(12) **PATENT**

(19) NO (11) **319579** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl[7] A 61 K 39/385, 39/39, 39/102

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19975366	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.05.24 PCT/FR96/00791
(22)	Inng.dag	1997.11.21	(85)	Videreføringsdag	1997.11.21
(24)	Løpedag	1996.05.24	(30)	Prioritet	1995.05.24, FR, 9506417
(41)	Alm.tilgj	1997.11.21			
(45)	Meddelt	2005.08.29			

(73) Innehaver Pasteur Merieux Serums et Vaccins SA , 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon, FR

(72) Oppfinner François Arminjon, Lyon, FR
Jean-René Cartier, Lyon, FR

(74) Fullmektig Ellen Holm - Bryns Zacco AS, Postboks 765 Sentrum, 0106 Oslo, NO

(54) Benevnelse **Vaksine sammensetning inneholdende høymolekylært polyribosylribitolfosfat, og fremgangsmåte for fremstilling derav**

(56) Anførte publikasjoner EP 0208375

(57) Sammendrag

Vaksinesammensetning inneholdende en eller flere antigener omfattende kapsulært polysakkarid med høy molekylvekt av typen b Haemophilus influenza, eller polyribosylribitol fosfat, koblet til tetanustoksoid og en aluminium-basert adjuvant, hvori den aluminium-baserte adjuvanten har, i dets naturlige tilstand, eller etter aniontilsetning, et ladningsnullpunkt som er mindre enn 7,2. En fremgangsmåte for fremstilling av nevnte vaksinesammensetning er også beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører området vaksinesammensetninger og spesielt vaksinesammensetninger omfattende minst et antigen som er høymolekylært polyribosylribitolfosfat som danner det kapsulære polysakkaridet Haemophilus influensatype b koblet til tetanus anatoksin, samt en aluminiumbasert adjuvans. Foreliggende oppfinnelse angår videre en fremgangsmåte for å fremstille vaksinen.

Et antigen som kan bli anvendt for vaksineformål i mennesker for å beskytte seg mot infeksjoner forårsaket av Haemophilus influensa type b er kjent innenfor teknikkens stand, og spesielt gjennom artikkelen "Quantitative and Qualitative Analyses of Serum Antibodies Elicited in Adults by Haemophilus influenzae Type b and Pneumococcus Type 6A Capsular Polysaccharide Tetanus Toxid Conjugates" Rachel Schneerson et al, Infect. Immun. May 1986. Dette antigenet blir dannet av et kapsulært polysakkarid fra bakterier, polyribosylribitolfosfat (eller PRP), som er gjort T-avhengig på grunn av kobling til et bærerprotein, tetanus anatoksin. Forsøk utført på rhesus barn har vist, som angitt i artikkelen, at immunresponsen var på samme tid høyere og tidligere dersom antigenet var assosiert med aluminiumhydroksid. Som angitt i en artikkel med tittelen "Clinical and Immunologic responses to the capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae type b alone or conjugated to tetanus toxoid in 18-23 month-old children", Bo A. Claesson and al, The Journal of Pediatrics, May 1988, er det blitt bemerket at dette antigenet, adsorbert på aluminiumhydroksid, var mindre immunogent etter lagring enn antigenet opprettholdt i saltvannsoppløsning, hvilket kan være forårsaket degradering av polysakkaridet.

For å løse dette stabilitetsproblemet til PRP-T, ble det foreslått i tidligere teknikk å lyofilisere det. Denne løsningen, til tross for at den muliggjør at antigenet beholder dets immunogene karakter over tid, viser noen ulemper spesielt på fremstillingsnivået. Lyofilisering og spesielt driftsbetingelsene som er nødvendige kompliserer produksjonsprosessen og dette øker kostnadene. I tillegg, ved administreringstidspunktet, er det nødvendig å ta opp igjen lyofilisatet, som betyr at det er nødvendig å ha, i tillegg til lyofilisatet, en væske for å løse opp dette lyofilisatet; og denne operasjonen representerer en tilleggsulempe for behandleren og representerer, som mange manipuleringer, risiko for at det ikke utføres tilfredsstillende.

I tillegg har et antall væskevaksinekombinasjoner antigener adsorbert på en aluminiumbasert adjuvans og det vil være fordelaktig å kunne, uten tap av immunogenisitet, tilsette antigener dannet av PRP-T til disse. Løsningen foreslått i tidligere teknikk og bestående av en spesialsprøyte med to rom (et første rom

inneholdende PRP-T i lyofilisert form og et andre rom inneholdende andre antigener i den vandige suspensjonen) hvor innholdet blir blandet for anvendelse bare ved administreringstidspunktet, er ikke tilfredsstillende verken når det gjelder produksjonskostnader eller når det gjelder operasjoner som skal bli utført av behandleren.

Det er følgelig ønskelig å kunne oppnå en flytende vaksinesammensetning som omfatter antigener dannet av PRP-T som har en meget god immunogen karakter opprettholdt i løpet av tidsperioden, og hvor fremstillingsbetingelsene muliggjør produksjon med lave kostnader.

For å oppnå disse målene vedrører oppfinnelsen en vaksinesammensetning omfattende minst et antigen som er høymolekylært polyribosylribitolfosfat som danner det kapsulære polysakkaridet til Heamophilus influensa type b koblet til tetanus anatoksin, samt en aluminiumbasert adjuvans, kjennetegnet ved at den aluminiumbaserte adjuvansen har et punkt med null ladning som er mindre enn 7,2.

Det ble overraskende oppdaget at PRP-T under disse betingelsene beholder dets meget gode immunogene karakter i vandig medium i løpet av tidsperioden.

Ifølge et bestemt karaktertrekk ifølge oppfinnelsen omfatter en aluminiumbaserte adjuvansen aluminiumhydroksider hvortil anioner er blitt tilsatt.

Det er følgelig mulig å anvende en adjuvans perfekt kvalifisert for vaksinebruk, med å beholde en meget god immunogenisitet av PRP-T i vandig medium.

Ifølge et annet karaktertrekk ifølge oppfinnelsen blir anionene valgt fra fosfater eller sitrater.

Ifølge et aspekt av oppfinnelsen omfatter den aluminiumbaserte adjuvans aluminiumfosfater.

Ifølge et annet aspekt av oppfinnelsen omfatter den aluminiumbaserte adjuvans kalium- og aluminiumsulfater.

Sammensetningen som blir oppnådd har følgelig alle trygghetsgarantiene som er nødvendige for vaksineadministrering.

Ifølge en spesiell egnet metode for å utføre oppfinnelsen omfatter vaksinesammensetningen i tillegg en eller flere vaksinevalenser valgt fra: difteri, tetanus, whooping hoste, hepatitt B og poliomyelitt.

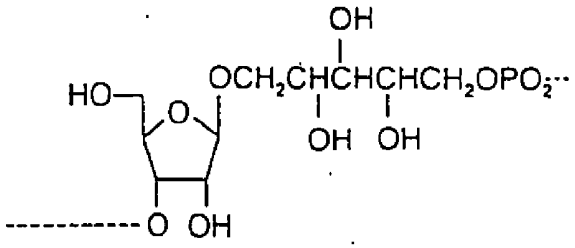
Det er følgelig mulig å oppnå flytende, stabile vaksinekombinasjoner hvori hvert antigen beholder dets immunogenisitet som muliggjør at behandleren, uten ytterligere manipulasjoner, kan vaksinere samtidig mot flere sykdommer. Dette muliggjør at kostnadene blir redusert når det gjelder produktene og når det gjelder antall besøk som må foretas.

Oppfinnelsen vedrører likeledes en fremgangsmåte for fremstilling av en vaksinesammensetning omfattende minst et antigen bestående av høymolekylært polyribosylribitolfosfat som danner det kapsulære polysakkaridet til Haemophilus influensa type b koblet til tetanusanatoksin, kjennetegnet ved at den omfatter tilsetning av en adjuvans til vaksinesammensetningen ved hjelp av en suspensjon av aluminiumkomplekser som har et punkt med null ladning som er mindre enn 7,2.

En foretrukken utførelsesform omfatter en fremgangsmåte, kjennetegnet ved at den består av tilsetning til aluminiumkompleksene anioner valgt fra fosfater og sitrater.

Foreliggende oppfinnelse vil bli bedre forstått når den detaljerte beskrivelsen leses.

Antigenet som blir dannet av kapsulær polysakkarid Haemophilus influensa type b er en lineær polymer bestående av ribose, ribitol og fosforsyre som har følgende monomeriske struktur:



Antall monomerer av denne typen er høyt (høyeren enn 100), og fører til et polysakkarid hvor molekylvekten er i størrelsesorden 500.000 til 1000.000.

For å indusere en immunrespons i T-cellene til små barn blir dette antigenet konjugert til et bærerprotein dannet av tetanus anatoksin.

Et slikt antigen kan for eksempel bli oppnådd ifølge fremgangsmåten beskrevet i "Quantitative and Qualitative analysis of serum antibodies elicited in adults by Haemophilus influenzae type b and Pneumococcus type 6A capsular polysaccharide-tatanus toxoid conjugates", Schneerson et al, Infect. Immun. 52: 519 (1986).

Karaktertrekkene som er hensiktsmessige for dette antigenet: høyt antall monomerer av polysakkaridet, egenskap til bærerproteinet, egenskap til koblingen mellom polysakkaridet og bærerproteinet gir spesielle kvaliteter og spesielt en meget god immunogenisitet.

For å beholde disse kvalitetene i det flytende mediet i løpet av denne tiden er det nå blitt oppdaget at det er mulig å anvende aluminiumkomplekser hvor punktet med null ladning er mindre enn omtrent 7,2. Det blir til og med oppdaget at når PRP-T er assosiert med slike aluminiumkomplekser blir dets meget gode immunogenisitetskarakter beholdt i løpet av tiden i flytende medium og dette foregår uansett grad av immobilisering på aluminiumkompleksene.

Punkt med null ladning (Point of Zero Charge, PZC) av aluminiumkompleksene er ekvivalent med det isoelektriske punktet til proteinene. Det er pH hvorpå ladningen på overflaten av aluminiumkompleksene er 0. Dette punktet med 0 ladning blir oppnådd ved målinger av zeta potensialet som kan bli utført ifølge forskjellige teknikker og den grunnleggende metoden er elektroforese. Det er mulig å utføre målinger ved hjelp av an apparatur så som DELSA 440 av Coulter Electronics, Hialeah, FI, USA).

Målingsmetodene og apparaturen kan være forskjellige og resultatene oppnådd kan likeledes variere. Aluminiumkompleksene egnede for foreliggende oppfinnelse er de hvor punktet med null ladning er mindre enn 7,2.

Aluminiumkomplekser egnede for formålet ifølge oppfinnelsen er de som har et punkt med null ladning som er mindre enn 7,2 eller de som kan bli modifisert for å redusere deres punkt med null ladning.

Blant aluminiumkompleksene som naturlig har et punkt med null ladning som er mindre enn 7,2 er det mulig å gjengi de som vanligvis blir betegnet aluminiumfosfater innen området vaksineadjuvanser, selv om fra et kjemisk synspunkt, inneholder salter som er forskjellige fra aluminiumfosfater. De er for eksempel ADJUFOS® aluminiumfosfat tilført av SUPERFOS BIOSECTOR a/s.

De kan likeledes være aluminiumkomplekser oppnådd ved omsetning av natriumkarbonat i PBS buffer på kalium og aluminiumsulfater.

Med slike komplekser, dersom PRP-T er fullstendig eller delvis bundet til aluminiumkompleksene, blir dets immunogenisitet beholdt igjennom tidsperioden.

Alternativt er det mulig ifølge oppfinnelsen å anvende aluminiumkomplekser som av natur har et punkt med null ladning som er høyere enn 7,2 og som er modifisert for å redusere dette null ladningspunktet.

Disse utgjør spesielt aluminiumkomplekser kjent innenfor fagområdet vaksineadjuvanser som aluminiumhydroksider, selv om de ut i fra et kjemisk synspunkt blir dannet eksklusivt fra aluminiumhydroksid. De kan spesielt være ALHYDROGEL aluminiumhydroksid tilført av SUPERFOS BIOSECTOR a/s, produktet anvendt som adjuvans i D.T. Coq^{TM} markedet av PASTEUR MERIEUX S & V eller selv produktet anvendt som en adjuvans i Rekombivax markedet til MERCK.

Ifølge oppfinnelsen består modifikasjon av disse aluminiumkompleksene av tilsetting av anioner. Anionene tilsatt kan være av forskjellig natur, under den forutsetningen at de alle har den garantien av å være trygge som er nødvendig for anvendelse av vaksineformål. Det er blitt observert at tilsetning av sitrationer eller fosfationer er spesielt godt egnet for formålene ifølge oppfinnelsen. Spesielt kan fosfationene komme fra en oppløsning inneholdende monokaliumfosfat, dinatriumfosfat og natriumklorid.

Det er likeledes mulig å anvende en kombinasjon av forskjellige anioner, for eksempel en kombinasjon av fosfationer og karbonationer.

Det er mulig at anionene blir tilsatt suspensjonen av aluminiumkomplekser før tilsetning av PRP-T, eller at anionene tilsettes til PRP-T før de bringes i kontakt med

aluminiumkomplekser. Det er foretrukket å suspendere PRP-T i en oppløsning inneholdende de valgte anionene før disse bringes i kontakt med adjuvans.

Mengdene av anionene tilsatt blir beregnet for å redusere punktet med null ladning til aluminiumkompleksene anvendt til en verdi som er mindre enn omtrent 7,2. Denne mengden varierer følgelig som en funksjon av egenskapene til aluminiumkompleksene som anvendes, samt mengden av anioner som muligens blir avgitt fra bufferforbindelsene som blir anvendt. Bestemmelsen derav hører inn under rammen til fagfolk innenfor dette området.

En vaksinesammensetning som er stabil i den flytende tilstanden blir følgelig oppnådd, dvs. hvor PRP-T har beholdt den gode immunogene karakteren.

Det er i tillegg blitt observert at på grunn av tilsetning av anionene, ble immobilisering av PRP-T på aluminiumkompleksene redusert og dette kan bidra til opprettholdelse av dets integritet og følgelig dets immunogenisitet.

Til tross for at dette ikke er foretrukket i foreliggende oppfinnelse er det allikevel mulig å tilsette anioner til aluminiumkompleksene som naturlig har en punkt null med ladning som allerede er mindre enn omtrent 7,2. I dette tilfellet er det blitt observert at punkt med null ladning kan bli redusert, og at immobiliseringen av PRP-T på aluminiumkompleksene likeledes er redusert.

Betegnelsen immobilisering skal bety en hvilken som helst form for binding som gjør PRP-T umulig å dosere når supernatanten blir samlet etter sentrifugering.

Vaksinesammensetningene ifølge oppfinnelsen omfatter vaksineantigenet dannet av PRP-T, men kan likeledes omfatte andre vaksineantigener og spesielt de som er ment å beskytte mot difteri, tetanus, whooping hoste (cellulær eller acellulær), poliomyelitt, hepatitt A, hepatitt B osv. Et hvilket som helst vaksineantigen som er kompatibel med PRP-T og aluminiumkompleksene kan inngå i vaksinesammensetningene ifølge oppfinnelsen. Det er følgelig mulig å ha flytende vaksinekombinasjoner som muliggjør, i en enkelt administrasjon, vaksinering mot flere sykdommer.
Vaksinesammensetningene ifølge oppfinnelsen er spesielt tilpasset for administrering til små barn.

I tillegg er det blitt observert at anvendelse av en slik flytende vaksinesammensetning i løpet av boostervaksinering utført på små barn på 12 måneder som har mottatt injeksjoner i alder 2, 4 og 6 måneder vil muliggjøre produksjon av anti-PRP-T-antistoffer å bli forøket på en spesiell måte med hensyn til en booster utført under de samme betingelsene med TETRAct-HIB™ vaksinen markedsført av PASTEUR MERIEUX Sèrums et Vaccins.

EKSEMPEL 1

En vaksinesammensetning blir fremstilt begynnende fra følgende bestanddeler:

• Renset tetanus anatoksin (PTA)	1 vaksineenhet
• Renset difteri anatoksin (PDA)	1 vaksineenhet
• Pertussis celleblanding	15 OU (opacimetriske enheter)
• PRP-T (uttrykt i vekst av PRP)	43,75 µg
• Aluminiumhydroksid (uttrykt i Al) så som det som er tilstede i D.T. Coq™	0,3 mg
• Fosfater	30 µmol
• 10 mmolar tris buffer omfattende 8,5% sukrose	0,125 ml
• vann for injeksjon qsp	0,5 ml

Fosfationer blir tilsatt begynnende med en oppløsning inneholdende monokaliumfosfat, dinatriumfosfat og natriumklorid.

EKSEMPEL 2

Immunogenisiteten til vaksinesammensetningen oppnådd ifølge eksempel 1 ble testet hos små barn sammenlignet med immunogenisiteten til en vaksine av en tidligere type dannet av vaksinen markedsført under navnet TETRAct-HIB™ og som har de samme vaksinevalensene, men hvor den lyofiliserte bibeholdte PRP-T valensen blir gjenopprettet like før injeksjon med vaksinesammensetningen inneholdende difteri og tetanus anatoksiner samt cellulær Pertussis blanding.

Denne testen ble utført på en gruppe av 262 nyfødte, hvor 130 mottok formuleringen ifølge eksempel 1 og 132 mottok den kommersielle vaksinen TETRAct-HIB™. Administrering av vaksinene ble utført intramuskulært etter 2, 6 og 12 måneder.

Før immuniseringen var GMT-titere til anti-PRP-antistoffet 0,2 µg/ml i de to gruppene. Det var 1,9 og 1,4 µg etter den andre injeksjonen og 5,9 og 5,8 etter tredje injeksjon for henholdsvis vaksinen ifølge oppfinnelsen og vaksinen ifølge tidligere teknikk.

Etter den andre injeksjonen hadde 98% (med vaksinen ifølge oppfinnelsen) og 93% (med vaksinen ifølge tidligere teknikk) av de nyfødte et anti-PRP-antistoffnivå som var høyre enn 0,15 µg/ml. Dette nivået ble opprettholdt etter tredje injeksjon i 100% av de nyfødte som mottok vaksine ifølge oppfinnelsen og i 99% av de nyfødte som mottok vaksinen ifølge tidligere teknikk.

Etter tredje injeksjon var mengdene av antistoffet rettet mot hver av vaksinevalensene i gjennomsnitt følgende:

	Tidligere teknikk vaksine	Vaksine ifølge oppfinnelsen
Difteri UI/ml	1,35	1,56
Tetanus UI/ml	5,1	4,9
Pertussis agglutin. titer GMT	597	601
PRP µg/ml	5,8	5,9

Etter boosterinjeksjonen utført ved 12 måneder var mengdene av antistoffene denne gangen:

	Tidligere teknikk vaksine	Vaksine ifølge oppfinnelsen
Difteri UI/ml	3,2	4,5
Tetanus UI/ml	12,0	11,5
Pertussis agglutin. titer GMT	2447	2560
PRP µg/ml	19,4	32,6

Disse resultatene viser at vaksinekombinasjonen oppnådd ifølge oppfinnelsen er stabil og bossterinjeksjonen utført på barn som var 12 måneder gamle ble utført med en vaksine som var blitt fremstilt 18 måneder tidligere. Resultatene viste derimot at immunogenisiteten til hver av antigenene til kombinasjonen blir opprettholdt. I tillegg blir en boosterffekt som er klart høyere med vaksinesammensetningen ifølge oppfinnelsen oppnådd, med hensyn til boostereffekten oppnådd med en vaksine ifølge tidligere teknikk som har samme vaksinevalenser.

EKSEMPEL 3

Doser av vaksinesammensetningen som beskrevet i eksempel 1 blir oppbevart ved +4°C i 18 til 24 måneder og deretter anvendt i et klinisk forsøk som inkluderer 104 barn.

Titerene oppnådd for hver av vaksinevalensene er oppsummert i tabellen nedenfor.

	Før vaksinering	Etter vaksinering
Difteri G.M.T.	0,013	0,736
Tetanus G.M.T.	0,181	3,831
PRP G.M.T. µg/ml	0,22	6,40

Det fremgår følgelig at selv etter lagring i en lang periode ved +4°C beholder vaksinesammensetningen ifølge oppfinnelsen dets immunogene karakter, både når det gjelder PRP-T og andre vaksineantigener.

EKSEMPEL 4

Vaksinesammensetningene omfatter hver PRP-T i en konsentrasjon på 20 µg PRP/ml som blir fremstilt i nærvær av aluminiumkomplekser av forskjellige typer, og forskjellige punkter med null ladning (PZC). Mengden av aluminiumkomplekser er slik at konsentrasjonen av aluminium i sammensetningen er 0,6 g/l.

Sammensetning 1: aluminiumkompleks dannet av aluminiumhydroksid som den som blir anvendt i D.T. Coq^{TM} vaksinen markedsført av PMsv. PZC = 11,3.

Sammensetning 2: aluminiumkompleks dannet av aluminiumhydroksid som den som blir anvendt i rekombivax vaksine markedsført av Merck. PZC = 7,4.

Sammensetning 3: aluminiumkompleks dannet av aluminiumfosfat oppnådd ved blanding av natriumklorid og trinatriumfosfat, PZC = 6,2.

Sammensetning 4: aluminiumkompleks dannet av produktet betegnet alum og oppnådd ved omsetning av natriumkarbonat i PBS buffer på kalium og aluminiumfosfater. PZC = 5,4.

Vaksinesammensetningene blir oppnådd ved enkel blanding av suspensjonene inneholdende aluminiumkomplekser og PRP-T.

EKSEMPEL 5

Immunogenisiteten til forskjellige sammensetninger oppnådd blir testet i mus.

For å verifisere den immunogene stabiliteten blir sammensetningene som blir oppnådd utsatt for betingelser ved akselerert aldring, dvs. de blir holdt ved 37°C i 2 uker.

Immunogenisitetstesten blir utført på mus med vekt 22-24 g hvortil doser på 0,5 ml hver inneholdende 2,5 µg PRP blir administrert subkutant. Administreringene blir utført på dag 0 og på dag 14. Blod fra mus blir tatt på dag 14 og på dag 21 og nivået av antistoffene blir bestemt ved radioimmunologiske bestemmelser. Antall mus inokulert for hver vaksine sammensetning er 8.

Resultatet blir betraktet å være tilfredsstillende dersom:

- Det er minst 75% av musene som på dag 21 har et titer på ≥ 0,5.
- Det er en betydelig forskjell mellom resultatene oppnådd på dag 14 og de som blir oppnådd på dag 21.

Det antas at vaksinesammensetningen som blir oppnådd er stabil dersom resultatene som blir oppnådd etter akselerert aldring er tilfredsstillende.

Resultatene oppnådd for sammensetningene testet er oppsummert i tabellen nedenfor:

	PZC	Immuno. test
C1	11,3	Ikke tilfredsstillende
C2	7,4	Ikke tilfredsstillende
C3	6,2	Tilfredsstillende
C4	5,4	Tilfredsstillende

Det ses derfor at når punktet med null ladning av aluminiumkompleksene er en sur pH er den oppnådde vaksinesammensetningen stabil.

EKSEMPEL 6

Prosentandel PRP-T immobilisert på aluminiumkomplekser er verifisert for hver av sammensetningene i eksempel 4.

Hver av sammensetningene blir sentrifugert og supernatanten samlet hvorpå mengden av ikke-immobilisert PRP-T blir målt ved ELISA eller ved RIA.

Forskjellen mellom konsentrasjonen av PRP-T i utgangssammensetningen og mengden bestemt i supernatanten muliggjør bestemmelse av prosentandel immobilisert PRP-T.

Resultatene som blir oppnådd er angitt nedenfor:

C1: 100%
C2: 100%
C3: 100%
C4: 70%

EKSEMPEL 7

Sammensetning 1 er modifisert ved tilsetning av fosfationer dertil for å oppnå en konsentrasjon på 50 mmol/l. Immunogenisitetstesten utført i mus etter akselerert aldring av oppløsningen fører da til et tilfredsstillende resultat.

Bestemmelse av prosentandel immobilisering av PRP-T på aluminiumkomplekser viser at under disse betingelsene bare 20% av PRP-T er immobilisert.

EKSEMPEL 8

Sammensetning 1 er modifisert ved denne gangen å tilsette citrationer dertil for å oppnå en konsentrasjon på 200 mmol/l.

Immunogenisitetstesten utført i mus etter akselerert aldring av oppløsningen fører da til et tilfredsstillende resultat.

Bestemmelse av prosentandel immobilisering av PRP-T på aluminiumkomplekser viser at under disse betingelsene er PRP-T ikke lenger immobilisert.

EKSEMPEL 9

Sammensetning 2 blir modifisert ved tilsetning av fosfationer for å oppnå en konsentrasjon på 20 mmol/l.

Immunogenisitetstesten utført i mus etter akselerert aldring av oppløsningen fører da til et tilfredsstillende resultat. Bestemmelse av prosentandel immobilisering av PRP-T på aluminiumkompleksene viste at under disse betingelsene er PRP-T ikke lenger immobilisert.

EKSEMPEL 10

Sammensetning 3 blir modifisert ved tilsetning av fosfationer i forskjellige mengder og prosentandelen av immobiliseringen av PRP-T på aluminiumkompleksene blir bestemt.

Dersom mengden av fosfationet tilsatt er slik at konsentrasjonen av fosfater i sammensetningen er 2 mmol/l, blir prosentandelen PRP-T immobilisert redusert til 10%.

Dersom mengden av fosfationer tilsatt er slik at konsentrasjonen av fosfatene i sammensetningen er 4 mmol/l, er PRP-T ikke lenger immobilisert.

Immunogenisitetstestene utført i mus etter akselerert aldring av oppløsningen er tilfredsstillende.

EKSEMPEL 11

Sammensetning 4 blir modifisert ved tilsetning av fosfationer for å oppnå en konsentrasjon på 60 mmol/l.

Bestemmelse av prosentandelen PRP-T immobilisert på aluminiumkomplekser viser at under disse betingelsene bare 30% av PRP-T er immobilisert. Immunogenisitetstesten utført i mus etter akselerert aldring av oppløsningen fører til et tilfredsstillende resultat.

EKSEMPEL 12

En vaksinesammensetning blir dannet begynnende fra følgende bestanddeler:

• Aluminiumhydroksid (uttrykt i Al)		0,25 mg
• PRP-T (uttrykt i vekt av PRP)		10 µg
• PDA		1 vaksinedose
• PTA		1 vaksinedose
• Fosfater		15 µmol
• Polioantigener	type I	40U
	type II	8U
	type III	32U
• Pertussis anatoksin		25 µg
• Pertussis F-HA		25 µg
• 50 mmolar trisbuffer sammensetning 42,5% sukrose		0,125 ml
• Vann for injeksjon	qsp	0,5 ml

Immunogenisitetstestene i forhold til PRP-T utført i mus med en oppløsning fremstilt på denne måten, samt med en oppløsning lagret 1 måned ved 37°C, en oppløsning lagret i 2 måneder ved 25°C og en oppløsning lagret i 6 måneder ved 4°C har alle ført til tilfredsstillende resultater som viser stabiliteten til PRP-T i et slikt miljø.

EKSEMPEL 13

En vaksinesammensetning blir dannet begynnende fra følgende bestanddeler:

• Aluminiumhydroksid (uttrykt i Al)		0,3 mg
• PRP-T (uttrykt i vekt av PRP)		10 µg
• PDA		1 vaksinedose
• PTA		1 vaksinedose
• Pertussis anatoksin		25 µg
• F-HA		25 µg
• Hbs protein (så som tilstede i GenHevac B PASTEUR® vaksineringsdose)		20 µg
• Polio antigener	type I	40 U
	type II	8 U
	type III	32 U
• Fosfater		20 µmol
• Karbonater		5 µl
• 50 mmolar trisbuffer omfattende 42,5% sukrose		0,125 ml
• Vann for injeksjon	qsp	0,5 ml

Stabiliteten til oppløsningen dannet på denne måten blir verifisert ved tilføring derav to uker ved 37°C og ved deretter å utføre en immunogenisitetstest av PRP-T i mus som beskrevet i eksempel 5.

Resultatene som blir oppnådd er tilfredsstillende.

En immunogenisitetstest for Hbs protein blir utført. Denne testen blir utført i mus og består i å bestemme anti-Hbs antistoff ved ELISA og deretter bestemme 50% effektiv dose som kan, dersom testen blir betraktet å være tilfredsstillende, være mindre enn 0,970 µg Hbs protein.

Resultatene oppnådd med oppløsninger fremstilt som angitt ovenfor og oppbevart i 2 uker i 37°C før den blir testet var tilfredsstillende.

EKSEMPEL 14

En vaksinesammensetning blir fremstilt begynnende fra følgende bestanddeler:

- Aluminiumhydroksid (uttrykt i Al) 0,3 mg
- PRP-T (uttrykt i vekt PRP) 10 µg
- PDA 1 vaksinedose
- PTA 1 vaksinedose
- Pertussis anatoksin 10 µg
- F-HA 5 µg
- Fimbriae 5 µg
- Pertactin 3 µg
- Hbs protein (som til stede i GenHevac B PASTEUR® vaksinering) 20 µg

• Polioantigener	type I	40 U
	type II	8 U
	type III	32 U
• Fosfater		20 µmol
• Karbonater		10 µmol
• $MgCl_2$		5 µmol
• 50 mmolar trisbuffer omfattende 42,5% sukrose		0,125 ml
• Vann for injeksjon	qsp	0,5 ml

Immunogenisitetstester i forhold til PRP-T utført som beskrevet i eksempel 5, og de i forhold til Hbs protein utført som beskrevet i eksempel 13, førte alle til tilfredsstillende resultater og dette viser stabiliteten til vaksinesammensetningen ifølge oppfinnelsen.

P a t e n t k r a v

1.
Vaksinesammensetning, omfattende minst et antigen som er høymolekylært polyribosylribiolfosfat som danner det kapsulære polysakkaridet til Heamophilus influensa type b koblet til tetanus anatoksin samt en aluminiumbasert adjuvans, k a r a k t e r i s e r t v e d at den aluminiumbaserte adjuvansen har et punkt med null ladning som er mindre enn 7,2.

2.
Vaksinesammensetning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den aluminiumbaserte adjuvansen omfatter aluminiumhydroksider hvortil anioner er blitt tilsatt.

3.
Vaksinesammensetning ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at anionene blir valgt fra fosfater og sitrater.

4.
Vaksinesammensetning ifølge ett av de foregående kravene, k a r a k - t e r i s e r t v e d at den aluminiumbaserte adjuvansen omfatter aluminiumfosfater.

5.
Vaksinesammensetning ifølge ett av de foregående kravene, k a r a k - t e r i s e r t v e d at den aluminiumbaserte adjuvansen omfatter kalium- og aluminiumsulfater.

6.
Vaksinesammensetning ifølge ett av de foregående kravene, k a r a k - t e r i s e r t v e d at den i tillegg omfatter en eller flere av vaksinevalensene valgt blant: difteri, tetanus, whooping hoste, hepatitt B og poliomyelitt.

7.
Fremgangsmåte for fremstilling av en vaksinesammensetning omfattende minst et antigen bestående av høymolekylært polyribosylribitolfosfat som danner det kapsulære

polysakkaridet til Haemophilus influensa type b koblet til tetanusanatoksin, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter tilsetning av en adjuvans til vaksinesammensetningen ved hjelp av en suspensjon av aluminiumkomplekser som har et punkt med null ladning som er mindre enn 7,2.

8.

Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at den består av tilsetning til aluminiumkompleksene anioner valgt fra fosfater og sitrater.