



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2200642 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 39/095 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2012.07.30
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.04.18
(86)	Europeisk søknadsnr	08838605.7
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.10.17
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.06.30
(30)	Prioritet	2007.10.19 US 999590 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(60)	Utskilt fra	12158035.1
(73)	Innehaver	Novartis AG, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Sveits
(72)	Oppfinner	CONTORNI, Mario, Novartis Vaccines Via Fiorentina 1, I-53100 Siena, Italia KAZZAZ, Jina, Novartis Vaccines 45 Sidney Street, Cambridge, MA 02139, USA O'HAGAN, Derek, Novartis Vaccines 45 Sidney Street, Cambridge, MA 02139, USA SINGH, Manmohan, Novartis Vaccines 45 Sidney Street, Cambridge, MA 02139, USA UGOZZOLI, Mildred, Novartis Vaccines 45 Sidney Street, Cambridge, MA 02139, USA
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Meningokokk vaksine formuleringer
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 1 741 443 B1, WO-A-2007/100699 B1, ARIGITA C ET AL: "Stability of mono- and trivalent meningococcal outer membrane vesicle vaccines" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 22, no. 5-6, 26 January 2004 (2004-01-26), pages 630-643, XP004485193 ISSN: 0264-410X, GRANOFF D M ET AL: "MF59 adjuvant enhances antibody responses of infant baboons immunized with Haemophilus influenzae type b and Neisseria meningitidis group C oligosaccharide-CRM197 conjugate vaccine" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, vol. 65, no. 5, 1 May 1997 (1997-05-01), pages 1710-1715, XP002081016 ISSN: 0019-9567 cited in the application, SINGH M ET AL: "A preliminary evaluation of alternative adjuvants to alum using a range of established and new generation vaccine antigens" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 24, no. 10, 6 March 2006 (2006-03-06), pages 1680-1686, XP025151148 ISSN: 0264-410X [retrieved on 2006-03-06]

MENINGOKOKKVAKSINE-FORMULERINGER

TEKNISK OMRÅDE

Denne oppfinnelse er innen området av formulering av meningokokkvaksiner.

5

TEKNIKKENS STAND

Forskjellige vaksiner mot serogruppe B av *Neisseria meningitidis* ("Men-B") undersøkes for tiden, men de deler en felles egenskap.

- 10 Ytre membranvesikkel (OMV) produkter produsert av Novartis (MENZB™), ved the Finlay Institute (VA-MENGOC-BC™), ved det norske folkehelseinstitutt (MEMBVAC™) og ved det nederlandske vaksineinstitutt (HEXAMEN™ og NONAMEN™) inkluderer alle en aluminiumhydroksidadjuvans. Den "universelle vaksine for serogruppe B meningokokk" rapportert av Novartis i referanse 1 inkluderer også aluminiumhydroksid-
15 adjuvans, som den bivalente OMV vaksinen gjør som nylig rapportert i referanse 2.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

- Ved utvikling av Novartis Men-B vaksinen, har oppfinnerne funnet at optimal immunogenitet krever tilstedeværelse av en adjuvans. Dessuten har de funnet at adsorpsjon
20 til aluminiumhydroksid gir god lagringsstabilitet for vaksineantigenene. For å unngå behovet for å anvende aluminiumsalter, har man imidlertid søkt alternativer.

- Bruken av ikke-aluminium adjuvanser for Men-B vaksiner er allerede kjent. Referanse 3 rapporterer f.eks. bruk av MF59 olje-i-vann emulsjonen som en adjuvans for Men-B
25 vesikler, og referanse 4 beskriver bruken av immunostimulerende oligonukleotider og/eller MF59 som adjuvanser. Immunogenitetsresultatene med MF59 var utmerket, og fortsatt forskning har vist at denne adjuvans kan øke stamme-dekningen av en Men-B vaksine sammenlignet med aluminiumhydroksid, har videre arbeid uventet vist
30 at Men-B immunogener med olje-i-vann emulsjoner som adjuvans har dårlig langtidsstabilitet. Det er således et formål for den foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en måte for å forbedre lagringsstabiliteten for Men-B vaksiner når det anvendes olje-i-vann emulsjon adjuvanser.

- Tidligere forsøk med olje-i-vann emulsjoner kommer fra området med influensavaksiner. FLUAD™ produktet inkluderer MF59 emulsjonen, og det er distribuert i et
35 forblandet flytende format i en enkelt beholder ("et rørs" metoden). Denne for-

blandede formulering er formuleringen som nå er blitt funnet til å gi dårlig stabilitet for Men-B vaksiner.

5 Som et alternativ til en "ett rørs" formulering med olje-i-vann emulsjon vaksiner, er en "to rørs" metode blitt anvendt for influenza (se f.eks. ref 5), for HSV (f.eks. ref 6) og for HIV (f.eks. ref 7), hvor vaksinen og emulsjonen fordeles sammen, begge i flytende format, for ekstemperert blanding på brukertidspunktet.

10 Ifølge den foreliggende oppfinnelse er en annen metode fulgt for Men-B vaksiner, ved anvendelse av en dobbel formulering av (i) en olje-i-vann emulsjon adjuvans og (ii) en Men-B immunogen komponent i frysetørket form. De frysetørkede Men-B antigenene kan rekonstitueres til flytende form med adjuvans på brukertidsrommet og er klar for administrering til en pasient. Denne formulering er blitt funnet til å gi utmerket resultat med hensyn til både stabilitet og immunogenitet.

15 Oppfinnerne har videre funnet at den frysetørkede komponenten kan bibeholde effektivitet når ett eller flere konjugerte sakkarider fra *N.meningitidis* i serogruppe A, C, W135 og/eller Y (Men-A, -C, -W135 og -Y) er inkludert. Kombinasjonen av antigener for immunisering mot multiple meningokokk serogrupper, som inkluderer serogruppe B, ved anvendelse av en enkelt frysetørket komponent er særlig fordelaktig.

25 Oppfinnelsen tilveiebringer således et kit som omfatter: (i) en første beholder som inneholder en adjuvans som omfatter en olje-i-vann emulsjon; og (ii) en andre beholder som inneholder et frysetørket antigenisk preparat som omfatter et immunogen for å fremkalle en immunrespons mot *N-meningitidis* serogruppe B. Det frysetørkede antigene preparat kan videre omfatte et konjugert kapsulært sakkarid fra en eller flere av *N-meningitidis* serogrupper A, C, W135 og/eller Y.

30 Oppfinnelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for å fremstille et immunogent preparat som omfatter et trinn med å blande: (i) en adjuvans som omfatter en olje-i-vann emulsjon, og (ii) et frysetørket antigenisk preparat som omfatter et immunogen for å stimulere en immunrespons mot *N.meningitidis* serogruppe B. Det frysetørkede antigeniske preparat kan videre omfatte et konjugert kapselsakkarid fra en eller flere av *N.meningitidis* serogrupper A, C, W135 og/eller Y.

35

Det frysetørkede antigeniske preparat

Oppfinnelsen anvender et frysetørket antigenisk preparat som inkluderer et immuno-
gen for å stimulere en immunrespons mot Men-B. Det kan eventuelt inkludere et
konjugert kapsulært sakkarid fra en eller flere av Men-A, Men-C, Men-W135 og/eller
5 Men-Y.

Men-B immunogenet kan omfatte membranvesikler fra en Men-B bakterie og/eller
Men-B rekombinante proteiner og/eller Men-B lipo-oligosakkarid (LOS).

10 Frysetørking av Men-B OMV'er er kjent innen teknikken [8], men disse OMV'er ble
deretter administrert sammen med en aluminiumfosfat-adjuvans. Således var pro-
blemet med antigen stabilitet når kombinert med en olje-i-vann emulsjon adjuvans
ikke rapportert. Likeledes er frysetørking av meningokokk konjugatantigener kjent,
som inkluderer påfølgende rekonstituering med MF59 [9], men ikke i kombinasjon
15 med noe Men-B antigen.

Men-B komponenter omfattende vesikler

Vesikler for anvendelse som Men-B vaksinekomponenter inkluderer en hvilken som
helst proteoliposom vesikkel oppnådd ved å nedbryte en bakterie yttermembran for å
20 danne vesikler derfra som inkluderer proteinkomponenter av yttermembranen. Så-
ledes inkluderer betegnelsen OMV'er (noen ganger omtalt som "blebs"), mikrovesikler
(MV'er [10]) og "native OMV'er" ("NOMV'er" [11]).

MV'er og NOMV'er er naturlig forekommende membranvesikler som dannes spontant
25 under bakterievekst og som frigis inn i dyrkingsmedium. MV'er kan oppnås ved å
dyrke *Neisseria* i buljongdyrkingsmedium, separere hele celler fra de mindre MV'er i
buljongdyrkingsmediet (f.eks. ved filtrering eller ved sentrifugering ved lav hastighet
for å pelletere kun cellene og ikke de mindre vesiklene), og deretter samle MV'ene fra
mediet som er uten celler (f.eks. ved filtrering, ved differensial presipitering eller
30 aggregering av MV'er, ved høyhastighetssentrifugering for å pelletere MV'ene).
Stammer for anvendelse i produksjon av MV'er kan generelt velges på grunnlag av
mengden av MV'er produsert i kultur, f.eks. beskriver referanse 12 & 13 *Neisseria* med
høy MV produksjon.

35 OMV'er fremstilles kunstig fra bakterier, og kan fremstilles ved å anvende detergent
behandling (f.eks. med deoksykholat), eller ved ikke-detergent midler (f.eks. se
referanse 14). Metoder for å oppnå passende OMV preparater er f.eks. omtalt i refe-

ransene som angitt her. Teknikker for å danne OMV'er inkluderer behandling av bakterier med en gallesyresaltdetergent (f.eks. salter av litocholsyre, chenodeoksy-cholsyre, ursodeoksycholeoylsyre, deoksycholeoylsyre, cholsyre,ursocholsyre osv., med natriumdeoksykholat [15 & 16] som foretrukket for å behandle *Neisseria*) ved en pH
 5 som er tilstrekkelig høy til ikke å presipitere detergenten [17]. Andre teknikker kan gjennomføres med hovedsakelig fravær av detergent [14] ved å anvende teknikker slik som sonikering, homogenisering, mikrofluidisering, kavitasjon, osmotisk sjokk, maling, fransk presse, blanding osv. Metoder ved anvendelse av ingen eller lite detergent kan bibeholde anvendbare antigener slik som NspA [14]. Således kan en
 10 metode anvende en OMV ekstraksjonsbuffer med omtrent 0,5 % deoksykholat eller lavere, f.eks. omtrent 0,2 %, omtrent 0,1 %, < 0,05 % eller null.

En anvendbar prosess for OMV fremstilling er beskrevet i referanse 18 og involverer ultrafiltrering på ubehandlede OMV'er, heller enn høyhastighetsentrifugering. Proses-
 15 sen kan involvere et trinn ved ultrasentrifugering etter at ultrafiltrering finnes sted.

Vesikler kan fremstilles fra en hvilken som helst Men-B stamme for anvendelse med oppfinnelsen. De kan være av en hvilken som helst serotype (f.eks. 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16 osv.), en hvilken som helst sero-subtype og en hvilken som helst immunotype
 20 (f.eks. L1; L2; L3; L3,3,7; L10 osv.). Meningokokkene kan være fra en hvilken som helst passende linje, som inkluderer hyperinvasive og hypervirulente linjer, f.eks. hvilken som helst av de etterfølgende syv hypervirulente linjer: subgruppe I; subgruppe III; subgruppe IV-1; ET-5 kompleks; ET-37 kompleks; A4 klynge; linje 3. Disse linjer er blitt definert ved multilocus enzymelektroforese (MLEE), men multilocus
 25 sekvenstyping (MLST) er også blitt anvendt for å klassifisere meningokokker [ref 19], f.eks. ET-37 komplekset er ST-11 komplekset ved MLST, ET-5 komplekset er ST-32 (ET-5), linje 3 er ST-41/44 osv. Vesikler kan fremstilles fra stammer som har en av de etterfølgende subtyper: P1.2, P1.2,5; P1.4; P1.5; P1.5,2; P1.5,c; P1.5c,10; P1.7,16; P1.7,16b; P1.7h,4; P1.9; P1.15; P1.9,15; P1.12,13; P1.13; P1.14; P1.21,16;
 30 P1.22,14.

Vesikler som anvendes med oppfinnelsen kan fremstilles fra villtype Men-B stammer eller fra mutantstammer. Referanse 20 omhandler f.eks. preparater av vesikler oppnådd fra *N.meningitidis* med et modifisert *fur* gen. Referanse 27 lærer at *nspA* eks-
 35 presjon bør oppreguleres med samtidig *porA* og *cps* knockout. Ytterligere knockout mutanter av *N.meningitidis* for OMV produksjon er omtalt i referanse 27 til 28. Referanse 21 omhandler vesikler hvor fHBP er oppregulert. Referanse 22 omhandler

konstruksjon av vesikler fra stammer modifiser til å uttrykke seks forskjellige PorA subtyper. Mutant *Neisseria* med lave endotoksinnivåer, oppnådd ved knockout av enzymer involvert i LPS biosyntese, kan også anvendes [23,24]. Disse eller andre mutanter kan alle anvendes med oppfinnelsen.

5

Således kan en Men-B stamme anvendt med oppfinnelsen i noen utførelsesformer uttrykke mer enn PorA subtype. 6-valent og 9-valent PorA stammer er tidlig blitt konstruert. Stammen kan uttrykke 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 eller 9 PorA subtyper. P1.7,16; P1.5-1,2-2; P1.19,15-1; P1.5-2,10; P1.12-1,13; P1.7-2,4; P1.22,14; P1.7-1,1 og/eller
 10 P1.18-1,3,6. I andre utførelsesformer kan en stamme være nedregulert for PorA ekspresjon f.eks. hvor mengden av PorA er blitt redusert ved minst 20 % (f.eks. ≥ 30 %, ≥ 40 %, ≥ 50 %, ≥ 60 %, ≥ 70 %, ≥ 80 %, ≥ 90 %, ≥ 95 % osv.) eller til og med slått ut i forhold til villtypenivåer (f.eks. i forhold til stamme H44/76, som omtalt i referanse 30).

15

I noen utførelsesformer kan en Men-B stamme overuttrykke (i forhold til den tilsvarende villtypestamme) bestemte proteiner. Stammer kan f.eks. overuttrykke NspA, protein 287 [45], fHBP [21], TbpA og/eller TbpB [25], Cu,Zn-superoxid dismutase [25] osv.

20

I noen utførelsesformer kan en Men-B stamme inkludere en eller flere av knockout og/eller over-ekspresjonsmutasjonene som angitt i referanse 26 til 29. Foretrukne gener for nedregulering og/eller knockout inkluderer: (a) Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA og/eller TbpB [26], (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA og/eller TbpB [27]; (c) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, GalE, LbpA, LpbB, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA og/eller TbpB [28]; og (d) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, Opa, OpC, PilC, PorB, SiaD, SynA, SynB og/eller SynC [29].

30

Der hvor en mutantstamme anvendes, kan den i noen utførelsesformer ha en eller flere eller alle av de etterfølgende egenskaper; (i) nedregulert eller utslått LgtB og/eller GalE for å trunkere meningokokk LOS; (ii) oppregulert TbpA; (iii) oppregulert Hsf; (iv) oppregulert Omp85; (v) oppregulert LbpA; (vi) oppregulert NspA; (vii) utslått PorA; (viii) nedregulert eller utslått FrpB; (ix) nedregulert eller utslått Opa; (x) nedregulert eller utslått Opc; (xii) deletert cps genkompleks. Et trunkert LOS kan
 35

være ett som ikke inkluderer en sialyl-lakto-N-neotetraose epitop f.eks. kan det være et galaktose-defisient LOS. LOS kan ha ingen α kjede.

5 Dersom LOS er til stede i en vesikkel, da er det mulig å behandle vesikkelen for å koble dens LOS og proteinkomponenter ("intra-bleb" konjugering [29]).

Oppfinnelsen kan anvendes med blandinger av vesikler fra forskjellige stammer. Referanse 30 omhandler f.eks. vaksine som omfatter multivalente meningokokkvesikelsammensetninger, som omfatter en første vesikkel avledet fra en meningokokk stamme med en serosubtype som er vanlig i et brukerland, og en andre vesikkel av-
 10 ledet fra en stamme som ikke behøver å ha en serosubtype hindring i et brukerland. Referanse 31 omhandler også anvendbare kombinasjoner av forskjellige vesikler. En kombinasjon av vesikler fra stammer i hver av L2 og L3 immunotypene kan anvendes i noen utførelsesformer.

15 Vesikkelbaserte antigener kan fremstilles fra serogrupper annet enn Men-B (f.eks. referanse 17 omhandler en prosess for Men-A). Oppfinnelsen kan følgelig anvendes med vesikler fremstilt fra serogrupper annet enn Men-B (f.eks. A, C, W135 og/eller Y). Hovedfokuset er imidlertid på Men-B.

20

Men-B komponenter som omfatter rekombinante proteiner

Rekombinante proteiner har også blitt rapportert for anvendelse som vaksine-immunogener mot Men-B. For eksempel er forskjellige antigener rapportert i referanse 32 til 40. Slike antigener kan anvendes alene eller i kombinasjoner. Der multiple
 25 rensede proteiner er kombinert, da er det nyttig å anvende en blanding av 10 eller færre (f.eks. 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) rensede antigener.

En særlig anvendbar kombinasjon av antigener er omtalt i referanse 1 og 40, og en sammensetning kan således inkludere 1, 2, 3, 4 eller 5 av: (1) et "NadA" protein; (2)
 30 en "fHBP" protein, tidligere kjent som "741"; (3) et "936" protein; (4) et "953" protein og (5) et "287" protein. Andre mulige antigenkombinasjoner kan omfatte et transferrin-bindingsprotein (f.eks. TbpA og/eller TbpB) og et Hsf antigen. Andre mulige rensede antigener inkluderer proteiner som omfatter en eller flere av de etterfølgende aminosyresekvenser: SEKV ID NR:650 fra ref 32; SEK ID NR:878 fra ref
 35 32; REKV ID NR:884 fra ref 32; SEKV ID NR:4 fra ref 33; SEKV ID NR:598 fra ref 34; SEKV ID NR: 818 fra ref 34; SEKV ID NR:864 fra ref 34; SEKV ID NR:866 fra ref 34; SEKV ID NR: 1196 fra ref 34; SEKV ID NR:1272 fra ref 34; SEKV ID NR:1274 fra ref

34; SEKV ID NR:1640 fra ref 34; SEKV ID NR:1788 fra ref 34; SEKV ID NR:2288 fra ref 34; SEKV ID NR:2466 fra ref 34; SEKV ID NR:2554 fra ref 34; SEKV ID NR:2576 fra ref 34; SEKV ID NR:2606 fra ref 34; SEKV ID NR:2608 fra ref 34; SEKV ID NR: 2616 fra ref 34; SEKV ID NR:2668 fra ref 34; SEKV ID NR: 2780 fra ref 34; SEKV ID NR:2932 fra ref 34; SEKV ID NR:2958 fra ref 34; SEKV ID NR:2970 fra ref 34; SEKV ID NR:2988 fra ref 34, eller et polypeptid som omfatter en aminosyresekvens som: (a) har 50 % eller større identitet (f.eks. 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % eller mere) med nevnte sekvenser; og/eller (b) omfatter et fragment av minst n påfølgende aminosyrer fra nevnte sekvenser, hvor n er 7 eller mere (f.eks. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 eller flere). Foretrukne fragmenter for (b) omfatter en epitop fra den relevante sekvensen. Mere enn ett (f.eks. 2, 3, 4, 5, 6) av disse polypeptider kan være inkludert.

fHBP antigenet faller innenfor tre distinkte varianter [39]. En Men-B komponent ifølge oppfinnelsen kan inkludere en enkelt fHBP variant, men den vil vanligvis inkludere et fHBP fra hver av to eller alle tre varianter. Den kan således inkludere en kombinasjon av to eller tre forskjellige rensede fHBP'er valgt fra: (a) et første protein omfattende en aminosyresekvens med minst a % sekvensidentitet med SEKV ID NR: 1 og/eller som omfatter en aminosyresekvens som består av et fragment av minst x påfølgende aminosyrer fra SEKV ID NR: 1; (b) et andre protein som omfatter en aminosyresekvens med minst b % sekvensidentitet med SEKV ID NR: 2 og/eller som omfatter en aminosyresekvens som består av et fragment av minst y påfølgende aminosyrer fra SEKV ID NR: 2, og/eller (c) et tredje protein som omfatter en aminosyresekvens med minst c % sekvensidentitet med SEKV ID NR: 3 og/eller som omfatter en aminosyresekvens som består av et fragment av minst z påfølgende aminosyrer fra SEKV ID NR: 3.

Verdien av a er minst 85, f.eks. 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 eller mere.

Verdien av b er minst 85 f.eks. 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 eller mere.

Verdien av c er minst 85 f.eks. 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 eller mere.

Verdien av a , b og c er ikke egentlig relatert til hverandre.

35

Verdien av x er minst 7 f.eks. 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160,

180, 200, 225, 250). Verdien av y er minst 7 f.eks. 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). Verdien av z er minst 7 f.eks. 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250). Verdien av x, y og z er ikke egentlig relatert til hverandre.

I noen utførelsesformer vil fHBP protein/proteiner være lipidisert, f.eks. i et N-terminalt cystein. I andre utførelsesformer vil de ikke være lipidiserte.

10

En anvendbar sammensetning basert på rensede proteiner omfatter en blanding av: (i) et første polypeptid med en aminosyresekvens SEKV ID NR: 4; (ii) et første polypeptid med en aminosyresekvens SEKV ID: NR: 5 eller SEKV ID NR: 7; og (iii) et første polypeptid med aminosyresekvens SEKV ID NR:6. Se referanse 1 & 40.

15

Men-B komponenter som omfatter LOS

Meningokokkvaksiner basert på lipooligosakkarid er blitt rapportert. LOS kan anvendes alene eller konjugert til en bærer. Når den er konjugert, kan konjugering være via en lipid A del i LOS eller ved en hvilken som helst annen passende enhet f.eks. dets KDO rester. Dersom lipid A enheten av LOS er fraværende, da er slik alternativ binding essensiell.

20

LOS kan være fra en hvilken som helst immunotype f.eks. L2, L3, L7, osv.

25 Heller enn anvendelse av nativ LOS er det foretrukket å anvende en modifisert form. Disse modifikasjoner kan oppnås kjemisk, men det er mere passende å sjalte ut enzymene i Men-B som ansvarlig for visse biosynteseaddisjoner. LOS kan f.eks. modifiseres til å fjerne i det minste den terminale Gal av den native lakto-N-neotetraoseenheten, og denne modifikasjon kan oppnås ved å sjalte ut ett eller flere 30 av de relevante enzymene. Enzymene som er ansvarlig for å addere de to terminale monosakkarider i et nativt LOS (salisytsyre og galaktose) kan sjaltes ut, enten for å eliminere bare den terminale Sia eller for å eliminere Sia-Gal disakkaridet. Utsjalting av *lgtB* genet f.eks. fjerner Sia-Gal. En utsjalting av *ga/E* genet tilveiebringer også et anvendbart modifisert LOS. Et lipid A fett-transferasegen kan sjaltes ut [41].

35

Minst en primær O-bundet fettsyre kan fjernes fra LOS [42]. LOS med et redusert antall sekundære acylkjeder per LOS molekyl kan også anvendes [43]. LOS kan være uten α kjede.

- 5 LOS kan omfatte GlcNAc-Hep₂fosfoetanolamin-KDO₂-Lipid A [44].

Blandede Men-B komponenter

Oppfinnelsen kan anvende vesikler, rensede polypeptider eller LOS som Men-B antigenet. Den kan også anvende kombinasjoner av disse tre antigener f.eks. (i)
 10 vesikler + rensede polypeptider; (ii) vesikler + LOS; (iii) rensede polypeptider + LOS; eller (iv) vesikler + rensede polypeptider + LOS. Disse kombinasjonene kan dannes ved å fremstille de individuelle komponentene separat og deretter blande dem. Referanse 45 omhandler f.eks. å tilsette rensede proteiner til vesikler for å tilveiebringe en sammensetning med bredere effektivitet.

15

Serogrupper A, C, W135 og Y

Konjugerte monovalente vaksiner mot serogruppe C er blitt godkjent for human bruk, og inkluderer MENJUGATE™, MENINGITEC™ og NEISVAC-C™. Blandinger av konjugater fra serogrupper A+C er kjent [46,47] og blandinger av konjugater fra serogrupper A+C+W135+Y er blitt rapportert [48-51] og ble godkjent i 2005 som det vandige
 20 MENACTRA™ produktet.

Den frysetørkede komponenten som anvendes med oppfinnelsen kan inkludere ett eller flere konjugater av kapselsakkarider fra 1, 2, 3 eller 4 meningokokk serogrupper
 25 A, C, W135 og Y f.eks. A+C, A+W135, A+Y, C+W135, C+Y, W135+Y, A+C+W125, A+C+Y, A+W135+Y, A+C+W135+Y osv. Komponenter som inkluderer sakkarider fra alle fire serogrupper A, C, W135 og Y er foretrukne.

Kapselsakkaridet i serogruppe A meningokokker er en homopolymer av (α 1→6)-
 30 bundet N-acetyl-D-mannosamin-1-fosfat, med delvis o-acetylering i C3 og C4 stillingene. Acetylering i C-3 stillingen kan være 70-95 %. Betingelser som anvendes for å rense sakkaridet kan resultere i de-O-acetylering (f.eks. under basiske betingelser), men er anvendbare for å opprettholde OAc i denne C-3 stillingen. I noen utførelsesformer er minst 50 % (f.eks. minst 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller mere) av
 35 mannosaminrestene i en serogruppe A sakkarider O-acetylerede i C-3 stillingen. Acetylgrupper kan erstattes med blokkerende grupper for å forhindre hydrolyse [52],

og slike modifiserte sakkarider er fremdeles serogruppe A sakkarider innen betydningen ifølge oppfinnelsen.

Serogruppe C kapselsakkaridet er en homopolymer av (α 2→9)-bundet sialinsyre (N-acetyl-neuraminsyre eller "NeuNAc"). Sakkaridstrukturen skrives som →9)-Neu p NAc 7/8 OAc-(α 2→. De fleste serogruppe C stammer har O-acetylgrupper i C-7 og/eller C-8 i sialinsyrerestene, men omtrent 15 % av kliniske isolater mangler disse O-acetylgrupper [53,54]. Tilstedeværelsen eller fravær av OAc grupper danner unike epitoper, og spesifisitet og antistoffbinding til sakkaridet kan påvirke dets baktericide aktivitet mot O-acetylt (OAc+) og de-O-acetylt (OAc-) stammer [55-57]. Serogruppe C sakkarider anvendt med oppfinnelsen kan fremstilles fra enten OAc+ eller OAc- stammer. Lisensierte Men-C konjugatvaksiner inkluderer både OAc- (NEISVAC-C™) og OAc+ (MENJUGATE™ & MENINGITEC™) sakkarider. I noen utførelsesformer er stammer for produksjon av serogruppe C konjugater OAc+ stammer, f.eks. serotype 16, serosubtype P1.7a,1 osv. Således kan C:16:P1.7a,1 OAc+ stammer anvendes. OAc+ stammer i serosubtype P1.1 er også anvendbare, slik som C11 stammen.

Serogruppe W135 sakkaridet er en polymer av sialinsyre-galaktose disakkaridenheter. Som serogruppe C sakkaridet har det variabel O-acetylering, men i sialinsyre 7 og 9 stillingene [58]. Strukturen er skrevet som: →4)-D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2→6)-D-Gal- α (1→.

Serogruppe Y sakkaridet er tilsvarende serogruppe W135 sakkaridet, unntatt at den disakkarid-repeterende enheten inkluderer glukose i stedet for galaktose. Lik serogruppe W135, har det variabel O-acetylering i sialinsyre 7 og 9 stillingene [58]. Serogruppe Y strukturen er skrevet som: →4)-D-Neup5Ac(7/9OAc)- α -(2→6)-D-Glc- α -(1→.

Sakkaridene som anvendes ifølge oppfinnelsen kan være O-acetylt som beskrevet ovenfor (f.eks. med det samme o-acetyleringsmønsteret som man ser i native kapselsakkarider), eller de kan være delvis eller totalt de-O-acetylte i en eller flere stillinger av sakkaridringene, eller de kan være hyper-O-acetylt i forhold til de native kapselsakkaridene.

Sakkaridenhetene i konjugater kan omfatte full-lengde sakkarider som fremstilt fra meningokokker, og/eller kan omfatte fragmenter av full-lengde sakkarider, dvs. sakkaridene kan være kortere enn de native kapselsakkaridene som man ser i bakterier.

Sakkaridene kan således være depolymeriserte, med depolymerisering som skjer under eller etter sakkaridrensing men før konjugering. Depolymerisering reduserer kjedelengden til sakkaridene. En depolymeriseringsmetode involverer bruken av hydrogenperoksid [48]. Hydrogenperoksid tilsettes til et sakkarid (f.eks. for å gi en endelig H_2O_2 konsentrasjon på 1 %), og blandingen inkuberes deretter (f.eks. ved omtrent 55°C) inntil en ønsket kjedelengdereduksjon er blitt oppnådd. En annen depolymeriseringsmetode involverer syrehydrolyse [49]. Andre depolymeriseringsmetoder er kjent innen teknikken. Sakkaridene som anvendes for å fremstille konjugater for anvendelse ifølge oppfinnelsen kan oppnås ved en hvilken som helst av disse depolymeriseringsmetoder. Depolymerisering kan anvendes for å tilveiebringe en optimal kjedelengde for immunogenitet og/eller for å redusere kjedelengde for fysisk håndterbarhet av sakkaridene. I noen utførelsesformer har sakkarider det etterfølgende område av gjennomsnittlig grad av polymerisering (Dp): A=10-20; C=12-22; W135=15-25, Y=15-25. Med hensyn til molekylvekt, heller enn Dp, er anvendbare områder for alle serogrupper: <100kDa; 5kDa-75kDa; 7kDa-50kDa; 8kDa-35kDa; 12kDa-25kDa; 15kDa-22kDa.

I noen utførelsesformer kan den gjennomsnittlige molekylvekten for sakkarider fra hver av meningokokk serogrupper A, C, W135 og Y være mere enn 50kDa f.eks. $\geq 75kDa$, $\geq 100kDa$, $\geq 110kDa$, $\geq 120kDa$, $\geq 130kDa$ osv. [59], og til og med opp til 1500kDa, særlig som bestemt av MALLS. For eksempel: et Men-A sakkarid kan være i området 50-500kDa f.eks. 60-80kDa; et Men-C sakkarid kan være i området 100-210kDa; en Men-W135 sakkarid kan være i området 60-190kDa f.eks. 120-140kDa, og/eller et Men-Y sakkarid kan være i området 60-190kDa f.eks. 150-160kDa.

Massen av meningokokksakkarid per serogruppe i den rekonstituerte vaksine vil vanligvis være mellom 1 μg og 20 μg , f.eks. mellom 2 og 10 μg per serogruppe, eller omtrent 4 μg eller omtrent 5 μg eller omtrent 10 μg . Der hvor konjugater fra mer enn en serogruppe er inkludert, da kan de være tilstede i hovedsakelig like masser, f.eks. er massen av hver serogrupperes sakkarid innen +10 % av hverandre. Som et alternativ til et likt forhold, kan en dobbel masse av serogruppe A sakkarid anvendes. Således kan en vaksine inkludere Men-A sakkarid i 10 μg og Men-C, -W135 og -Y sakkarider i 5 μg hver.

Foretrukne bærerproteiner er bakterielle toksiner, slik som difteri eller tetanustoksiner, eller toksoider eller mutanter derav. Disse er vanlig anvendt i konjugatvaksiner. CRM₁₉₇ difteritoksinmutanten er særlig foretrukket [60]. Andre

passende bærerproteiner inkluderer N-meningitidis yttermembran proteinkompleks [61], syntetiske peptider [62, 63], varmesjokkproteiner [64, 65], pertussis proteiner [66, 67], cytokiner [68], lymfokiner [68], hormoner [68], vekstfaktorer [68], artifisielle proteiner som omfatter multiple humane CD4⁺ T celle epitoper fra

5 forskjellige patogenavlede antigenener [69] slik som N19 [70], protein D fra *H-influenzae* [71-73], pneumolysin [74] eller dets ikke-toksiske derivater [75], pneumokokk overflateprotein PspA [76], jernopptakproteiner [77], toksin A eller B fra *C-difficile* [78], rekombinant *Pseudomonas aeruginosa* eksoprotein A (rEPA) [79] osv. Et enkelt bærerprotein kan bære sakkarider fra multiple ulike serogrupper [80], men

10 denne oppstilling er ikke foretrukket. Der den frysetørkede komponenten inkluderer konjugater fra mer enn en meningokokk serogruppe, da kan de forskjellige konjugater anvende ulike bærerproteiner (f.eks. en serogruppe på CRM197, en annen på tetanustoksoid) eller de kan anvende det samme bærerprotein (f.eks. sakkarider fra to serogrupper separat konjugert til CRM197 og deretter kombinert).

15 Konjugater med et sakkarid:protein forhold (vekt/vekt) på mellom 1:5 (dvs. overskudd av protein) og 5:1 (dvs. overskudd av sakkarid) kan anvendes, f.eks. forhold mellom 1:2 og 5:1 og forhold mellom 1:1,25 og 1:2,5. Som beskrevet i referanse 82, kan ulike meningokokk-serogruppekonjugater i en blanding ha ulike sakkarid:protein

20 forhold, f.eks. en kan ha et forhold på mellom 1:2 & 1:5, mens en annen kan ha et forhold på mellom 5:1 & 1:1,99.

Sakkarider og konjugater med egenskapene omtalt i referanse 82 er anvendbare.

25 Bærermolekylet kan konjugeres kovalent til meningokokksakkaridet direkte eller via en linker. Forskjellige linkere er kjent, f.eks. en adipinsyrelinker, som kan dannes ved å kople en fri -NH₂ gruppe (f.eks. introdusert for et sakkarid ved aminering) med adipinsyre (f.eks. ved å anvende di-imid aktivering) og deretter kopling av et protein til det resulterende sakkarid-adipinsyre mellomprodukt [83, 84]. En annen foretrukket

30 bindingstype er en karbonyl linker, som kan dannes ved reaksjon av en fri hydroksylgruppe av et sakkarid med CDI [85, 86] etterfulgt av reaksjon med et protein for å danne en karbamatbinding. Andre linkere inkluderer β-propionamido [87], nitrofenyl-etylamin [88], haloacylhalogenider [89], glykosidiske bindinger [90], 6-aminokaprin-syre [91], N-suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat (SPDP) [92], adipinsyre-

35 dihydrazid ADH [93], C₄ til C₁₂ enheter [94] osv. Karbodiimidkondensasjon kan også anvendes [95].

Som beskrevet i referanse 96 kan en blanding inkludere ett konjugat med direkte sakkarid/proteinbinding og et annet konjugat med binding via en linker. Denne oppstilling gjelder spesielt når det anvendes sakkaridkonjugater fra ulike meningokokk-serogrupper, f.eks. kan Men-A og Men-C sakkarider være konjugert via en linker, mens Men-W135 og Men-Y sakkarider kan være konjugert direkte til et bærerprotein.

Der et preparat inkluderer ett eller flere av Men-A, -C, -W og/eller -Y konjugater, kan det i noen utførelsesformer fordelaktig også inkludere et Hib konjugat (se nedenfor). Der hvor et preparat inkluderer sakkarid fra mere enn en meningokokk-serogruppe, er der en gjennomsnittlig sakkaridmasse per serogruppe. Dersom hovedsakelig like masser av hver serogruppe anvendes, da vil gjennomsnittlig masse være den samme som hver individuelle masse; der ikke-like masser anvendes da vil gjennomsnittet avvike f.eks. med en 10:5:5:5 µg mengde for en Men-ACWY blanding, hvor den gjennomsnittlige massen er 6,25 µg per serogruppe. Dersom et Hib sakkarid også er inkludert da vil, i noen utførelsesformer, dets masse være i alt vesentlig den samme som den gjennomsnittlige massen av meningokokk-sakkarid per serogruppe. I noen utførelsesformer vil massen av Hib sakkarid være mer enn (f.eks. minst 1,5x) den gjennomsnittlige massen av meningokokk-sakkarid per serogruppe. I noen utførelsesformer vil massen av Hib sakkarid være mindre enn (f.eks. minst 1,5x) den gjennomsnittlige massen av meningokokk-sakkarid per serogruppe [97].

Olje-i-vann emulsjon adjuvans

Forskjellige olje-i-vann emulsjon adjuvanser er kjent, og de inkluderer typisk minst en olje og minst en surfaktant, hvor oljen/oljene og surfaktanten/surfaktantene er bio-nedbrytbare (metaboliserbare) og biokompatible. Oljedråpene i emulsjonen er generelt mindre enn 5 µm i diameter, og kan til og med ha en sub-mikron diameter, hvor disse små størrelser oppnås med en mikrofluidisator for å tilveiebringe stabile emulsjoner. Dråper med størrelse mindre enn 220 nm er foretrukket, da de kan underkastes filtersterilisering.

30

Oppfinnelsen kan anvendes med oljer slik som dem fra en animalsk kilde (slik som fisk) eller vegetabilsk kilde. Kilder for vegetabiliske oljer inkluderer nøtter, frø og korn. Jordnøttolje, soyabønneolje, kokosnøttolje og olivenolje, de mest vanlig tilgjengelige, er eksempler på nøtteoljer. Jojobaolje kan anvendes, f.eks. oppnådd fra jojobabønnen. Frøoljer inkluderer safranolje, bomullsfrøolje, solsikkefrøolje, sesamfrøolje og lignende. I korngruppen, er maisolje den lettest tilgjengelige, men oljen fra andre kornsorter slik som hvete, havre, rug, ris, bifriergress, tritikal og lignende kan også

35

anvendes. Fettsyreestere av glykol med 6-10 karbonatomer og 1,2-propandiol, som ikke naturlig forekommer i frøoljer, kan fremstilles ved hydrolyse, separering og for-
 5 estering av de passende materialer ved å starte fra en nøtteolje eller frøolje. Fett og oljer fra pattedyrmelk er metaboliserbare og kan derfor anvendes i praksis i forbindelse med oppfinnelsen. Prosedyrer for separasjon, rensing, forsåpning og andre midler som er nødvendig for å oppnå rene oljer fra animalske kilder er vel kjent innen teknikken. De fleste fisker inneholder metaboliserbare oljer som lett kan utvinnes. Torskeleverolje, haileverolje og hvalolje slik som spermasett er eksempler på de mange fiskeoljer som kan anvendes heri. En rekke oljer med forgrenet kjede syntetiseres biokjemisk i 5-karbon isoprenenheter og er generelt omtalt som terpenoider.
 10 Haileverolje inneholder forgrenede, umettede terpenoider kjent som skvalen, 2,6,10,15,19,23-heksametyl-2,6,10,14,18,22-tetrakosaheksaen, som er særlig foretrukket heri. Skvalan, den mettede analogen til skvalen, er også en foretrukket olje. Fiskeoljer, som inkluderer skvalen og skvalan, kan lett oppnås fra kommersielle kilder eller kan oppnås ved metoder som kjent innen teknikken. Andre foretrukne oljer er
 15 tokoferolene. Blandinger av oljer kan anvendes.

Der et preparat inkluderer en tokoferol, kan hvilken som helst av α , β , γ , δ , ϵ eller ξ tokoferoler anvendes, men α -tokoferoler er foretrukne. Tokoferolen kan ha en rekke
 20 former f.eks. forskjellige salter og/eller isomerer. Salter inkluderer organiske salter, slik som succinat, acetat, nikotinat, osv. D- α -tokoferol og DL- α -tokoferol kan begge anvendes. En foretrukket α -tokoferol er DL- α -tokoferol, og det foretrukne salt av dette tokoferol er succinatet.

25 Surfaktanter kan klassifiseres ved deres "HLB" (hydrofil/lipofil balanse). Foretrukne surfaktanter i forbindelse med oppfinnelsen har en HLB på minst 10, foretrukket minst 15, mere foretrukket minst 16. Oppfinnelsen kan anvendes med surfaktanter som inkluderer, men som ikke er begrenset til: polyoksyetylensorbitanestersurfaktanter (vanligvis omtalt som Tweens), særlig polysorbate 20 og polysorbate 80; kopolymerer
 30 av etylenoksid (EO), propylenoksid (PO), og eller butylenoksid (BO), solgt under handelsnavnet DOWFAX™, slik som lineære EO/PO blokk-kopolymerer; oktoxyner, som kan variere i antall repeterende etoksy (oksy-1,2-etandiyl)grupper, med oktoxyner-9 (Triton X-100, eller t-oktylfenoksy-polyetoksyetanol) som er av særlig interesse; (oktylfenoksy)-polyetoksyetanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolipider slik
 35 som fosfatidylcholin (lecitin); polyoksyetylen-fettestere avledet fra lauryl, cetyl, stearyl og oleyl alkoholer (kjent som Brij surfaktanter), slik som trietylglykolmonolauryleter (Brij 30); og sorbitanestere (vanligvis kjent som SPAN),

slik som sorbitantrioleat (Span 85) og sorbitanmonolaurat. Foretrukne surfaktanter for å inkludere i emulsjonen er Tween 80 (polyoksyetylensorbitanmonooleat), Span 85 (sorbitantrioleat), lecitin og Triton X-100.

- 5 Blandinger av surfaktnater kan anvendes, f.eks. Tween 80/Span 85 blandinger. En kombinasjon av en polyoksyetylensorbitanester slik som polyoksyetylensorbitanmonooleat (Tween 80) og en oktoksynol slik som t-oktylfenoksypropyltoksyetanol (Triton X-100) er også passende. En annen anvendbar kombinasjon omfatter lauret-9 pluss en polyoksyetylensorbitanester og/eller en oktoxytol.

10

Foretrukne mengder av surfaktanter (vekt %) er: polyoksyetylensorbitanestere (slik som Tween 80) 0,01 til 1 %, særlig omtrent 0,1 %; oktyl- eller nonylfenoksypropyltoksyetanoler (slik som Triton X-100, eller andre detergenter i Triton seriene) 0,001 til 0,1 %, særlig 0,005 til 0,02 %; polyoksyetylenetere (slik som lauret 9) 0,1 til 20 %, foretrukket 0,1 til 10 % og særlig 0,1 til 1 % eller omtrent 0,5 %.

15

Spesifikke olje-i-vann emulsjon adjuvanter som er anvendbare i forbindelse med oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til:

20

- En sub-mikron emulsjon av skvalen, Tween 80 og Span 85. Sammensetningen i emulsjonen, uttrykt i volum, kan være omtrent 5 % skvalen, omtrent 0,5 % polysorbat 80 og omtrent 0,5 % Span 85. Uttrykt i vekt, blir disse forhold 4,3 % skvalen, 0,5 % polysorbat 80 og 0,48 % Span 85. Denne adjuvans er kjent som "MF59" [98-100], som beskrevet mere detaljert i kapittel 10 i ref. 101 og kapittel 12 i ref. 102. MF59 emulsjonen kan inkludere citrater, f.eks. 10 mM natriumcitratbuffer.

25

30

- En emulsjon av skvalen, et tokoferol og Tween 80. Emulsjonen kan inkludere fosfatbufferet saltvann. Det kan også inkludere Span 85 (f.eks. i 1 %) og/eller lecitin. Disse emulsjoner kan ha fra 2 til 10 % skvalen, fra 2 til 10 % tokoferol og fra 0,3 til 3 % Tween 80, og vektforholdet av skvalen:tokoferol er foretrukket ≤ 1 da dette gir en mere stabil emulsjon. Skvalen og Tween 80 kan være til stede i et volumforhold på omtrent 5:2. En slik emulsjon kan dannes ved å oppløse Tween 80 i PBS til å gi en 2 % oppløsning, deretter blande 90 ml av denne oppløsning med en blanding av (5 g DL- α -tokoferol og 5 ml skvalen), deretter mikrofluidisere blandingen. Den oppnådde emulsjon kan ha sub-mikron oljedråper, f.eks. med en gjennomsnittlig diameter på mellom 100 og 250 nm, foretrukket omtrent 180 nm.

35

- En emulsjon av skvalen, et tokoferol og en Triton detergent (f.eks. Triton X-100). Emulsjonen kan også inkludere et 3d-MPL. Emulsjonen kan inneholde en fosfatbuffer.
- 5 En emulsjon som omfatter et polysorbat (f.eks. polysorbat 80), en Triton detergent (f.eks. Triton X-100) og et tokoferol (f.eks. et α -tokoferol succinat). Emulsjonen kan inkludere disse tre komponenter i et masseforhold på omtrent 75:11:10 (f.eks. 750 μ g/ml polysorbat 80, 110 μ g/ml Triton X-100 og 100 μ g/ml α -tokoferol succinat), og disse konsentrasjoner bør inkludere et hvilket som helst bidrag av disse komponenter fra antigener. Emulsjonen kan også
10 inkludere skvalen. Emulsjonen kan også inkludere et 3d-MPL. Den vandige fasen kan inneholde en fosfatbuffer.
- En emulsjon av skvalen, polysorbat 80 og poloksamer 401 ("PluronicTM L121"). Emulsjonen kan formuleres i fosfatbufret saltvann pH 7,4. Denne emulsjon er en anvendbar avleveringsvehikkel for muramyl dipeptider, og er blitt anvendt
15 med treonin-MDP i "SAF-1" adjuvansen [103] (0,05-1 % Thr-MDP, 5 % skvalen, 2,5 % Pluronic L121 og 0,2 % polysorbat 80). Den kan også anvendes uten Thr-MDP, som i "AF" adjuvansen [104] (5 % skvalen, 1,25 % Pluronic L121 og 0,2 % polysorbat 80). Mikrofluidisering er foretrukket.
- En emulsjon som omfatter skvalen, et vandig løsningsmiddel, en polyoksy-
20 etylenalkyleter hydrofil ikke-ionisk surfaktant (f.eks. polyoksyetylen (12) ceto-stearyleter) og en hydrofob ikke-ionoisk surfaktant (f.eks. en sorbitanester eller mannidester, slik som sorbitanmonoleat eller 'Span 80'). Emulsjonen er foretrukket termoreversibel og/eller har minst 90 % av oljedråpene (uttrykt i volum) med en størrelse som mindre enn 200 nm [105]. Emulsjonen kan også
25 inkludere en eller flere av: alditol; et kryobeskyttelsesmiddel (f.eks. et sukker, slik som dodecylmaltosid og/eller sukrose); og/eller et alkylpolyglykosid. Slike emulsjoner kan være frysetørket.
- En emulsjon med fra 0,5-50 % av en olje, 0,1-10 % av et fosfolipid og 0,05-5 % av en ikke-ionisk surfaktant. Som beskrevet i referanse 106, er foretrukne
30 fosfolipidkomponenter fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol, fosfatidylglyserol, fosfatidinsyre, sfingomyelin og kardiolipin. Sub-mikron dråpestørrelser er fordelaktig.
- En sub-mikron olje-i-vann emulsjon av en ikke-metaboliserbar olje (slik som lett mineralolje) og minst en surfaktant (slik som lecitin, Tween 80 eller Span
35 80). Tilsetningsstoffer kan være inkludert, slik som QuilA saponin, kolesterol, et saponin-lipofilt konjugat (slik som GPI-0100, beskrevet i referanse 107, produsert ved tilsetning av alifatisk amin til desacylsaponin via karboksylgruppen av

glukonsyre), dimetyldioktadecylammoniumbromid og/eller N,N-dioktadecyl-N,N-bis (2-hydroksyetyl)propandiamin.

- En emulsjon som omfatter en mineralolje, en ikke-ionisk lipofil etoksylert fettalkohol, og en ikke-ionisk hydrofil surfaktant (f.eks. en etoksylert fettalkohol og/eller polyoksytylen-polyoksypropylen-blokk-kopolymer) [108].
- En emulsjon som omfatter en mineralolje, en ikke-ionisk hydrofil etoksylert fettalkohol og en ikke-ionisk lipofil surfaktant (f.eks. en etoksylert fettalkohol og/eller polyoksytylen-polyoksypropylen-blokk-kopolymer) [108].
- En emulsjon med et saponin (f.eks. QuilA eller QS21) og en sterol (f.eks. et kolesterol) er assosiert som heliske miceller [109].

Olje-i-vann emulsjoner kan anvendes som adjuvanser som sådan, eller som bærere for ytterligere immunstimulerende forbindelser, f.eks. immunstimulerende oligonukleotider, 3d-MPL, osv.

3dMPL (også kjent som 3 de-O-acylert monofosforyllipid A eller 3-O-desacyl-4'-monofosforyllipid A) er en adjuvans hvor posisjon 3 i reduserende ende glukosaminet i monofosforyllipid A er blitt de-acylert. 3dMPL er blitt fremstilt fra en heptoseløs mutant av *Salmonella minnesota*, og er kjemisk tilsvarende lipid A men mangler en syrelabil fosforylgruppe og en baselabil acylgruppe. Fremstilling av 3dMPL ble opprinnelig beskrevet i referanse 110.

Rekonstituering og pakking

Frysetørkede antigenkomponenter ifølge oppfinnelsen vil til syvende og sist rekonstitueres med en flytende komponent til å gi material som er egnet for administrering til en pasient. Rekonstitueringen vil typisk finne sted på brukertidspunktet. Således kan et antigen og en olje-i-vann emulsjon adjuvans holdes adskilt i et emballert eller fordelt vaksinekit, som er klar for endelig formulering på brukertidspunktet.

I et kit som inneholder to beholdere, vil en inkludere væske for rekonstituering og den andre beholder inkluderer frysetørket material. Den andre beholder vil vanligvis være hermetisk forseglet. Væsken vil vanligvis innføres i den andre beholderen via en første nål, for derved å rekonstituere det frysetørkede material til en flytende form. Væsken vil deretter bli trukket opp, vanligvis i en sprøyte, for administrering til en pasient. Dette trinnet med opptrekking kan gjennomføres ved hjelp av den første nålen, men vil ofte være via en andre nål. Nålen som anvendes for

opptrekkingen kan være den samme nålen som den som anvendes for pasientinjeksjon, eller den kan være forskjellig.

Den andre beholderen vil typisk være et rør. En olje-i-vann emulsjon for rekonstituering av det frysetørkede material kan også være lokalisert i et rør, men som et alternativ kan være lokalisert i en sprøyte. En ytterligere oppstilling har første og andre beholdere som separerte kamre i en dobbelkammersprøyte slik at når væskematerialet aktiveres, blir det innført fra den første beholder inn i den andre beholder. De blandede og rekonstituerte materialene kan deretter forlate sprøyten i flytende form. I alle tilfeller blir imidlertid de frysetørkede og flytende materialene holdt separat inntil man er klar for blanding.

Skjønt en olje-i-vann emulsjon vanligvis vil anvendes i sin flytende form, er det i noen utførelsesformer av oppfinnelsen mulig å anvende en frysetørket olje-i-vann emulsjon adjuvans. Frysetørking av emulsjon adjuvanser på denne måte er f.eks. omtalt i referanse 105 og 111. Disse tørkede emulsjoner vil fremdeles rekonstitueres til flytende form på brukertidspunktet, f.eks. ved å anvende en vandig bærer. Den frysetørkede adjuvans komponent og den frysetørkede antigen komponent kan være komponenter i separate kit, men i noen utførelsesformer kan de være blandet (enten før eller etter frysetørking) i frysetørket form. Således, i noen utførelsesformer, tilveiebringer oppfinnelsen et preparat som omfatter en blanding av en frysetørket olje-i-vann emulsjon og et frysetørket antigenisk preparat som omfatter et immunogen for å øke immunrespons mot *Neisseria meningitidis* serogruppe B. Dette blandede frysetørkede preparat kan blandes med en vandig bærer til å gi, i ett rekonstitueringsstrinn, et Men-B preparat med en olje-i-vann emulsjon adjuvans.

Således kan et kit f.eks. omfatte to rør, en allerede fylt sprøyte og ett rør, osv. En sprøyte vil generelt inkludere en enkelt dose av preparatet, mens et rør kan inkludere en enkeltdose eller multiple doser. For multiple doseformer er derfor rør foretrukne fremfor på forhånd fylte sprøyter.

Ytterligere flytende og/eller frysetørkede materialer kan også tilsettes før administrering til en pasient.

En beholder for en frysetørket komponent kan ha en hette (f.eks. en Luer-lås) tilpasset slik at en forhåndsfylt sprøyte kan føres inn i hetten, innholdene i sprøyten

kan drives inn i røret for å rekonstituere det frysetørkede materialet deri, og innholdene i røret kan føres tilbake til sprøyten. Etter fjerning av sprøyten fra røret, kan en nål deretter festes, og vaksinen kan administreres til en pasient. Hetten kan være anbrakt inne i en forsegling eller deksel, slik at forseglingen eller
5 dekselet må fjernes før man får tilgang til hetten.

Når en komponent emballeres i et rør, er dette foretrukket dannet av et glass-material eller plastmaterial. Røret er foretrukket sterilisert før materialet tilsettes til det. For å unngå problemer med lateksfølsomme pasienter, kan rør forsegles
10 med en lateksfri kork. Røret kan inkludere en enkeltdose av vaksine, eller det kan inkludere mer enn en dose (et "multidose" rør) f.eks. 10 doser. Foretrukne rør er dannet av fargeløst glass.

Der vaksinen er emballert i en sprøyte, kan sprøyten ha en nål festet til den, eller
15 den kan være uten nål. En separat nål kan leveres sammen med sprøyten for sammenstilling og bruk. Sikkerhetsnåler er foretrukne. 1-inch 23-gauge, 1-inch 25-gauge og 5/8-inch 25-gauge nåler er typiske. Sprøyter kan være utstyrt med engangsetiketter hvor produksjonsnummer og utløpsdato for innholdene kan være trykket for å forenkle registrering. Stempelet i sprøyten har foretrukket en stopp-
20 anordning for å hindre at stempelet tilfeldigvis beveges under aspirasjon.

Når en glassbeholder (f.eks. en sprøyte eller et rør) anvendes, da er det foretrukket å anvende en beholder som er dannet av et borsilikatglass i stedet for et sodakalkglass.
25

Da vaksiner vanligvis administreres til pasienter i 0,5 ml doser, vil volumet av væsken i den første beholder være egnet til å gi et doseringsvolum, etter rekonstituering, på minst 0,5 ml, f.eks. 0,6 ml, når man regner med volum av svinn.

30 Av stabilitetsgrunner, kan den frysetørkede komponent ifølge oppfinnelsen inkludere en stabilisator slik som laktose, sukrose og/eller mannitol, så vel som blandinger derav f.eks. laktose/sukroseblandinger, sukrose/mannitolblandinger, osv. Anvendelse av en sukrose/mannitolblanding kan fremskynde tørkeprosessen. En frysetørket komponent kan også inkludere natriumklorid. Oppløselige kompo-
35 nenter i det frysetørkede materialet kan bibeholdes i preparatet etter rekonstituering, og derfor kan endelige flytende vaksiner således inneholde laktose og/eller sukrose.

Et preparat kan inkludere et temperaturbeskyttende middel som beskrevet i referanse 112. Eksempler inkluderer glyserin, propylenglykol og/eller polyetylen-glykol (PEG). Passende PEG'er kan ha en gjennomsnittlig molekylvekt som
5 strekker seg fra 200-20.000 Da. I en foretrukket utførelsesform, kan polyetylen-glykolen ha en gjennomsnittlig molekylvekt på omtrent 300 Da ("PEG-300").

Farmasøytiske preparater

- 10 Materialer ifølge oppfinnelsen vil til sist anvendes for å fremstille farmasøytiske preparater for administrering til en pasient. Disse vil typisk inkludere en farmasøytisk akseptert bærer. En inngående diskusjon om farmasøytisk aksepterte bærere er tilgjengelig i referanse 113.
- 15 Effektive doseringsvolumer kan rutinemessig etableres, men en typisk human dose av preperatet har et volum på omtrent 0,5 ml, f.eks. for intramuskulær injeksjon. RIVM OMV-basert vaksine ble administrert i et 0,5 ml volum [114] ved intramuskulær injeksjon til låret eller overarmen. MeNZB™ administreres i 0,5 ml ved intramuskulær injeksjon til det anterolaterale lår eller deltaområdet i armen.
- 20 Tilsvarende doser kan anvendes for andre avleveringsruter f.eks. en intranasal OMV-basert vaksine for forstøvning kan ha et volum på omtrent 100 µl eller omtrent 130 µl per spray, med fire sprayer administrert for å gi en total dose på omtrent 0,5 ml.
- 25 pH i et preparat etter rekonstituering er foretrukket mellom 6 og 8, og mere foretrukket mellom 6,5 og 7,5 (f.eks. omtrent 7). pH i den RIVM OMV-baserte vaksinen er 7,4 [115], og en pH <7,5 er foretrukket for preparater. RIVM OMV-basert vaksine opprettholder pH ved å anvende en 10 mM Tris/HCl buffer, og stabil pH i preparater kan opprettholdes ved bruk av en buffer f.eks. en Tris buffer,
- 30 citratbuffer, fosfatbuffer eller histidinbuffer. Således vil preparater generelt inkludere en buffer. Bufferkomponentene vil være lokalisert i væskekomponenten og/eller den frysetørkede komponenten, som passende, for å gi den endelige etterrekonstituering anordningen som ønskelig.
- 35 Preparatet kan være sterilt og/eller pyrogenfritt. Preparater kan være isotoniske med hensyn til mennesker.

Preparater for administrering til pasienter er immunogene, og er mere foretrukket
vaksinepreparater. Vaksiner ifølge oppfinnelsen kan enten være profylaktiske (dvs.
for å hindre infeksjon) eller terapeutiske (dvs. for å behandle infeksjon), men vil
typisk være profylaktiske. Immunogene preparater anvendt som vaksiner omfatter
5 en immunologisk effektiv mengde av antigen/antigener, så vel som hvilke som
helst andre komponenter, etter behov. Ved "immunologisk effektiv mengde",
menes at administreringen av denne mengden til et individ, enten i en enkelt dose
eller som del av en serie, er effektiv for behandling eller forebygging. Denne
mengden varierer avhengig av helsen og den fysiske tilstand til individet som skal
10 behandles, alder, den taksonomiske gruppen til individet som skal behandles
(f.eks. ikke-human primat, primat, osv.), kapasiteten til individets immunsystem
til å syntetisere antistoffer, graden av ønsket beskyttelse, formuleringen av vaksin-
en, den behandlede leges vurdering av den medisinske situasjonen, og andre rele-
vante faktorer. Det er forventet at mengden vil ligge i et relativt bredt område som
15 kan bestemmes gjennom rutineforsøk. Antigeninnholdet i preparater vil generelt
uttrykkes som mengden av protein per dose. En dose på omtrent 0,9 mg protein
per ml er typisk for OMV-baserte intranasale vaksiner.

Meningokokker påvirker forskjellige området i kroppen, og preparater kan således
20 være fremstilt i ulike flytende former. Prepartene kan f.eks. fremstilles som inji-
serbare former, enten som oppløsninger eller suspensjoner. Preparatet kan frem-
stilles for pulmonal administrering f.eks. ved hjelp av en inhalator, ved å anvende
en fin spray. Preparatet kan fremstilles ved administrering til nese, øre og øyne,
f.eks. som spray eller dråper. Injiserbare preparater for intramuskulær admini-
25 strering er typisk.

Preparater kan inkludere et antimikrobielt middel, særlig når emballert i multippel-
doseformat. Antimikrobielle midler slik som tiomersal og 2-fenoksyetanol er vanlig
funnet i vaksiner, men det er foretrukket å anvende enten et kvikksølvfritt konser-
30 veringsmiddel eller ikke noe konserveringsmiddel i det hele tatt.

En frysetørket komponent ifølge oppfinnelsen og/eller en koemballert olje-i-vann
emulsjon adjuvans kan være i alt vesentlig fri for aluminiumsalter. Dette gjør at et
rekonstituert preparat ifølge oppfinnelsen er i alt vesentlig fri for aluminiumsalter.

35 Preparater kan omfatte detergent f.eks. Tween (polysorbat), slik som Tween 80.
Detergenter er generelt til stede i små mengden, f.eks. < 0,01 %.

Preparater kan inkludere restdetergent (f.eks. deoksyholat) fra OMV fremstilling. Mengden av restdetergent er foretrukket mindre enn 0,4 µg (mer foretrukket mindre enn 0,2 µg) for hvert µg av Men-B protein.

5

Preparater kan inkludere LOS fra meningokokker. Mengden av LOS er foretrukket mindre enn 0,12 µg (mere foretrukket mindre enn 0,05 µg) for hvert µg protein.

10

Preparater kan inkludere natriumsalter (f.eks. natriumklorid) for å gi tonisitet. En konsentrasjon på 10±2 mg/ml NaCl er typisk, f.eks. omtrent 9 mg/ml.

Metoder for behandling

15

Oppfinnelsen kan anvendes i en metode for å stimulere en immunrespons i et pattedyr, som omfatter administrering av et flytende farmasøytisk preparat ifølge oppfinnelsen til pattedyret. Immunresponsen er foretrukket beskyttende og involverer foretrukket antistoffer. Metoden kan stimulere en booster respons i en pasient som allerede er blitt primet mot *N.meningitidis*. Subkutane og intranasale prime/boost regimer for OMV'er er omtalt i ref. 116.

20

Pattedyret er foretrukket et menneske. Der vaksinen er for profylaktisk bruk, er mennesket foretrukket et barn (f.eks. et lite barn eller et spedbarn) eller en tenårings, og hvor vaksinen er for terapeutisk bruk er mennesket foretrukket et voksent individ. En vaksine for barn kan også administreres til voksne f.eks. for å vurdere sikkerhet, dosering, immunogenitet osv.

25

Disse anvendelser og metoder er foretrukket for å forebygge og/eller behandle en sykdom forårsaket av *N.meningitidis*, f.eks. bakteriell (eller mere spesifikt meningokokk) meningitt eller sepsis.

30

En måte å undersøke effektivitet av terapeutisk behandling involverer å måle *Neisseria* infeksjon etter administrering av preparatet. En måte å undersøke effektivitet av profylaktisk behandling involverer å måle immunresponser mot antigener etter administrering av preparatet. Immunogenitet for preparater kan bestemmes ved å administrere dem til forsøksindivider (f.eks. 12-16 måneder gamle barn eller dyremodeller [117]) og deretter bestemme standard parametere som inkluderer serum-baktericide antistoffer (SBA) og ELISA titer (GMT). Disse immunresponser vil generelt bestemmes rundt 4 uker etter administrering av

35

preparatet, og sammenlignes med verdier som er bestemt før administrering av preparatet. En SBA økning som er minst 4-ganger eller 8-ganger er foretrukket. Hvor mere enn en dose av preparatet administreres, kan mere enn en bestemmelse etter administrering gjennomføres.

5

Generelt er preparater i stand til å indusere serum-baktericid antistoffrespons etter administrering til et individ. Disse responser måles passende i mus og er en standard indikator på vaksineeffektivitet. Serum-baktericid aktivitet (SBA) måler bakteriedreping som mediert ved komplement, og kan analyseres ved å anvende humant eller kaninunge komplement. WHO standarder krever at en vaksine induserer minst en 4-ganger økning i SBA i mere enn 90 % av resipienter. MeNZB™ stimulerer en 4-ganger økning i SBA 4-6 uker etter administrering av den tredje dosen.

10

15

Foretrukne preparater kan gi et antistoff titer i en human pasient som er overlegen kriteriet for serobeskyttelse for en akseptert prosentandel av individer. Antigener med et assosiert antistoff titer over hvilket en vert betraktes til å være serokonvertert mot antigenet er vel kjent, og slike titere er publisert av organisasjoner slik som WHO. Foretrukket er mer enn 80 % av en statistisk signifikant prøve av individer serokonvertert, mere foretrukket mer enn 90 %, enda mere foretrukket mer enn 93 % og mest foretrukket 96-100 %.

20

Preparater vil generelt bli administrert direkte til en pasient. Direkte avlevering kan gjennomføres ved parenteral injeksjon (f.eks. subkutan, intraperitoneal, intravenøs, intramuskulær eller til det interstitielle rom av et vev), eller ved en annen passende rute. Oppfinnelsen kan anvendes for å utløse systemisk og/eller mukosal immunitet. Intramuskulær administrering til låret eller overarmen er foretrukket. Injeksjon kan være via en nål (f.eks. en hypodermisk nål), men injeksjon uten nål kan alternativt anvendes. En typisk intramuskulær dose er 0,5 ml.

25

30

Dosebehandling kan være en enkeltdoseplan eller en multippeldoseplan. Multiple doser kan anvendes i en primær immuniseringsplan og/eller i en booster immuniseringsplan. En primær doseplan kan etterfølges av en boosterdoseplan. Passende tid mellom priming av doser (f.eks. mellom 4-16 uker) og mellom priming og boosting, kan rutinemessig bestemmes. Den OMV-baserte RIVM vaksinen ble testet ved å anvende en 3- eller 4-doser primær plan, med vaksinasjon ved 0,2 &

35

8 eller 0, 1, 2 & 8 måneder. MeNZB™ administreres som tre doser med seks ukers intervaller.

Preparater kan anvendes for å indusere baktericid antistoffrespons mot mere enn
 5 en hypervirulent linje av meningokokker. De kan foretrukket spesielt indusere baktericid responser mot to eller tre av de etterfølgende tre hypervirulente linjer: (i) klynge A4; (ii) ET5 kompleks og (iii) linje 3. De kan i tillegg indusere baktericide antistoffresponser mot en eller flere hypervirulent linje subgruppe I, subgruppe III, subgruppe IV-1 eller ET-37 kompleks, og mot andre linjer, f.eks. hyperinvasive
 10 linjer. Dette betyr nødvendigvis ikke at preparatet kan indusere baktericide antistoffer mot hver og en stamme av meningokokker med disse hypervirulente linjer, f.eks. for en hvilken som helst gitt gruppe av fire eller flere stammer av meningokokker innen en spesiell hypervirulent linje, er antistoffene indusert ved preparatet baktericid mot minst 50 % (f.eks. 60 %, 70 %, 80 %, 90 % eller mere) av gruppen.
 15 Foretrukne grupper av stammer vil inkludere stammer isolert i minst fire av de etterfølgende land: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR og CU. Serumet har foretrukket et baktericid titer på minst 1024 (f.eks. 2^{10} , 2^{11} , 2^{12} , 2^{13} , 2^{14} , 2^{15} , 2^{16} , 2^{17} , 2^{18} eller høyere, foretrukket minst 2^{14}) f.eks. er serumet i stand til å drepe minst 50 % av testbakterier i en spesiell stamme når fortynnet 1/1024.

20

Anvendbare preparater kan indusere baktericide responser mot de etterfølgende stammer av serogruppe B meningokokker: (i) fra klynge A4, stamme 961-5945 (B:2b:P1.21,16) og/eller stamme G2136 (B:-); (ii) fra ET-5 kompleks, stamme MC58 (B:15:P1.7,16b) og/eller stamme 44/76 (B:15:P1.7,16); (iii) fra linje 3,
 25 stamme 394/98 (B:4:P1.4) og/eller stamme BZ198 (B:NT:-). Mere foretrukne preparater kan indusere baktericide responser mot stammer 961-5945, 44/76 og 394/98.

Stammer 961-5945 og G2136 er begge *Neisseria* MLST referansestammer [ids 638 & 1002 i ref 118]. Stamme MC58 er omfattende tilgjengelig (f.eks. ATCC BAA-335)
 30 og var stammen sekvensert i referanse 119. Stamme 44/76 er blitt omfattende anvendt og karakterisert (f.eks. ref 120) og er en av *Neisseria* MLST referansestammene [id 237 i ref 118; rad 32 i tabell 2 i ref 19]. Stamme 394/98 ble opprinnelig isolert i New Zealand i 1998, og der har blitt en rekke publiserte studier som har anvendt denne stammen (f.eks. ref 121 & 122). Stamme BZ198 i
 35 en annen MLST referansestamme (id 409 i ref 118; rad 41 i tabell 2 i ref 19).

Ytterligere antigeniske komponenter

I tillegg til å inneholde antigener fra *N.meningitidis* kan preparater inkludere antigener fra ytterligere patogener. Preparatet kan f.eks. omfatte ett eller flere av de etterfølgende ytterligere antigener:

- 5 - et antigen fra *Streptococcus pneumoniae*, slik som et sakkarid (typisk konjugert)
- et antigen fra hepatitis B virus, slik som overflateantigenet HBsAg
- et antigen fra *Bordetella pertussis*, slik som pertussis holotoksin (PT) og filamentøst hemagglutinin (FHA) fra *B.pertussis*, eventuelt også i kombinasjon
- 10 med pertaktin og/eller agglutinogener 2 og 3
- et difteriantigen, slik som et difteritoksoid
- et tetanusantigen slik som et tetanustoksoid
- et sakkaridantigen fra *Haemophilus influenzae* B (Hib), typisk konjugert
- inaktiverte poliovirusantigener.

15

Disse ytterligere antigener kan være inkludert i flytende form i den samme beholderen som olje-i-vann emulsjonen, i frysetørket form i den samme beholderen som det frysetørkede Men-B antigen, eller i en tredje beholder (enten i frysetørket form eller vanligvis i flytende form).

20

Der hvor et difteriantigen er inkludert i prepratet, er det foretrukket at det også inkluderer tetanusantigen og pertussisantigener. Likeledes der hvor et tetanusantigen er inkludert er det foretrukket at det også er inkludert difteri og pertussisantigener. Likeledes, der et pertussisantigen er inkludert er det foretrukket at det også er

25 inkludert difteri og tetanusantigener. DTP kombinasjoner er således foretrukket.

30

Dersom et Hib sakkarid er inkludert (typisk som et konjugat), kan sakkaridenheten være et polysakkarid (f.eks. full-lengde polyribosylribitolfosfat (PRP) som renses fra bakterier), men det er også mulig å fragmentere det rensede sakkarid for å fremstille oligosakkarider (f.eks. molekylvekter fra ~1 til ~5 kDa) f.eks. ved hydrolyse.

35

Konsentrasjonen av Hib konjugat i en rekonstituert vaksine vil vanligvis være i området fra 0,5 µg til 50 µg, f.eks. fra 1-20 µg, fra 10-15 µg, fra 12-16 µg, osv. Mengden kan være omtrent 15 g, eller omtrent 12,5 µg i noen utførelsesformer. En masse som er mindre enn 5 µg kan være passende [123], f.eks. i området 1-5 µg, 2-4 µg eller omtrent 2,5 µg. Også beskrevet ovenfor, i kombinasjoner som inkluderer Hib sakkarid og meningokokksakkarider, kan dosen av førstnevnte velges basert på dosen av sistnevnte (særlig med multiple meningokokk serogrupper, deres gjennomsnittlige

masse). Videre egenskaper for Hib konjugater er omtalt ovenfor for meningokokk konjugater som inkluderer valg av bærerprotein (f.eks. CRM197 eller tetanustoksoid), bindinger, forhold osv.

5 Dersom et *S.pneumoniae* antigen er inkludert, kan dette være et polypeptid eller et sakkarid. Kapselsakkarid-konjugater er særlig anvendbare for å immunisere mot pneumokokker. Sakkaridet kan være et polysakkarid med størrelsen som fremkommer under rensing av sakkaridet fra bakterier, eller det kan være et oligosakkarid oppnådd ved fragmentering av et slikt polysakkarid. I det 7-valente PREVNAR™ produktet, er
 10 f.eks. 6 av sakkaridene presentert som intakte polysakkarider mens ett (18C serotypen) er presentert som et oligosakkarid. Et preparat kan inkludere et kapselsakkarid fra en eller flere av de etterfølgende pneumokokk serotypene: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F og/eller 33F. Et preprat kan inkludere multiple serotyper, f.eks. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,
 15 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 eller flere serotyper. 7-valent, 9-valent, 10-valent, 11-valent og 13-valent konjugat kombinasjoner er allerede kjent innen teknikken, like som en 23-valent ukonjugert kombinasjon. For eksempel kan en 10-valent kombinasjon inkludere sakkarid fra serotyper 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F og 23F. En 11-valent kombinasjon kan videre inkludere sakkarid fra serotype 3.
 20 En 12-valent kombinasjon kan addere til 10-valent blandingen: serotype 6A og 19A; 6A og 22F; 19A og 22F; 6A og 15B; 19A og 15B; r 22F og 15B; en 13-valent kombinasjon kan addere til 11-valent blandingen: serotyper 19A og 22F; 8 og 12F; 8 og 15B; 8 og 19A; 8 og 22F; 12F og 15B; 12F og 19A; 12F og 22F; 15B og 19A; 15B og 22F, osv. Ytterligere egenskaper hos pneumokokk konjugater er omtalt ovenfor for
 25 meningokokk konjugater, som inkluderer valg av bærerprotein, (f.eks. CRM197 eller tetanus toksoid), bindinger, forhold, osv. Der et preparat inkluderer mer enn ett konjugat, kan hvert konjugat anvende det samme bærerprotein eller et annet bærerprotein. Referanse 124 beskriver potensielle fordeler når det anvendes forskjellige bærerproteiner i multivalente pneumokokk konjugat vaksiner.

30

Generelt

Betegnelsen "omfattende" omfatter "inkluderende" så vel som "bestående av", f.eks. et preprat som "omfatter" X kan bestå utelukkende av X eller kan inkludere noe i tillegg, f.eks. X + Y.

35

Betegnelsen "omtrent" i forbindelse med en tallverdi x betyr f.eks. $x \pm 10\%$.

Ordet "i alt vesentlig" utelukker ikke "fullstendig" f.eks. et preparat som er "i alt vesentlig fri" for Y kan være fullstendig fri for Y. Der det er nødvendig kan ordet "i alt vesentlig" være utelatt fra definisjonen ifølge oppfinnelsen.

5 KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 viser to analytiske spor som er lagt oppå hverandre for et preparat ifølge oppfinnelsen. Linjene er et preparat før frysetørking og et preparat etter rekonstituering. Kun en linje er hovedsakelig synlig fordi de er så like hverandre.

- 10 Figur 2 viser to analytiske spor som er lagt oppå hverandre for et preparat lagret ved 4°C og et preparat lagret ved 37°C. Til forskjell fra figur 1, er to linjer synlige.

- Figur 3 viser SDS-PAGE analyse av forskjellige formuleringer. De 10 sporene fra venstre til høyre viser: (1) molekylvektsmarkør; (2)-(4) flytende antigener ved 100
15 µg/ml, 50 µg/ml og 25 µg/ml; (5) antigener i blanding av 2 % mannitol og 3 % sukrose, før frysetørking; (6) som spor (5), men etter frysetørking og rekonstituering med wfi; (7) som spor (5), men etter frysetørking og rekonstituering med MF59; (8) til (10) er spor (5) til (7), men i 5 % sukrose.

20 MÅTER FOR Å GJENNOMFØRE OPPFINNELSEN

Inkludering av adjuvans i Men-B vaksine

- Initial pre-klinisk bestemmelse av Novartis Men-B vaksinen indikerte at en optimal immunrespons krevde tilstedeværelsen av aluminiumhydroksid adjuvans. Selv i nærvær av denne adjuvans, var imidlertid stamme-dekningsområdet ufullstendig. Mens
25 f.eks. 100 % av testet ST32 og ST8 stammer ble drept ved serum fremkalt ved vaksinen, falt dette tall til 65 % for ST11 stammer. I motsetning til dette, tilveiebrakte bruken av MF59 emulsjonen som adjuvansen 100 % dekningsområde for alle av ST32, ST8 og ST11 stammer. Ytterligere forsøk bekreftet overlegenheten til MF59.
- 30 Den samme overlegenheten ble sett når konjugerte kapselsakkarider fra serogruppe A, C, W135 og Y ble tilsatt til Men-B vaksinen. Immunogeniteten oppnådd med denne A-B-C-W-Y vaksinen var bedre ved anvendelse av MF59 enn når det anvendes aluminiumhydroksid, både med hensyn til baktericide titere og stamme-dekningsområde.

35

MF59 tilveiebringer således en økt immunogen effektivitet sammenlignet med aluminiumhydroksid adjuvans. Når stabiliteten av denne ble testet, ble det imidlertid

funnet at Men-B antigenene begynte å nedbrytes etter rundt 12 uker selv under lagring ved 4°C. Ved lagring ved høyere temperaturer var nedbrytningen åpenbar så tidlig som 2 uker, med fullstendig nedbrytning etter 6 måneder. Analyse ved anvendelse av Agilent 2100 Bioanalyser eller størrelseseksklusjonskromatografi bekreftet nedbrytningen. I motsetning til dette forble antigenene stabile når de var adsorbent til aluminiumhydroksid.

Redusert stabilitet ble også sett for konjugerte kapselsakkarider fra ikke-B- serogrupper i MF59. Nivået av fri sialinsyre (en komponent i kapselsakkaridene av Men-C, Men-W135 og Men-Y) steg gradvis i en formulering med MF59-adjuvans lagret ved 4°C, og nådde omtrent 15 % etter 6 måneder. Ved høyere temperaturer nådde imidlertid det frie nivået 50 % etter omtrent 10 uker og 100 % (dvs. total nedbrytning) i løpet av 6 måneder.

Således er den økte immunogeniteten oppnådd ved MF59 på bekostning av lagringsstabilitet. Arbeid ble utført for å se om en stabil formulering kunne oppnås mens det anvendes MF59 og/eller uten å kreve adsorpsjon til en aluminiumhydroksid adjuvans.

Men-B frysetørking

I et forsøk for å oppnå stabilitetsmålet, ble Men-B antigener frysetørket. Etter rekonstituering, ble det bekreftet at deres effektivitet ble bibeholdt. Dessuten så man stabilitet for blandinger av Men-B antigener med konjugerte kapselsakkarider fra hver av serogrupper A, C, W135 og Y.

Figur 1 viser f.eks. to analysespor som er lagt oppå hverandre, med topper som tilsvarende elueringsposisjonen til Men-B proteiner. Sporene er nesten identiske, og viser ingen vesentlige fysisk-kjemiske forandringer. I motsetning viser figur 2 to spor som er lagt oppå hverandre av det samme preparatet lagret ved enten 4°C eller 37°C, og forandringene er lett synlige. Andre analyseteknikker bekreftet fravær av noen detekterbare forandringer før og etter frysetørking. Integriteten til de individuelle Men-B antigener synes å være bevart selv etter 6 måneders lagring ved 4°C etter frysetørking.

Preparatene er blitt frysetørket i nærvær av 4,5 % mannitol og 1,5 % sukrose.

35

Således kan langtidsstabilitet av meningokokk antigener oppnås uten at man behøver adsorpsjon til et aluminiumssalt. Således tillater frysetørking at antigener kan an-

vendes i kombinasjon med en olje-i-vann emulsjon for derved å tilveiebringe den økte effektivitet og stamme-dekning som er blitt vist for disse adjuvanter mens man unngår de stabilitetsproblemer som er forbundet dermed.

5 Ytterligere formuleringer

I ytterligere utviklingsarbeid for en frysetørket presentasjon av Men-B vaksinen, ble to formuleringer av den rekombinante proteinvaksinen fremstilt. Begge anvendte sukrose som en frysetørkingsstabilisator, men en inkluderte i tillegg mannitol. Osmolaritet er 300mOsmU og pH er 7,0. Hvert rør inkluderer nok materiale for en human dose med
10 40 % overskudd (70 µg av hvert rekombinante protein, 15 mg PBS og enten 14 mg mannitol eller 21 mg mannitol + 35 mg sukrose), og vil ble rekonstituert med 700 µl vann av MF59 (eller for sammenligning, med wfi).

Fuktighetsnivåene ble målt umiddelbart etter frysetørring og deretter en måned ved
15 lave eller økte temperaturer. Fuktighetsinnholdet forble konstant på omtrent 1,1 %.

En sammenligning av RP-HPLC spor før frysetørring og etter rekonstituering viste at proteinene i begge formuleringer forble stabile etter frysetørring selv i 1 måned ved 37°C. SDS-PAGE (figur 3) og western blot viste også at de tre proteinene var stabile
20 etter frysetørkingsprosessen, uten bevis på nedbrytning eller aggregering etter rekonstituering med enten MF59 eller wfi ved både 4°C og 37°C. Experion analyse ga det samme resultatet. Størrelseseksklusionskromatografi viste at frysetørring førte til en liten økning i aggregering, men mengden av aggregat økte ikke deretter, selv etter 3 måneder ved 37°C eller 6 måneder ved 4°C.

25

Immunogenitetsstudier

Mus ble anvendt i et immunogenitetsstudie for å bestemme effekt av frysetørring på vaksinepotens. Frysetørkede formuleringer ble rekonstituert med MF59 og titere ble sammenlignet mot de samme antigener i flytende form og ekstemperert blandet med
30 MF59 (som i en "to rørs" tilnærming). Formuleringene induserte tilsvarende titere.

For å studere stabilitet over en lengre tid, ble to frysetørkede antigenpreparater (ett frysetørket med sukrose, det andre med sukrose+mannaitol) lagret ved 4°C og deres immunogeniteter ble testet etter 3 og 6 måneders lagring. De lagrede antigener ble
35 rekonstituert med MF59 (også lagret ved 4°C med antigener) og raskt anvendt for immunisering. For sammenligning, ble nylagede vandige antigener og MF59 også blandet og testet parallelt.

ELISA resultater fra to separate studier indikerte at de frysetørkede formuleringer, når rekonstituert med MF59, induserte tilsvarende antistoff titere (GMT) som dem fremkalt ved den nylagede formulering. Det samme ble sett når antistoff responser ble bestemt ved SBA, f.eks. et SBA titer på 32768 ble sett på tiden null med sukrose-frysetørket antigen og ble fremdeles sett etter 6 måneders lagring. Således forblir Men-B antigenene aktive etter frysetørking og lagring.

I ytterligere studier ble de frysetørkede preparatene lagret ved enten 4°C eller 37°C, og immunogenitet ble deretter bestemt. Selv etter 1 måneds lagring ved 37°C viste de frysetørkede antigenene ikke noe tap av SBA aktivitet.

Størrelsesstabilitet for emulsjon blandet med frysetørkede Men-B antigener

Oljedråpestørrelsen av en MF59 emulsjon ble målt over en 24 timers periode ved 4°C og 25°C, enten som emulsjon alene, eller blandet med frysetørkede Men-B antigener, eller blandet med et kontrollantigen. Dråpestørrelser (nm) var som følger:

Temp (°C):	25				4	
Tid (time):	0	3	5	24	0	24
MF59 alene	171	169	172	168	172	170
MF59 + kontroll Ag	173	170	167	172	169	172
MF59 + Men-B_{1yo}	169	168	176	170	173	171

Således er partikkelstørrelsen av emulsjonen i nærvær av de frysetørkede Men-B antigenene stabil i 24 timer ved 4°C eller 25°C og er i alt vesentlig den samme som for emulsjonen alene.

Det ville forstås at oppfinnelsen er blitt beskrevet på en eksempelvis måte og at modifikasjoner kan gjennomføres.

Referanser

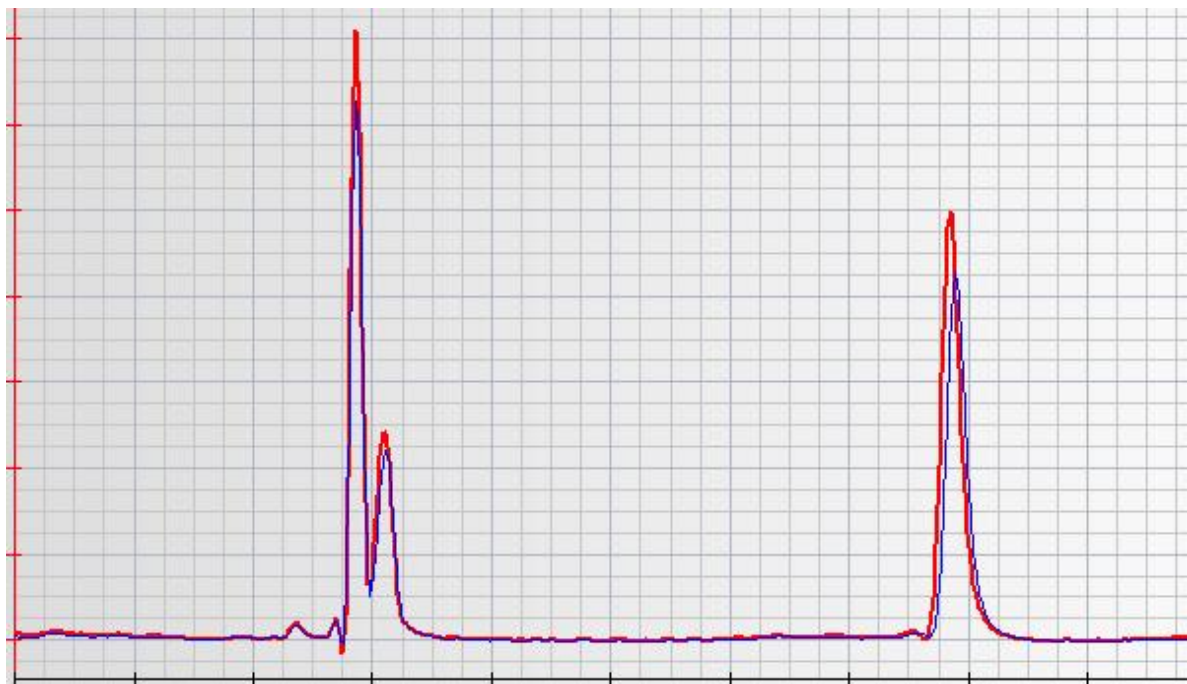
- [1] Giuliani et al. (2006) Proc Natl Acad Sci U S A 103(29):10834-9.
- [2] Boutriau et al. (2007) Clin Vaccin Immunol 14:65-73.
- [3] WO99/61053.
- 5 [4] WO00/50075.
- [5] WO2006/100109.
- [6] Shi & Schofield (2004) Exp Opin Drug Safety 3:153-8.
- [7] Belshe et al. (1998) AIDS. 12(18):2407-15.
- [8] Arigita et al. (2004) Vaccine 22:629-42.
- 10 [9] Granoff et al. (1997) Infect Immun 65:1710-5.
- [10] WO02/09643.
- [11] Katial et al. (2002) Infect. Immun. 70:702-707.
- [12] US patent 6,180,111.
- [13] WO01/34642.
- 15 [14] WO2004/019977.
- [15] European patent 0011243.
- [16] Fredriksen et al. (1991) NIPH Ann. 14(2):67-80.
- [17] WO01/91788.
- [18] WO2005/004908.
- 20 [19] Maiden et al. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
- [20] WO98/56901.
- [21] WO2006/081259.
- [22] Claassen et al. (1996) 14(10):1001-8.
- [23] WO99/10497.
- 25 [24] Steeghs et al. (2001) The EMBO Journal 20:6937-6945.
- [25] WO00/35811.
- [26] WO01/09350.
- [27] WO02/09746.
- [28] WO02/062378.
- 30 [29] WO2004/014417.
- [30] WO03/105890.
- [31] WO2006/024946
- [32] WO99/24578.
- [33] WO99/36544.
- 35 [34] WO99/57280.
- [35] WO00/22430.
- [36] WO96/29412.
- [37] WO01/64920.
- [38] WO03/020756.
- 40 [39] WO2004/048404.
- [40] WO2004/032958.
- [41] WO98/53851
- [42] US-6531131
- [43] WO00/26384.
- 45 [44] US-6645503
- [45] WO01/52885.
- [46] Costantino et al. (1992) Vaccine 10:691-8.
- [47] Lieberman et al. (1996) JAMA 275:1499-503.
- [48] WO02/058737.
- 50 [49] WO03/007985.
- [50] Rennels et al. (2002) Pediatr Infect Dis J 21:978-979.
- [51] Campbell et al. (2002) J Infect Dis 186:1848-1851.
- [52] WO03/080678.
- [53] Glode et al. (1979) J Infect Dis 139:52-56
- 55 [54] WO94/05325; US patent 5,425,946.
- [55] Arakere & Frasch (1991) Infect. Immun. 59:4349-4356.
- [56] Michon et al. (2000) Dev. Biol. 103:151-160.
- [57] Rubinstein & Stein (1998) J. Immunol. 141:4357-4362.
- [58] WO2005/033148
- 60 [59] WO2007/000314.
- [60] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)
- [61] EP-A-0372501.
- [62] EP-A-0378881.
- [63] EP-A-0427347.
- 65 [64] WO93/17712

- [65] WO94/03208.
- [66] WO98/58668.
- [67] EP-A-0471177.
- [68] WO91/01146
- 5 [69] Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
- [70] Baraldo et al. (2004) Infect Immunol 72(8):4884-7.
- [71] EP-A-0594610.
- [72] Ruan et al. (1990) J Immunol 145:3379-3384.
- [73] WO00/56360.
- 10 [74] Kuo et al. (1995) Infect Immun 63:2706-13.
- [75] Michon et al. (1998) Vaccine. 16:1732-41.
- [76] WO02/091998.
- [77] WO01/72337
- [78] WO00/61761.
- 15 [79] WO00/33882
- [80] WO99/42130
- [81] WO2007/000341.
- [82] Bardotti et al. (2008) Vaccine 26:2284-96.
- [83] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
- 20 [84] EP-A-0208375
- [85] Bethell G.S. et al., J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-4
- [86] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18
- [87] WO00/10599
- [88] Gever et al., Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
- 25 [89] US patent 4,057,685.
- [90] US patents 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [91] US patent 4,459,286.
- [92] US patent 5,204,098
- [93] US patent 4,965,338
- 30 [94] US patent 4,663,160.
- [95] WO2007/000343.
- [96] WO2007/000342.
- [97] WO2007/000322.
- [98] WO90/14837.
- 35 [99] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
- [100] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
- [101] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [102] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular
- 40 Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [103] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
- [104] Hariharan et al. (1995) Cancer Res 55:3486-9.
- [105] US-2007/014805.
- [106] WO95/11700.
- 45 [107] US patent 6,080,725.
- [108] WO2006/113373.
- [109] WO2005/097181.
- [110] GB-A-2220211.
- [111] US-5472706
- 50 [112] WO2006/110603.
- [113] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [114] RIVM report 124001 004.
- [115] RIVM report 000012 003.
- [116] Bakke et al. (2001) Infect. Immun. 69:5010-5015.
- 55 [117] WO01/30390.
- [118] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
- [119] Tettelin et al. (2000) Science 287:1809-1815.
- [120] Pettersson et al. (1994) Microb Pathog 17(6):395-408.
- [121] Welsch et al. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of
- 60 Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C Neisseria meningitidis strains.
- [122] Santos et al. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of N. meningitidis.
- 65 [123] WO2007/000327.
- [124] WO2007/071707

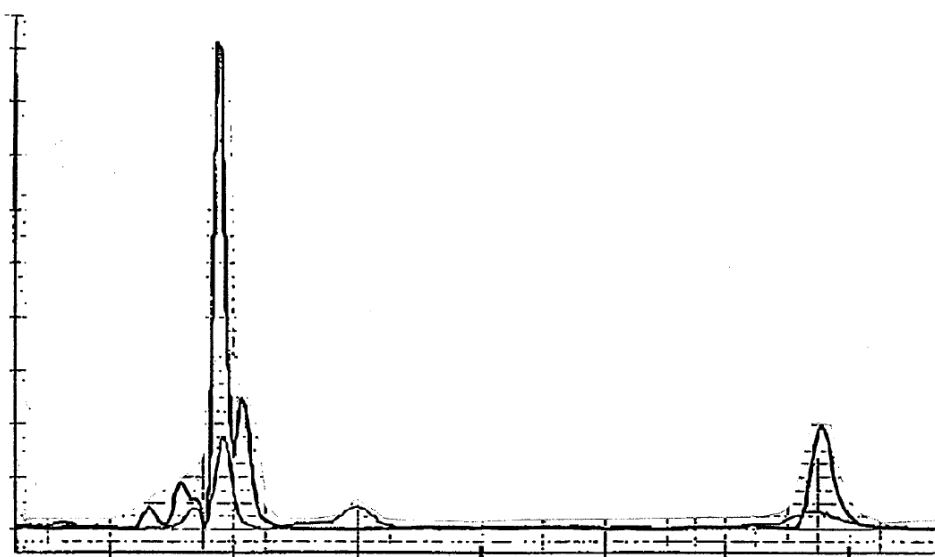
PATENTKRAV

1. Kit som omfatter: (i) en første beholder som inneholder en adjuvans som omfatter en olje-i-vann emulsjon, og (ii) en andre beholder som inneholder et fryse-
5 tørket antigenisk preparat som omfatter et immunogen for å stimulere en immun-
respons mot *Neisseria meningitidis* serogruppe B.
2. Kit ifølge krav 1, hvor det frysetørkede antigeniske preparat i den andre
beholderen videre omfatter et konjugert kapselsakkarid fra en eller flere av
10 *N.meningitidis* serogrupper A, C, W135 og/eller Y.
3. Kit ifølge krav 2, hvor det frysetørkede antigeniske preparat er i alt vesentlig fri
for aluminiumssalter.
- 15 4. Kit ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvor det frysetørkede antigeniske
preparat og/eller emulsjon adjuvansen er i alt vesentlig fri for aluminiumssalter.
5. Kit ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor det frysetørkede
antigeniske preparat omfatter membranvesikler fra en serogruppe B stamme av
20 *N.meningitidis*.
6. Kit ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor det frysetørkede
antigeniske preparat omfatter rekombinante proteiner av en serogruppe B stamme av
N.meningitidis.
25
7. Kit ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor det frysetørkede
antigeniske preparat omfatter et lipooligosakkarid fra en serogruppe B stamme av
N.meningitidis.
30

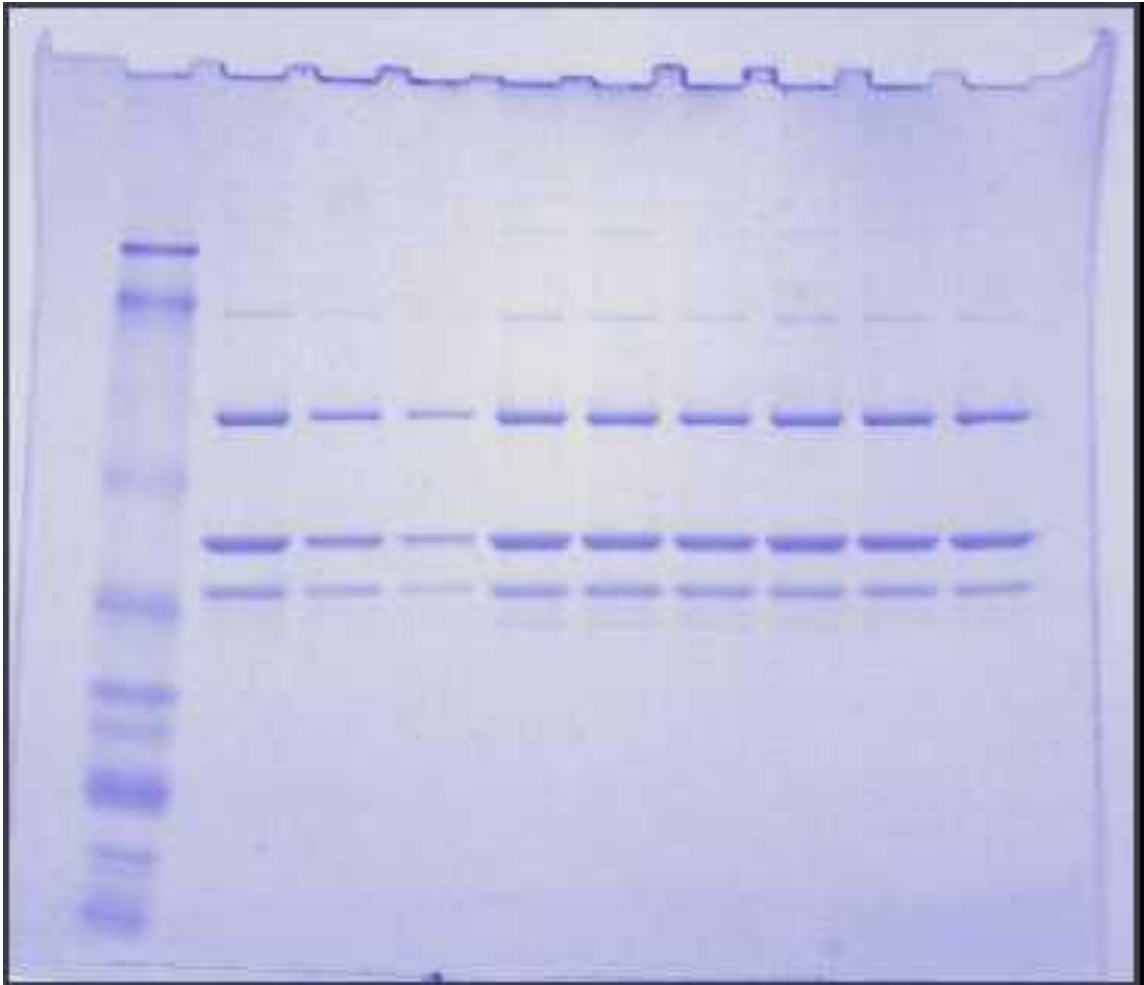
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Sekvensliste

1/8

<110> NOVARTIS AG
 <120> MENINGOCOCCAL VACCINE FORMULATIONS
 <130> P051966W0
 <140> PCT/IB2008/_____
 <141> 2008-10-17
 <150> US-60/999,590
 <151> 2007-10-19
 <160> 7
 <170> SeqWin99, version 1.02
 <210> 1
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 1
 Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
 1 5 10 15
 Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser
 20 25 30
 Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys
 35 40 45
 Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
 50 55 60
 Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln
 65 70 75 80
 Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His
 85 90 95
 Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His
 100 105 110
 Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala
 115 120 125
 Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr
 130 135 140
 Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr
 145 150 155 160
 Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His
 165 170 175
 Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys
 180 185 190
 Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn
 195 200 205
 Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala
 210 215 220
 Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg
 225 230 235 240
 His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
 245

2/8

<210> 2
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 2
 Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
 1 5 10 15
 Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser
 20 25 30
 Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys
 35 40 45
 Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp
 50 55 60
 Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln
 65 70 75 80
 Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His
 85 90 95
 Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys
 100 105 110
 Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly
 115 120 125
 Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr
 130 135 140
 His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr
 145 150 155 160
 Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu
 165 170 175
 Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala
 180 185 190
 Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser
 195 200 205
 Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln
 210 215 220
 Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu
 225 230 235 240
 Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 245

<210> 3
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 3
 Val Ala Ala Asp Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
 1 5 10 15
 Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser
 20 25 30
 Ile Pro Gln Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys
 35 40 45

3/8

Thr Phe Lys Ala Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu
 50 55 60
 Lys Asn Asp Lys Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val
 65 70 75 80
 Asp Gly Gln Thr Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys
 85 90 95
 Gln Asn His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn
 100 105 110
 Pro Asp Lys Thr Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser
 115 120 125
 Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Gly Lys
 130 135 140
 Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg
 145 150 155 160
 Leu His Tyr Ser Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile
 165 170 175
 Glu His Leu Lys Thr Leu Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu
 180 185 190
 Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg
 195 200 205
 Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp
 210 215 220
 Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys
 225 230 235 240
 Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
 245 250

<210> 4
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 4
 Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro
 20 25 30
 Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Gly Gln
 35 40 45
 Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala
 50 55 60
 Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Ala Gln Asn Asp Met
 65 70 75 80
 Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro
 85 90 95
 Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Pro Asp Ala
 100 105 110
 Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Thr Ala
 115 120 125

4/8

Asp	Gly	Met	Gln	Gly	Asp	Asp	Pro	Ser	Ala	Gly	Gly	Glu	Asn	Ala	Gly
130						135					140				
Asn	Thr	Ala	Ala	Gln	Gly	Thr	Asn	Gln	Ala	Glu	Asn	Asn	Gln	Thr	Ala
145					150					155					160
Gly	Ser	Gln	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Asn	Pro	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser
				165					170					175	
Gly	Gly	Asp	Phe	Gly	Arg	Thr	Asn	Val	Gly	Asn	Ser	Val	Val	Ile	Asp
			180					185					190		
Gly	Pro	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Leu	Thr	His	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Cys
		195					200					205			
Ser	Gly	Asn	Asn	Phe	Leu	Asp	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Lys	Ser	Glu	Phe
	210					215					220				
Glu	Lys	Leu	Ser	Asp	Ala	Asp	Lys	Ile	Ser	Asn	Tyr	Lys	Lys	Asp	Gly
225					230					235					240
Lys	Asn	Asp	Gly	Lys	Asn	Asp	Lys	Phe	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Asp	Ser
				245					250					255	
Val	Gln	Met	Lys	Gly	Ile	Asn	Gln	Tyr	Ile	Ile	Phe	Tyr	Lys	Pro	Lys
			260					265					270		
Pro	Thr	Ser	Phe	Ala	Arg	Phe	Arg	Arg	Ser	Ala	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser
		275					280					285			
Leu	Pro	Ala	Glu	Met	Pro	Leu	Ile	Pro	Val	Asn	Gln	Ala	Asp	Thr	Leu
	290					295					300				
Ile	Val	Asp	Gly	Glu	Ala	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	His	Ser	Gly	Asn	Ile
305					310					315					320
Phe	Ala	Pro	Glu	Gly	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Ala	Glu	Lys
				325					330					335	
Leu	Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Leu	Arg	Val	Gln	Gly	Glu	Pro	Ser	Lys
			340					345					350		
Gly	Glu	Met	Leu	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Tyr	Asn	Gly	Glu	Val	Leu	His
		355					360					365			
Phe	His	Thr	Glu	Asn	Gly	Arg	Pro	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala
	370					375					380				
Ala	Lys	Val	Asp	Phe	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	Asp	Gly	Ile	Ile	Asp	Ser
385					390					395					400
Gly	Asp	Gly	Leu	His	Met	Gly	Thr	Gln	Lys	Phe	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp
				405					410					415	
Gly	Asn	Gly	Phe	Lys	Gly	Thr	Trp	Thr	Glu	Asn	Gly	Gly	Gly	Asp	Val
			420					425					430		
Ser	Gly	Lys	Phe	Tyr	Gly	Pro	Ala	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Tyr
		435					440					445			
Ser	Tyr	Arg	Pro	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Phe	Ala
	450					455					460				
Gly	Lys	Lys	Glu	Gln	Asp	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Tyr	Lys
465					470					475					480
Val	Asp	Glu	Tyr	His	Ala	Asn	Ala	Arg	Phe	Ala	Ile	Asp	His	Phe	Asn
				485					490					495	

5/8

Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu
 500 505 510
 Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val
 515 520 525
 Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp His Leu Lys Ser
 530 535 540
 Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser
 545 550 555
 Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser Val Asp Gly Asn
 565 570 575
 Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys
 580 585 590
 Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly
 595 600 605
 Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu
 610 615 620
 Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu
 625 630 635 640
 Ala Ala Lys Gln
 <210> 5
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 5
 Met Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala
 1 5 10 15
 Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala
 20 25 30
 Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln
 35 40 45
 Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asn Arg His
 50 55 60
 Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val
 65 70 75 80
 Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr
 85 90 95
 Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp
 100 105 110
 Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ser Pro
 115 120 125
 Ala Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Tyr Gly Asn Val Thr Tyr
 130 135 140
 Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr Gln Lys
 145 150 155 160
 Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val Ile Thr Leu Tyr Gln Asn
 165 170 175
 Tyr Val Gln Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly

6/8

180										185										190																																		
Ala	Gly	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Ala	Pro	Leu	Asp	His	Lys	Asp	Lys																																							
		195					200					205																																										
Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Val	Arg	Lys	Asn	Glu	Lys																																							
	210					215					220																																											
Leu	Lys	Leu	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Glu	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Asp																																							
	225				230					235																																												
Ser	Leu	Asn	Thr	Gly	Lys	Leu	Lys	Asn	Asp	Lys	Val	Ser	Arg	Phe	Asp																																							
				245					250					255																																								
Phe	Ile	Arg	Gln	Ile	Glu	Val	Asp	Gly	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Glu	Ser																																							
			260					265					270																																									
Gly	Glu	Phe	Gln	Val	Tyr	Lys	Gln	Ser	His	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala	Phe																																							
		275					280					285																																										
Gln	Thr	Glu	Gln	Ile	Gln	Asp	Ser	Glu	His	Ser	Gly	Lys	Met	Val	Ala																																							
		290				295						300																																										
Lys	Arg	Gln	Phe	Arg	Ile	Gly	Asp	Ile	Ala	Gly	Glu	His	Thr	Ser	Phe																																							
					310					315																																												
Asp	Lys	Leu	Pro	Glu	Gly	Gly	Arg	Ala	Thr	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ala	Phe																																							
				325				330						335																																								
Gly	Ser	Asp	Asp	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Thr	Tyr	Thr	Ile	Asp	Phe	Ala																																							
			340					345					350																																									
Ala	Lys	Gln	Gly	Asn	Gly	Lys	Ile	Glu	His	Leu	Lys	Ser	Pro	Glu	Leu																																							
		355					360					365																																										
Asn	Val	Asp	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Ile	Lys	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	His																																							
		370				375					380																																											
Ala	Val	Ile	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Gln	Ala	Glu	Lys	Gly	Ser																																							
					390					395																																												
Tyr	Ser	Leu	Gly	Ile	Phe	Gly	Gly	Lys	Ala	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Ser																																							
				405					410					415																																								
Ala	Glu	Val	Lys	Thr	Val	Asn	Gly	Ile	Arg	His	Ile	Gly	Leu	Ala	Ala																																							
			420					425					430																																									

Lys Gln

<210> 6
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 6
 Ala Thr Asn Asp Asp Val Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu
 20 25 30
 Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala
 35 40 45
 Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys
 50 55 60
 Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn

7/8

65				70				75				80			
Val	Asp	Ala	Lys	Val ₈₅	Lys	Ala	Ala	Glu	Ser ₉₀	Glu	Ile	Glu	Lys	Leu ₉₅	Thr
Thr	Lys	Leu	Ala ₁₀₀	Asp	Thr	Asp	Ala	Ala ₁₀₅	Leu	Ala	Asp	Thr	Asp ₁₁₀	Ala	Ala
Leu	Asp	Ala ₁₁₅	Thr	Thr	Asn	Ala	Leu ₁₂₀	Asn	Lys	Leu	Gly	Glu ₁₂₅	Asn	Ile	Thr
Thr	Phe ₁₃₀	Ala	Glu	Glu	Thr	Lys ₁₃₅	Thr	Asn	Ile	Val	Lys ₁₄₀	Ile	Asp	Glu	Lys
Leu ₁₄₅	Glu	Ala	Val	Ala	Asp ₁₅₀	Thr	Val	Asp	Lys	His ₁₅₅	Ala	Glu	Ala	Phe	Asn ₁₆₀
Asp	Ile	Ala	Asp	Ser ₁₆₅	Leu	Asp	Glu	Thr	Asn ₁₇₀	Thr	Lys	Ala	Asp	Glu ₁₇₅	Ala
Val	Lys	Thr	Ala ₁₈₀	Asn	Glu	Ala	Lys	Gln ₁₈₅	Thr	Ala	Glu	Glu	Thr ₁₉₀	Lys	Gln
Asn	Val	Asp ₁₉₅	Ala	Lys	Val	Lys	Ala ₂₀₀	Ala	Glu	Thr	Ala	Ala ₂₀₅	Gly	Lys	Ala
Glu	Ala ₂₁₀	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala ₂₁₅	Asn	Thr	Ala	Ala	Asp ₂₂₀	Lys	Ala	Glu	Ala
Val ₂₂₅	Ala	Ala	Lys	Val	Thr ₂₃₀	Asp	Ile	Lys	Ala	Asp ₂₃₅	Ile	Ala	Thr	Asn	Lys ₂₄₀
Asp	Asn	Ile	Ala	Lys ₂₄₅	Lys	Ala	Asn	Ser	Ala ₂₅₀	Asp	Val	Tyr	Thr	Arg ₂₅₅	Glu
Glu	Ser	Asp	Ser ₂₆₀	Lys	Phe	Val	Arg	Ile ₂₆₅	Asp	Gly	Leu	Asn	Ala ₂₇₀	Thr	Thr
Glu	Lys	Leu	Asp ₂₇₅	Thr	Arg	Leu	Ala ₂₈₀	Ser	Ala	Glu	Lys	Ser ₂₈₅	Ile	Ala	Asp
His	Asp ₂₉₀	Thr	Arg	Leu	Asn	Gly ₂₉₅	Leu	Asp	Lys	Thr	Val ₃₀₀	Ser	Asp	Leu	Arg
Lys ₃₀₅	Glu	Thr	Arg	Gln	Gly ₃₁₀	Leu	Ala	Glu	Gln	Ala ₃₁₅	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu ₃₂₀
Phe	Gln	Pro	Tyr	Asn	Val	Gly									

<210> 7
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 7
 Met Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala
 1 5 10
 Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala
 20 25 30
 Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln
 35 40 45
 Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asp Arg His
 50 55 60
 Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val

