



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: A 61 K 39/385 A 61 K 39/02

(21) Patentansøgning nr: PA 1988 00025

(22) Indleveringsdag: 1988-01-05

(24) Løbedag: 1987-05-01

(41) Alm. tilgængelig: 1988-01-05

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-11-08

(86) International ansøgning nr: PCT/US87/01020

(86) International indleveringsdag: 1987-05-01

(85) Videreførelsesdag: 1988-01-05

(30) Prioritet: 1986-05-05 US 859975

(73) Patenthaver: The University of Rochester, Rochester, New York 14627, USA

(72) Opfinder: Porter W. Anderson, 40 Alpine Street, Rochester, N.Y. 14620, USA
Ronald John Eby, 297 West Squire Drive, Rochester, N.Y. 14623, USA

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark

(54) Benævnelse: Immunogent konjugat og fremstilling deraf samt vaccine indeholdende dette og fremgangsmåde til fremstilling af et kapselpolymerfragment

(56) Fremdragne publikationer:

WO A1 8601228

US A 4356170

US A 4496538

Arch. Biochem. Biophys, bd. 181, 1977, side 542-549

Chem. Abs., bd. 103, 1985, nr. 86144e

Infect. and Immun., bd. 39, nr. 1, 1983, side 233-238

Progress in Allergy, bd. 33, 1983, side 144-158

J. Immun., bd. 127, nr. 3, 1981, side 1011-1017

(57) Sammendrag:

Immunogent konjugat, som omfatter det reductive amineringsprodukt af et kapselpolymerfragment med mindst 2 carbonylgrupper og afledt af den kapselpolymer af et bakterielt patogen, og et bakterie-toxin eller -toxoid, kan anvendes til vaccinering af børn.

V. fremstillingen sker den reductive aminering i nærværelse af cyanoborhydridioner.

Den foreliggende opfindelse angår immunogene konjugater som angivet i krav 1-22, krav 23-41, 42 og 43-46, en fremgangsmåde til fremstilling af et immunogent konjugat som angivet i krav 47-69, en vaccine som angivet i krav 70
5 samt en fremgangsmåde til fremstilling af et kapselpolymerfragment som angivet i krav 71. Vaccinen kan anvendes til immunisering af unge varmblodede dyr, herunder mennesker, mod infektioner og sygdom forårsaget af bakterier, herunder eksempelvis *Haemophilus influenzae* type b, *Escherichia coli*,
10 *Neisseria meningitidis* serogrupperne A og C, *Streptococcus pneumoniae* serotyperne 3, 6, 12, 14, 19, 23 og 51 og *Pseudomonas*.

Det er kendt, at rensede bakterielle kapselpolymere (capsular polymers, CP) almindeligvis er immunogene hos
15 voksne mennesker og dyr og kan anvendes som vacciner mod de tilsvarende systemiske infektioner. Som udtrykket "kapselpolymere" anvendes i denne beskrivelse, refererer det til sukkerholdige polymere, såsom polymere af sukkerarter, sukker-syrer, aminosukkerarter, polyvalente alkoholer og sukkerphosphater, og vedrører ikke aminosyreholdige polymere. Disse
20 "kapselpolymere" omtales ofte i den medicinske litteratur som "kapselpolysaccharider", skønt de kan indeholde andre end glycosidiske bindinger og andre konstituentter end sukkerarter, såsom de, der er angivet ovenfor.

25 Kapselpolymererne af forskellige bakterier varierer meget med hensyn til immunogenicitet i menneskets første leveår. Nogle er moderat aktive, såsom *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 og *Neisseria meningitidis* serogruppe A. Modtageligheden for systemisk infektion med indkapslede bakterier er større i det første leveår. Den immunogene reaktion
30 over for mange bakterielle kapselpolymere hos børn er afhængig af alderen, dvs. at immunfunktionen mod CP øges til voksen-niveau ved omkring 6 års alderen.

Blandt de inaktive CP er *Haemophilus influenzae*
35 type b, *Streptococcus pneumoniae*, serotyperne 6 og 12, og *Neisseria meningitidis* serogruppe C. Eksempler på CP'er,

som giver en intermediær reaktion hos børn, er *Streptococcus pneumoniae* serotyperne 19 og 51.

Der er blevet isoleret og rensset intakte kapselpoly-
mere, der kan være anvendelige i eller som vacciner. Eksem-
5 pelvis er der i US-patentskrift nr. 4.220.717 beskrevet en
fremgangsmåde til isolering og rensning af immunologisk
aktivt polyribosyl-ribitol-phosphat (PRP) fra kapselpolymeren
af *H. influenzae* b. Desuden angår US-patentskrift nr.
4.210.641 polysaccharidekstrakter af *H. influenzae* med en
10 tilsyneladende molekylvægt, der er større end 200.000 dalton,
og først og fremmest sammensat af galactose, glucose og
mannose, og som indeholder en lille mængde osaminer.

Man har anvendt disse og andre intakte kapselpolymere
til formuleringer til opnåelse af bedre immunologiske reak-
15 tioner. Eksempelvis kendes der fra US-patentskrift nr.
4.196.192 en vaccine indeholdende rensset intakt PRP og hele
Bordetella pertussis-bakterier. Denne fremgangsmåde til at
øge immunogeniciteten resulterer i forøgede niveauer af
anti-PRP og anti-pertussis-antistoffer hos unge pattedyr.

20 Man har undersøgt konjugation af kapselpolymere til
bærerproteiner i et forsøg på at forøge antistofdannelse
ved hjælp af den såkaldte "bærervirkning". Eksempelvis be-
skriver Schneerson et al., J. Exper. Med. 152, 361-376
(1980), *H. influenzae* b-polymer-proteinkonjugater, der er
25 kendt for at tilføre immunitet mod angribende sygdomme,
forårsaget af *H. influenzae* b. I referencen dokumenteres
den alders-relaterede immunologiske adfærd af kapselpolymere
hos børn, og man forsøger at overvinde denne aldersafhæn-
gighed ved konjugering af den intakte kapselpolymere med
30 mange forskellige proteiner, herunder serumalbuminer, *Limulus*
polyphemus hæmocytein og difteritoxin. Fremgangsmåden til
konjugering indebærer anvendelsen af et bindingsmiddel,
såsom adipin-dihydrazid.

Geyer et al., Med. Microbiol. Immunol. 165, 171-288
35 (1979), fremstiller konjugater af visse *Klebsiella pneumo-*
niae-kapselpolysaccharidfragmenter og et nitrophenylethyl-

aminbindingsmiddel ved reduktiv aminering, og det derivatiserede sukker blev derpå bundet til proteinerne ved anvendelse af azo-kobling.

I både WO 86/01228 og US patentskrift nr. 4.673.574
5 beskrives et immunogent konjugat, som omfatter det reduktive
amineringsprodukt af et immunogent kapselpolymerfragment
med en reducerende ende afledt fra den bakterielle kapsel-
polymer af et bakteriepatogen, og et bakterietoxin eller
-toxoid. Infect & Immun (1983), 39(1), 233-238, beskriver
10 oligosaccharider fremstillet ud fra Haemophilus influenzae
type b-kapselpolysaccharid og konjugeret til CRM 197 ved
reduktiv aminering. I J. Clin. Invest. (1985), 76(1), 52-
59, beskrives det, at Haemophilus influenzae type b-kapsel-
polysaccharid hydrolyseres selektivt til reducerende oligo-
15 saccharider, og fraktioner indeholdende 3-10 ribosyl-ribo-
tolphosphat-gentagelsesenheder konjugeres ved reduktiv amine-
ring til difteritoxin, dets ikke-toksiske derivat CRM 197
eller difteritoxoid.

US patentskrift nr. 4.356.170 og J. Immunol. 127(3),
20 1011-1018 (1981) angår begge det samme emne. Begge dokumenter
beskriver antigene konjugater, hvori en intakt kapselpolymer
med en molekylvægt over 2000 dalton er bundet via en ter-
minalt indført aldehydgruppe, til en aminogruppe af tetanus-
toxoid gennem reduktiv aminering. Man drager omsorg for at
25 undgå fragmentering af den intakte kapselpolymer, som anven-
des til fremstilling af de antigene konjugater. Fremgangs-
måden til kovalent binding angives at være specifik derved,
at den eneste kovalente forbindelse mellem toxoidet og kap-
selpolysaccharidet finder sted ved den terminalt lokaliserede
30 aldehydgruppe i polysaccharidet (se f.eks. J. Immunol.
127(3), 1011-1018 (1981) på side 1011, spalte 2, linie 3-6
og på side 1012, spalte 1, linie 34-44). Det hævdes endvidere
i de nævnte referencer, at det "monofunktionelle gruppe-til-
tag" til kobling anvender "undgåelse af tværbinding" mellem
35 polysaccharidet og proteinerne (se f.eks. eksempel, id,
linie 42).

Den foreliggende opfindelse angår den kovalente binding af kapselpolymerfragmenter, afledt af bakterielle kapselpolymerer, til bakterietoxiner eller -toxoider ved hjælp af reduktiv aminering. Som udtrykket "toxoid" anvendes i
5 den foreliggende beskrivelse, betyder det en form for toxin, som har toxinets antigene virkning, men ikke dets toksiske.

De her omhandlede immunogene konjugater fremstilles ved først at danne reducerende terminale grupper på fragmenter af de kapselpolymerer og omsætte disse med aminogrupper i det bakterielle toxin eller toxoid ved hjælp af reduktiv aminering. De reducerende terminale grupper kan dannes
10 ved hjælp af en hvilken som helst egnet fremgangsmåde, herunder selektiv hydrolyse, eksempelvis ved hjælp af syrer eller enzymer, eller ved hjælp af oxidativ spaltning, eksempelvis ved hjælp af periodat eller beslægtede oxygensyrer.
15

Konjugationen opnås fortrinsvis ved hjælp af reduktiv aminering i en vandig opløsning indeholdende cyanoborhydrid-anioner.

De immunogene konjugater ifølge opfindelsen kan formuleres med et farmaceutisk acceptabelt bærerstof til fremstilling af en vaccine, som frembringer virkningsfulde niveauer af anti-kapsel-antistof-dannelse hos unge pattedyr, herunder mennesker. Vaccinen kan anvendes til at fremkalde aktiv immunisering mod systemisk infektion hos unge pattedyr,
20 forårsaget af de respektive indkapslede bakterier, ved at indgive en immunogen mængde af konjugatet til pattedyret.

De immunogene konjugater har vist sig at være mindre aldersafhængige end kapselpolymererne alene, og er anvendelige til den aktive immunisering af særdeles unge varmblodede
30 dyr mod systemiske infektioner af de respektive indkapslede bakterier.

Endvidere indeholder de her omhandlede immunogene konjugater ikke potentielt toksiske bindingsmidler, såsom adipinsyre-dihydrazid eller p-nitro-phenyl-ethylamin, som er
35 blevet anvendt til at konjugere carbonhydrat til protein.

Endelig indeholder de her omhandlede immunogene konjugater fragmenter af kapselpolymerer, ikke intakte kapselpolymerer. Den særdeles repetitive struktur af kapselpolymerer kan til dels være ansvarlig for deres svigt med hensyn
5 til at udvide kapaciteten for antistofproduktion hos børn. Et konjugat af en intakt (højpolymeriseret) CP og protein kan kun delvis overvinde de immunologiske ulemper ved CP alene.

På den anden side kan man ved anvendelsen af kapselpolymerfragmenter på en bærer omgå ulemperne ved den repetitive struktur. Endvidere er CP-determinanterne af et konjugat med CP-fragmenter i gennemsnit tættere på bæreren end CP-determinanterne i konjugater med intakt CP, og denne
10 nærhed til bærerstoffet kan være nødvendig til en mere effektiv "bærervirkning".
15

En yderligere fordel ligger i til proteinbærerstoffet at anvende et bakterietoxin eller -toxoid, mod hvilket børn rutinemæssigt vaccineres, eksempelvis stivkrampe eller difteri. Ønsket immunitet over for toxinet eller toxoidet
20 fremkaldes sammen med immunitet mod de patogener, der er knyttet til kapselpolymeren.

Det forstås, at henvisning i denne beskrivelse til enhver teori til forklaring af de beskrevne resultater ikke skal begrænse opfindelsens omfang. Uafhængigt af den fremgangsmåde, ved hjælp af hvilken opfindelsen fungerer, kan
25 man opnå de i den foreliggende beskrivelse beskrevne resultater og fordele ved henvisning til den følgende detaljerede beskrivelse.

De her omhandlede konjugater dannes ved at omsætte
30 reducerende terminale grupper af kapselpolymerfragmentet med primære aminogrupeer af et bakterietoxin eller -toxoid, hvorved man får antigene determinanter af kapselpolymeren, kovalent bundet til bærerproteinet. De reducerende grupper kan dannes ved selektiv hydrolyse eller specifik oxidativ
35 spaltning eller kombinationer af begge fremgangsmåder.

- Antigene fragmenter med mindst én reducerende ende kan dannes ud fra kapselpolymere ved mange fremgangsmåder, afhængigt af de strukturelle særpræg hos den bestemte kapselpolymere. Begrænset oxidativ spaltning ved hjælp af periodat (eller beslægtede reagenser, såsom paraperiodsyre, natriummetaperiodat og kaliummetaperiodat) efterlader aldehydiske terminaler. En sådan fremgangsmåde vil være begrænset til polymere med nabostillede dihydroxygrupper. Ved hydrolyse af en glycosidisk binding fås en reducerende sukkerterminal.
- 10 En sådan hydrolyse kan mest specifikt udføres enzymatisk ved hjælp af glycosidaser, men denne anvendelse vil være begrænset til relativt få kapselpolymere, eksempelvis *Streptococcus pneumoniae* 8, til hvilken der kendes glycosidaser. Sur hydrolyse anvendes almindeligvis til hydrolyse af glycosidiske bindinger.
- 15 Anvendeligheden af denne fremgangsmåde vil være begrænset, hvis den polymere indeholder syre-følsomme ikke-glycosidiske bindinger, eller hvis den polymere indeholder syre-følsomme forgreningsbindinger, som er vigtige for den antigene specificitet. Man kan også anvendes basehydrolyse, hvis polysaccharidet indeholder baselabile bindinger til det glycosidiske carbonatom, såsom phosphat-, sulfat- eller esterbindinger. Anvendeligheden af denne fremgangsmåde vil være begrænset, hvis den polymere indeholder andre basefølsomme ikke-glycosidiske bindinger.
- 20
- 25 Visse kapselpolymere kan mangle nabostillede hydroxygrupper, som er modtagelige for spaltning ved hjælp af periodat (eller beslægtede oxygensyrer). Imidlertid kan hydrolyse på forhånd af sådanne kapselpolymere med syre, base eller enzym generelt frigøre nabostillede dihydroxygrupper,
- 30 som generelt vil være modtagelige over for oxidativ spaltning. Eksempelvis kan fjernelse af eksempelvis pyrodruesyre, acetater og formiater ved hjælp af sur hydrolyse, eller fjernelse af sialsyre ved hjælp af enzymspaltning, ske forud for det oxidative spaltningstrin. Dette vil naturligvis være
- 35 begrænset i anvendelse til de kapselpolymere, hvori de modificerede grupper ikke er vigtige for antigen specificitet.

Når kapselpolymererne hydrolyseres til dannelse af kapselpolymerfragmenter med kun en funktionel aldehydgruppe, resulterer konjugering til et multifunktionelt protein (med mindst to frie aminogrupeer) i et konjugat, hvori der til et enkelt proteinmolekyle covalent er bundet et eller flere kapselpolymerfragmenter. Det fremgår, at antallet af kapselpolymerfragmenter, bundet til proteinet, rutinemæssigt kan styres ved at ændre konjugationsreaktionsbetingelserne, herunder den relative koncentration af kapselpolymerfragmenter i forhold til proteiner og den totale koncentration af reaktanterne. Naturligvis vil styring af hvilken som helst omsætningsparameter, eksempelvis tid, temperatur og pH-værdi, som påvirker reaktiviteten eller omsætningshastigheden, ændre slutsammensætningen og strukturen af konjugatet.

Når kapselpolymerfragmentet har mindst én funktionel aldehydgruppe anbragt på hver ende af fragmentet (eksempelvis som resultat af oxidativ spaltning af nabostillede dihydroxygrupper af en ikke-cyklisk rest), kan konjugering til et multifunktionelt protein resultere i adskillige typer af konjugat. Eksempelvis er der ved konjugering af sådanne reaktanter mulighed for at danne et gitter eller netværk, især, når der er mange frie aminer på proteinet, og kapselfragmenterne foreligger i et lille molært overskud i forhold til protein. Graden af tværbinding og den totale størrelse af netværket eller gitteret kan reguleres ved hjælp af rutinevariation af konjugeringsreaktionsbetingelserne.

Konjugeringen udføres i overensstemmelse med den reductive amineringsfremgangsmåde ifølge Schwartz og Gray, Arch. Biochem. Biophys. 181:542-549 (1977). I korthed indebærer fremgangsmåden, at man omsætter det reducerende kapselpolymerfragment og bakterietoxid eller -toxoid i nærværelse af cyanoborhydridioner eller et andet reduceringsmiddel, som ikke reducerer de reducerende ender af interesse eller påvirker toxinet eller toxoidet eller kapselpolymeren skadeligt.

Cyanoborhydraterne (eller ækvivalenterne dertil) virker først og fremmest som et mildt selektivt reduktionsmiddel af det Schiff-base-mellemprodukt, der dannes mellem carbonylgrupperne i kapselpolymerfragmentet og aminogrupperne i proteinet. En anden virkning af sådanne ioner er den langsomme reduktion af hvilke som helst aktive aldehydgrupper, der bliver tilbage på kapselpolymerfragmenterne, efter at der er sket konjugering. Eventuelt kan man efter konjugering tilsætte yderligere cyanoborhydrater (eller ækvivalenter dertil) til reduktion af sådanne uomsatte frie aldehydgrupper. Det er ofte ønskeligt at tilsætte det stærkere reducerende middel, borhydridion, efter konjugering for at sikre passende reduktion af de tilbageblevne carbonylgrupper.

Til forskel fra tidligere anvendte konjugeringsfremgangsmåder, hvori de aktive molekyler er forenede ved hjælp af et bindingsmiddel, som danner en del af slutproduktet, er de i den foreliggende beskrivelse anvendte reducerende anioner således ikke inkorporerede i slutproduktet. Det er vigtigt ud fra et synspunkt med hensyn til at kontrollere den potentielle toxicitet, (dvs. uønsket immunogenicitet) af slutproduktet. Tegn på kovalent binding påvises af det faktum, at bindingen mellem eksempelvis en PRP-del og bærerproteinet varer ved på trods af udsaltning af proteinet i nærværelse af 8 M urinstof-opløsning, hvilket har en stor evne til at opløse ikke-kovalente bindinger.

Egnede bærerproteiner er proteiner, som er ufarlige til indgift til unge pattedyr og immunologisk virkningsfulde som bærerstoffer. Sikkerheden omfatter fravær af primær toxicitet og minimal risiko for allergiske komplikationer. Difteri- og stivkrampetoxoider opfylder disse betingelser, dvs. at de passende tilberedt er ikke-toxiske, og forekomsten af allergiske reaktioner er veldokumenteret. Skønt risikoen for allergisk reaktion kan være relativt betydelig for voksne, er den minimal for børn.

Ved "bærervirkningen" bliver et svagt antigen ved at blive bundet til et stærkere antigen som bærerstof (eksem-

pelvis et heterologt protein) mere immunogent, end hvis det blev indgivet alene. Hvis et dyr tidligere er immuniseret med udelukkende bærerstoffet, kan det blive "forbehandlet" for en forstærket reaktion ikke kun mod bærerantigenet, men
5 også det tilknyttede svagere antigen. Børn immuniseres rutinemæssigt med tetanus- og difteri-toxoider. De ville således blive forbehandlet til senere indgift af et kapselpolymerantigen, konjugeret til et hvilket som helst af disse toxoider.

Alment kan et hvilket som helst heterologt protein
10 tjene som et bærerantigen. Visse bakterietoxiner, såsom stivkrampe og difteri, kan imidlertid have en vis fordel ved, at de er sammensat af to dele, af hvilke den ene ("bindings"-underenheden) har en stærk affinitet til binding til pattedyrcelleoverflader. Det er tænkeligt, at konjugering
15 til et sådant "bindings"-protein ville tillade det bærede antigen mere effektivt at starte reaktioner i immunsystemets celler.

Bærerproteinerne, hvortil kapselpolymeren er konjugeret, kan være nativt toxin eller detoxificeret toxin
20 (toxoid). Ved hjælp af relativt ny mutationsteknik kan man ligeledes fremstille genetisk ændrede proteiner, som antigenetisk ligner toxinet, men ikke er toksisk. De kaldes "krydsreagerende materialer" eller CRM'er. CRM₁₉₇ er bemærkelsesværdigt, eftersom det har en enkelt aminosyreændring i forhold til det native difteritoxin og immunologisk ikke kan
25 skelnes fra dette.

Der er deponeret en kultur af *Corynebacterium diphtheria* af stammen C7 (B197), som producerer CRM₁₉₇ protein, i American Type Culture Collection, Rockville, Maryland,
30 USA, og som har fået tildelt accessionsnummeret ATCC 53281.

Konjugering af kapselpolymere til nativt toxin kan nedsætte toxiciteten, men der kan restere betydelig toxicitet. Således ville der kræves yderligere detoxifikation. Ved
gængs detoxifikation af proteintoxiner anvendes der formalin,
35 som reagerer med frie aminogruupper i proteinet. Resttoxicitet kan stadig give anledning til bekymring. Endvidere er spontan

gentoxifikation mulig med hvilken som helst bestemt batch vaccine, og det forbliver en genstand for bekymring med denne fremgangsmåde.

Alternativt kan man detoxificere nativt toxin med formalin til fremstilling af gængs toxoid før konjugering til kapselpolymeren. Imidlertid reducerer den forudgående formalinbehandling antallet af frie aminogru-
5 perer, som er tilgængelige til omsætning med de reducerende grupper i kapselpolymerfragmentet. Der er således tydelige fordele ved CRM'er ved, at de ikke har nogen iboende toxicitet, selv om
10 ingen af deres aminogru- perer er besat af formalinet. En yderligere fordel er, at der ikke findes nogle biologiske risici ved arbejde med CRM'er.

I tilfældet med CRM₁₉₇, som er immunologisk identisk med nativt toxin, forstærker behandling med formalin (skønt
15 der ikke er noget behov for at detoxificere) den immunologiske reaktion kraftigt. Det menes, at dette skyldes stabilisering af molekylet over for nedbrydning ved hjælp af mekanismer i legemet og/eller aggregering med tværbinding (immunogenicitet af partikler stiger med størrelsen).
20

Af alle de ovennævnte årsager er stivkrampe- og difteritoxiner de vigtigste kandidater til bærerstofproteiner, selv om der er andre, som også kan være egnede. Skønt disse andre muligvis ikke har den sikkerhedsforhistorie, der fore-
25 kommer hos difteri og stivkrampe, kan der være andre overvældende årsager til at anvende dem. Eksempelvis kan de være endog mere effektive som bærere, eller produktionsbesparelserne kan være signifikante. Andre kandidater som bærere omfatter toxiner eller toxoider af pseudomonas, staphylococcus,
30 streptococcus, pertussis og enterotoxigene bakterier, herunder Escherichia coli.

Egnede bærermedier til formulering af en vaccine omfatter natriumphosphatpufret saltvand (pH-værdi = 7,4) eller 0,125 M aluminiumphosphatgel, suspenderet i natrium-
35 phosphatpufret saltvand med en pH-værdi, som er lig med 6,

og andre gængse medier. Andre farmaceutiske bærere, der er egnede til anvendelse i vacciner, tilhører teknikkens stade.

Almindeligvis er vacciner ifølge opfindelsen, der indeholder fra ca. 5 til ca. 100 μ g, fortrinsvis fra ca. 10
5 til ca. 50 μ g, egnede til at frembringe effektive antistof-niveauer mod kapselpolymeren i unge varmblodede pattedyr. Naturligvis vil den nøjagtige dosis blive bestemt ved hjælp af rutinedosis-/reaktionsforsøg. Adskillige små doser, indgivet i rækkefølge, forventes at være overlegne i forhold
10 til den samme mængde konjugat, indgivet som en enkelt injektion.

De her omhandlede vacciner kan indgives ved hjælp af injektion til varmblodede pattedyr i en hvilken som helst alder og er specielt tilpasset til at fremkalde aktiv im-
15 munisering mod systemiske infektioner i unge pattedyr, forårsaget af patogenerne Haemophilus influenzae type b, Escherichia coli, Pneumococcus, Meningococcus, Streptococcus og Pseudomonas.

I det følgende er der angivet et ikke-begrænsende
20 eksempel på en fremgangsmåde til fremstilling af typiske eksempler på immunogene konjugater ifølge opfindelsen og deres anvendelse i vacciner.

Eksempel: Konjugering af PRP-fragmenter, frem-
25 stillet ved oxidativ spaltning, og CRM₁₉₇

I dette eksempel omfatter slutkonjugatet to komponenter: Fragmenter af PRP af rimeligt veldefineret kædelængde, covalent bundet til det ikke-toksiske, immunogene
30 difteri-toxin CRM₁₉₇. I dette eksempel styrer betingelserne ved periodatoxideringen og isoleringen ved ultrafiltrering kædelængden af kapselpolymer-(PRP)-fragmenterne.

Konjugatet opbygges med kapselpolymerfragmenter med en aldehydgruppe i begge ender af fragmentet. Således kan
35 hvert fragment covalent bindes til CRM ved begge ender, formodentlig ved CRM-lysingrupper. Strukturen af produktet kan derfor betragtes som værende et "gitter".

Sammensætningen og formodentlig strukturen af konjugatet kan ændres ved at ændre koncentrationen af de to komponenter i den konjugerende kemiske reaktion.

PRP, der anvendes til at fremstille PRP-fragmenterne
5 til PRP-CRM-konjugatvaccinen, har de følgende specifikationer:

	Proteinindhold	<1,0%
	Nucleinsyreindhold	≤1,0%
	Endotoxin (LAL)	<1,0 EU/μg PRP
10	Molekylstørrelse (Kd)	<0,3 (Sephacrose CL-48)
		<0,6 (---"-----"---28)

Fremgangsmåder til fremstilling af PRP-fragmenter

- a. En opløsning af PRP (5-7 mg/ml) afkøles til 4°C, og der tilsættes 2 M fosfatpuffer med en pH-værdi på
15 7,0 for at gøre slutkoncentrationen 0,2 M med hensyn til fosfat.
- b. Natriummetaperiodat (0,2-0,3 mol IO₄/mol PRP) tilsættes under hurtig omrøring, og opløsningen inkuberes ved 4°C natten over i mørke.
- 20 c. Reaktionsopløsningen ultrafiltreres under anvendelse af en H1P30 hulfiber (Amicon, molvægtsafskæring-30.000). Det tilbageholdte materiale vaskes fire gange med 250 ml saltvand. Filtraterne forenes og ultrafiltreres under anvendelse af en H1P10 hulfiber
25 (Amicon, molvægtsafskæring 10.000). Det tilbageholdte materiale vaskes fire gange med 250 ml saltvand. Det tilbageholdte materiale koncentrerer derpå til >35 mg på PRP/ml.
- d. Det tilbageholdte materiale analyseres for ribose
30 ved hjælp af orcinolanalyse, og reducerende grupper ved hjælp af basiske ferricyanidanalyse. En lille portion af det tilbageholdte materiale analyseres på en Biogel P-100 søjle (0,7 cm x 25 cm) under anvendelse af en 0,15 M natriumchlorid-opløsning som elueringsmiddel, og idet man analyserer hver af fraktionerne ved hjælp af orcinol og den basiske fer-
35

ricyanidanalyse. Analysen viser, at det tilbageholdte materiale er sammensat af oligosaccharider med en DP, der ligger mellem 15 og 30, idet den vægtgennemsnitlige DP ligger på ca. 20.

- 5 For kapselpolymerfragmenter, fremstillet ved oxidativ spaltning, er kædelængden (DP) defineret som (riboseenheder/-reducerende grupper) x 2.

To portioner periodat-oxideret PRP fraktioneres som i del d og karakteriseres som følger:

10

Saccharidkædelængde

<u>Fraktion nr.</u>	<u>DP af fraktion</u>		<u>% af det hele</u>		
	<u>Batch nr. 2</u>	<u>Batch nr. 3</u>	<u>Batch nr. 2</u>	<u>Batch nr. 3</u>	
15	14	36,5	41,0	12,7	5,9
	15	24,1	32,5	11,0	9,4
	16	25,3	24,5	13,2	11,8
	17	25,4	22,8	14,4	14,3
	18	23,2	20,2	13,6	14,6
20	19	20,2	19,0	11,9	14,2
	20	20,4	17,7	9,3	12,4
	21	16,1	16,0	6,7	10,0
	22	11,7	12,3	7,2	7,1

25

CRM-PRP Konjugering

- a. CRM-protein opløses i 0,2 M natriumphosphatpuffer (pH-værdi = 7,0) til en slutkoncentration på 10 mg/ml.
- b. Lyofiliseret oligosaccharid rekonstitueres i destilleret vand, der sættes en passende mængde (gennemsnits DP på 20) til CRM-proteinet, og opløsningen blandes.
- 30 c. Der tilsættes natriumcyanoborhydrid (0,5 g/ml) (10 gange molært overskud), og opløsningen blandes og inkuberes ved 37°C i 3 dage.

35

- d. Der tilsættes natriumborhydridopløsning (100 x de reducerende grupper), og opløsningen tillades at henstå ved stuetemperatur i 2 timer.
- e. Konjugatet destilleres 10 gange med 6 M urinstof--opløsning til opløsning af hvilket som helst præcipitat, og opløsningen ultrafiltreres under anvendelse af en Amicon omrørt celle med en YM-30 membran (molekylvægtsafskæring 30.000).
- f. Opløsningen ultrafiltreres gentagne gange under anvendelse af sterilt saltvand, indtil filtratet er negativt med hensyn til pentose og cyanidion.

Egenskaber af slutkonjugaterne

I tabel 1 er angivet forskellige egenskaber for PRP-CRM₁₉₇-konjugaterne fra forskellige portioner oxideret PRP og portioner, der er et resultat af adskillige konjugeringsforsøg:

Tabel 1

Produkter af CRM-PRP konjugation

	Vaccine batch. nr.	PRP saccharid-batch	Forhold mellem PRP og CRM i reaktionsblandingen (µg/µg)	Forhold mellem PRP og CRM i slutkonjugat (µg/µg)	Kd* (sepharose CL-4B)
25	5	nr. 2	1,0	0,25	0,27
	6	nr. 2	2,0	0,62	0,31
	7	nr. 3	1,0	0,38	0,36
	8	nr. 3	2,0	0,57	0,44
30	9	nr. 6	1,0	0,60	0,48
	10	nr. 6	2,0	0,42	0,48
	11	nr. 7	1,0	0,27	0,30
	12	nr. 7	2,0	0,42	0,48

* Kd, ved hvilken 50% af materialet (protein) eluerer.

Påfyldning i flasker.

- a. CRM-PRP-konjugatet sterilfiltreres gennem et 0,8 og derpå et 0,22 μm filter til en tareret steril beholder.
- 5 b. En prøve fjernes aseptisk og analyseres for protein ved hjælp af Lowry-analysen.
- c. Rumfanget af filtreret materiale bestemmes ved at veje beholderen, og der beregnes et slutrumfang, hvorved man får 50 μg protein pr. ml.
- 10 d. Der tilsættes en mængde 1% Thimerosal i sterilt saltvand gennem et sterilt 0,22 μm filter, hvorved man får 0,01% Thimerosal i slutopløsningen.
- e. Vaccinen bringes op på slutrumfanget med sterilt saltvand, filtreret gennem et 0,22 μm filter.
- 15 f. Opløsningen blandes, og der tilsættes portionsvis 5,5 ml til sterile, pyrogen-frie 10 ml hætteglas (Wheaton, glas af type 1), som tilproppes (gråt butylgummi, Wheaton), forsegles og opbevares ved 2-8°C.

20

Slutdosis-formuleringer*

	Vaccine batch nr.	Protein ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PRP ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Kd**
25	5	50	12,5	0,27
	6	50	31,0	0,31
	7	50	19,0	0,36
	8	50	28,5	0,44
30	9	50	30,0	0,48
	10	50	21,0	0,48
	11	50	13,5	0,30
	12	50	21,0	0,48

35 * Alle formuleringer er tilberedt i 0,9% NaCl og 0,01% Thimerosal.

** Kd, ved hvilken 50% af materialet (protein) eluerer.

Afprøvning af in vitro-antigenicitet

Rækkefortyndinger af vaccine i PBS 0,05% Tween sættes in duplo til fordybninger i microtiterplader, på forhånd overtrukket med difteri-toxoid. Et forenet polyklonalt humant difteri-antitoxin-serum med høj titer eller et humant polyklonalt anti-PRP-serum sættes derpå til fordybningerne, og pladerne inkuberes ved 20°C i 24 timer. Antistofbinding bestemmes ved senere inkubering af fordybningerne med enzym-mærket anti-human immunglobulin, fulgt af inkubering i 60 minutter med enzymsubstratet og kvantificering af den optiske densitet. Disse resultater er angivet i tabel 2.

Tabel 2In vitro antigenicitet af PRP-CRM konjugat

Inhibering af binding af human polyclonal anti-difteri-toxoid og anti-PRP-antistoffer

20	<u>Ækvivalent inhibitor med hensyn til binding</u>		
	<u>Vaccine</u>	<u>Anti-PRP</u>	<u>Anti-DIP toxoid</u>
	PRP	(1)	-
	DY-Mass ^x	-	(1)
	nr. 5	1,5	87,0
25	nr. 6	1,1	57,0
	nr. 7	3,3	9,3
	nr. 8	2,9	8,0

^x difteri-toxoid leveret af Massachusetts Public Health Biologic Laboratories, batch Dcp 27.

Dataene i tabel 2 viser, at de forskellige portioner vaccine bibeholder in vitro-antigenicitet: De kan konkurrere med polyclonale antistoffer mod PRP og mod difteri-toxoid. Data viser ligeledes, at PRP-antigenet er relativt ekspon-

ret, medens difteri-toxoidepitoperne er mindre godt og ujævnt eksponerede.

Immunogenicitet hos dyr

a. Kaniner

5 I tabel 3 er opsummeret tre forsøg, hvori unge kaniner vaccineres i ugerne 0, 1 og 2 med 25 µg vaccine. Alle vacciner er immunogene og giver anti-PRP--reaktioner, der kan forstærkes, som bestemt ved ELISA-prøven. Der ses moderate anti-PRP-reaktioner selv
10 efter en enkelt injektion på 25 µg af den konjugerede vaccine.

b. Mus

De resultater, der fås ved vaccination af unge "Swiss Webster" mus fremkalder atter en anti-PRP-reaktion,
15 der kan forstærkes (data er ikke vist).

Tabel 3

Anti-PRP-reaktioner hos kaniner, der lige er vundet fra, overfor for forskellige batch'er
20 PRP-CRM konjugater

Vaccine batch nr.	Uge 0	Uge 1	Uge 3
	µg/ml (GMT)	µg/ml (GMT)	µg/ml (GMT)
25			
5	0,1	0,23	7,56
6	0,1	0,38	2,86
7	0,2	0,86	9,70
8	0,1	0,87	7,61
30			
9	0,1	0,36	3,88
10	0,1	0,92	1,84
11	0,1	0,21	5,01
12	0,1	0,31	2,33

Immunogenicitet hos børn

Børnene er raske og er ikke tidligere blevet immuniseret med Hib-vaccine og har heller ikke tidligere reageret kraftigt mod vacciner. Idet man begynder i den alder, der er angivet i tabel 4 (henholdsvis 18, 7 og 2 måneder), blev der udtaget blod fra dem, og de får som indgift en 25 μ g subcutan primær injektion af PRP-CRM-konjugat, iagttages i mindst 20 minutter og sendes til deres forældre til iagttagelse og registrering af eventuelle lokale og systemiske skadelige reaktioner.

For gruppen af de 7 måneder gamle og 2 måneder gamle børn gentages processen efter forløbet af de tidsrum, der er angivet i tabel XIV, til en sekundær immunisering med den samme vaccine. Efter forløbet af yderligere et tidsrum, (jff. tabel 4), udtages der atter blod til bestemmelse af den sekundære reaktion.

Som det fremgår af tabel 4, er enkelte injektioner virkningsfulde til øgning af antistoffer i aldersgrupperne 18 og 7 måneder, medens der hos 2 måneder gamle børn iagttages en moderat stigning i antistof (på trods af det forventede fald i IgG-antistoffer fra moderen). Hos alle disse børn iagttages der passende niveauer af anti-PRP-antistof 1-2 måneder efter den anden immunisering. Den reaktion, der iagttages hos 6 måneder gamle børn efter to immuniseringer, er tilstrækkelig til at frembringe beskyttende niveauer af antistoffer.

Tabel 4

Anti-PRP-antistof-reaktion
mod 25 µg vaccine

5	Alder (måned) ved vacci- nation	Antal af børn	<u>Antistof, µg/ml[*]</u>			
			Før	Efter 1	Efter 2	
10	18-23	84	0,40	1 md.	,6,53	
	7-15	88	0,15	1-2 md.	4,54	1-2 md. 18,9
	2-6	30	0,17	2 md.	0,25	2 md. 1,23

^{*} Geometrisk middelværdi af titer.

P A T E N T K R A V .

1. Immunogent konjugat, der omfatter det reductive amineringsprodukt af

- (i) et kapselpolymerfragment, der har mindst to carbonylgrupper, og som er afledt fra kapselpolymeren af et bakterielt patogen, idet kapselpolymerfragmentet fås ved en fremgangsmåde, der omfatter behandling af polymeren med en syre, base eller et enzym og dannelse af carbonylgrupper ved behandling med et oxidationsmiddel, og
- 10 (ii) et bakterietoxin eller -toxoid, hvilket konjugat omfatter et tværbundet konjugat.

2. Immunogent konjugat ifølge krav 1, i hvilket kapselpolymeren er immunogen i voksne mennesker og mindre immunogen i børn.

- 15 3. Immunogent konjugat ifølge krav 1, i hvilket den reductive aminering udføres i nærværelse af cyanoborhydrid-anioner.

4. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor toxinet eller toxoidet er difteritoxin eller -toxoid.

- 20 5. Immunogent konjugat ifølge krav 4, hvor toxoidet er CRM₁₉₇.

6. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor toxinet eller toxoidet er tetanustoxin eller -toxoid.

- 25 7. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor toxinet eller toxoidet er et Pseudomonas-toxin eller -toxoid.

8. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor toxinet eller toxoidet er et Staphylococcus-toxin eller -toxoid.

9. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor toxinet eller toxoidet er et Streptococcus-toxin eller -toxoid.

- 30 10. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor toxinet eller toxoidet er Pertussis-toxin eller -toxoid.

11. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor toxinet eller toxoidet er et Escherichia coli-toxin eller -toxoid.

- 35 12. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor det bakterielle patogen er Haemophilus influenzae type b.

13. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor bakteriepathogenet er *Escherichia coli*.

14. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor bakteriepathogenet er *Neisseria meningitidis*.

5 15. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor bakteriepathogenet er *Neisseria meningitidis* serogruppe A.

16. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor bakteriepathogenet er *Neisseria meningitidis* serogruppe C.

10 17. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor bakteriepathogenet er *Streptococcus pneumoniae*.

18. Immunogent konjugat ifølge krav 1, hvor bakteriepathogenet er valgt fra gruppen bestående af *Streptococcus pneumoniae* serotyper 6, 12, 14, 19, 23 og 51.

15 19. Immunogent konjugat ifølge krav 5, hvor bakteriepathogenet er *Haemophilus influenzae* type b.

20. Immunogent konjugat ifølge krav 5, hvor bakteriepathogenet er valgt fra gruppen bestående af *Streptococcus pneumoniae* serotyper 6, 12, 14, 19, 23 og 51.

20 21. Immunogent konjugat ifølge krav ethvert af kravene 1-20, hvor oxidationsmidlet er periodat.

22. Immunogent konjugat ifølge ifølge ethvert af kravene 1-21, hvor fragmentet fremstilles ud fra en kapselpolymer ved først at behandle polymeren med syre, base eller enzym og dernæst frembringelse af aldehydgrupper ved behandlingen med et oxidationsmiddel.

23. Immunogent konjugat omfattende det reduktive amineringsprodukt af et kapselpolymerfragment med en kædelængde på fra ca. 10 til ca. 30 monomerenheder og mindst to carbonylgrupper, hvilket fragment er afledt fra kapselpolymeren af et bakteriepathogen, der er *Streptococcus pneumoniae* eller *Haemophilus influenzae*-bakterie, idet kapselpolymerfragmentet fås ved en fremgangsmåde, der omfatter behandling af polymeren med en syre, en base eller et enzym og dannelse af carbonylgrupper ved behandling med et oxidationsmiddel, og et bakterietoxin- eller toxoid, hvilket konjugat omfatter et tværbundet konjugat.

24. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor kapsel-polymeren er immunogen i voksne mennesker og mindre immunogen i børn.
25. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor den reductive aminering udføres i nærværelse af cyanoborhydrid-anioner.
26. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor toxinet eller toxoidet er difteri-toxoid.
27. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor toxoidet er CRM₁₉₇.
28. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor toxinet eller toxoidet er tetanus-toxin eller-toxoid.
29. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor toxinet eller toxoidet er et Pseudomonas-toxin eller -toxoid.
30. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor toxinet eller toxoidet er et Staphylococcus-toxin eller -toxoid.
31. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor toxinet eller toxoidet er et Streptococcus-toxin eller -toxoid.
32. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor toxinet eller toxoidet er Pertussis-toxin eller -toxoid.
33. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor toxinet eller toxoidet er et Escherichia coli-toxin eller -toxoid.
34. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor bakterie-pathogenet er Haemophilus influenzae type b.
35. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor bakterie-pathogenet er Streptococcus pneumoniae.
36. Immunogent konjugat ifølge krav 23, hvor bakterie-pathogenet er valgt fra gruppen bestående af Streptococcus pneumoniae serotyper 6, 12, 14, 19, 23 og 51.
37. Immunogent konjugat ifølge krav 27, hvor bakterie-pathogenet er Haemophilus influenzae type b.
38. Immunogent konjugat ifølge krav 27, hvor bakterie-pathogenet er Streptococcus pneumoniae.
39. Immunogent konjugat ifølge krav 27, hvor bakterie-pathogenet er valgt fra gruppen bestående af Streptococcus pneumoniae serotyper 6, 12, 14, 19, 23 og 51.

40. Immunogent konjugat ifølge ethvert af kravene 23-39, hvor oxidationsmidlet er periodat.

41. Immunogent konjugat ifølge ethvert af kravene 23-40, hvor fragmentet fremstilles ud fra en kapselpolymer
5 ved først at behandle polymeren med syre, base eller enzym og dernæst frembringe aldehydgrupper med et oxidationsmiddel.

42. Immunogent konjugat, der omfatter et formalinbehandlet reduktivt amineringsprodukt af et kapselpolymerfragment med mindst to carbonylgrupper og afledt fra en
10 kapselpolymer af et bakteriepathogen, idet kapselpolymerfragmentet fås ved en fremgangsmåde, der omfatter behandling af polymeren med en syre, en base eller et enzym og frembringelse af carbonylgrupper ved behandling med et oxidationsmiddel, og et bakterietoxin eller -toxoid, hvilket konjugat
15 omfatter et tværbundet konjugat.

43. Immunogent konjugat omfattende et formalinbehandlet reduktivt amineringsprdukt af et kapselpolymerfragment med en kædelængde på fra ca. 10 til ca. 30 monomerenheder og mindst to carbonylgrupper, hvilket fragment er afledt
20 fra kapselpolymeren af en Streptococcus pneumoniae- eller Haemophilus influenzae-bakterie, idet kapselpolymerfragmentet fås ved en fremgangsmåde, der omfatter behandling af polymeren med en syre, en base eller et enzym og dannelse af carbonylgrupper ved behandlingen med et oxidationsmiddel,
25 og et bakterietoxin eller -toxoid, hvilket konjugat omfatter et tværbundet konjugat.

44. Immunogent konjugat ifølge krav 42 eller 43, hvor bakterietoxoidet er difteritoxoid.

45. Immunogent konjugat ifølge krav 42 eller 43,
30 hvor toxoidet er CRM₁₉₇.

46. Immunogent konjugat ifølge krav 42 eller 43, hvor bakterietoxinet eller -toxoidet er tetanus-toxin eller-toxoid.

47. Fremgangsmåde til fremstilling af et immunogent
35 konjugat omfattende dannelse af det reductive amineringsprodukt af

- (i) et kapselpolymerfragment, der har mindst to carbonylgrupper, og som er afledt fra kapselpolymeren af et bakteriepathogen, idet kapselpolymerfragmentet fås ved en fremgangsmåde, der omfatter behandling af polymeren med syre, base eller enzym og dannelse af carbonylgrupper ved behandling med et oxidationsmiddel og
- (ii) et bakterietoxin eller -toxoid, idet den reduktive aminering udføres i nærværelse af cyano-borhydrid-ioner, og konjugatet omfatter et tværbundet konjugat.
48. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor kapselpolymeren er immunogen i voksne mennesker og mindre immunogent i børn.
49. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor toxinet eller toxoidet er difteri-toxin eller -toxoid.
50. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor toxinet eller toxoidet er CRM₁₉₇.
51. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor toxinet eller toxoidet er tetanus-toxin eller -toxoid.
52. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor toxinet eller toxoidet er Pseudomonas-toxin eller -toxoid.
53. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor toxinet eller toxoidet er Staphylococcus-toxin eller -toxoid.
54. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor toxinet eller toxoidet er Streptococcus-toxin eller -toxoid.
55. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor toxinet eller toxoidet er Pertussis-toxin eller -toxoid.
56. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor toxinet eller toxoidet er et Escherichia coli-toxin eller -toxoid.
57. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor pathogenet er Haemophilus influenzae type b.
58. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor pathogenet er Escherichia coli.
59. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor pathogenet er Neisseria meningitidis.
60. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor pathogenet er Streptococcus pneumoniae.

61. Fremgangsmåde ifølge krav 47, hvor pathogenet er *Pseudomonas*.

62. Fremgangsmåde ifølge krav 49, hvor pathogenet er *Haemophilus influenzae* type b.

5 63. Fremgangsmåde ifølge krav 49, hvor pathogenet er *Streptococcus pneumoniae*.

64. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 47-63, hvor oxidationsmidlet er periodat.

10 65. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 47-64, hvor fragmentet fremstilles ud fra en kapselpolymer ved først behandling af polymeren med syre, base eller enzym og dernæst frembringelse af aldehydgrupper ved behandling med et oxidationsmiddel.

15 66. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 47-65, der yderligere omfatter behandling af det reductive amineringsprodukt med formalin.

67. Fremgangsmåde ifølge krav 66, hvor bakterietoxoidet er difteri-toxoid.

20 68. Fremgangsmåde ifølge krav 66, hvor toxoidet er CRM₁₉₇.

69. Fremgangsmåde ifølge krav 66, hvor bakterietoxinet eller -toxoidet er tetanus-toxin eller -toxoid.

25 70. Vaccine, der fremkalder virksomme niveauer af antikapselpolymer-antistoffer hos mennesker, omfattende et immunogent konjugat ifølge ethvert af kravene 1-46 og en farmaceutisk acceptabel bærer.

71. Fremgangsmåde til fremstilling af et kapselpolymerfragment, der har mindst to carbonylgrupper, og som er egnet til anvendelse ved fremstillingen af et tværbundet
30 immunogent konjugat, hvilken fremgangsmåde omfatter behandling af en kapselpolymer af et bakteriepathogen med syre, base eller enzym og frembringelse af carbonylgrupper ved behandling med et oxidationsmiddel.