(12) **PATENT**

(19) NO (11) **319569** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl[7] A 61 K 39/09, 39/116

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19951109	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1993.09.24 PCT/US93/09056
(22)	Inng.dag	1995.03.23	(85)	Videreføringsdag	1995.03.23
(24)	Løpedag	1993.09.24	(30)	Prioritet	1992.09.24, US, 949970 1993.09.23, US, 125556
(41)	Alm.tilgj	1995.05.22			
(45)	Meddelt	2005.08.29			

(73) Innehaver Brigham and Women's Hospital Inc, 75 Francis Street, Boston, MA 02115, US
National Research Council of Canada, 1200 Montreal Road, Building M58, Room South 107, Ottawa, ON K1A 0R6, CA
Dennis L. Kasper, Newton Centre, MA, US

(72) Oppfinner Harold J. Jennings, Gloucester, ON, CA

(74) Fullmektig Onsagers AS, Postboks 6963 St Olavs Plass, 0130 OSLO, NO

(54) Benevnelse **Vaksiner, omfattende gruppe B strptococcus Type II og Type V polysaccharid- proteinkonjugat**

(56) Anførte publikasjoner

Journal of Biological Chemistry, vol. 266, nr. 11, 1991, s. 6714-6719, Wessels et al.

Journal of Clinical Investigation, vol. 86, 1990, s. 1428-1433, Wessels et al.

(57) Sammendrag

Foreliggende oppfinnelse angår antigene konjugatmolekyler som omfatter kapselpolysakkaridet til gruppe B streptokokk type II som er kovalent bundet til protein. Oppfinnelsen angår videre antigene konjugatmolekyler som omfatter kapselpolysakkaridet til gruppe B streptokokk type V som er kovalent bundet til protein. Foreliggende oppfinnelse angår også vaksiner og fremgangsmåte til å immunisere pattedyr, inkludert mennesker mot infeksjon av gruppe B streptokokk type II (GBS II) og/eller gruppe B streptokokk type V (GBS V). Multivalente vaksiner som omfatter konjugatmolekyler av foreliggende oppfinnelse og antigener til andre patogene bakterier er også krevd.

Foreliggende søknad er en delvis fortsettelse (continuation-in-part) av US patentsøknad 07/949 970 innsendt 24. september 1992.

Foreliggende oppfinnelse ble foretatt med støtte av regjeringen under NIH stipendium A123339, A130628 og A128040 gitt av National Institutes of Health. Regjeringen har visse rettigheter i foreliggende oppfinnelse.

Den foreliggende oppfinnelsen angår antigene konjugatmolekyler som omfatter kapselpolysakkarid fra gruppe B streptokokk type II eller V som er kovalent bundet til protein og fremgangsmåte til fremstilling av konjugatmolekylet . Foreliggende oppfinnelse angår også vaksiner og anvendelse av konjugatmolekylet til å fremstille en vaksine til å immunisere pattedyr, inkludert mennesker mot infeksjon av gruppe B streptokokk type II (GBS II) og/eller type V (GBS V). Multivalente vaksiner som omfatter konjugatmolekylene i henhold til foreliggende oppfinnelse og antigener til andre patogene bakterier er også krevd.

Infeksjoner som skyldes gruppe B streptokokk (GBS) er den vanligste enkle årsak til sepsis og meningitt i nyfødte i utviklede land (3, 31). Nylige rapporter fra noen sentra i US viser en lavere mortalitet (9 til 13%) enn i serier fra 1970-årene, kanskje som et resultat av tidligere diagnose og intensiv behandling (1, 10). Ikke desto mindre forekommer fremdeles fatale infeksjoner og like viktig opptil 50% av de som overlever GBS-meningitt har kroniske neurologiske skader som varierer fra døvhet og milde lærevanskeligheter til dype motorisk, sensorisk og kognitiv deffekter (3). Forhindring heller enn forbedring av diagnose eller terapi vil sannsynligvis ha den mest signifikante effekt på ytterligere reduksjon av GBS-relatert morbiditet og mortalitet.

Fordi GBS-kapsel polysakkaridspesifikke antistoffer synes å beskytte både eksperimentdyr (23, 24) og menneskespedbarn (4, 5) mot GBS-infeksjon, har noen av polysakkaridene blitt renset og testet i friske voksne som eksperimentelle vaksiner (6). Hvis en sikker og virkningsfull GBS-vaksine var tilgjengelig, kunne den administreres til kvinner før eller under graviditet for å danne antistoffer som ville overføres til fosteret i uterus og tilveiebringe beskyttelse mot neonatal infeksjon. Av de tre GBS-polysakkarider (type Ia, II og III) testet i frivillige, hadde type II den høyeste grad av immunogenisitet, og dannet et type II spesifikt antistoffrespons i 88% av tidligere ikke-immune resipienter (6). Skjønt et utvalg av GBS-serotyper er tidligere blitt erkjent som å bidra betydelig til prosentandelen av pasienter med GBS-infeksjon, har ikke type V blitt vurdert til å være ansvarlig for en signifikant prosentandel av GBS-infeksjon. I neonatale er nivået av spesifikt antistoff nødvendig for beskyttelse mot type II GBS-infeksjon ikke presist definert, men er blitt estimert til 2 eller 3 μg/ml (6). I en vaksinemottager som oppnår en antistoffrespons bare litt over det minimum som kreves for beskyttelse, kan

mengden av maternalt antistoff som overføres over placenta være utilstrekkelig til å beskytte et prematurt spedbarn, pga. ufullstendig overføring til fosteret av maternalt immunoglobulin G (IgG), eller et spedbarn med sent inntredende infeksjon, siden halveringstiden til maternale IgG-antistoffer i den nyfødte er ca. 25 dager (13). Mange spedbarnene i disse to grupper av pasienter kan bli beskyttet hvis størrelsen av den spesifikke antistoffresponsen til vaksinering var høyere. Overføringen av maternalt IgG til fosteret øker gjennom tredje trimester, slik at et høyere maternalt antistoffnivå ville tilveiebringe beskyttelse tidligere, dvs. til et mer prematurt spedbarn (16). På samme måte ville høyere maternale nivåer resultere i lenger opprettholdelse av maternale antistoffer i spedbarnet for derved å tilveiebringe beskyttelse mot sent inntredende sykdom såvel som tidlig.

Immunogenisiteten til flere bakterielle polysakkaridantigener er blitt økt ved tilfesting av egnede bærerproteiner til polysakkarider eller derivatoligosakkarider (2, 14, 17-19, 22, 27, 29, 30, 34). Ønskede egenskaper til polysakkaridproteinkonjugatvaksiner inkluderer økt immunogenisitet av polysakkaridet, forhøyet haptenspesifikk antistoffrespons til "booster"-doser, og en overvekt av IgG klasse antistoffer. Nylig har vi lykkedes i å utvikle en GBS III-Tetanus Toxoid (TT) vaksine ved å anvende sidekjedesialsyredelene som seter for styrt proteinkobling (33). III-TT-vaksinen utviklet GBS type III-spesifikk, opsoniserisk aktive antistoffer, mens det ukonjugerte type III polysakkarid var ikke-immunogent i kaniner (33).
Det er derfor hensikt å tilveiebringe antigen-konjugatmolekyler til vaksiner for å høyne innholdet av maternale antistoffer hos spedbarn. Denne hensikt er oppnådd ved foreliggende oppfinnelse kjennetegnet ved det som fremgår av de vedlagte krav.

Foreliggende oppfinnelse krever antigenkonjugatmolekyler som omfatter kapsel polysakkaridet avledet fra gruppe B streptokokk type II og en proteinkomponent eller gruppe B streptokokk type V og en proteinkomponent hvori to eller flere sidekjeder avsluttes med sialsyrerester av type II eller type V polysakkaridkomponent er hver bundet ved en sekundær aminbinding til protein.

Det er også krevd en fremgangsmåte til å fremstille konjugatmolekylene til et kapselpolysakkarid av gruppe B streptokokk type II eller type V, og et protein som omfatter:

(a) å utsette gruppe B streptokokk type II eller type V kapselpolysakkarid for periodatoksidasjon som er tilstrekkelig til å innføre en aldehydgruppe i to eller flere terminale sialsyrerester bundet til ryggraden av polysakkaridet;

(b) å koble det oksiderte gruppe B streptokokk type II eller type V kapselpolysakkarid til et protein gjennom reduktiv aminering for å danne en sekundær aminbinding mellom kapselpolysakkaridet og proteinet.

Konjugatmolekylet fremstilt i henhold til fremgangsmåten beskrevet ovenfor er også krevd.

Foreliggende oppfinnelse krever videre vaksiner som omfatter hver av konjugatmolekylene beskrevet ovenfor. I tillegg krever foreliggende oppfinnelse multivalente vaksiner som omfatter konjugatmolekylene i henhold til oppfinnelsen og minst et annet immunogent molekyl som er i stand til å utløse produksjonen av antistoffer til en patogen substans foruten gruppe B streptokokk type II eller type V. Spesielt i tillegg til å omfatte GBS type II og/eller GBS type V konjugatmolekyler, omfatter den multivalente vaksine i henhold til oppfinnelsen videre andre immunogene molekyler som er i stand til å utløse produksjon av antistoffer til patogener selektert fra gruppen som består av gruppe B streptokokk type Ia, type Ib, III og IV og Haemophilus influensa type b og E. coli type K1.

I en annen utforming av foreliggende oppfinnelse, kreves en anvendelse til å fremstille en vaksine til å immunisere neonatale hvori vaksinen som omfatter konjugatmolekylet i henhold til oppfinnelsen blir administrert i en immunogen mengde til et kvinnelig menneske, slik at det fremstilles antistoffer som er i stand til å passere inn i et foster unnfanget før eller etter administrering av vaksinen i en mengde som er tilstrekkelig til å fremstille beskyttelse mot infeksjon i den neonatale ved fødsel.

Det er også krevd en anvendelse til å fremstille en vaksine til å immunisere voksne hvori en vaksine som omfatter konjugatmolekylene i henhold til oppfinnelsen blir administrert i en immunogen mengde til voksne mennesker som har risiko for å bli infisert med gruppe B streptokokk type II eller type V.

En annen utforming er anvendelse av konjugatmolekylet til å fremstille en vaksine for personer hvis immunsystem er undertrykket av forskjellige grunner, inkludert men ikke begrenset til kreft eller diabetes.

En annen utforming av foreliggende oppfinnelse er en anvendelse til å fremstille en vaksine til å immunisere melkedyr mot bovin mastitt som består av å administrere en vaksine som omfatter konjugatmolekylene i henhold til oppfinnelsen i en immunogen mengde til melkekyr.

Fig. 1. Strukturen til den repeterende heptasakkaridenhet av type II GBS kapselpolysakkarid (920).

Fig. 2. GBS type II polysakkarid konkurrerende ELISA. GBS type Ia (○), type II (●), og type III (▲) polysakkarider ble anvendt som inhibitorer til II-TT vaksineantistoffbinding til plater belagt med type II polysakkarid. Resultater er

uttrykt som prosentandeler av inhibering relativ til den til kontrollbrønner som manglet inhibitor.

Fig. 3. GBS type II polysakkarid konkurrerende ELISA. Nativt (●) og desialysert eller kjerne (□) type II polysakkarider ble brukt som inhibitorer av antistoffer utløst av II-TT vaksine. Datapunkter er gjennomsnitt (med standard avvik) av triplikatbestemmelser. Resultater blir uttrykt som prosentandel av inhibisjon relativ til den til kontrollbrønner som manglet inhibitor.

Fig. 4. Struktur til den repeterende enhet av type V GBS kapselpolysakkarid.

Fig. 5. GBS type V polysakkaridkonkurrerende ELISA. GBS type Ia (-▲-), type Ib (-▲-), type II (-●-), type III (-○-), type V (-■-) og type VI (-□-) polysakkarider ble anvendt som inhibitorer til antistoffer utløst av V-TT vaksine. Datapunkter er gjennomsnitt av duplikate bestemmelser. Resultatene blir uttrykt som prosentandel av inhibisjon relativt til den av kontrollbrønner som manglet inhibitor.

Fig. 6. In vitro opsonofagocytisk dreping med humane perifere blodlymfocytter av GBS type V stamme CJB 111 opsonisert med kaninantisera rettet på GBS type V-TT konjugatvaksine. C' er komplement.

Oppfinnelsen angår antigene konjugatmolekyler som omfatter en kapselpolysakkaridkomponent og en proteinkomponent.

Bakterielle stammer. GBS type II stamme 18RS21 og type Ia stamme 090 ble opprinnelige oppnådd fra den avdøde Rebecca Lancefield ved Rockefeller Univeristy og ble holdt som frosne kulturer ved -80°C. Stamme 18RS21 ble anvendt in vitro og in vivo assayer og var kilden til type II kapselpolysakkarid anvendt i konjugatvaksinen. To GBS type II kliniske isolater (stammer S16 og S20) og type III stamme M781 ble oppnådd fra Channing Laboratory's kultursamling.

Skjønt tidligere ikke anerkjent for å bidra av betydning til antall av GBS infeksjoner hos mennesker, angir nyere funn at type V serotyp bidrar til ca. 15% av GBS infeksjoner. For å fremstille en GBS type V konjugatvaksine, ble GBS type V stamme 1169-NT1 oppnådd fra Dr. J. Jelinkova ved The Institute og Hygiene and Epidemology, Praha, den Tsjekkiske Republikk, og ble holdt som frosne kulturer ved -80°C. Stamme 1169-NT1 ble brukt i ni in vitro og in vivo assayer og var kilden eller type V kapselpolysakkarid anvendt i konjugatvaksinen. GBS type V stamme CJB 111 ble opprinnelig oppnådd fra Dr. Carol Baker ved Baylor University.

Konjugasjon av CBS type II polysakkarid eller type V polysakkarid til TT. Type II kapselpolysakkarid ble renset fra stamme 18RS21-celler ved

fremgangsmåter som er beskrevet tidligere for rensing av type III polysakkarid (33). Konjugasjon av type II polysakkarid til monomer TT ble utført ved å anvende teknikker beskrevet i detalj tidligere for konjugasjon av TT til GBS type III polysakkarid (33). I korthet ble nativ type II polysakkarid størrelsesfraksjonert på en sefarose CL-6B kolonne (1,6 x 85 cm; Pharmacia Fine Chemicals). Materialet som ble eluert i sentrum av hovedtoppen ble oppsamlet, dialysert mot vann og lyofilisert for å gi materiale med en relativ molekylvekt på 200 000. Analyse av dette materialet ved ^{1}H-kjernemagnetisk resonansspektroskopi på 500 MHz konfirmerte den native type II polysakkaridstruktur (20) og fravær av gruppe B antigen (26). Polysakkarider egnet for anvendelse i konjugatmolekylene i henhold til foreliggende oppfinnelse kan variere i molekylvekt over et bredt område. Et foretrukket molekylvektsområde for polysakkaridkomponenten er mellom ca. 5 000 og 1 000 000 daltons. Et mer foretrukket område er mellom 100 000 og 300 000. I området fra 100 000 til 300 000 daltons er polysakkarider som har molekylvekter på ca. 200 000 daltons foretrukket.

Størrelsesfraksjoner type II polysakkarid ble utsatt for mild oksidering med natriummetaperiodat (18). Denne fremgangsmåte resulterte i konversjon av en del av sialsyrerestene på polysakkaridet til åtte-karbonanalogen av sialsyre, 5-acetamido-3,5-dideoksy-D-galaktosyloktulosonsyre (33). Prosentandelen av sialsyrerester oksidert ble estimert ved gasskromatografi - massespektroskopi av sialsyrerestene og deres oksiderte derivater som beskrevet tidliger (33). Fortrinnsvis mellom 5 og 50% av sialsyrerestene i hvert GBS type II polysakkarid blir modifisert og tilgjengelig for å bindes til protein. Mer fortrinnsvis mellom ca. 5 og 25% av sialsyrerestene og GBS type II polysakkarid blir modifisert og tilgjengelig for binding til protein. Modifikasjon av mellom ca. 5 og 10% av GBS type II polysakkarider er mest foretrukket.

Oksidasjon av GBS type V polysakkarid for å oppnå mellom ca. 5 og 80% modifikasjon av de terminale sialsyrerester for å danne reaktive aldehyder er foretrukket. Modifikasjon av mellom ca. 10 til 50% av de terminale sialsyrerester er mer foretrukket.

Proteinkomponenten av konjugatmolekyler i henhold til oppfinnelsen kan være ethvert fysiologisk tolerert protein. Blant de foretrukne proteiner er tetanus toksoid, difteritoksoid og kryssreaktive mateiraler såsom CRM_{197}.

Det oksiderte type II polysakkarid ble bundet til monomer tetanus toksoid ("TT") (Institute Armand Frappier, Montreal, Canada) ved reduktiv aminering som beskrevet tidligere (33). TT ble renset til sin monomer med gelfiltrasjonens kromotografi, også som beskrevet tidligere (33). I korthet ble 10 mg av periodatbehandlet type II polysakkarid og 10 mg av renset TT oppløst i 0,6 ml av

0,1 M natriumbikarbonat (pH-verdi 8,1). Natriumcyanoborhydrid (20 mg) ble satt til blandingen og inkubert ved 37°C i 5 dager. Progresjonen i konjugeringen ble overvåket ved hurtig proteinvæskekromatografi (FPLC) av små prøver av reaksjonsblandingen analysert på en Superose 6 (Pharmacia) gel filtrasjonskolonne. Reaksjonen ble avsluttet når høyden av toppen eluert ved det tomme volum av kolonnen (som representerer høy molekylvektkonjugat) forble konstant. Konjugatet ble renset ved kromatografi på en kolonne av Biogel A, 0,5 M (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.) som beskrevet tidligere (33). Proteininnholdet i vaksinen ble estimert ved fremgangsmåten til Lowry et al. (25), med bovin serumalbumin som standard. Karbohydratinnholdet ble vurdert ved fremgangsmåten til Dubois et al. (11), med renset type II polysakkarid som standard.

Type V kapselpolysakkarid ble renset fra GBS type V stamme 1169-NT1-celler ved fremgangsmåter beskrevet tidligere for rensing av type III polysakkarid (33). Konjugasjonen av type V polysakkarid til monomer TT ble utført ved å anvende teknikker beskrevet i detalj tidligere for konjugasjon av TT til GBS type III polysakkarider (33).

Nativ type V polysakkarid hadde en relativ molekylvekt på 200 000 daltons. Analyse av dette materialet ved H-kjernemagnetisk resonansspektroskopi på 500 MHz konfirmerte den native type V struktur (2) og fravær av gruppe B antigen (26).

For å innføre reaktive aldehydgrupper på de terminale sialsyrerester av type V polysakkarid for binding til protein, ble type V polysakkarid utsatt for mild oksidering med natriummetaperiodat (18). Denne fremgangsmåte resulterte i konversjon av en del av sialsyrerestene på polysakkaridet til åtte-karbonanalogen av sialsyre, 5-acetimido-3,5-dideoksy-D-galaktosyloktulosonsyre (33). Prosentandelen av sialsyrerester oksidert ble estimert ved gasskromatografi - massespektroskopi av sialsyrerestene og deres oksiderte derivater.

Det oksiderte type V polysakkarid ble bundet til monomert TT (Institute Armand Frappier, Montreal, Canada) ved reduktiv aminering som beskrevet tidligere (33). TT ble renset til sitt monomer fra gelfiltrasjonskromatografi som også er beskrevet tidligere (33). I korthet ble 8,6 mg av det periodatbehandlede type V polysakkarid og 8,7 mg av renset TT oppløst i 0,5 ml av 0,1 M natriumbikarbonat (pH-verdi 8,2). Natriumcyanoborhydrid (11,5 mg) ble satt til blandingen og inkubert ved 37°C i 10 dager. Progresjonen i konjugasjonen ble overvåket ved hurtig proteinvæskekromatografi (FPLC) i små prøver av reaksjonsblandingen analysert på en Superose 6 (Pharmacia) gel filtrasjonskolonne. Reaksjonen ble avsluttet når høyden av toppen fra det tomme volum (void volume) av kolonnen (som

representerer høymolekylvektkonjugatet) forble konstant. Konjugatet ble renset ved kromatografi på en 2,6 x 91 cm kolonne av Sephacryl S-300 HR (Pharmacia) ved å benytte 0,01 M fosfat, 0,15 M NaCl, pH-verdi 7 i tillegg til 0,01% thimerosal som den løpende buffer. Proteininnholdet i vaksinen ble estimert ved fremgangsmåten til Lowry et al. (25), med bovint serumalbumin som en standard. Karbohydratinnholdet ble vurdert ved fremgangsmåten til Dubois et al. (11), med galaktose som en standard.

Vaksinasjon av kaniner med II-TT vaksine og V-TT vaksine. Grupper på tre New Zealand White hunkaniner (Millbrook Farms, Amherst, Mass.), hvor hver kanin veide ca. 3 kg, ble vaksinert subkutant på fire steder på ryggen med 50 µg av enten ukoblet nativ type II polysakkarid eller II-TT vaksine, hver emulgert med fullstendig Freunds adjuvans i et totalt volum på 2 ml. Disse dyr mottok "booster injeksjoner" (50 µg) av vaksine fremstilt med ufullstendig Freunds adjuvans på dagene 20 og 41. Serum ble oppnådd fra hvert dyr på dagene 0, 20, 34, 41, 55 og 70; filtrert sterilt og lagret ved -80°C.

En New Zealand White hunkanin (Millbrook Farms, Amherst, Mass.) som veier ca. 3 kg ble vaksinert subkutant på fire steder på ryggen med 50 µg GBS type V-TT konjugat vaksine blandet med alun på dager 22 og 42. Serum ble oppnådd fra hvert dyr på dagene 0, 35, 56 og 91, filtrert, sterilistert og lagret ved -80°C.

ELISA. GBS type II spesifikke kaninantistoffer ble kvantifisert ved enzymbundet immunosorbentassay (ELISA) med geit antikanin IgG konjugert til alkalisk fosfatase (Tago Inc, Burlingham, Calif.) ved en fortynning på 1/3 000. Mikrotiterplater (Immulon 2; Dynatech Laboratories, Inc, Chantillty, Va.) ble belagt med 100 ng av renset type II polysakkarid bundet til poly-L-lysin pr. brønn som beskrevet tidligere (15, 33). Antistofftitere ble registrert som resiprok fortynning som resulterte i en A_{405} på ≥0,3 når brønner som inneholder referanseserumet (kaninantiserum dyrket mot hele BGS 18RS21 celler) ved en fortynning på 1/800 nådde en A_{405} på 0,5. Mengden av antistoff som er spesifikt for proteindelen av konjugatvaksinen ble estimert ved ELISA ved å benytte plater belagt med monomert TT (100 ng pr. brønn). TT-spesifikk IgG titere ble registrert som den resiproke fortynning som resulterte i en A_{405} på ≥0,3 35 minutter etter tilsetting av substratet, p-nitrofenylfosfat (Sigma 104 fosfatasesubstrattabletter; Sigma Chemical Co.).

GBS type V-spesifikke kaninantistoffer ble også kvanitifisert med ELISA med geit antikanin IgG konjugert til alkalisk fosfatase (Tago Inc, Burlingham, Calif.) ved en fortynning på 1/3 000. Mikrotiterplater (Immulon 2; Dynatech Laboratories, Inc, Chantillty, VA) ble belagt med 100 ng av renset type V polysakkarid bundet til poly-L-lysin pr. brønn som tidligere beskrevet (15). Antistofftitere ble registrert

som den resiproke fortynning som resulterte i en A_{405} på ≥0,3 når brønnene som inneholder referanseserum (kaninantiserum dyrket mot hele type V-stamme 1169-NT1) ved en fortynning på 1/3 000 nådde en A_{405} på 0,3.

Separasjon av IgG og IgM fra immunkaninserum. Protein A-agarose-affinitetskolonnekromatografi (Pierce Chemical Co, Rockford, Ill.) ble brukt til å separere immunoglobuliner (IgG og IgM) fra 0,5 ml sammenslått immun-kaninserum, oppnådd på dag 70, provosert (raised) til II-TT vaksine som beskrevet et annet sted (28). Adskillelse av antistoffklasser ble konfirmert med type II polysakkaridbelagt ELISA plater med geit antikanin IgG (γ og lett kjedespesifikk; Tago) brukt ved en fortynning på 1/500 og geit antikanin IgM (μ kjedespesifikk; Sera-Lab, Westbury, N.Y.) brukt ved en fortynning på 1/200.

Konkurrerende ELISA. Spesifisiteten til kaninserum provosert til II-TT vaksine ble bestemt ved konkurrerende ELISA med homologe (type II) og heterologe (typer Ia og III) polysakkarider som inhibitorer. Epitopspesifisitet til vaksineindusert sammenslått kaninserum (oppnådd på dag 70) ble undersøkt med nativt og desialylert type II polysakkarid og β-O-metylgalktopyranose som inhibitorer av antistoffbinding. Nativ type II polysakkarid ble desialysert ved behandling med 6% eddiksyre ved 8°C i to timer. Polysakkaridinhibitorer ble seriefortynnet 4 ganger og blandet med et likt volum (75 μl) av sammenslått kaninserum (fortynnet 10 000 ganger) oppnådd på dag 70 etter vaksinering med II-TT vaksine. Denne blanding (100 μl) ble deretter satt til type II polysakkaridbelagte ELISA brønner. Alkalisk fosfatasekonjugert antikanin IgG ble brukt som det sekundære antistoff med en fortynning på 1/3 000. Resultatene blir uttrykt som følger: % inhibisjon = [A_{405} med ingen inhibitor - A_{405} med inhibitor/A_{405} med ingen inhibitor] x 100.

Serotypspesifisiteten til GBS type V-TT kaninantiserum ble evaluert ved å benytte GBS type spesifikke polysakkarider Ia, Ib, II, III, V og VI. ELISA brønner ble belagt med 100 ng/brønn med GBS type V polysakkarid bundet til poly-L-lysin. Kaninantisera til V-TT vaksine, fortynnet 1/6 000, ble inkubert med hver av polysakkaridinhibitorene. Inkubert antiserum ble satt til ELISA brønner og platen prosessert med geit antikanin IgG alkalisk fosfatasekonjugert (fortynnet 1/3 000), og substrat som beskrevet i detalj tidligere (28).

In vitro antistoffmediert dreping av GBS. Evnen til vaksineinduserte kaninantistoffer til å opsonisere GBS celler for påfølgende dreping ved humane perifere blodleukocyter ble vurdert ved et in vitro opsonofagocytoseassay (7, 8).

Reaksjonsassayet for å bestemme den opsonofagocytiske aktivtet til GBS type V reaktive antistoffer ble utført ved å inkubere 1,5 x 10^7 hvite blodceller (WBC) i 300 μl buffer; 3 x 10^6 CFU av type V GBS stamme CJB 111 i 50 μl; human

komplement (absorbert med GBS type V-stamme celler) (50 µl); antistoff-anti V-TT-varmeinaktivert (50 µl); modifisert Eagle's Medium (50 µl). Blandingen ble inkubert med blanding i 60 minutter ved 37°C. Forskjellen i GBS kolonidannende enheter (CFU) ble bestemt etter inkubering ved 37°C i 1 time ved standard platetellefremgangsmåte.

Passiv beskyttelse av mus med vaksineindusert kaninantistoffer. Grupper på 10 sveitsisk-Webster utavlede hunmus (Taconic Farms, Germatown, N.Y.), hvor hver mus veide 18-20 g, ble injisert intraperitonialt med 0,2 ml sammenslått serum (dag 70) fra kaniner vaksinert med enten type II polysakkarid eller II-TT vaksine. Titeren, målt ved ELISA, av det sammenslåtte serum oppnådd på dag 70 fra kaniner immunisert med type II polysakkarid var 100, og den til II-TT vaksine var 12 800. Kontrollgrupper på fem mus mottok sammenslått preimmuniseringskaninserum eller sammenslått antiserum provosert til ukoblet TT (27). 24 timer senere ble mus utfordret med type II stamme 18RS21 (1,5 x 10^5 CFU pr. mus) i et totalt volum på 1,0 ml Todd-Hewitt næringsmedium. Utfordringsdosen for hver stamme var tidligere bestemt til å være lethal for >90% av musene med lignende vekt og alder. Overlevende mus ble opptelt daglig i tre påfølgende dager.

Statistisk analyse. Fishers nøyaktige test ble brukt til å sammenligne evnen til forskjellige kaninsera til passivt å beskytte musene mot lethal GBS infeksjon.

RESULTATER

Fremstilling og sammensetning av II-TT vaksine og V-TT vaksine. GBS II-TT vaksine og GBS V-TT vaksine ble fremstilt ved fremgangsmåter beskrevet i detalj tidligere for konstruksjon av GBS type III konjugatvaksine (33). Kontrollert periodatoksidering av type II GBS polysakkarid resulterte i modifisering av 7% av polysakkaridets sialsyrerester som bestemt ved gasskromatografi - massespektrometrianalyse. Monomert TT ble kovalent bundet til modifiserte sialsyreseter på type II polysakkaridet ved reduktiv aminering. Den rensede II-TT vaksine inneholdt 32% (vekt/vekt) protein og 68% (vekt/vekt) karbohydrat. Det endelige utbytte av II-TT vaksine var 7,8 mg eller 39%.

Kontrollert periodatoksidasjoner av type V GBS polysakkarid resulterte i modifikasjon av ca. 8%, 25% og 50% av sialsyrerestent i polysakkaridet. Monomert TT ble kovalent bundet til de modifiserte sialsyrerester av type V polysakkarid ved reduktiv aminering. Polysakkarider som var oksidert slik at ca. 8% av deres sialsyrerester var modifisert, resulterte i konjugater som har et lavt polysakkarid til protein molart forhold. Polysakkarider i hvilke 25 eller 50% av de terminale sialsyrerester ble modifisert resulterte i konjugatmolekyler som har en mer foretrukket polysakkarid til protein molart forhold. Et GBS type V polysakkarid i

hvilket 25% av sialsyrerestene var modifisert, ble brukt til å fremstille konjugatvaksiner som har den biokjemiske karakteriseringen vist i tabell 1.

TABELL 1.

Sammensetning av GBS type V-TT vaksine

Polysakkaridstørrelse (M^r)	200 000
Sialsyrerester oksidert (%)	25
Mengde av vaksine som tetanustoksoid (% tørrvekt)	38
Mengde av vaksine som karbohydrat (% tørrvekt)	62
Mol karbohydrat/mol protein[a]	0,56

[a] Bestemt M^r av tetanustoksoid monomer var 150 000.

Immunogenisitet av II-TT vaksine og V-TT vaksine i kaniner.
Immunogenisiteten til II-TT vaksine og nativ type II polysakkarid ble sammenlignet i kaniner. En økning i type II spesifikk antistoff ble sett etter den primære dose av II-TT vaksine (tabell 2). En boosterdose av vaksine økte videre antistoffresponsen. Antistoffnivåer forble uforandret eller steg litt etter en andre boosterdose på dag 41 og ble opprettholdt gjennom den gjenværende del av undersøkelsen (tabell 2). I motsetning til II-TT vaksinen, mislykkes ukoblet nativ GBS type II polysakkarid i å utløse en spesifikk antistoffrespons (tabell 2). Dyr som var vaksinert med II-TT vaksinen utviklet også antistoffer til TT, og oppnådde ca. en 3-$\log_{10}$ økning over preimmuniseringsnivåer.

TABELL 2.

GBS type II polysakkaridspesifikke antistofftitere til kaniner vaksinert med nativ type II polysakkarid eller II-TT vaksine.

Vaksine og kanin	Antistofftiter i ELISA på dag:[a]					
	0	20[b]	34	41[b]	55	70
Nativ type II polysakkarid						
1	100	100	100	200	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	200	100	100	100	100	100
II-TT						
1	100	400	3200	3200	6400	12800
2	100	1600	3200	6400	6400	25600
3	100	6400	12800	25600	12800	12800

[a]En verdi på 100 angir en antistofftiter på ≤100. Verdiene er gjennomsnittsverdier av duplikatbestemmelser. Kaniner ble vaksinert subkutant med 50 µg vaksine emulgert med fullstendig Freunds adjuvans på dag 0.

[b]Boosterdoser med ufullstendig Freuds adjuvans ble administrert.

Immunogenisiteten til V-TT vaksine (polysakkarid oksidert til 25%) ble også vurdert i kaniner. Antistoffnivåer (IgG) økte etter den første og andre dose av type V-TT vaksine og ble opprettholdt for resten av undersøkelsen (tabell 3).

TABELL 3.
GBS type V polysakkaridspesifikk IgG titer.

Vaksine	IgG titer bestemt ved en ELISA på dag[a]:			
	0	35	56	91
$V_{25\% oks}$-TT Kanin 1[a]	100	800	1600	1600

[a]Dette dyr mottok tre 50 µg doser av vaksine blandet med alun på 3 ukers intervaller som begynte på dag 0.

Antigene egenskaper til vaksineindusert kaninsera. Konjugasjon av polysakkarid til en proteinbærer skulle ikke forandre riktige antigene epitoper funnet på polysakkaridet i dets native form. Vi testet spesifisiteten av II-TT vaksineinduserte antistoffer med konkurrerende ELISA ved å bruke homologe og heterologe GBS polysakkarider som inhibitorer. Nativ type II polysakkarid i en konsentrasjon på 450 ng/ml inhiberte 50% av bindingen til kaninantistoffer provosert til II-TT vaksine (fig. 2). GBS type Ia og III polysakkarider inhiberte ikke binding av serum provosert til II-TT vaksine selv ved konsentrasjoner så høye som 500 ng/ml (fig. 2). Disse resultater konfirmerer serotype spesifisiteten til II-TT vaksineinduserte antistoffer for målantigen og angir preserving av antigenet epitoper av polysakkariddelen av konjugatvaksinen.

For å bestemme om epitopen influert av sialsyre ble opprettholdt under fremstilling av II-TT vaksine, ble native og desialylerte type II polysakkarider anvendt i en konkurrerende ELISA som inhibitorer for binding av kaninantistoffer provosert til II-TT vaksine. Desialylering av polysakkaridet ble utført ved behandling med 6% eddiksyre ved 80°C i 2 timer. Kvantitativ fjerning av sialsyrerester ble konfirmert ved tiobarbitursyreassayet (32) med N-acetylneuraminsyre (Sigma) som standard. K_{av} av nativ type II polysakkarid før syrebehandling var 0,49, mens K_{av} av

syrebehandlet polysakkarid var 0,52 på en Superose 6 FPLC kolonne (LKB-Pharmacia, Sverige), og angir en lett reduksjon i molekylstørrelse av polysakkaridet pga. tap av sidekjedesialsyrerester som utgjør 20 vekt% av det native polysakkarid. Til og med 200 µg desialylert GBS type II polysakkarid pr. ml inhiberte med 33% av bindingen av II-TT vaksineantistoffer til nativ type II polysakkarid (fig. 3). Den relativt dårlige gjenkjennelse av desialylert eller kjernetype II polysakkarid ved II-TT vaksineantiserum ble konfirmert ved immunoelektroforesegeler, som viste et utfellingsbånd dannet med det native, men ikke kjernetype II polysakkaridet (ikke vist). Binding av II-TT vaksineantisera til nativ type II polysakkarid kunne ikke inhibieres med β-O-metylgalaktopyranose anvendt i et konsentrasjonsområde fra 0,01 til 10 mg/ml (ikke vist).

Spesifisiteten av GBS type V-TT vaksineinduserte antistoffer ble testet ved konkurrerende ELISA ved å bruke homologe og heterologe GBS polysakkarider som inhibitorer. Nativ type V polysakkarid inhiberte effektivt binding av kaninantistoffer provosert til type V-TT vaksine (fig. 5). GBS type Ia, type Ib, type II, type III og type VI inhiberte ikke binding av serum provosert til type V-TT vaksine (fig. 5). Disse resultater viser spesifisiteten av type V-TT vaksineinduserte antistoffer for målantigenet.

In vitro aktivering av GBS vaksineinduserte antistoffer. Evnen til immunserum til å opsonisere GBS for dreping ved humane perifere blodleukocytter in vitro var korrelert med beskyttende virkningsgrad mot GBS i dyrebeskyttelseseksperimenter (27, 33). Antistoffer provosert til tre kaniner vaksinert med II-TT vaksine økte drepingen av GBS type II stamme 18RS21 med ≥1,8 $\log_{10}$ (tabell 4). Preimmuniseringskaninserum eller serum fra kaniner vaksinert med nativ GBS type II polysakkarid eller ukoblet TT mislyktes i å øke in vitro drepingen av GBS (tabell 4). Vaksineinduserte kaninantistoffer fremmet drepingen ved humane blodleukocytter av to GBS type II kliniske isolater (stamme S16 og S20) med ≥1,8 $\log_{10}$ sammenlignet med preimmunisasjonskaninserum (tabell 5). Kaninserum til type II-TT vaksine ble bestemt å være serotypisk spesifikk idet det mislykkes å fremme in vitro dreping av heterologe (type Ia og III) GBS stammer (tabell 5).

TABELL 4.

In vitro opsonofagocytisk dreping av GBS type II stamme 18RS21 ved kaninantiserum provosert til nativ type II polysakkarid, II-TT vaksine eller TT.

Serumkilde (oppsamlingsdag)	CFU på[a]:		GBS killed (log_{10})
	0 min.	60 min.	
Type II polysakkarid (70)[b]	$4,3 \times 10^6$	$6,6 \times 10^6$	-0,19
II-TT vaksine (0)	$6,0 \times 10^6$	$6,4 \times 10^6$	-0.03
II-TT vaksine (70)			
Kanin 1	$4,0 \times 10^6$	$5,7 \times 10^4$	1,85
Kanin 2	$4,3 \times 10^6$	$2,7 \times 10^4$	2,20
Kanin 3	$3,9 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$	1,96
TT (70)	$4,2 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$	-0,21
Ingen	$3,9 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$	-0,26

[a]Reaksjonsblanding inneholdt i serum (ved en endelig assaykonsentrasjon på 1%) som skal testes, type II GBS-absorbert humant serum som en kilde for komplement, humane perifere blodleukocyter og type II GBS 18RS21. Verdiene er gjennomsnittene av duplikatbestemmelser.

[b]Kaninserum oppsamlet etter den primære dose av nativ type II polysakkarid i fullstendig Freuds adjuvans.

TABELL 5.

In vitro opsonofagocytisk dreping av GBS stammer ved preimmunisering og immunkaninserum provosert til II-TT vaksine.

GBS type og stamme	GBS drept (log_{10})[a]	
	Preimmunisering (dag 0)	Immun II-TT vaksine (dag 70)
II		
18RS21	-0,36	1,98
S16	0,96	2,78
S20	-0,01	1,84
Ia 090	ND	-0,51
III M781	ND	-0,54

[a]CFU (log_{10}) ved 60 min. - CFU (log_{10}) ved 0 min. Reaksjonsblandingen inneholdt serum som skulle bli testet, type II GBS absorbert humant serum som en kilde for komplement, humane perifere blodleukocyter og type II GBS 18RS21. Verdier er gjennomsnitter av duplikatbestemmelser. ND; ikke gjort.

Protein A-affinitetsrenset IgG og IgM ble oppnådd fra sammenslått serum provosert til type II-TT vaksine (28). Spesifisiteten til hver Ig-fraksjon ble konfirmert ved ELISA med klassespesifikt sekundært antistoff. A_{405} for IgM- og IgG-fraksjoner (fortynnet 1/100) var henholdsvis 0,384 og 0,009 med μ-kjedespesifikt konjugat og henholdsvis 0,086 og 2,367 med geit antikanin IgG (γ og lett kjedespesifikt). Isolerte IgM og IgG ble testet for sin evne til å øke opsonisk dreping av type II GBS ved humane blodleukocyter. Ufraksjonerte sera provosert til type II-TT vaksine, fortynnet 1:100, og en ekvivalent 1:100 fortynning av IgG fraksjonen fra det samme sera fremmet dreping av type II GBS med henholdsvis $1,65 \pm 0,22$ og $0,95 \pm 0,09$ log_{10}. I motsetning ble type II GBS ikke drept men vokste i nærvær av preimmunisasjonsserum ($-0,39 \pm 0,13$ log_{10}) og IgM-anriket fraksjon fra serum provosert til type II-TT vaksine ($-0,28 \pm 0,09$ log^{10}) i det opsonofagocyttiske assay.

Evnen til GBS type V-TT vaksineindusert kanin antisera til å promotere dreping av en GBS type V-stamme (CJB 111) ved humane blodleukocytter ble også vurdert ved det in vitro opsonofagocyttiske assay (8). Som vist i fig. 6, optimaliserte GBS type V-TT anitsera ved en konsentrasjon på 10% effektivt GBS type V stamme CJB 111 relativt til kontroller. Kontrollreaksjonsbetingelser var: komplement (10%) uten antisera; antiserum (10%) uten komplement; antiserum (1%) og komplement.

Musebeskyttelsesassay. For å teste de in vivo beskyttende evner til vaksine-induserte antistoffer ble mus passivt immunisert med sammenslått II-TT vaksinesera (dag 70) 24 timer før utfordring med type II GBS 18RS21. Tidligere var utfordringen bestemt å være letal for 90 til 100% av de testede mus. Fullstendig (100%) beskyttelse ble gitt til grupper av mus som mottok serum provosert til GBS II-TT vaksine, mens bare en av fem mus som mottok prevaksinasjonsserum overlevde (tabell 6). Det var ingen overlevende blant musene som mottok serum fra kaniner vaksinert med enten ukoblet type II polysakkarid eller ukoblet TT (tabell 6).

TABELL 6.

Passiv beskyttelse av sveitsisk-Webster utavlede mus mot GBS type II stamme 18RS21 med sera fra kaniner vaksinert med nativ type II polysakkarid II-TT vaksine eller II-TT[a]

Kaninserum[b] (oppsamlingsdag)	Antall overlevende/ totalt antall mus[c]	% overlevelse
II-TT vaksine (70)	10/10	100[d]
II-TT vaksine (0)	1/5	20
Type II polysakkarid (70)	0/10	0
TT (70)	0/5	0

[a] Mus ble gitt en 90% letal dose (1,5 x 10^5 CFU pr. mus) av GBS.

[b] Serumprøver fra tre kaniner ble slått sammen.

[c] Overlevelse ble bestemt 72 timer etter utfordring.

[d] P=0,0037 sammenlignet med preimmuniseringsverdier (dag 0).

Koblingsstrategien brukt med GBS type III polysakkarid, først utviklet for meningokokk polysakkarid (18), kan være anvendbar til alle GBS kapselpolysakkarid antigener, siden de alle inneholder sialsyre. Til forskjell fra de andre GBS polysakkarider som har sialsyre som det terminale sakkarid av di- eller trisakkarid sidekjeder, har imidlertid GBS type II polysakkarid en gjentagende enhet som bærer sialsyre som det eneste sukker på en av de to monosakkaridsidekjedene (9, 20). Ved konstruksjon av GBS type II konjugatvaksine oksiderte vi 7% av sialsyrerestene på type II polysakkaridet og brukte disse som seter for å koble polysakkaridet til TT. Renset II-TT vaksine eluert i det tomme volum til en Superose 6 kolonne (kompatibel med en molekylevekt på > 10^6) og ble komponert av 68% (vekt/vekt) karbohydrat og 32% (vekt/vekt) protein.

Type II-TT vaksine emulgert med adjuvans ble immunogen i kaniner i kontrast til ukoblet nativ type II polysakkarid, som mislykkes i å utløse type II polysakkaridspesifikt antistoff. To av tre kaniner som ble immunisert responderte sterkt tre uker etter en enkel dose av II-TT vaksine. Optimalt typespesifikt antistoff ble oppnådd i alle tre kaniner 3 uker etter en boosterdose av II-TT vaksine. Videre øking i type II spesifikk antistofftiter ble ikke sett etter den tredje dose av II-TT vaksine. Resultater in vitro og in vivo eksperimenter anga at antistoffer provosert til II-TT vaksine var funksjonelt aktive mot type II GBS. Serum fra hver av tre kaniner vaksinert med type II-TT vaksine fremmet in vitro dreping av type II GBS ved humane perifere leukocyter og tilveiebragte utavlede mus med fullstendig (100%) beskyttelse mot en lethal dose av type II GBS. II-TT vaksine antiserum ble opsonisk

aktiv mot homologe GBS-stammer (18RS21, S16 og S20) men ikke heterologe GBS serotyper (type Ia og III) testet.

Mens nativ type II polysakkarid inhiberte binding av II-TT vaksine antisera til type II polysakkaridbelagte ELISA-brønner, ble <40% inhibisjon oppnådd med desialylert type II polysakkarid, selv når det ble brukt en konsentrasjon på 200 µg/ml. Dette resultatet antyder at en viktig antigendeterminant i type II polysakkarid er avhengig av nærvær av sialsyrerester. Dette resultatet bekreftet de oppnådd med kanin antisera provosert til hele type II organismer (21). ELISA inhibisjonseksperimenter som anvendte β-O-metylgalaktopyranose som en inhibitor indikerte imidlertid at kanin antisera provosert til II-TT vaksine ikke inneholdt galaktosespesifikke antistoffer. Ingen inhibisjon av binding av II-TT vaksine antiserum til type II nativt polysakkarid ble oppnådd selv med β-O-metylgalaktopyranose i en konsentrasjon på 10 mg/ml. Derfor synes ikke sidekjedegalaktose å være en immundominerende epitop i type II polysakkarid når polysakkaridet er koblet til TT. Disse resultater er i motsetning til immunokjemiske studier utført med kaninsera provosert til hel type II GBS organismer (12, 21) i hvilke galaktosesidekjeden synes å være en av to immunodominerende seter, sammen med en sialsyreavhengig epitop i type II polysakkarid. Fullstendig type II GBS-celler brukt i tidligere studier (12, 21) og ikke dyrket under pH-kontrollerte betingelser kan inneha polysakkarider som i noen grad mangler sialsyre. Under disse omstendigheter kan sidekjedegalaktose være betydeligst antigenisk epitop. Kilden til type II polysakkarid anvendt for å syntetisere II-TT vaksine var en kultur av type II GBS holdt ved en pH-verdi på 7,0; en avsluttende analyse konfirmerte at sialsyre utgjorde -20% (vekt/vekt) av polysakkaridet. Vi kan ikke ekskludere muligheten at å koble type II polysakkarid til TT forandret konformasjonen av polysakkaridet og derved gjør galaktoseepitopen utilgjengelig for gjenkjennelse av vertens immunsystem. Skjønt II-TT vaksineindusert kaninantiserum manglet galaktosespesifikke antistoffer var det fullt funksjonelt in vitro og in vivo mot type II GBS organismer. Hverken kjemisk modifikasjon av noen av sialsyrerestene eller den påfølgende binding av TT til disse seter forandret kritiske antigene epitoper som var nødvendig for å utløse funksjonell type II spesifikk antistoff. At renset IgG fra kaninsera provosert til II-TT vaksine fremmet dreping in vitro av type II GBS ved humane leukocyter foreslår at ikke bare var immunogenisiteten av type II polysakkarid økt ved å konjugeres til TT men også funksjonelle IgG antistoffer ble utløst.

GBS type V kapselpolysakkarid har en struktur med gjentagende enheter som består av en trisakkaridryggrad som inneholder to distinkte sidekjeder på tilstøtende sukkerrester. (Referanse 35; fig. 4). I en av GBS type V-TT konjugatvaksinepreparatene var 25% av sialsyrerestene på den lengre sidekjede (dvs. 3 sukkerrester) i type V polysakkarid oksidert. De oksiderte sialsyrerester ble

brukt som seter for å koble type V polysakkarid til TT. Den rensede type V-TT vaksine ble sammensatt av 38% (vekt/vekt) TT og 62% (vekt/vekt) karbohydrat. V-TT vaksinen blandet med alun ble vist å være immunogen i kaniner. En sterk respons ble observert etter den første dose, og boosterdoser av type V-TT vaksine. Den andre boosterdose resulterte også i en ytterligere økning i type V polysakkarid IgG titer. Serospesifisiteten til type V-TT indusert assay ble demonstrert ved konkurrerende ELISA. Kanin antiserum provosert mot V-TT vaksine er funksjonelt aktiv som vist ved evnen til å drepe type V GBS in vitro i nærvær av humane hvite blodceller og komplement.

Som III-TT vaksine, demonstrerte II-TT vaksine forbedret immunogenisitet i kaniner sammenlignet med aktivt polysakkarid og utløste opsonisk aktivit IgG i kaniner på tross av forskjellen i polysakkaridstruktur, posisjon av sialsyren på polysakkaridet til hvilket TT var bundet og vaksinesammensetning. Type V-TT vaksine viste seg også immunogent i kaniner og å være i stand til å indusere funksjonelle antistoffer in vivo. Vi antesiperer at GBS polysakkarid-proteinkonjugater av denne konstruksjon vil til slutt bestå av komponenter av en multivalent GBS vaksine som er i stand til å tilveiebringe beskyttelse mot GBS serotyper som oftest er assosiert med sykdommer hos mennesker.

I tillegg antesiperer vi at vaksiner kan fremstilles fra konjugatmolekylene i henhold til foreliggende oppfinnelse, ved å tilsette konjugatmolekylene til en farmasøytisk akseptabel bærer. Fortrinnsvis er graden av kryssbinding i de antigene molekyler i henhold til foreliggende oppfinnelse kontrollert i en grad som er tilstrekkelig til å tilveiebringe vaksiner som kan filtersteriliseres gjennom et 0,2 mikron filter. Slike vaksiner er fortrinnsvis oppløselige. Immunisering kan utføres ved å injisere mottakerpattedyret med vaksinen fulgt en gang av en påfølgende boosterinjeksjon hvis nødvendig. En tilstrekkelig dose av vaksinen som skal administreres kan baseres på mengden av polysakkarid tilstede: et område på 3-80 µg av polysakkaridkomponenten til konjugatvaksinen kan bli administrert.

REFERANSER

1. Adams, W.G., J. Kinney, A. Schuchat, C. Collier, C. Papasian, H. Kilbride, F. Riedo, and C. Broome, 1991, Program Abstr. 31st Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1056.

2. Avery, O.T., and W.F. Goebel, 1931. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. V. The immunological specificity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of type III pneumococcus with foreign protein. J. Exp. Med. 54:437-447.

3. Baker, C.J., and M.S. Edwards, 1990, Group B streptococcal infections, p. 742-811, *In* J.S. Remington and J.O. Klein (ed.), Infectious diseases of the fetus and newborn infant. The W.B. Saunders Co., Philadelphia.

4. Baker, C.J., M.S. Edwards, and D.L. Kasper, 1981, Role of antibody to native type III polysaccharide of group B *Streptococcus* in infant infection, Pediatrics 68:544-549.

5. Baker, C.J., and D.L. Kasper, 1976. Correlation of material antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection, N. Engl. J. Med. 294:753-756.

6. Baker, C.J., and D.L. Kasper, 1985. Group B streptococcal vaccines. Rev. Infect. Dis. 7:458-467.

7. Baker, C.J., M.A. Rench, M.S. Edwards, R.J. Carpenter, B.M. Hays, and D.L. Kasper, 1988.

Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B *Streptococcus*. N. Engl. J. Med. 319:1180-1220.

8. Baltimore, R.S., D.L. Kasper, C.J. Baker, and D.K. Goroff, 1977. Antigenic specificity of opsonophagocytic antibodies in rabbit anti-sera to group B streptococci. J. Immunol. 118:673-678.

9. De Cueninck, B.J., T.F. Grebar, T.K. Eisenstein, R.M. Swenson, and G.D. Schockman, 1983. Isolation, chemical composition, and molecular size of extracellular type II and type Ia polysaccharides of group B. streptococci. Infect. Immun. 41:527-534.

10. Dillon, H.C., S. Khare, and B.M. Gray, 1987. Group B streptococcal carriage and disease: a six-year retrospective study. J. Pediatr. 110:31-36.

11. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebars, and F. Smith. 1956. Colormetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.

12. Freimer, E.H. 1967. Type-specific polysaccharide antigens of group B streptococci, J. Exp. Med. 125:381-392.

13. Gelfand, H.M., J.P. Fox, D.R. LeBlanc, and L. Elveback, 1960. Studies on the development of natural immunity to poliomyletis in Louisiana. V. Passive transfer of polioantibody from mother to fetus, and natural decline and disappearance of antibody in the infant. J. Immunol. 85:46-55.

14. Goebel, W.F., and O.T. Avery, 1931. Chemo-Immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. IV. The synthesis of the p-aminobenzyl ether of the soluble specific substance of type III pneumococcus and its coupling with protein. J. Exp. Med. 54:431-436.

15. Gray, B.M. 1979. ELISA methodology for polysaccharide antigens: protein coupling of polysaccharides for adsorption to plastic tubes. J. Immunol. Methods 28:187-192.

16. Hobbs, J.R., and J.A. Davis, 1967. Serum gamma-G globulin levels and gestational age in premature babies. Lancet 493:757-759.

17. Insel, R.A., and P.W. Anderson, 1986. Oligosaccharide-protein conjugate vaccines induce and prime for oligoclonal IgG antibody responses to the *Haemophilus Influenzae* b capsular polysaccharide in human infants. J. Exp. Med. 163:262-269.

18. Jennings, H.J., and C. Lugowski, 1981. Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide tetanus toxoid conjugates. J. Immunol. 127:1011:1018.

19. Jennings, H.J., C. Lugowski, and F.E. Ashton, 1984, Conjugation of meningococcal lipopolysaccharide R-type oligosaccharides to tetanus toxoid as a route to a potential vaccine against group B *Neisseria meningitidis*. Infect. Immun. 43:407-412.

20. Jennings, H.J., K.G. Rosell, E. Katzenellenbogen, and D.L. Kasper. 1983. Structural determination of the capsular

polysaccharide antigen of type II group B *Streptococcus*. J. Biol. Chem. 258:1793-1798.

21. Kasper, D.L., C.J. Baker, B. Galdes, E. Katzenellenbogen, and H.J. Jennings. 1983. Immunochemical analysis and immunogenicity of the type II group B streptococcal capsular polysaccharide. J. Clin. Invest. 72:260-269.

22. Lagergard, T., J. Shiloach, J.B. Robbins, and R. Schneerson. 1990. Synthesis and immunocological properties of conjugates composed of group B *Streptococcus* type III capsular polysaccharide covalently bound to tetanus toxoid. Infect. Immun. 58:687-694.

23. Lancefield, R.C. 1972. Cellular antigens of group B streptococci, p. 57-65. *In* L.W. Wannamaker and J.M. Matson (ed.), Streptococci and streptococcal diseases: recognition, understanding, and management. Academic Press, Inc. New York.

24. Lancefield, R.C., M. McCarty, and W.N. Everly. 1975. Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci. J. Exp. Med. 142:165-179.

25. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

26. Michon, F., E. Katzenellenbogen, D.L. Kasper, and H.L. Jennings. 1987. Structure of the complex group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*. Biochemistry 26:476-486

27. Paoletti, L.C., D.L. Kasper, F. Michon, J. DiFabio, K. Holme, H.J. Jennings, and M.R. Wessels. 1990. An oligosaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine against type III group B Streptococcus. J. Biol. Chem. 265:18278-18283.

28. Paoletti, L.C., D.L. Kasper, F. Michon, H.J. Jennings, T.D. Tosteson, and M.R. Wessels. 1992. Effects of chain length on the immunogenicity in rabbits of group B *Streptococcus* type III oligosaccharide-tetanus toxoid conjugates. J. Clin. Invest. 89:203-209.

29. Schneerson, R. O. Barrera, A. Sutton, and J.B. Robbins. 1980. Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates. J. Exp. Med. 152:361-376.

30. Svenson, S.B. and A.A. Lindberg. 1979. Coupling of acid-labile *Salmonella* specific oligosaccharides to macromolecular carriers. J. Immunol. Methods 25:323-335.

31. Walsh, J.A., and S. Hutchins. 1989. Group B streptococcal disease: its importance in the developing world and prospect for prevention with vaccines. Pediatr. Infect. Dis. J. 8:271-276.

32. Warren, L. 1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem. 234:1971-1975.

33. Wessels, M.R., L.C. Paoletti, D.L. Kasper, J.L. DiFabio, F. Michon, K. Holme, and H.J. Jennings. 1990. Immunogenicity in animals of a

polysaccharide-protein conjugate vaccine against type III group B *Streptococcus*, J. Clin. Invest. 86:1428-1433.

34. Zigterman, J.W.J., J.E.G. van Dam, H. Snippe, F.T.M. Rottsveel, M. Jansze, J.M.N. Willers, J.P. Kamerling, and J.F.G. Vliegenthart. 1985. Immunogenic properties of octasaccharide-protein conjugates derived from *Klebsiella* serotype II capsular polysaccharide. Infect. Immun. 47:421-428.

35. Wessels, M.R., J.L.D;Fabio, V.J. Benedi, D.L. Kasper, F. Michon, J-R. Brisson, J.Jelinkova and H.J. Jennings 1991. Structural Determination and Immunochemical Characterization of the Type V Group B Streptococcus Capsular Polysaccharide. Journal of Biological Chemistry 266:8714-8719.

Mens vi hittil har beskrevet et antall utforminger av foreliggende oppfinnelse er det klart at de basale konstruksjoner kan bli forandret for å tilveiebringe andre utforminger som utnytter fremgangsmåten til foreliggende oppfinnelse. Derfor vil det foretrekkes at området til foreliggende oppfinnelse er definert ved de vedheftede krav heller enn ved de spesifikke utforminger som er blitt presentert hittil ved hjelp av eksempel.

PATENTKRAV

1. Antigenkonjugatmolekyl,
karakterisert ved at det omfatter kapselpolysakkaridet selektert fra gruppen avledet fra en gruppe B streptokokk av type II eller type V bakterier og en proteinkomponent hvori to eller flere sidekjeder som avsluttes med sialsyrerester av polysakkaridkomponenten hver er bundet gjennom en sekundær aminbinding til protein og hvori molekylvekten til polysakkaridet er minst 5 000 dalton.

2. Konjugatmolekylet som angitt i krav 1,
karakterisert ved at mellom 5 og 50% av de terminale sialsyrerester i hvert polysakkarid er tilgjengelig for å bindes til protein.

3. Konjugatmolekylet som angitt i krav 2,
karakterisert ved at mellom 5 og 25% av de terminale sialsyrerester i hvert polysakkarid er tilgjengelig for å bindes til protein.

4. Konjugatmolekyl som angitt i krav 3,
karakterisert ved at mellom 5 og 10% av de terminale sialsyrerester i hvert polysakkarid er tilgjengelig for å bindes til protein.

5. Konjugatmolekyl som angitt i krav 4,
karakterisert ved polysakkaridet er GBS type II og hvori 7% av de terminale sialsyrerester i hvert polysakkarid er tilgjengelig for å bindes til protein.

6. Konjugatmolekyl som angitt i krav 1,
karakterisert ved at det antigene konjugatmolekyl er i stand til å bli filtersterilisert gjennom et 0,2 mikron filter.

7. Konjugatmolekyl som angitt i krav 1,
karakterisert ved at polysakkaridkomponenten har en molekylvekt mellom ca. 5 000 og 1 000 000 dalton.

8. Konjugatmolekyl som angitt i krav 7,
karakterisert ved at polysakkaridkomponenten har en molekylvekt på mellom ca. 50 000 og 500 000 dalton.

9. Konjugatmolekyl som angitt i krav 1,
karakterisert ved at polysakkaridet er GBS type V og hvori ca. 25% de terminale sialsyrerester i hvert polysakkarid er bundet til protein.

10. Konjugatmolekyl som angitt i krav 8,
karakterisert ved at polysakkaridkomponenten har en molekylvekt på mellom ca. 100 000 og 300 000 dalton.

11. Konjugatmolekyl som angitt i krav 10,
karakterisert ved at polysakkaridkomponenten har en molekylvekt på ca. 200 000 dalton.

12. Konjugatmolekyl som angitt i krav 1,
karakterisert ved at proteinet er valgt fra gruppen som består av tetanus toksoid, difteritoksoid og CRM (kryssreaktivt materiale) 197.

13. Fremgangsmåte til å fremstille et konjugatmolekyl av et kapselpolysakkarid fra gruppe B streptokokk type II eller type V bakterier og et protein,
karakterisert ved at den omfatter

(a) å utsette gruppe B streptokokk type II eller type V kapselpolysakkarid til periodatoksidasjon tilstrekkelig til å innføre en aldehydgruppe i to eller flere terminale sialsyrerester bundet til polysakkaridets ryggrad;

(b) å koble det oksiderte gruppe B streptokokk type II eller type V kapselpolysakkarid til et protein gjennom reduktiv aminering for å danne en sekundær aminbinding mellom kapselpolysakkridet og proteinet.

14. Fremgangsmåte som angitt i krav 13,
karakterisert ved at mellom ca. 5 og 50% av sialsyrerestene i hvert polysakkarid blir oksidert for å danne aldehydgrupper som er i stand til å kobles til protein.

15. Fremgangsmåte som angitt i krav 14,
karakterisert ved at mellom ca. 5 og 25% av sialsyrerestene i hvert polysakkarid blir oksidert for å danne aldehydgrupper som er i stand til å kobles til protein.

16. Fremgangsmåte som angitt i krav 15,
karakterisert ved at mellom ca. 5 og 10% av sialsyrerestene i hvert polysakkarid blir oksidert for å danne aldehydgrupper som er i stand til å kobles til protein.

17. Fremgangsmåte som angitt i krav 16,
karakterisert ved at polysakkaridet er GBS type II og hvori 7% av sialsyrerestene i hvert polysakkarid blir oksidert for å danne aldehydgrupper som er i stand til å kobles til protein.

18. Fremgangsmåte som angitt i krav 13,
karakterisert ved at mellom ca. 5 og 50% av sialsyrerestene i hvert polysakkarid blir kovalent bundet til protein.

19. Fremgangsmåte som angitt i krav 18,
karakterisert ved at mellom ca. 5 og 25% av sialsyrerestene i hvert polysakkarid blir kovalent bundet til protein.

20. Fremgangsmåte som angitt i krav 19,
karakterisert ved at mellom ca. 5 og 10% av sialsyrerestene i hvert polysakkarid blir kovalent bundet til protein.

21. Fremgangsmåte som angitt i krav 19,
karakterisert ved at polysakkaridet er GBS type II og hvori 5% av sialsyrerestene i hvert polysakkarid blir kovalent bundet til protein.

22. Fremgangsmåte som angitt i krav 13,
karakterisert ved at polysakkaridet er GBS type V og hvori ca. 25% av de terminale sialsyrerester i hvert polysakkarid er bundet til protein.

23. Konjugatmolekyl,
karakterisert ved at det er fremstilt i henhold til fremgangsmåten i krav 13.

24. Vaksine,
karakterisert ved at den omfatter konjugatmolekyler i henhold til krav 1.

25. Multivalent vaksine,
karakterisert ved at den omfatter konjugatmolekylet som angitt i krav 1 og minst et annet immunogent molekyl som er i stand til å utløse produksjonen av antistoffer til en patogen substans utover gruppe B streptokokk type II.

26. Multivalent vaksine som angitt i krav 25,
karakterisert ved at de andre immunogene molekyler er i stand til å utløse produksjon av antistoffer til patogener selektert fra gruppen som består av gruppe B streptokokk type Ia, Ib, II, III, IV og V, Haemophilus influenzae type b og E. coli type K1.

27. Multivalent vaksine som angitt i krav 26,
karakterisert ved at de andre immunogene molekyler er i stand til å utløse produksjon av antistoffer mot patogener selektert fra gruppen som består av

gruppe B streptokokk type Ia, Ib, II, III, Haemophilus influenzae type b og E. coli type K1.

28. Multivalent vaksine som angitt i krav 27, karakterisert ved at de andre immunogene molekyler er i stand til å utløse produksjon av antistoffer mot patogener selektert fra gruppen som består av gruppe B streptokokk type Ia, Ib, II, og III, og E. coli type K1.

29. Multivalent vaksine som angitt i krav 28, karakterisert ved at de andre immunogene molekyler er i stand til å utløse produksjon av antistoffer mot patogener selektert fra gruppen som består av gruppe B streptokokk type Ia, Ib, II, III.

30. Anvendelse av konjugatmolekylet som angitt i krav 1 i en immunogen mengde til å fremstille en vaksine som kan administreres til en kvinne, slik at det produseres antistoffer som er i stand til å passere inn i et foster unnfanget før eller etter at vaksinen er administrert, i en tilstrekkelig mengde til å gi beskyttelse mot infeksjon i den nyfødte ved fødsel.

31. Anvendelse som angitt i krav 30, hvori vaksinen blir administrert før graviditet.

32. Anvendelse som angitt i krav 30, hvori vaksinen blir administrert til en kvinne i alder mellom 10 og 50 år.

33. Anvendelse som angitt i krav 30, hvori vaksinen blir administrert under graviditet.

34. Anvendelse av konjugatmolekylet som angitt i krav 1 til å fremstille en vaksine for å immunisere mennesker, hvori vaksinen blir administrert i en immunogen mengde.

35. Anvendelse av konjugatmolekylet som angitt i krav 1 til fremstilling av en vaksine til å beskytte en voksen person som risikerer å bli infisert av gruppe B streptokokk type II eller type V, hvori vaksinen administreres i en immunogen mengde.

36. Anvendelse som angitt i krav 35, hvori vaksinen blir administrert til en person hvis immunsystem er undertrykket.

37. Anvendelse som angitt i krav 36, hvori immunsuppresjonen skyldes sykdom valgt fra gruppen som består av kreft og diabetes.

38. Anvendelse som angitt i krav 37, hvori vaksinen blir administrert i en farmasøytisk akseptabel bærer.

39. Anvendelse av konjugatmolekylet som angitt i krav 1 til fremstilling av en vaksine til å immunisere melkedyr mot bovin mastitt, hvori det administreres en immunogen mengde av vaksiner til melkekuer.

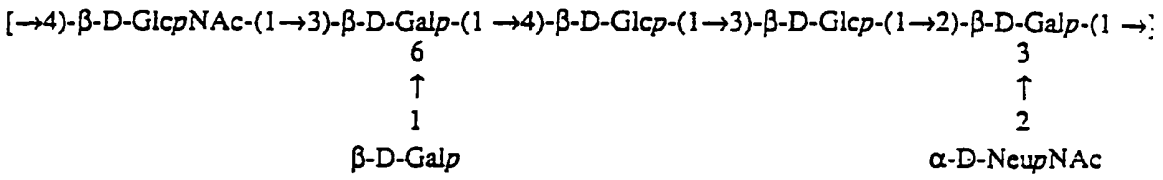

[→4)-β-D-GlcpNAc-(1→3)-β-D-Galp-(1 →4)-β-D-Glcp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→2)-β-D-Galp-(1 →]
6
↑
1
β-D-Galp
3
↑
2
α-D-NeupNAc

FIG. 1

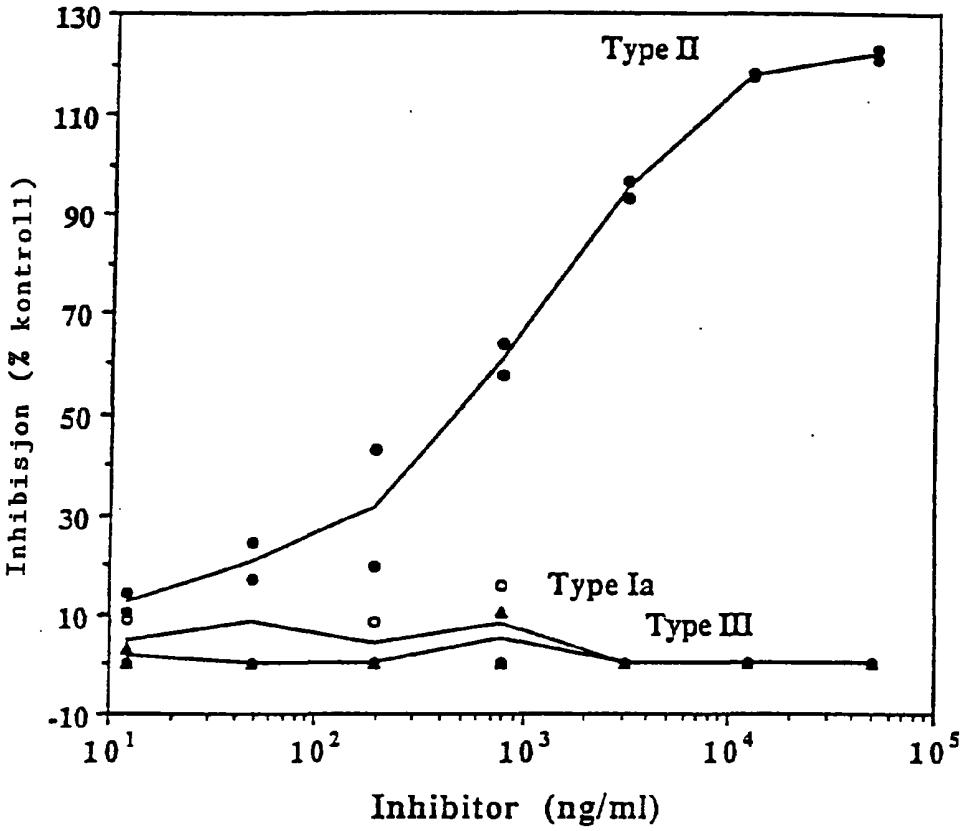

130
110
90
70
50
30
10
-10
Inhibisjon (% kontroll)
Type II
Type Ia
Type III
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Inhibitor (ng/ml)

FIG. 2

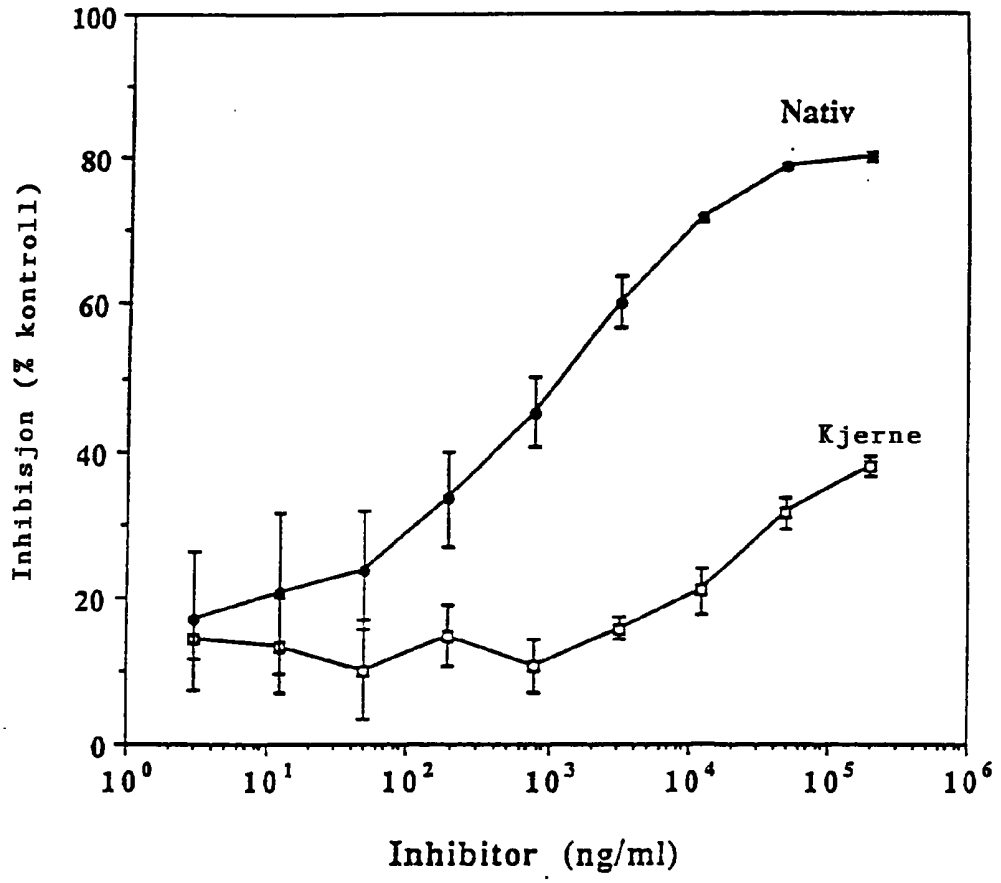

100
80
60
40
20
0
Inhibisjon (% kontroll)
Nativ
Kjerne
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Inhibitor (ng/ml)

FIG. 3

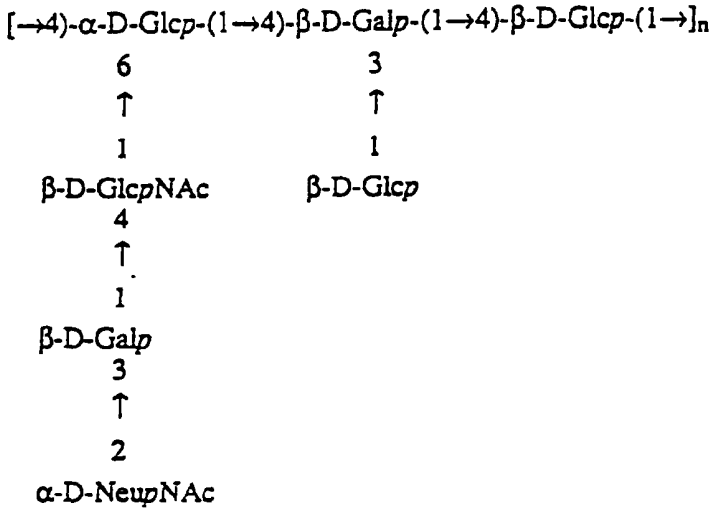

[→4)-α-D-Glcp-(1→4)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-Glcp-(1→]n
6
3
β-D-GlcpNAc
β-D-Glcp
4
β-D-Galp
3
2
α-D-NeupNAc

FIG. 4

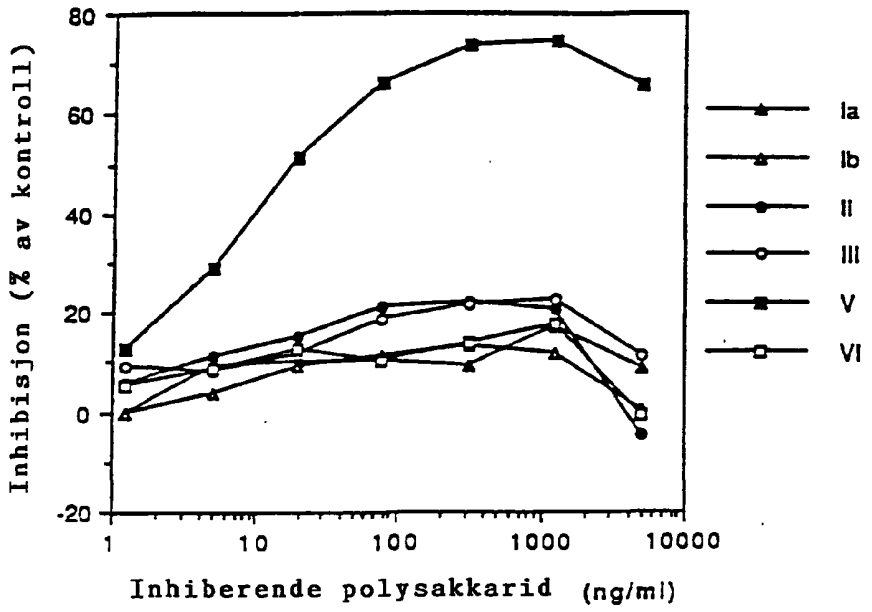

80
60
40
20
0
-20
1
10
100
1000
10000
Inhibisjon (% av kontroll)
Inhiberende polysakkarid (ng/ml)
Ia
Ib
II
III
V
VI

FIG. 5

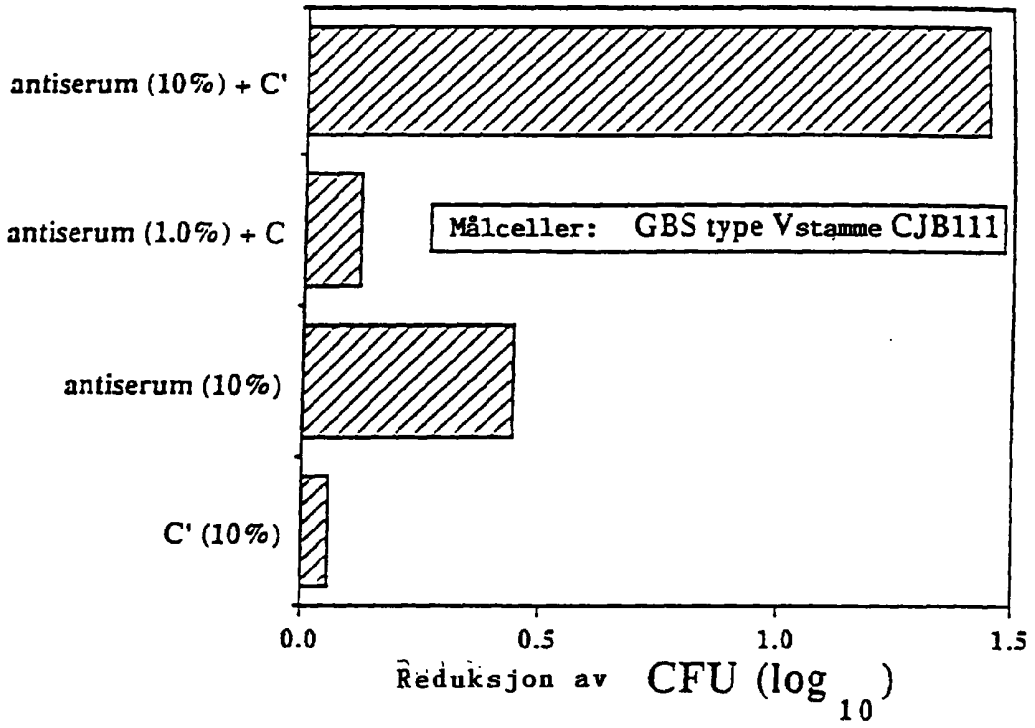

antiserum (10%) + C'
antiserum (1.0%) + C
antiserum (10%)
C' (10%)
Målceller: GBS type Vstamme CJB111
0.0
0.5
1.0
1.5
Reduksjon av CFU (log10)

FIG. 6