\text{g/ml}$ og 19F-antistoff-GMC ($\mu\text{g/ml}$) før og én måned etter 23-valent forsterkningsdose med rentpolysakkarid i barn primet med 1 μg 19F-PD, 3 μg 19F-DT eller Pevnar (2 μg 19F-CRM) (Total gruppe)

Primær gruppe	11Pn-PD&Di-002 (22F ELISA)					
	Før forsterkningsvaksinasjon			En måned etter 23-valent PS-forsterkning		
	N	% $\geq 0,20 \mu\text{g/ml}$ (95% CI)	GMC ($\mu\text{g/ml}$) (95% CI)	N	% $\geq 0,20 \mu\text{g/ml}$ (95% CI)	GMC ($\mu\text{g/ml}$) (95% CI)
11Pn-PD	70	77,1 (65,6-86,3)	0,67 (0,45-0,98)	67	94,0 (85,4-98,3)	11,50 (7,76-17,03)
19F-DT Form 1 [†]	68	91,2 (81,8-96,7)	0,71 (0,54-0,94)	69	98,6 (92,2-100)	14,50 (10,47-20,07)
19F-DT Form 2 [†]	74	81,1 (70,3-89,3)	0,59 (0,43-0,80)	72	95,8 (88,3-99,1)	9,90 (6,74-14,54)
Pevnar	65	64,6 (51,8-76,1)	0,40 (0,27-0,60)	67	100 (94,6-100)	9,40 (6,95-12,71)

[†] Preparatet med de forskjellige formuleringer er vist i tabell 4.

Tabell 11 Prosentandel av individer med 19F OPA-titer $\geq 1:8$ og 19F OPA GMT før og én måned etter 23-valent forsterkningsdose med rent polysakkarid hos barn primet med 1 μ g 19F-PD, 3 μ g 19F-DT eller Prevnar (2 μ g 19F-CRM) (Total gruppe)

Primær gruppe	11Pn-PD&Di-002					
	Før vaksinasjon med forsterkningsdose			Én måned etter 23-valent PS-forsterkning		
	N	% $\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)	N	% $\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	29	27,6 (12,7-47,2)	10,9 (5,0-23,7)	28	82,1 (63,1-93,9)	408,0 (157,3-1058,3)
19F-DT Form 1 [†]	19	47,4 (24,4-71,1)	18,1 (7,2-45,7)	18	94,4 (72,7-99,9)	1063,8 (386,6-2927,5)
19F-DT Form 2 [†]	27	33,3 (16,5-54,0)	8,5 (4,7-15,3)	28	100 (87,7-100)	957,6 (552,8-1659,0)
Prevnar	24	12,5 (2,7-32,4)	8,1 (3,4-19,6)	23	82,6 (61,2-95,0)	380,9 (133,2-1089,5)

[†] Preparatet med de forskjellige formuleringer er vist i tabell 4.

Tabell 12 Prosentandel av individer med antistoffkonsentrasjoner $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$, OPA $\geq 1:8$ og GMC/GMT mot 19F-pneumokokker én måned etter 11Pn-PD- eller Prevnar-forsterkningsdose hos barn primet med 1 μ g 19F-PD, 3 μ g 19F-DT eller Prevnar (2 μ g 19F-CRM) (Total gruppe)

Primær gruppe	11Pn-PD&Di-002					
	22F-ELISA-forsøk			OPA-forsøk		
	N	% $\geq 0,20 \mu\text{g/ml}$ (95% CI)	GMC ($\mu\text{g/ml}$) (95% CI)	N	% $\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	70	100 (94,9-100)	4,52 (3,7-5,5)	21	100 (83,9-100)	255,6 (135,5-481,9)
19F-DT Form 1 [†]	66	98,5 (91,8-100)	3,45 (2,8-4,3)	23	95,7 (78,1-99,9)	374,0 (192,6-726,2)
19F-DT Form 2 [†]	70	98,6 (92,3-100)	3,80 (2,9-4,9)	29	96,6 (82,2-99,9)	249,1 (144,7-428,7)
Prevnar	69	97,1 (89,9-99,6)	2,56 (2,0-3,3)	31	96,8 (83,3-99,9)	528,7 (319,4-875,2)

[†] Preparatet med de forskjellige formuleringer er vist i tabell 4.

Tabell 13 Prosentandel av individer med antistoffkonsentrasjoner $\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$, OPA $\geq 1:8$ og GMC/GMT mot 19A-pneumokokker én måned etter primær vaksinasjon med $1\mu\text{g}$ 19F-PD, $3\mu\text{g}$ 19F-DT eller Prevnar ($2\mu\text{g}$ 19F-CRM) (Total gruppe)

Gruppe	11Pn-PD&Di-001					
	22F-ELISA-forsøk			OPA-forsøk		
	N	% $\geq 0,20 \mu\text{g/ml}$ (95% CI)	GMC ($\mu\text{g/ml}$) (95% CI)	N	% $\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	45	28,9 (16,4-44,3)	0,09 (0,07-0,11)	52	7,7 (2,1-18,5)	5,2 (4,0-6,8)
19F-DT Form 2 [†]	51	29,4 (17,5-43,8)	0,11 (0,08-0,16)	59	27,1 (16,4-40,3)	12,4 (7,6-20,3)
Prevnar	55	18,2 (9,1-30,9)	0,10 (0,08-0,12)	61	3,3 (0,4-11,3)	4,6 (3,8-5,6)

[†] Preparatet med de forskjellige formuleringer er vist i tabell 4.

Eksempel 5: Adjuvansforsøk i prekliniske modeller: innvirkning på immunogeneiteten av pneumokokk 11-valente polysakkaridkonjugater hos eldre Rhesus-aper

For optimalisering av responsen fremkalt overfor konjugat-pneumokokkvaksiner i den eldre populasjon formulerte GSK en 11-valent polysakkarid- (PS) konjugat-vaksine med en nye adjuvan Adjuvans C – se nedenfor.

Grupper med 5 eldre Rhesus-aper (14 til 28 år gamle) ble immunisert intramuskulært (IM) på dagene 0 og 28 med $500 \mu\text{l}$ av enten 11-valente PS-konjugater adsorbert på $315 \mu\text{g}$ AlPO_4 eller 11-valente PS-konjugater blandet med Adjuvans C.

I begge vaksineformuleringer besto hver av de 11-valente PS-konjugater av følgende konjugater: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-PD, PS19F-PD, PS23F-DT og PS6B-DT. Den anvendte vaksine var 1/5 dose av den humane dose av vaksinen ($5 \mu\text{g}$ av hvert sakkarid pr. human dose bortsett fra i 6B [$10 \mu\text{g}$]) konjugert i henhold til tabell 6-betingelser (eksempel 4), bortsett fra at 19F var laget i henhold til følgende CDAP-prosessbetingelser: Størrelsesregulert sakkarid med 9 mg/ml , PD med 5 mg/ml , et begynnelses-PD/PS-forhold på 1,2/1, en CDAP-konsentrasjon på $0,75 \text{ mg/mg}$ PS, $\text{pH}_a=\text{pH}_c=\text{pH}_q$ 9,0/9,0/9,0 og en koblingstid på 60 min.

Anti-PS-ELISA-IgG-nivåer og opsonofagocytosetitrer ble dosert i sera tappet på dag 42. Anti-PS3-hukommelses-B-celle-frekvenser ble målt ved Elispot fra perifere blodceller tappet på dag 42.

I henhold til resultatene vist nedenfor, forbedret Adjuvans C signifikant immunogeniteten av 11-valente PS-konjugater sammenstilt med konjugater med AIPO₄ hos eldre aper. Den nye adjuvans forbedret IgG-responsene overfor PS (figur 1) og opsonofagocytose-antistofftitrene (tabell 14). Det var også støttende bevis for at frekvensen av PS3-spesifikke hukommelses-B-celler økes ved anvendelse av adjuvans C (Figur 2).

Tabell 14. Konjugat-immunogenitet hos eldre Rhesus aper (post-II opsonofagocytosetiter)

		PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7E	PS6V	PS14	PS18C	PS10F	PS23F
11-valent AIPO ₄	Pre-immun	<8	5	<8	5	<8	16	<8	<8	<8	<8	<8
	dag 14 post II	8	163	64	49	64	8096	42	37	169	64	364
11-valent Adj-C	Pre-immun	5	9	<8	5	8	37	<8	<8	<8	<8	<8
	dag 14 post II	776	1353	891	676	6208	16384	113	161	7132	2648	<64

B-Celle-Elispot

Prinsippet for forsøket er basert på det faktum at hukommelses-B-celler modnes til plasmaceller in vitro etter dyrkning med CpG i 5 dager. In vitro-frembrakte antigenspesifikke plasmaceller kan lett detekteres og derfor opptelles ved anvendelse av B-celle-Elispot-forsøket. Antallet spesifikke plasmaceller gjenspeiler hyppigheten av hukommelses-B-celler ved begynnelsen av dyrkningen.

Kort angitt inkuberes in vitro-frembrakte plasmaceller i dyrkningsplater belagt med antigen. Antigenspesifikke plasmaceller danner antistoff/antigen-flekker som detekteres ved konvensjonell immun-enzymatisk prosedyre og medregnes som hukommelses-B-celler.

I foreliggende undersøkelse er polysakkarider blitt anvendt til belegging av dyrkningsplater for opptelling av respektive hukommelses-B-celler. Resultatene

uttrykkes som hyppighet av PS-spesifikke hukommelses-B-celler innenfor en million av hukommelses-B-celler.

Undersøkelsen viser at adjuvans C kan være i stand til å lindre det kjente problem med PS3-forsterkbarhet (se 5th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, April 2-6 2006, Alice Springs, Sentral-Australia.

Specificities of immune responses against a serotype 3 pneumococcal conjugate. Schuerman L, Prymula R, Poolman J. Abstract book s. 245, PO10.06).

Eksempel 6. Effektivitet av detoksifisert pneumolysin (dPly) som proteinbærer for forbedring av immunogeniteten av PS 19F hos unge Balb/c-mus

Grupper med 40 BALB/c hunnmus (4 uker gamle) ble immunisert IM på dagene 0, 14 og 28 med 50 µl av enten 4-valent rent PS eller 4-valent dPly-konjugert PS, begge blandet med Adjuvans C.

Begge vaksineformuleringer besto av 0,1 µg (mengde av sakkarid) av hvert av følgende PS: PS8, PS12F, PS19F og PS22F.

Anti-PS-ELISA-IgG-nivåene ble dosert i sera tappet på dag 42.

Anti-PS19F-responsen, vist som et eksempel på figur 3, ble sterkt forbedret hos mus som fikk 4-valente dPly-konjugater, sammenlignet med mus immunisert med det rene PS. Samme forbedring ble observert for anti-PS8-, 12F- og 22F-IgG-responsene (data ikke vist).

Eksempel 7. Effektivitet av pneumokokk-histidin-triade-protein D (PhtD) som proteinbærer for forbedring av immunogeniteten av PS 22F hos unge Balb/c-mus

Grupper med 40 BALB/c-hunnmus (4 uker gamle) ble immunisert IM på dagene 0, 14 og 28 med 50 µl av enten 4-valent rent PS eller 4-valent PhtD-konjugert PS, begge blandet med Adjuvans C.

Begge vaksineformuleringer besto av 0,1 µg (mengde av sakkarid) av hvert av følgende PS: PS8, PS12F, PS19F og PS22F.

Anti-PS-ELISA-IgG-nivåene ble dosert i sera tappet på dag 42.

Anti-PS22F-responsen, vist som et eksempel på figur 4, var sterkt forbedret hos mus som hadde fått 4-valente PhtD-konjugater sammenlignet med mus immunisert med det rene PS. Samme forbedring ble observert for anti-PS8-, -12F- og -19F-IgG-responsene (data ikke vist).

Eksempel 8. Immunogenitet hos eldre C57Bl-mus av 13-valente PS-konjugater inneholdende 19A-dPly og 22F-PhtD

Grupper med 30 gamle C57Bl-mus (>69 uker gamle) ble immunisert IM på dagene 0, 14 og 28 med 50 µl av enten 11-valente PS-konjugater eller 13-valente PS-konjugater, begge blandet med adjuvans C (se nedenfor).

Den 11-valente vaksineformulering besto av 0,1 µg sakkarid av hvert av følgende konjugater: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT og PS23F-PD (se tabell 1 og kommentar angående 11-valent vaksine angitt under tabell 2). Den 13-valente vaksineformulering inneholdt i tillegg 0,1 µg PS19A-dPly- og PS22F-PhtD-konjugater (se tabell 1 og kommentar til 13-valent vaksine angitt under tabell 2 [med anvendelse av direkte-konjugert 22F]). I gruppe 2 og 4 ble pneumolysin-bæreren detoksifisert med GMBS-behandling, i gruppe 3 og 5 ble det utført med formaldehyd. I gruppene 2 og 3 ble PhtD anvendt til konjugering av PS 22F, i gruppene 4 og 5 ble en PhtD_E-fusjon (konstruksjonen VP147 fra WO 03/054007) anvendt. I gruppe 6 ble 19A konjugert til difteritoksoid og 22F til protein D.

Anti-PS19A- og 22F-ELISA-IgG-nivåer ble dosert i individuelle sera tappet på dag 42. ELISA-IgG-responsen fremkalt mot det andre PS ble målt i samlede sera.

19A-dPly og 22F-PhtD administrert i den 13-valente konjugat-vaksineformulering ble vist å være immunogene i gamle C57Bl-mus (tabell 15). Immunresponsen fremkalt mot det andre PS var ikke negativt påvirket hos mus som hadde fått den 13-valente formulering sammenlignet med dem som var immunisert med den 11-valente formulering.

Tabell 15. PS-immunogenitet hos gamle C57Bl-mus (post-III-IgG-nivåer)

Gamle sorte C57-mus						
ELISA	GRUPPE 1	GRUPPE 2	GRUPPE 3	GRUPPE 4	GRUPPE 5	GRUPPE 6
	11V 0,1µg/50µl Adj C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1µg/50µl Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1µg/50µl Adj C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1µg/50µl Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1µg/50µl Adj C	11V 19A-DT 22F-PD 0,1µg/50µl Adj C
1 gjennomsnittlig samling	19,30	20,20	24,40	12,80	12,10	13,60
3 gjennomsnittlig samling	6,32	4,84	5,21	6,74	2,38	2,54
4 gjennomsnittlig samling	60,9	67,1	51,4	47,4	45,5	41,1
5 gjennomsnittlig samling	1,34	3,81	3,06	2,75	1,26	1,23
6B gjennomsnittlig samling	4,41	4,12	5,88	1,58	2,31	5,64
7F gjennomsnittlig samling	0,83	0,81	1,65	1,98	0,89	0,99
9V gjennomsnittlig samling	13,8	23,7	20,0	13,1	15,5	9,6
14 gjennomsnittlig samling	25,73	42,96	34,12	32,53	23,97	15,60
18C gjennomsnittlig samling	13,4	20,1	11,9	9,1	8,3	8,4
19F gjennomsnittlig samling	57,5	90,0	63,8	36,5	47,0	69,1
23F gjennomsnittlig samling	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19A GMC IC %sero	0,06 0,04-0,1 33%	0,09 0,05-0,14 47%	0,25 0,15-0,41 83%	0,08 0,06-0,12 53%	0,23 0,14-0,38 80%	0,19 0,09-0,3 73%
22F GMC IC %sero	NR 0%	5,81 3,2-10,6 97%	3,76 1,8-7,9 90%	0,54 0,3-1,1 77%	0,85 0,4-1,7 87%	2,02 1,2-3,4 97%

Eksempel 9. Immunogenitet hos unge Balb/c-mus av 13-valente PS-konjugater inneholdende 19A-dPly og 22F-PhtD

Grupper av 30 unge Balb/c-mus (4 uker gamle) ble immunisert IM på dagene 0, 14 og 28 med 50 µl av enten 11-valente PS-konjugater eller 13-valente PS-konjugater, begge blandet med Adjuvans C (se nedenfor).

Den 11-valente vaksineformulering besto av 0,1 µg sakkarid av hvert av følgende konjugater: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT og PS23F-PD (se tabell 1 og kommentar til 11-valent vaksine angitt under tabell 2). Den 13-valente vaksineformulering inneholdt i tillegg 0,1 µg PS19A-dPly- og PS22F-PhtD-konjugater (se tabell 1 og kommentar til 13-valent vaksine angitt under tabell 2 [ved anvendelse av direkte-konjugert 22F]). I gruppe 2 og 4 ble pneumolysin-bæreren detoksifisert ved GMBS-behandling, i gruppe 3 og 5 ble det utført med formaldehyd. I grupper 2 og 3 ble PhtD anvendt til konjugering av PS 22F, i gruppene 4 og 5 ble en PhtD_E-fusjon (konstruksjonen VP147 fra WO 03/054007) anvendt. I gruppe 6 ble 19A konjugert til difteritoksoid og 22F til protein D.

Anti-PS19A- og 22F-ELISA-IgG-nivåene ble dosert i individuelle sera tappet på dag 42. ELISA-IgG-responsen fremkalt overfor det andre PS ble målt i samlede sera.

19A-dPly og 22F-PhtD administrert i den 13-valente konjugat-vaksineformulering ble vist å være immunogene i unge Balb/c-mus (tabell 16). Immunresponsen fremkalt mot det andre PS ble ikke negativt påvirket hos mus som hadde fått den 13-valente formulering sammenlignet med dem som var immunisert med den 11-valente formulering.

Tabell 16. PS-immunogenitet hos unge Balb/c-mus (post-III IgG-nivåer)

BalbC-mus							
ELISA		GRUPPE 1	GRUPPE 2	GRUPPE 3	GRUPPE 4	GRUPPE 5	GRUPPE 6
		11V 0,1µg/50µl Adj C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1µg/50µl Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0,1µg/50µl Adj C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1µg/50µl Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0,1µg/50µl Adj C	11V 19A-DT 22F-PD 0,1µg/50µl Adj C
1	gjennom- snittlig samling	131,70	101,20	83,00	82,40	67,90	85,50
3	gjennom- snittlig samling	21,85	10,38	12,53	8,83	8,73	14,98
4	gjennom- snittlig samling	147,4	127,0	104,4	95,0	113,6	114,2
5	gjennom- snittlig samling	21,38	20,29	18,26	18,95	18,02	23,04
6B	gjennom- snittlig samling	1,97	4,76	3,72	2,35	1,43	1,05
7F	gjennom- snittlig samling	7,69	4,58	4,77	4,24	3,92	3,94
9V	gjennom- snittlig samling	30,1	30,7	26,5	21,4	23,4	28,3
14	gjennom- snittlig samling	28,78	27,67	26,23	21,54	24,34	13,73
18C	gjennom- snittlig samling	53,4	52,37	46,5	57,8	47,8	75,8
19F	gjennom- snittlig samling	186,6	157,7	169,3	178,9	181,9	223,2
23F	gjennom-	4,98	3,9	5,11	0,57	3,13	4,57

snittlig samling							
19A	GMC	0,4	32,8	25,1	21,6	18,9	23,5
	IC	0,2-0,6	26,4-40,7	20,6-30,6	17,5-26,7	15,1-23,5	19,5-28,5
	%sero	93%	100%	100%	100%	100%	100%
22F	GMC	NR	3,99	3,76	6,27	8,70	18,76
	IC		1,9-8,42	1,8-8	3,8-10,4	5,4-13,9	15,2-23,1
	%sero	0%	93%	100%	100%	100%	100%

Eksempel 10. Immunogenitet i marsvin av 13-valente PS-konjugater inneholdende 19A-dPly og 22F-PhtD

Grupper av 20 unge marsvin (Hartley-stamme; 5 uker gamle) ble immunisert IM på dagene 0, 14 og 28 med 125 µl av enten 11-valente PS-konjugater eller 13-valente PS-konjugater, begge blandet med adjuvans C (se nedenfor).

Den 11-valente vaksineformulering besto av 0,25 µg sakkarid av hvert av følgende konjugater: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT og PS23F-PD (se tabell 1 og kommentar angående 11-valent vaksine angitt under tabell 2). Den 13-valente vaksineformulering inneholdt i tillegg 0,1 µg PS19A-dPly- og PS22F-PhtD-konjugater (se tabell 1 og kommentar angående 13-valent vaksine angitt under tabell 2 [med anvendelse av direkte-konjugert 22F]). I gruppe 2 og 4 ble pneumolysinbæreren detoksifisert med GMBS-behandling, i gruppe 3 og 5 ble det utført med formaldehyd. I gruppene 2 og 3 ble PhtD anvendt til konjugering av PS 22F, i gruppene 4 og 5 ble det anvendt en PhtD_E-fusjon (konstruksjonen VP147 fra WO 03/054007). I gruppe 6 ble 19A konjugert til difteritoksoid og 22F til protein D.

Anti-PS19A- og 22F-ELISA-IgG-nivåer ble dosert i individuelle sera tappet på dag 42. ELISA-IgG-responsen fremkalt overfor det andre PS ble målt i samlede sera.

Tabell 17. PS-immunogenitet hos unge Balb/c-mus (post-III-IgG-nivåer)

Marsvin						
ELISA	GRUPPE 1	GRUPPE 2	GRUPPE 3	GRUPPE 4	GRUPPE 5	GRUPPE 6
	11V 0,1 µg/50 µl Adj C	11V 19A-dPly- gmbs 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Adj C	11V 19A-dPly- formol 22F-PhtD 0,1 µg/50 µl Adj C	11V 19A-dPly- gmbs 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Adj C	11V 19A-dPly- formol 22F-PhtD-E 0,1 µg/50 µl Adj C	11V 19A-DT 22F-PD 0,1 µg/50 µl Adj C
1 gjennom- snittlig samling	78,00	77,21	76,15	68,77	68,59	81,04
3 gjennom- snittlig samling	7,75	9,31	12,73	7,94	4,75	9,59
4 gjennom- snittlig samling	130,7	94,4	132,6	166,8	85,0	101,3
5 gjennom- snittlig samling	109,10	117,10	110,70	158,40	74,10	100,40
6B gjennom- snittlig samling	3,14	4,26	14,4	7,63	6,3	7,52
7F gjennom- snittlig samling	154,2	216,0	240,0	181,0	142,0	179,1
9V gjennomsnitt samling	90,69	105,45	98,20	93,45	54,12	73,05
14 gjennomsnitt samling	71,19	77,18	46,53	59,67	38,47	53,69
18C gjennom- snittlig samling	109,4	122,3	137,1	79,9	73,7	83,1
19F gjennom- snittlig samling	73,9	102,5	112,2	75,5	62,3	72,1
23F gjennom- snittlig	19,19	30,74	29,44	31,52	19,13	24,94

samling							
19A	GMC	0,4	25,58	41,49	14,25	27,49	6,74
	IC	0,24-0,68	12-54,5	24,4-70,5	5,9-34,6	16,6-45,4	4-11,3
	%sero	75%	100%	100%	100%	100%	100%
22F	GMC	0,12	2,51	3,67	45,74	30,68	96,38
	IC	0,09-0,16	0,94-6,73	1,59-8,42	29,3-71,4	17-53,3	73,5-126,4
	%sero	10%	95%	95%	100%	100%	100%

Eksempel 11: Lagring og testing av formuleringer

a) Følgende formuleringer lages (ved anvendelse av den 13-valente vaksine fra tabell 1 og serotype 3 fra tabell 5 – se kommentar angående 14-valent vaksine angitt under tabell 2 [ved anvendelse av direkte-konjugert 22F eller gjennom en ADH-linker]). Sakkaridene formuleres med aluminiumfosfat og 3D-MPL som vist nedenfor.

13V 20µg MPL Sum av BAC aluminium-innhold -> FF Pr. dose:						13V 10µg MPL Sum av BAC aluminium-innhold -> FF Pr. dose:					
PS	bærer	µg PS	µg MPL	forhold PS:A1	µg A1	PS	bærer	µg PS	µg MPL	forhold PS:A1	µg A1
1	PD	1		10	10	1	PD	1		10	10
2	PD	1		10	10	2	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10	3	PD	1		10	10
4	PD	1		10	10	4	PD	1		10	10
5	PD	1		10	10	5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10	6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10	6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10	7F	PD	1		10	10
8V	PD	1		10	10	8V	PD	1		10	10
13	PD	1		10	10	13	PD	1		10	10
18C	FF _{alg}	3		15	45	18C	FF _{alg}	3		15	45
19A	gPlv	3		10	30	19A	gPlv	3		10	30
19F	DF	3		10	30	19F	DF	3		10	30
22F	PSD	3		10	30	22F	PSD	3		10	30
22F	PD	1		10	10	22F	PD	1		10	10
BAC MPL 50:50			25	3	100	BAC MPL 50:50			10	4	40
FF aluminium-innhold				Sum =	355	FF aluminium-innhold				Sum =	295

b) Den samme sakkaridformulering blir tilsatt hvert av følgende adjuvantia:

- I tabellen nedenfor er konsentrasjonen av emulsjonskomponentene pr. 500µl dose vist.

	Adjuvans A1	Adjuvans A2	Adjuvans A3
Bestanddeler	250µl olje-i-vann-emulsjon	125µl olje-i-vann-emulsjon	50µl olje-i-vann-emulsjon
alfa-Tokoferol	11,88 mg	5,94 mg	2,38 mg
Squalen	10,7 mg	5,35 mg	2,14 mg
Tween 80	4,85 mg	2,43 mg	0,97 mg

Adjuvans A4	Adjuvans A5	Adjuvans A6	Adjuvans A7	
Bestand- deler	250µl olje-i- vann- emulsjon	250µl olje-i- vann-emulsjon	125µl olje-i- vann-emulsjon	50µl olje-i- vann-emulsjon
alfa-Tokoferol	11,88 mg	11,88 mg	5,94 mg	2,38 mg
Squalen	10,7 mg	10,7 mg	5,35 mg	2,14 mg
Tween 80	4,85 mg	4,85 mg	2,43 mg	0,97 mg
3D-MPL	50µg	25µg	25µg	10µg

c) Sakkaridene formuleres også med to liposombaserte adjuvantia:

Sammensetning av adjuvans B1

Kvalitativt kvantitativt (pr. 0,5 ml dose)

Liposomer:

- DOPC 1 mg

- kolesterol 0,25 mg

3DMPL 50 µg

QS21 50 µg

KH_2PO_4 1 3,124 mg buffer

Na_2HPO_4 1 0,290 mg buffer

NaCl 2,922 mg

(100 mM)

WFI q.s. ad 0,5 ml løsningsmiddel

pH 6,1

1. Total PO_4 -konsentrasjon = 50 mM

Sammensetning av adjuvans B2

Kvalitativt kvantitativt (pr. 0,5 ml dose)

Liposomer:

- DOPC 0,5 mg

- kolesterol 0,125 mg

3DMPL 25 µg

QS21 25 µg

KH_2PO_4 1 3,124 mg buffer

Na_2HPO_4 1 0,290 mg buffer

NaCl 2,922 mg

(100 mM)

WFI q.s. ad 0,5 ml løsningsmiddel

pH 6,1

d) Sakkaridene formuleres også med adjuvans C (se ovenfor for andre preparater hvor denne adjuvans er anvendt):

Kvalitativt kvantitativt (pr. 0,5 ml dose)

Olje-i-vann-emulsjon: 50 µl

- squalen 2,136 mg
- α -tokoferol 2,372 mg
- Tween 80 0,97 mg
- kolesterol 0,1 mg
- 3DMPL 50 μ g
- QS21 50 μ g
- KH_2PO_4 1 0,470 mg buffer
- Na_2HPO_4 1 0,219 mg buffer
- NaCl 4,003 mg
- (137 mM)
- KCl 0,101 mg
- (2,7 mM)
- WFI q.s. ad 0,5 ml løsningsmiddel
- pH 6,8

Eksempel 12. Virkning av konjugeringskjemi på 22F-PhtD-konjugat-immunogenitet i Balb/c-mus

Grupper av 30 BALB/c hunnmus ble immunisert intramuskulært (IM) på dagene 0, 14 og 28 med 13-valente PS-formuleringer inneholdende PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F og 23F (dose: 0,3 μ g sakkarid / konjugat for PS 4, 18C, 19A, 19F og 22F, og 0,1 μ g sakkarid / konjugat for det andre PS).

PS 18C ble konjugert til tetanustoksoid, 19F til difteritoksoid, 19A til formol-detoksifisert Ply, 22F til PhtD og det andre PS til PD.

To formuleringer, bestående av enten 22F-PhtD fremstilt ved direkte CDAP-kjemi, eller 22F-AH-PhtD (ADH-derivatisert PS), ble sammenlignet. Se eksempel 2, tabell 1, og kommentar under tabell 2 for karakteristika for 13-valent vaksine laget enten med 22F direkte konjugert eller via en ADH-spacer. Vaksineformuleringene ble supplert med adjuvans C.

Anti-PS22F-ELISA-IgG-nivåer og opsono-fagocytose-titrer ble målt i sera tappet på dag 42.

22F-AH-PhtD ble vist å være meget mer immunogent enn 22F-PhtD når det gjaldt begge IgG-nivåer (figur 5) og opsono-fagocytiske titrer (figur 6).

Eksempel 13. Virkning av nye adjuvantia på immunogenitet av *Streptococcus pneumoniae*-kapsel-PS-konjugater

Grupper av 40 BALB/c-hunnmus ble immunisert IM på dagene 0, 14 og 28 med 13-valente PS-formuleringer inneholdende PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C,

19A, 19F, 22F og 23F (dose: 0,3 µg / konjugat for PS 4, 18C, 19A, 19F og 22F og 0,1 µg / konjugat for det andre PS).

PS 18C ble konjugert til tetanustoksoid, 19F til difteritoksoid, 19A til formol-detoksifisert Ply, 22F til PhtD og de andre PS til PD. Se eksempel 2, tabell 1, og kommentar under tabell 2 med hensyn til karakteristika for 13-valent vaksine laget med 22F direkte konjugert.

Fire formuleringer, supplert med enten AlPO_4 , adjuvans A1, adjuvans A4 eller adjuvans A5, ble sammenlignet.

Anti-PS-, Ply-, PhtD- og PD-ELISA-IgG-nivåer ble målt i sera tappet på dag 42 og samlet pr. gruppe. De følgende forhold ble beregnet for hvert antigen: IgG-nivå fremkalt med den nye testede adjuvans / IgG-nivå fremkalt med AlPO_4 .

Alle de nye testede adjuvantia forbedret minst 2 ganger immunresponsene overfor 13-valente konjugater sammenlignet med den klassiske AlPO_4 -formulering (figur 7).

Eksempel 14. Beskyttende effektivitet av en PhtD/detoksifisert Ply-kombinasjon i en pneumokokk-ape-lungebetennelse-modell

Grupper av 6 Rhesus-aper (3 til 8 år gamle), valgt som dem som har de laveste pre-eksisterende anti-19F-antistoffnivåer, ble immunisert intramuskulært på dagene 0 og 28 med enten 11-valente PS-konjugater (dvs. 1 µg PS 1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14 og 23F, og 3 µg PS 4, 18C og 19F [av sakkarid]) eller PhtD (10 µg) + formol-detoksifisert Ply (10 µg) eller adjuvansen alene.

PS 18C ble konjugert til tetanustoksoid, 19F til difteritoksoid og de andre PS til PD. Se eksempel 2, tabell 1 og kommentar under tabell 2 med hensyn til karakteristika for 11-valent vaksine. Alle formuleringer ble supplert med adjuvans C.

Pneumokokker type 19F ($5 \cdot 10^8$ cfu) ble inokulert i høyre lunge på dag 42. Kolonier ble tellt i bronko-alveolære utskyllingsvæsker tappet på dagene 1, 3 og 7 etter inokulering. Resultatene ble uttrykt som antall dyr pr. gruppe enten døde, lungekoloniserte eller utklarerte på dag 7 etter inokulering.

Som vist på figur 8, ble det oppnådd god beskyttelse nær statistisk signifikans (til tross for det lave antall dyr anvendt) med 11-valente konjugater og

PhtD+dPly-kombinasjonen ($p < 0,12$, Fisher eksakt-test) sammenlignet med gruppen med kun adjuvans.

Eksempel 15. Innvirkning av konjugeringskjemi på anti-PhtD-antistoff-responsen og den beskyttende effektivitet mot en type 4-utfordring fremkalt med 22F-PhtD-konjugater

Grupper av 20 OF1-hunnmus ble immunisert intramuskulært på dagene 0 og 14 med 3 μg av enten 22F-PhtD (fremstilt ved direkte CDAP-kjemi) eller 22F-AH-PhtD (ADH-derivatisert PS) eller kun adjuvansen. Begge monovalente 22F-konjugater var laget ved prosessene ifølge eksempel 2 (se også tabell 1 og tabell 2). Hver formulering ble supplert med adjuvans C.

Anti-PhtD ELISA-IgG-nivåene ble målt i sera tappet på dag 27.

Musene ble tilført intranasalt $5,10^6$ cfu av type 4-pneumokokker på dag 28 (dvs. en pneumokokk-serotype ikke potensielt dekket av PS som var til stede i den testede vaksineformulering). Den induserte dødeligheten ble overvåket inntil dag 8 etter angrep.

22F-AH-PhtD fremkalte en signifikant høyere anti-PhtD IgG-respons og bedre beskyttelse mot type 4-angrep enn 22F-PhtD.

P A T E N T K R A V

1. Immunogenpreparat for småbarn,
karakterisert ved at det omfatter en multivalent *Streptococcus*
pneumoniae-vaksine omfattende 10 eller flere kapselsakkaridkonjugater fra
5 forskjellige serotyper omfattende konjugater av *S. pneumoniae* kapsulære
sakkarider 4, 6B, 9V, 14, 18C og 23F, hvor preparatet omfatter et serotype 22F
sakkaridkonjugat for anvendelse i behandling eller forebygging av sykdom
forårsaket av *Streptococcus pneumoniae* infeksjon, hvor sykdommen er minst en
av mellomørebetennelse, meningitt, bakteriemi, lungebetennelse eller konjunktivitt
10 hos spedbarn.
2. Immunogenpreparat ifølge kravene 1, hvor 2 forskjellige bærerproteiner er
separat konjugert til minst 2 forskjellige *S. pneumoniae*-kapselsakkarid-serotyper.
- 15 3. Immunogenpreparat ifølge hvilket som helst av kravene 1 eller 2,
hvor det omfatter 22F-kapselsakkarid konjugert til bærerproteinet via en linker.
4. Immunogenpreparat ifølge krav 3, hvor linkeren er adipinsyre dihydrazid
(ADH).
20
5. Immunogenpreparat ifølge krav 3 eller 4, hvor linkeren er knyttet til
bærerproteinet ved karbodiimid-kjemi.
6. Immunogenpreparat ifølge hvilket som helst av kravene 3-5,
25 hvor 22F-sakkaridet er konjugert til bærerproteinet eller til linkeren ved
anvendelse av 1-cyano-4-dimetylamino pyridinium tetrafluoroboronat (CDAP)
kjemi.
7. Immunogenpreparat ifølge hvilket som helst av kravene 1-6, hvor det
30 omfatter et 22F-sakkarid-konjugat, hvor forholdet mellom bærerprotein og 22F-
sakkarid er mellom 5:1 og 1:5, 4:1 og 1:1 eller 2:1 og 1:1 (på vektbasis).
8. Immunogenpreparat ifølge hvilket som helst av kravene 1-7,

omfattende et 22F-sakkarid-konjugat, hvor den gjennomsnittlige størrelse (f.eks. M_w) av 22F-sakkaridet er over 100 kDa.

9. Immunogenpreparat ifølge hvilket som helst av kravene 1-8,
5 videre omfatter ett eller flere ukonjugerte eller konjugerte *S. pneumoniae*-proteiner.

10. Immunogenpreparat ifølge krav 9, hvor det ene eller flere *S. pneumoniae*-
proteiner er valgt fra polyhistidintriade-familien (PhtX), kolinbindende protein-
familien (CbpX), trunkerte CbpX-proteiner, LytX-familien, trunkerte LytX-proteiner,
10 kimæriske trunkerte CbpX - trunkerte LytX-proteiner, detoksifisert pneumolysin
(Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 og Sp133.

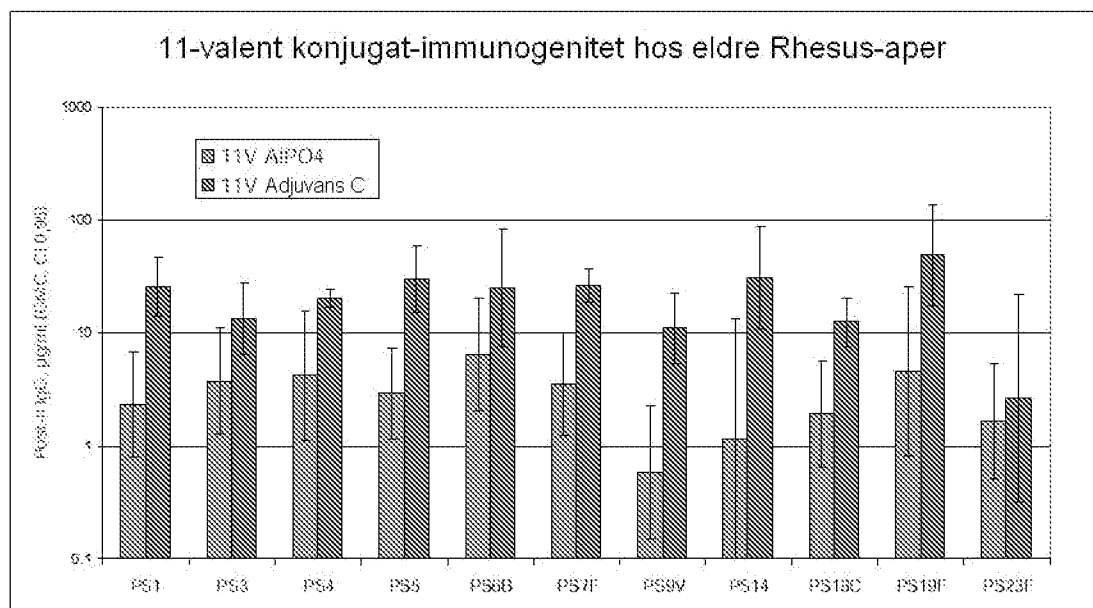
11. Immunogenpreparat ifølge hvilket som helst av kravene 1-10,
videre omfatter en adjuvans.

15

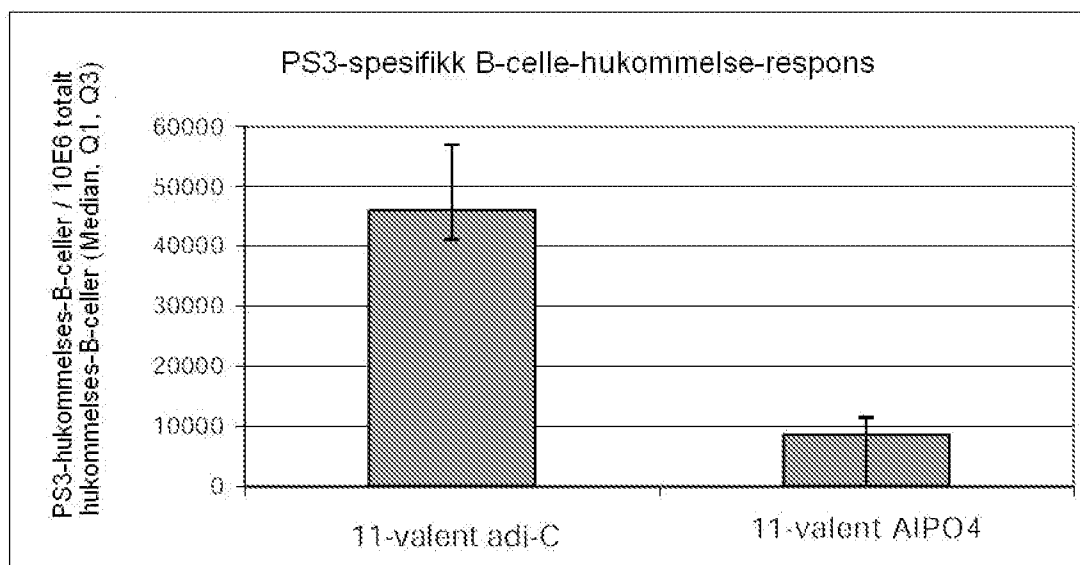
12. Fremgangsmåte for fremstilling av en vaksine omfattende å blande det
immunogene preparatet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11 med et
farmasøytisk akseptabel hjelpestoff.

- 20 13. Immunogenpreparat ifølge et av kravene 1 til 11 for behandling av
infeksjoner forårsaket av *S. pneumoniae*.

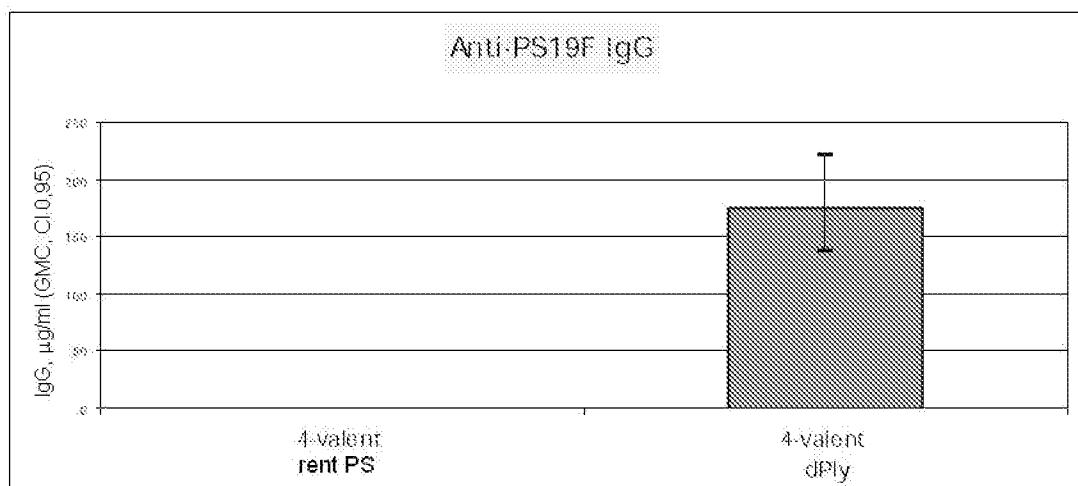
14. Anvendelse av preparatet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11 ved
fremstilling av et medikament for behandling av infeksjoner forårsaket av
25 *Streptococcus pneumoniae*.



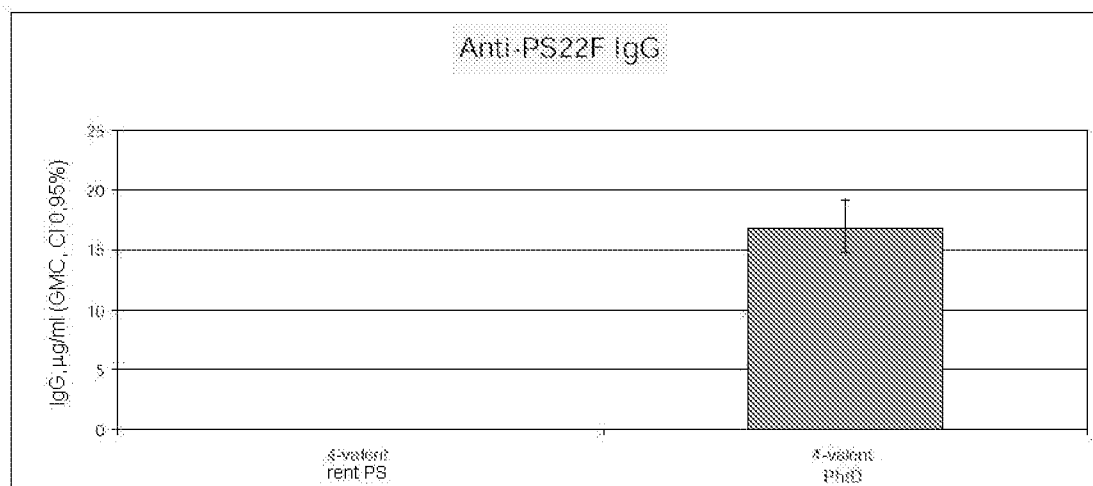
Figur 1. Konjugat-immunogenitet hos eldre Rhesus-aper (post-II anti-PS-IgG-nivåer)



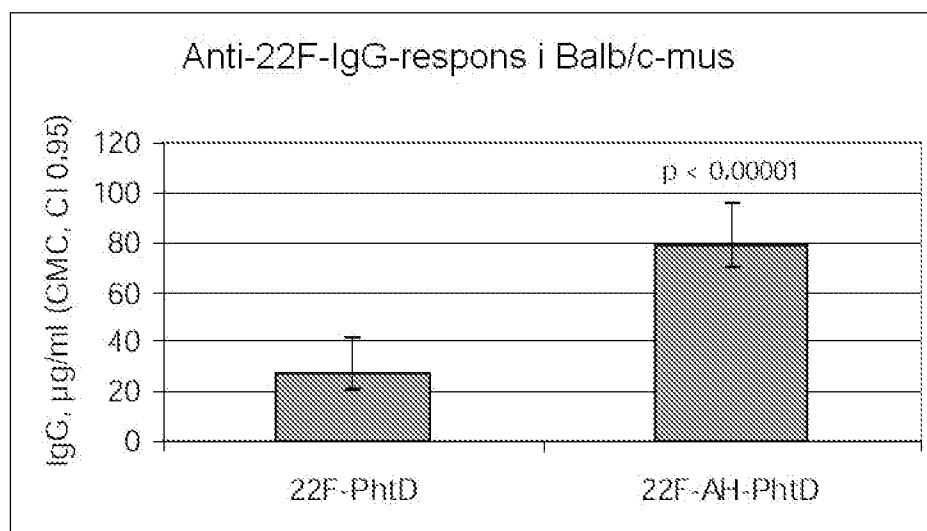
Figur 2. Konjugat-immunogenitet hos eldre Rhesus-aper (post-II-anti-PS3-hukommelses-B-cellehyppigheter)



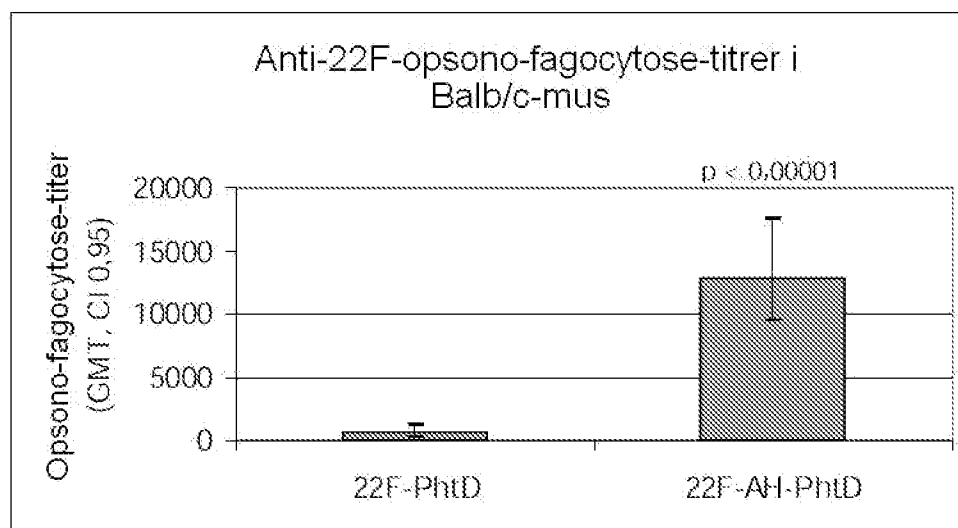
Figur 3. PS19F-immunogenitet i Balb/c-mus (post-III-IgG-nivåer)



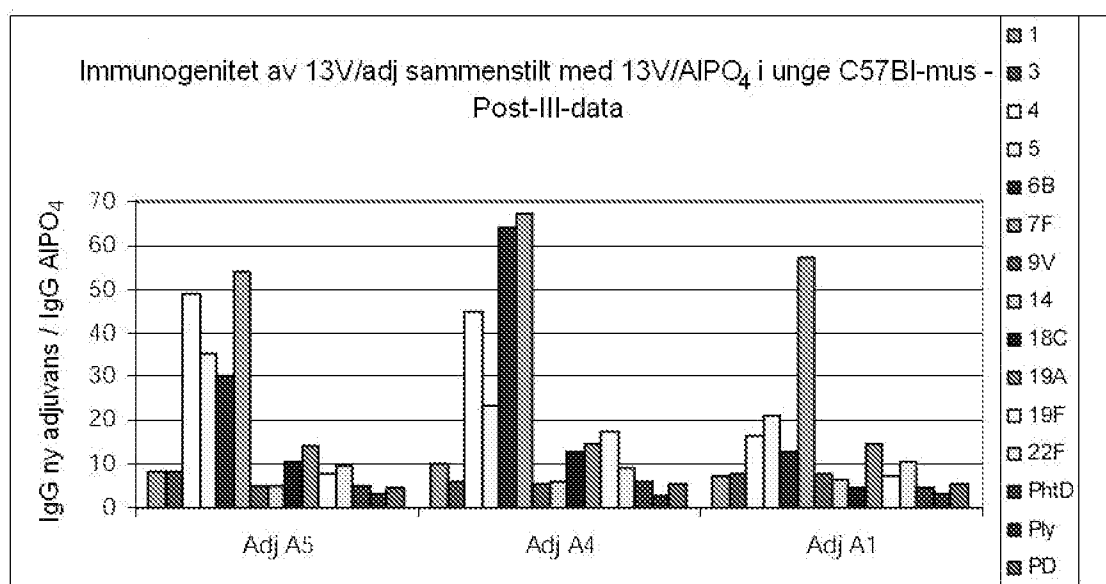
Figur 4. PS22F-immunogenitet i Balb/c-mus (post-III-IgG-nivåer)



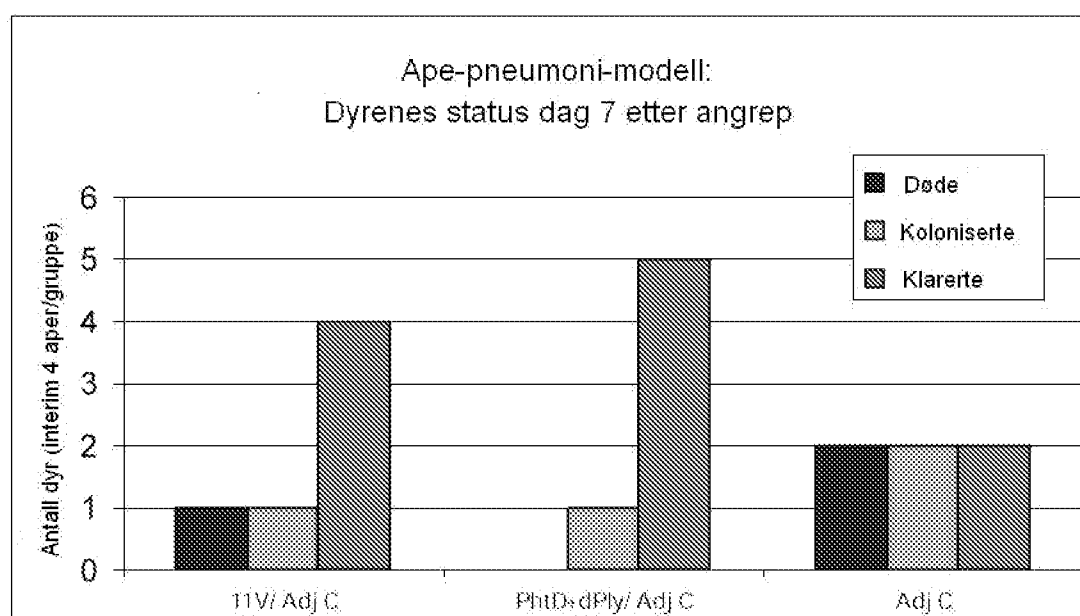
Figur 5. Serum-anti-PS-IgG-antistoffnivåer



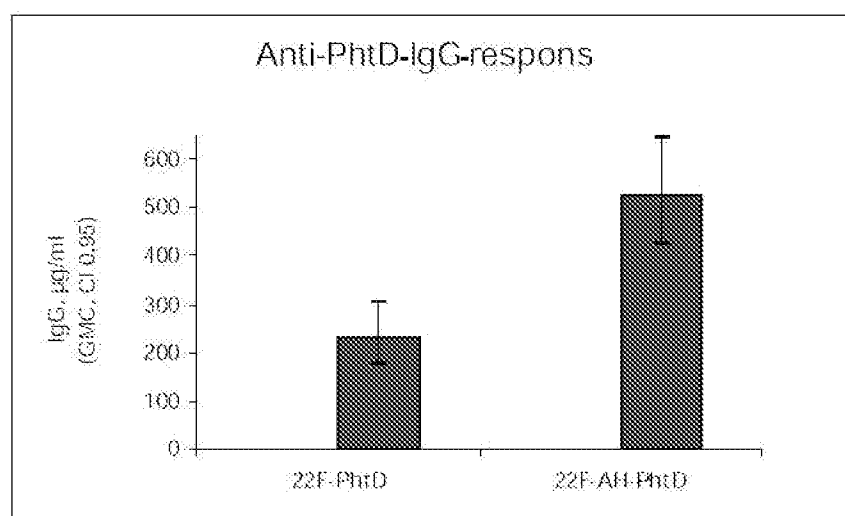
Figur 6. Opsono-fagocytose-titrer



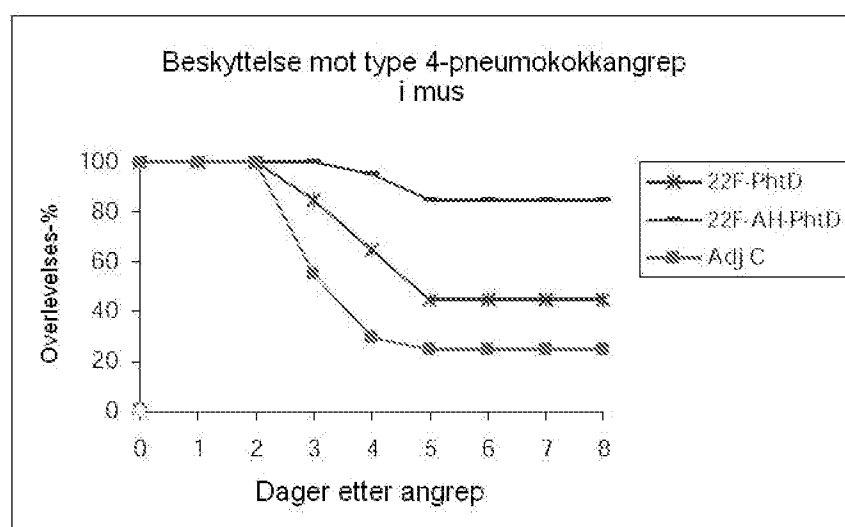
Figur 7. Sammenlikning av IgG-responser fremkalt med nye adjuvantia med responsen fremkalt med AIPO₄



Figur 8. Beskyttende virkning av PhtD + dPly-protein-kombinasjon overfor type 19F-lungekolonisering i Rhesus-aper



Figur 9. Serum-anti-PhtD-IgG-respons



Figur 10
Beskyttelse mot type 4-pneumokokkangrep i mus