



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2211901 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 39/145 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.09.09
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.05.01
(86)	Europeisk søknadsnr	08854338.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.11.25
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.08.04
(30)	Prioritet	2008.06.05, GB, 0810305 2007.11.26, US, 4334 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
(73)	Innehaver	Novartis AG, Lichtstrasse 35, 4002 Basel, Sveits
(72)	Oppfinner	PODDA, Audino, Novartis VaccinesVia Fiorentina 1, I-53100 Siena, Italia RAPPUOLI, Rino, Novartis VaccinesVia Fiorentina 1, I-53100 Siena, Italia
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Vaksinering med flere klader av H5-influenza A-virus
(56)	Anførte publikasjoner	BRESSON J L ET AL: "Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine: phase I randomised trial" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 367, no. 9523, 20 May 2006 (2006-05-20), pages 1657-1664, XP025094558 ISSN: 0140-6736 [retrieved on 2006-05-20] Cannes IVW Conference, April 2009 Schwarz et al, 'Single dose primary vaccination...' DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US April 2008 HOELSCHER MARY A ET AL: 'A broadly protective vaccine against globally dispersed clade 1 and clade 2 H5N1 influenza viruses' Database accession no. PREV200800353107 & JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 197, no. 8, April 2008 (2008-04), pages 1185-1188, ISSN: 0022-1899, DOI: DOI:10.1086/529522 DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 2003, HAAHEIM L R: "Original antigenic sin. A confounding issue?" XP002519290 Database accession no. NLM15088775 cited in the application & DEVELOPMENTS IN BIOLOGICALS 2003, vol. 115, 2003, pages 49-53, ISSN: 1424-6074 KEITEL ET AL: "Preparing for a possible pandemic: influenza A/H5N1 vaccine development" CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 7, no. 5, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 484-490, XP022300861 ISSN: 1471-4892 PLOS ONE vol. 3, 18 June 2008, page E2432 STEPHENSON I ET AL: "Boosting immunity to influenza H5N1 with MF59-adjuvanted H5N3 A/Duck/Singapore/97 vaccine in a primed human population" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 21, no. 15, 2 April 2003 (2003-04-02), pages 1687-1693, XP004413557 ISSN: 0264-410X STEPHENSON IAIN ET AL: "Antigenically distinct MF59-adjuvanted vaccine to boost immunity to H5N1." THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE 9 OCT 2008, vol. 359, no. 15, 9 October 2008 (2008-10-09), pages 1631-1633, XP002519289 ISSN: 1533-4406 cited in the application STEPHENSON IAIN ET AL: "Phase I evaluation of intranasal trivalent inactivated influenza

vaccine with nontoxigenic Escherichia coli enterotoxin and novel biovector as mucosal adjuvants, using adult volunteers" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 80, no. 10, May 2006 (2006-05), pages 4962-4970, XP002519288 ISSN: 0022-538X
VACCINE vol. 27, 09 May 2009, pages 4187 - 4195
VIROLOGY JOURNAL vol. 5, October 2008, pages 1 - 9
Vilamoura EIC Conference, September 2008. Kistner et al, 'Induction of cross-clade anti-H5N1 immune responses...'

BESKRIVELSE TEKNISK OMRÅDE

[0001] Foreliggende oppfinnelse ligger innen området vaksiner for å beskytte mot influensavirusinfeksjon, og nærmere bestemt for å beskytte mot influensapandemier.

5 TEKNIKKENS STAND

[0002] Influenzavirusstammer for bruk i vaksiner endrer seg fra sesong til sesong. I flere år har vaksiner typisk omfattet to influensa A-stammer (H1N1 og H3N2) og én influensa B-stamme. For å gripe an "antigen drift", varierer de nøyaktige stammer som brukes for vaksinasjon, fra år til år.

[0003] Til mer bekymring enn antigen drift er "antigent skift", hvor subtypen av de aktuelle influensa A-virus endres fra H1N1 og H3N2. Spesielt forventes det at H5-subtype av influensa A-virus kan bli utbredt i nær fremtid. Ettersom menneskeheten er immunologisk naiv mot den nye hemagglutinin-subtype, vil dette antigene skift forårsake et pandemisk utbrudd av influensainfeksjoner. Kjennetegnene av en influensastamme som gir den et potensiale til å forårsake et pandemisk utbrudd, er: (a) den inneholder et nytt hemagglutinin sammenlignet med hemagglutininene i aktuelt sirkulerende humane stammer, dvs. et agglutinin som ikke har vært synlig i den menneskelige befolkning på over et tiår, eller ikke tidligere er blitt observert i det hele tatt i den menneskelige befolkning; (b) den kan overføres horisontalt i den menneskelige befolkning; og (c) den er patogenisk for mennesker.

[0004] Under forberedelsene på en influensapandemi forårsaket av en H5-stamme, er det blitt foreslått å bruke en pre-pandemisk vaksinasjonsstrategi [1]. Pasienter immuniseres med en verserende H5-stamme (fra fugler) i håp om at den resulterende immunitet vil være nyttig når pandemien opptrer, til tross for en eventuell antigen drift som kan finne sted i mellomtiden.

[0005] I oktober 2006, kunngjorde Sanofi Pasteur resultater for sin kandidat for en pre-pandemisk vaksine, som ble testet i former med og uten adjuvanter i forskjellige antigendoser. I november 2006 kunngjorde Novartis Vaksiner at de søkte om myndigheters godkjenning av en pre-pandemisk vaksine med adjuvanter. I juni 2007 kunngjorde GlaxoSmithKline at de hadde som intensjon å donere 50 millioner doser pre-pandemisk H5N1-vaksine med adjuvanter til WHO, og i februar 2008 fikk deres produkt PREPANDRIX™ en positiv innstilling fra EMEA's Committee for Medicinal Products for Human Use. Alle tre produkter baserer seg på stammen H5N1/A/Vietnam/1194/04.

[0006] Vaccine, vol. 21, 2003, 1687-1693 beskriver levering av en H5N3-basert vaksine for å styrke immuniteten mot H5N1-virus.

BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

[0007] H5N1-virus isolert fra dyr og mennesker fra 2003, deles opp i flere avgrensede klader (genetiske grupper) av nært beslektede virus basert på hemagglutinin-aminosyresekvensen. H5N1/A/Vietnam/1194/04-stammen klassifiseres i klade 1.

[0008] Ifølge oppfinnelsen slik som den defineres i kravene, brukes flere klader ved immunisering mot influensa.

[0009] I et første trekk av oppfinnelsen (se krav 1), brukes en primer-booster-immuniseringsplan hvor et individ får en primende dose av en første klade av H5-influensa A-virus og en boosterdose av en andre klade av H5-influensa A-virus. For eksempel kan en pasient primes med et antigen fra klade 1 og boostes med klade 2, eller omvendt.

[0010] På lignende måte (se krav 2), kan det gis en booster-immunisering til en patient som allerede har mottatt en H5-vaksine fra en første klade (f.eks. klade 1), ved å bruke en H5-vaksine fra en annen klade (f.eks. klade 2). Pasienten vil som regel ha mottatt en fullstendig primær kur (f.eks. to doser) av vaksinen mot første klade.

[0011] I et annet trekk kan en immunogen sammensetning omfatte hemagglutininantigener fra flere klader av H5-influenza A-virus, hvilket tillater en samtidig immunisering mot flere H5-klader.

H5-klader

[0012] Hemagglutinin-antigenene av virusene som brukes med oppfinnelsen, er av H5-subtype, men innen H5-subtype faller de i forskjellige klader.

[0013] Hemagglutinin (HA)-sekvensene av hovedparten av H5N1-virus som har sirkulert i fuglearter fra 2003, faller i tydelige fylogenetiske klader. Klade 1-virus som sirkulerte i Cambodia, Thailand og VietNam, var ansvarlige for smitte på mennesker i disse landene i 2004 og 2005, og i Thailand i 2006. Klade 2-virus har sirkulert i fugler i Kina og Indonesia fra 2003; de spredte seg vestover i 2005 og 2006 til Midtøsten, Europa og Afrika. Fra sent i 2005 har klade 2-virus vært hovedansvarlige for smitte av mennesker. Flere subklader av klade 2 er blitt identifisert; tre av disse, nemlig subklader 1, 2 og 3 (Fig. 1), har forskjellig geografisk fordeling og har hittil vært hovedansvarlige for tilfellene blant mennesker.

[0014] Mellom august 2006 og mars 2007 falt hovedparten av HA-sekvensene av H5N1-virus som har fortsatt å sirkulere eller har gjenopptrådt i fuglearter og har vært forbundet med sporadiske humane infeksjoner i Afrika, Asia og Europa, i de ovennevnte fylogenetiske klader og subklader. Klade 1-virus var ansvarlige for utbrudd i fugler i Thailand og VietNam og for smitte av mennesker i Thailand. Klade 2.1-virus sirkulerer fortsatt i fjærfe og forårsaker smitte av mennesker i Indonesia. Klade 2.2-virus har forårsaket utbrudd i fugler i enkelte land i Afrika, Asia og Europa, og har vært forbundet med smitte av mennesker i Egypt, Irak og Nigeria. Klade 2.3-virus er blitt isolert sporadisk i Asia og har vært ansvarlige for smitte av mennesker i Kina og Laofolkets demokratiske republikk.

[0015] I tillegg har man under lokaliserte utbrudd i Asia isolert noen få virus fra fjærfe som faller utenfor disse klassifikasjoner. Disse faller i fremvoksende klader, representert ved A/gås/Guiyang/337/2006 (klade 4) og A/kylling/Shanxi/2/2006 (klade 7). Til sammen har man per dato definert 10 klader (Figur 2), nummerert 0 til 9.

[0016] For referanse heri, er prototypiske stammer for hver klade som følger, sammen med den kodende sekvens av deres hemagglutinin-gener:

Klade	Stamme	SEQ ID NO
1	A/HongKong/213/03	1
2	A/Indonesia/5/05	2
3	A/kylling/Hong Kong/SF219/01	3
4	A/kylling/Guiyang/441/2006	4
5	A/and/Guangxi/1681/2004	5
6	A/pilfink/Henan/4/2004	6
7	A/kylling/Shanxi/2/2006	7
8	A/kylling/Henan/12/2004	8
9	A/and/Guangxi/2775/2005	9
0	A/Hong Kong/156/97	10

[0017] Et H5-virus fra klade 1 kan defineres heri i fylogenetisk forstand som et influensa A-virus som har en hemagglutinin-kodende sekvens som er nærmere beslektet med den kodende sekvens fra A/HongKong/213/03-stamme (SEQ ID NO: 1) enn med den kodende sekvens fra noen av 0 og 2 til 9 (SEQ ID NO:

2 til 10), bedømt i henhold til DNADIST-algoritmen slik den implementeres i Phylip package [2] (f.eks. ved bruk av Kimura 2-parameteravstander og en likelengdet matrise). På lignende måte har et virus fra klade 2 en hemagglutinin-kodende sekvens som er nærmere beslektet med den kodende sekvens fra A/Indonesia/5/05-stamme (SEQ ID NO: 2) enn med den kodende sekvens fra noen av kladene 0, 1 og 3 til 9 (SEQ ID NO: 1 og 3 til 10). De øvrige klader defineres fylogenetisk på lignende måte, med en hemagglutinin-kodende sekvens som er nærmere beslektet med den relevante kodende sekvens fra SEQ ID NO: 1 til 10 enn med de øvrige sekvenser i SEQ ID NO: 1 til 10.

[0018] Et virus fra klade 1 kan defineres heri i forstand av nukleinsyresekvenser som et influensa A-virus som har en hemagglutinin-kodende sekvens med større sekvensidentitet med A/HongKong/213/03-stamme (SEQ ID NO: 1) enn med noen av SEQ ID NO: 2 til 10. De øvrige klader defineres på lignende måte: med en hemagglutinin-kodende sekvens som er nærmere beslektet med den relevante kodende sekvens fra SEQ ID NO: 1 til 10 enn med noen av de andre sekvenser i SEQ ID NO: 1 til 10.

[0019] Et H5-virus kan defineres heri som å være av en bestemt klade i forstand av aminosyresekvenser, ved henvisning til karakteristiske HA-mutasjoner [3]. For eksempel kan et virus fra klade 3 ha ett eller flere av de følgende aminosyreresiduer, som er forskjellige i klade 1 og 2: Asn-45; Ser-84; Asn-94; Asn-124; Leu-138; Ser-144; Glu-212; Ser-223 og/eller Arg-325. Et virus fra klade 2 kan ha Asp-124, som ikke forekommer i klade 1 eller 3. Et virus fra klade 1 kan ha ett eller flere av de følgende aminosyreresiduer, som skiller seg fra klade 2 og 3: Ser-124; Leu-129.

[0020] Innen klade 2 har man identifisert minst tre subklader: 2.1, 2.2 og 2.3 (Figur 1). Et H5-virus fra klade 2.1 kan defineres heri i fylogenetisk forstand med at det har en hemagglutinin-kodende sekvens som er nærmere beslektet med A/Indonesia/5/05-stamme (SEQ ID NO: 2) enn med enten A/Anhui/1/2005-stamme (SEQ ID NO: 11) eller A/kalkun/Tyrkia/1/05 (SEQ ID NO: 12). På lignende måte kan et H5-virus fra klade 2.2 defineres heri i fylogenetisk forstand med at det har en hemagglutinin-kodende sekvens som er nærmere beslektet med A/kalkun/Tyrkia/1/05-stamme (SEQ ID NO: 12) enn med enten A/Anhui/1/2005 (SEQ ID NO: 11) eller A/Indonesia/5/05-stamme (SEQ ID NO: 2). Endelig kan et H5-virus fra klade 2.3 defineres heri i fylogenetisk forstand med at det har en hemagglutinin-kodende sekvens som er nærmere beslektet med A/Anhui/1/05-stamme (SEQ ID NO: 11) enn med enten A/kalkun/Tyrkia/1/05 (SEQ ID NO: 12) eller A/Indonesia/5/05-stamme (SEQ ID NO: 2).

[0021] I enkelte utførelser kan en stamme i subklade 2.2 ha et HA som omfatter én eller flere av de følgende sekvenser: Ile-223; Ile-230; Ser-294; Ile-517; Δ Ser-133; et spaltningssete som har sekvensen REGRRRKR (SEQ ID NO: 13); et spaltningssete som har sekvensen GERRRRKR (SEQ ID NO: 16). HA-genet kan omfatte ett eller flere av nukleotidene: A-41; A-142; A-209; A-295; G-433; A-467; A-496; C-610; A-627; A-643; C-658; T-661; T-689; T-727; A-754; G-880; C-937; G-1006; T-1012; A-1019; T-1177; A-1235; T-1402; C-1415; T-1480; C-1510; T-1614; C-1615; A-1672; G-1708 (hvor ethvert av disse valgfritt kan endre aminosyren som kodes for av det relevante kodon). NA-genet kan omfatte nukleotidet A-743, som ikke vil endre aminosyren som kodes for av det relevante kodon.

[0022] I enkelte utførelser av oppfinnelsen er primer-antigenet og/eller booster-antigenet ikke fra klade 0, er for eksempel ikke fra stamme A/Hong Kong/156/97. For eksempel hvis det andre antigen er fra klade 1 (f.eks. A/Vietnam/1203/2004), da er det første antigen fortrinnsvis ikke fra klade 0 (f.eks. A/Hong Kong/156/97).

Kladekombinasjoner

[0023] Oppfinnelsen benytter seg av antigener avledet fra flere enn én H5-klade, for immunisering.

[0024] For eksempel kan en pasient primes med antigen fra et H5-virus i en første klade, men deretter få en booster med antigen fra et H5-virus i en andre klade. Nyttige kladekombinasjoner i denne primer/booster-strategi omfatter, men er ikke begrenset til, de følgende:

Primer	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2.1	2.2	2.3
Booster	2	1	4	7	4	7	2.1	2.2	2.3	1	1	1

[0025] I krav 2 tilveiebringer oppfinnelsen også en boosterimmunisering for en pasient som på forhånd er blitt primet med antigen fra et H5-virus i en første klade, hvor boosterens er fra en andre (forskjellig) klade. Kombinasjonene ovenfor kan også brukes i denne primer/booster-fremgangsmåte.

[0026] I krav 8 tilveiebringer oppfinnelsen også en immunogen sammensetning omfattende antigener fra H5-virus i minst to forskjellige. Nyttige kombinasjoner av to klader omfatter, men er ikke begrenset til:

Første	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1
Andre	2	3	4	5	6	7	8	9	4	7	2.1	2.2	2.3

Influenzavirusantigen

[0027] Vaksiner som brukes med oppfinnelsen, omfatter et antigen fra et influensa A-virus som har hemagglutinin-subtype H5. Vaksinen vil omfatte et protein som omfatter minst én H5-hemagglutininepitop, for eksempel vil vaksinen omfatte viralt hemagglutinin fra et H5-virus.

[0028] Foretrukne vaksiner ifølge oppfinnelsen omfatter også et protein som omfatter minst én influenzavirus-neuraminidaseepitop, f.eks. vil vaksinen omfatte viralt neuraminidase fra et H5-virus. Oppfinnelsen kan beskytte mot én eller flere av A-virus-NA-subtypene N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 eller N9, men vil vanligvis være mot N1 (dvs. et H5N1-virus) eller N3 (dvs. et H5N3-virus). Første klade og andre klade kan ha samme NA-subtype (f.eks. begge være N1 eller begge N3) eller forskjellige NA-subtyper (f.eks. N1 deretter N3, eller N3 deretter N1, osv.). Hvis kun én av primer- og boosterdosene omfatter neuraminidase, kan dette være primerdosen.

[0029] Antigenet vil typisk være fremstilt fra influensavirioner, men som et alternativ kan antigener så som hemagglutinin og neuraminidase uttrykkes i en rekombinant vert (f.eks. i en insektcellelinje ved bruk av en baculovirusvektor) og brukes i renset form [4,5,6] eller i form av virus-lignende partikler (VLP'er; se f.eks. litteraturhenvisningene 7 og 8). Generelt vil antigenene imidlertid være fra virioner.

[0030] Antigenet kan foreligge i form av et levende virus eller, mer foretrukket, et inaktivert virus. Kjemiske måter å inaktivere et virus omfatter behandling med en virksom mengde av ett eller flere av de følgende midler: rensemidler, formaldehyd, formalin, β -propiolakton eller UV-lys. Andre kjemiske måter å inaktivere på omfatter behandling med "methylene blue", psoralen, carboksyfulleren (C60) eller en kombinasjon av hvilke som helst av disse. Andre metoder for viral inaktivering er kjent innen faget, så som for eksempel binært etylamin, acetyletylenimin eller gammastråling.

[0031] Når det brukes et inaktivert virus, kan vaksinen omfatte helt virion, delt virion eller rensede overflateantigener (medregnet hemagglutinin og vanligvis også medregnet neuraminidase). Produktet DARONRIX™ H5N1 er en vaksine av inaktivert helt virion. Produktet PREPANDRIX™ H5N1 er en vaksine av inaktivert delt virion. Delt virion og rensede overflateantigener (dvs. subvirionvaksiner) er spesielt nyttige med oppfinnelsen.

[0032] Virioner kan samles fra virusholdige væsker ved bruk av forskjellige metoder. For eksempel kan en renseprosess omfatte zonalsentrifugering ved bruk av en lineær sakkarosegradientløsning som omfatter rensemiddel, for å løse virionene. Antigenene kan deretter renses, etter valgfri fortynning, ved diafiltrering.

[0033] Delt virioner kan erholdes ved å behandle virioner med rensemidler (f.eks. etyleter, polysorbat 80, deoksyklat, tri-*N*-butylfosfat, Triton X-100, Triton N101, cetyltrimetylammoniumbromid, Tergitol NP9 osv.) for å danne subvirionpreparater, medregnet "Tween-eter"-splitteprosessen. Metoder for å

splitte influensavirus er velkjent innen faget, se f.eks. litteraturhenvisningene 9-14 osv. Splitting av viruset utføres typisk ved å løse ut eller fragmentere helt virus, være seg smittelig eller ikke-smittelig, med en utløsende konsentrasjon av et splittemiddel. Utløsningen fører til en hel eller delvis løseliggjøring av virusproteinene og endrer integriteten av viruset. Foretrukne splittemidler er ikke-ioniske og ioniske (f.eks.

5 kationiske) surfaktanter, f.eks. alkylglykosider, alkyltioglykosider, acylsukkerer, sulfobetainer, betainer, polyoksyetylenalkyletere, N,N-dialkyl-glukamider, Hecameg, alkylfenoksy-polyetoksyetanoler, kvaternære ammoniumforbindelser, sarcosyl, CTAB'er (cetyltrimetylammoniumbromider), tri-N-butylfosfat, Cetavlon, myristyltrimetylammoniumsalter, lipofectin, lipofectamin og DOT-MA, oktyl- eller nonylfenoksy-polyoksyetanoler (f.eks. Triton-surfaktanter, så som Triton X-100 eller Triton N101),
10 polyoksyetylenorbitanestere (Tween-surfaktanter), polyoksyetylenetere, polyoksyetylenestere osv. Én nyttig splittemetode benytter seg etter hverandre av virkningene av natriumdeoksykolat og formaldehyd, og splitting kan finne sted under den første virionrensing (f.eks. i en gradientløsning av sakkarosetetthet). Dermed kan en splitteprosess omfatte klaring av det virionholdige materiale (for å fjerne ikke-virionmateriale), konsentrasjon av de samlede virioner (f.eks. ved bruk av en adsorpsjonsmetode så som CaHPO_4 -adsorpsjon), separasjon av
15 hele virioner fra ikke-virionmateriale, splitting av virioner ved bruk av et splittemiddel i et sentrifugeringstrinn med tetthetsgradient (f.eks. ved bruk av en sakkarosegradient som inneholder et splittemiddel så som natriumdeoksykolat), og deretter filtrering (f.eks. ultrafiltrering) for å fjerne uønskede materialer. Det kan være nyttig å resuspendere splittede virioner i natriumfosfat-bufret isotonisk natriumkloridløsning. Produktene BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ og FLUSHIELD™ er splittede vaksiner.

20 [0034] Rensede overflateantigenvaksiner omfatter influensaens overflateantigener hemagglutinin og vanligvis også neuraminidase. Fremgangsmåter for å fremstille disse proteiner i rensert form er velkjent innen faget. Produktene FLUVIRIN™, AGRIPPAL™, FOCETRIA™ og INFLUVAC™ er delenhetsvaksiner.

[0035] Influentaantigener kan også presenteres i form av virosomer [15] (nukleinsyre-frie viral-lignende liposomale partikler), slik som i produktene INFLEXAL V™ og INVAVAC™, men det foretrekkes å ikke
25 bruke virosomer med foreliggende oppfinnelse. I enkelte utførelser er influenzaantigenet derfor ikke form av et virosom.

[0036] Stammen som viruset fremstilles fra, vil typisk være et fugleinfluensavirus eller et humant influensavirus. Det vil vanligvis være i stand til å smitte mennesker, men i noen tilfeller kan det brukes en
30 stamme som ikke kan smitte mennesker, f.eks. en fuglestamme som senere kan oppnå evnen til å smitte mennesker. Stammen kan være en HPAI-stamme ("highly pathogenic avian influenza") [16].

[0037] Influensaviruset kan være svekket. Influensaviruset kan være temperaturfølsomt. Influensaviruset kan være tilpasset til kulde. Disse tre trekk er spesielt nyttige når en bruker levende virus som antigen.

[0038] Influensaviruset kan være resistent mot antiviral terapi (f.eks. resistent mot oseltamivir [17]
35 og/eller zanamivir).

[0039] Sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan omfatte antigen(er) fra én eller flere (f.eks. 1, 2, 3, 4 eller flere) influensavirusstammer, medregnet influenza A-virus og/eller influenza B-virus, forutsatt at de omfatter antigen fra minst én H5-stamme. Således kan en sammensetning omfatte antigen fra én eller flere stammer som er karakteristiske for en normal årlig vaksine, plus minst én H5-stamme f.eks. en 4-verdig vaksine
40 med tre influenza A-stammer (H1N1 og H3N2, pluss en H5-stamme, f.eks. H5N1), og én influenza B-stamme. I andre utførelser kan den omfatte antigen fra minst to H5-stammer, og valgfritt en H1-stamme og/eller en H3-stamme og/eller en influenza B-virusstamme. Når en vaksine omfatter flere enn én influensastamme, dyrkes de forskjellige stammene typisk atskilt og blandes etter at virusene er blitt samlet og antigenene fremstilt. Dermed kan en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen omfatte trinnet å blande antigener fra flere enn én
45 influensastamme.

[0040] Influenzaviruset kan være en resortert stamme, og kan ha blitt erholdt ved reversgenetiske teknikker. Reversgenetiske teknikker [f.eks. 18-22] gjør det mulig å fremstille influensavirus med de ønskede genomsekvenser *in vitro* ved bruk av plasmider. Typisk omfatter det å uttrykke (a) DNA-molekyler som koder for de ønskede virale RNA-molekyler f.eks. fra poll-promotere, og (b) DNA-molekyler som koder for virale proteiner f.eks. fra polII-promotere, slik at ekspresjon av begge typene DNA i en celle fører til sammensetning av et fullstendig intakt smittelig virion. DNA'en tilveiebringer fortrinnsvis alt det virale RNA og proteiner, men det er mulig å bruke et hjelpevirus for å tilveiebringe noe RNA og proteiner. Plasmidbaserte metoder ved bruk av separate plasmider for å produsere hvert virale RNA foretrekkes [23-25], og disse metoder vil også omfatte bruk av plasmider for å uttrykke alle eller enkelte (f.eks. bare PB1-, PB2-, PA- og NP-proteinene) av de virale proteiner, hvor det brukes opptil 12 plasmider i enkelte metoder. Hvis det brukes hundeceller, kan det brukes en hunde-poll-promoter [26].

[0041] For å redusere antall plasmider som trengs, kombinerer én fremgangsmåte [27] et flertall RNA-polymerase I-transkripsjonskassetter (for viral RNA-syntese) på samme plasmid (f.eks. sekvenser som koder for 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller alle 8 influenza A-vRNA-segenter), og et flertall proteinkodende regioner med RNA-polymerase II-promotere på et annet plasmid (f.eks. sekvenser som koder for 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller alle 8 influenza A-mRNA-transkripter). Foretrukne aspekter av metoden i litteraturhenvisning 27 omfatter: (a) PB1-, PB2- og PA-mRNA-kodende regioner på ett enkelt plasmid; og (b) alle 8 vRNA-kodende segmenter på ett enkelt plasmid. Innlemmelse av NA- og HA-segmentene på ett plasmid og de øvrige seks segmenter på et annet plasmid kan også forenkle saken.

[0042] Som et alternativ til å bruke poll-promotere til å kode for de virale RNA-segenter, er det mulig å bruke bakteriofage polymerasepromotere [28]. For eksempel kan promotere for SP6-, T3- eller T7-polymerase bekvemt brukes. På grunn av art-spesifisiteten av poll-promotere, kan bakteriofage polymerasepromotere være bedre egnet for mange celletyper (f.eks. MDCK), selv om en celle også må transifiseres med et plasmid som koder for det eksogene polymeraseenzym.

[0043] I andre teknikker er det mulig å bruke duale poll- og polII-promotere for å samtidig kode for de virale RNA'er og for eksprimerbare mRNA'er fra én enkelt sjablon [29,30].

[0044] Et influenza A-virus kan omfatte ett eller flere RNA-segenter fra et A/PR/8/34-virus (typisk 6 segmenter fra A/PR/8/34, hvor HA- og N-segmentene er fra en vaksinstamme, dvs. en 6:2-reassortant), spesielt når virusene dyrkes i egg. Det kan også omfatte ett eller flere RNA-segenter fra et A/WSN/33-virus, eller fra enhver annen virusstamme som er nyttig for å generere reassortante virus for fremstilling av vaksiner. Typisk beskytter oppfinnelsen mot en stamme som har evnen til å overføres fra menneske til menneske, og dermed vil stammens genom vanligvis omfatte minst ett RNA-segment som stammer fra et pattedyr-influenzavirus, for eksempel fra menneske). Det kan omfatte et NS-segment som hadde sitt opphav i et fugleinfluenzavirus.

[0045] Virusene som brukes som kilde for antigenene, kan dyrkes enten på egg eller i cellekultur. Dagens standardmetode for å dyrke influensavirus benytter seg av spesifikke patogenfrie (SPF) embryonerte hønseegg, hvor viruset renses fra eggeinnholdet (allantoinvæske). Mer nylig har man imidlertid dyrket virus i dyrecellekultur, og på grunn av hastigheten og pasientallergier, er denne vekstmetode å foretrekke. Hvis det brukes eggebasert viral vekst, da kan én eller flere aminosyrer innføres i allantoinvæsken av egget sammen med viruset [14].

[0046] Når det brukes cellekultur, vil det virale vekstsubstrat typisk være en cellelinje av pattedyropphav. Egnede pattedyr-opphavsceller omfatter, men er ikke begrenset til, hamster-, storfe-, primat- (medregnet fra mennesker og aper) og hundeceller. Det kan brukes forskjellige celletyper, så som nyreceller, fibroblaster, retinale celler, lungeceller osv. Eksempler på egnede hamstercellelinjer er cellelinjene ved navn BHK21 og HKCC. Egnede apeceller er f.eks. "Afrikan green monkey"-celler, så som nyreceller, slik som i Vero-cellelinjen. Egnede hundeceller er f.eks. nyreceller, så som i MDCK-cellelinjen. Egnede cellelinjer omfatter

dermed, men er ikke begrenset til: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38 osv. Egnede pattedyrcellelinjer for å dyrke influensavirus omfatter: MDCK-celler [31-34] avledet fra Madin Darby-hundenyre; Vero-celler [35-37], avledet fra nyren av "African green monkey" (*Cercopithecus aetiops*); eller PER.C6-celler [38], avledet fra humane embryoniske retinoblaster. Disse cellerlinjer er lett tilgjengelige, f.eks. fra samlingen American Type Cell Culture (ATCC), fra Coriell Cell Repositories eller fra European Collection of Cell Cultures (ECACC). For eksempel fører ATCC diverse forskjellige Vero-celler under katalognumre CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 og CRL-1587, og den leverer MDCK-celler under katalognummer CCL-34. PER.C6 er tilgjengelig fra ECACC under deponeringsnummer 96022940. Som et mindre foretrukket alternativ til cellerlinjer fra pattedyr, kan virus dyrkes på fuglecellerlinjer [f.eks. litteraturhenvisningene 39-41], medregnet cellerlinjer avledet fra and (f.eks. ande-retina) eller høns. Eksempler på fuglecellerlinjer omfatter fugleembryostamceller [39,42] og ande-retinaceller [40]. Egnede fugleembryostamceller omfatter EBx-cellerlinjen avledet fra kyllingembryostamceller, EB45, EB 14 og EB14-074 [43]. Kyllingembryofibroblaster (CEF) kan også brukes.

[0047] De mest foretrukne cellerlinjer for å dyrke influensavirus er MDCK-cellerlinjer. Den opprinnelige MDCK-cellerlinje er tilgjengelig fra ATCC som CCL-34, men derivater av denne cellerlinje kan også brukes. For eksempel beskriver litteraturhenvisning 31 en MDCK-cellerlinje som ble tilpasset for vekst i suspensjonskultur ("MDCK 33016", deponert som DSM ACC 2219). På lignende måte beskriver litteraturhenvisning 44 en MDCK-avledet cellerlinje som vokser i suspensjon i serumfri kultur ("B-702", deponert som FERM BP-7449). Litteraturhenvisning 45 beskriver ikke-tumorigene MDCK-celler, medregnet "MDCK-S" (ATCC PTA-6500), "MDCK-SF101" (ATCC PTA-6501), "MDCK-SF102" (ATCC PTA-6502) og "MDCK-SF103" (PTA-6503). Litteraturhenvisning 46 beskriver MDCK-cellerlinjer med høy tilbøyelighet for infeksjon, medregnet "MDCK.5F1"-celler (ATCC CRL-12042). Hvilke som helst av disse MDCK-cellerlinjer kan brukes.

[0048] Når viruset er blitt dyrket på en pattedyrcellerlinje, vil sammensetningen med fordel være fri for eggeproteiner (f.eks. ovalbumin og ovomucoid) og for kylling-DNA, hvorved allergenisiteten reduseres.

[0049] Når viruset er blitt dyrket på en cellerlinje, da vil vekstkulturen, og også det virale podestoff som brukes for å starte kulturen, fortrinnsvis være frie for (dvs. vil ha blitt testet og fått et negativt resultat for smitte med) herpes simplex-virus, respiratorisk syncytialvirus, parainfluenzavirus 3, SARS-coronavirus, adenovirus, rhinovirus, reo-virus, polyomavirus, birnavirus, circovirus og/eller parvovirus [47]. Fravær av herpes simplex-virus er spesielt å foretrekke.

[0050] For vekst på en cellerlinje, så som på MDCK-celler, kan virus dyrkes på celler i suspensjon [48-50] eller i adhesjonskultur. Én egnet MDCK-cellerlinje for suspensjonskultur er MDCK 33016 (deponert som DSM ACC 2219). Alternativt kan det brukes mikrobærerkultur.

[0051] Cellerlinjer som støtter influensavirusreplikasjon, dyrkes fortrinnsvis i serumfritt kulturmedium og/eller proteinfritt medium. Et medium nevnes serumfritt medium i sammenheng med foreliggende oppfinnelse hvis det ikke er blitt tilsatt additiver som stammer fra serum av mennesker eller dyr. Proteinfritt skal bety kulturer hvor multiplikasjonen av cellene finner sted under utelukkelse av proteiner, vekstfaktorer, andre proteinadditiver og ikke-serumproteiner, men kan valgfritt omfatte proteiner så som trypsin eller andre proteaser som kan være nødvendige for den virale vekst. Cellene som vokser i slike kulturer, inneholder naturligvis selv proteiner.

[0052] Cellerlinjer som støtter influensavirusreplikasjon, dyrkes fortrinnsvis ved under 37°C [51] under den virale replikasjon, f.eks. 30-36°C.

[0053] Metoden for å formere virus i dyrkede celler, omfatter generelt trinnene å pøde de dyrkede celler med stammen som skal dyrkes, dyrke de infiserte celler over et ønsket tidsrom for virusformering, som for eksempel kan bestemmes ved virustiter eller antigenekspresjon (f.eks. mellom 24 og 168 timer etter podingen) og å samle viruset som har formert seg. De dyrkede celler podes med A-virus (målt ved PFU eller TCID₅₀) til et celleforhold fra 1:500 til 1:1, fortrinnsvis 1:100 til 1:5, mer foretrukket 1:50 til 1:10. Viruset tilsettes til en suspensjon av cellene eller påføres på et monosjikt av cellene, og viruset absorberes på cellene i

minst 60 minutter, men vanligvis mindre enn 300 minutter, fortrinnsvis mellom 90 og 240 minutter ved 25°C til 40°C, fortrinnsvis 28°C til 37°C. Den infiserte cellekultur (f.eks. monosjikt) kan fjernes enten ved frysetining eller ved enzymatisk virkning for å heve det virale innhold i de samlede kultursupernatanter. De samlede væsker inaktiveres deretter enten, eller lagres frosne. Dyrkede celler kan infiseres med en infeksjonsmultiplisitet ("multiplicity of infection", m.o.i.) fra ca. 0,0001 til 10, fortrinnsvis 0,002 til 5, mer foretrukket 0,001 til 2. Enda mer foretrukket infiseres cellene med en m.o.i rundt ca. 0,01. Infiserte celler kan samles 30 til 60 timer etter infeksjonen. Fortrinnsvis samles cellene 34 til 48 timer etter infeksjonen. Enda mer foretrukket samles cellene 38 til 40 timer etter infeksjonen. Proteaser (typisk trypsin) tilsettes generelt under celledyrkingen for å tillate viral frigivning, og proteasene kan tilsettes på ethvert egnet stadium under dyrkingen.

[0054] Hemagglutinin (HA) er hovedimmunogenet i inaktiverte influensavaksiner, og vaksinedoser standardiseres ved henvisning til HA-nivået, vanligvis målt ved bruk av et "single radial immunodiffusion" (SRID)-assay. Dagens vaksiner inneholder typisk ca. 15 µg HA per stamme, selv om lavere doser også brukes, for eksempel for barn, eller i pandemiske situasjoner. Fraksjonelle doser så som ½ (dvs. 7,5 µg HA per stamme, slik som i FOCETRIA™), ¼ (dvs. 3,75 µg per stamme, slik som i PREPANDRIX™) og ⅓ er blitt brukt [52,53], slik som også høyere doser (f.eks. 3x- eller 9x-doser [54,55]). Dermed kan vaksiner omfatte mellom 0,1 og 150 µg HA per influensastamme, fortrinnsvis mellom 0,1 og 50 µg, f.eks. 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7,5 µg, 0,5-5 µg osv. Spesielle doser omfatter f.eks. ca. 45, ca. 30, ca. 15, ca. 10, ca. 7,5, ca. 5, ca. 3,8, ca. 3,75, ca. 1,9, ca. 1,5 osv. µg per stamme. En lik HA-masse per stamme er typisk. For sammensetninger omfattende HA fra stammer i forskjellige H5-klader, er det nyttig å innlemme 3,75 µg, 7,5 µg eller 15 µg per stamme (f.eks. 2 x 3,75 µg, hvilket gir til sammen 7,5 µg HA, typisk i kombinasjon med en adjuvant så som en skvalen-i-vann-emulsjon). Lavere doser (dvs. <15 µg/dose) er mest nyttige når det foreligger en adjuvant i vaksinen, slik som i oppfinnelsen. Selv om doser opptil 90 µg er blitt brukt i enkelte studier (f.eks. litteraturhenvisning 56), vil sammensetninger ifølge oppfinnelsen (spesielt i booster-dosen) vanligvis omfatte 15 µg/dose eller mindre.

[0055] For levende vaksiner, måles doseringen ved den midlere vevkultursmiddeldose ("tissue culture infectious dose", (TCID₅₀)) heller enn HA-innholdet, og en TCID₅₀-verdi mellom 10⁶ og 10⁸ (fortrinnsvis mellom 10^{6,5}-10^{7,5}) per stamme er typisk.

[0056] HA brukt med oppfinnelsen kan være et naturlig HA slik som det finnes i et virus, eller kan ha blitt modifisert. For eksempel er det kjent å modifisere HA for å fjerne determinanter (f.eks. hyperbasiske regioner rundt spaltningssetet mellom HA1 og HA2) som kan gjøre et virus høyt patogent i fuglearter, ettersom disse determinanter ellers kan gjøre det umulig å dyrke et virus i egg.

[0057] Sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan omfatte rensemiddel, f.eks. en polyoksyetylen-sorbitanester-surfaktant (kjent som "Tweens", f.eks. polysorbat 80), en oktoksynol (så som oktoksynol-9 (Triton X-100) eller 10, eller t-oktylfenoksy-polyetoksyetanol), et cetyltrimetylammoniumbromid ("CTAB") eller natriumdeoksykolat, spesielt for en splittet eller overflateantigen-vaksine. Rensemiddel kan foreligge bare i spormengder. Dermed kan vaksinen omfatte mindre enn 1 mg/ml hver av oktoksynol-10, α-tokoferylhydrogensuksinat og polysorbat 80. Andre restkomponenter i spormengder kunne være antibiotika (f.eks. neomycin, kanamycin, polymyxin B).

Vertcelle-DNA

[0058] Når viruset er blitt dyrket på en cellelinje, er det standard praksis å minimere mengden rest-DNA fra cellelinjen i den endelige vaksine, for å minimere enhver onkogen aktivitet av DNA'et. Når viruset er blitt dyrket på en cellelinje, inneholder sammensetningen dermed fortrinnsvis mindre enn 10 ng (fortrinnsvis mindre enn 1 ng og mer foretrukket mindre enn 100 pg) rest-DNA fra vertcellen per dose, selv om spormengder av vertcelle-DNA kan foreligge. Det foretrekkes at den midlere lengde av eventuelt forekommende rest-vertcelle-DNA er mindre enn 500 bp, f.eks. mindre enn 400 bp, mindre enn 300 bp, mindre

enn 200 bp, mindre enn 100 bp osv. Generelt gjelder at vertcelle-DNA som det er ønskelig å utelukke fra sammensetningene ifølge oppfinnelsen, er DNA som er lengre enn 100 bp.

[0059] Måling av rest-vertcelle-DNA er nå et rutinemessig lovpålagt krav for biologisk materiale og ligger innen den normale evne til fagmannen. Assayet som brukes til å måle DNA, vil vanligvis være et validert assay [57, 58]. Ytelseskarakteristikken av et validert assay kan beskrives med matematiske og kvantifiserbare begreper, og dets mulige feilkilder vil ha blitt identifisert. Assayet vil generelt ha blitt testet for karakteristikk

5 så som nøyaktighet, presisjon, spesifisitet. Når et assay vel er blitt kalibrert (f.eks. mot kjente standardmengder vertcelle-DNA) og testet, da kan kvantitative DNA-målinger utføres rutinemessig. Tre prinsipielle teknikker for DNA-kvantifisering kan brukes: hybridiseringsmetoder så som Southern blots eller slot blots [59]; immunoassaymetoder så som Threshold™-systemet [60]; og kvantitativ PCR [61]. Fagmannen er kjent med alle disse metodene, selv om de nøyaktige karakteristikk av hver metode kan avhenge av den aktuelle vertcelle, f.eks. valget av prober for hybridisering, valget av primere og/eller prober for amplifikasjon osv. Threshold™-systemet fra *Molecular Devices* er et kvantitativt assay for picogram-mengder samlet DNA og er blitt brukt for å overvåke nivået av forurensende DNA i biofarmasøytika [60]. Et typisk assay omfatter ikke-sekvens-spesifikk

10 dannelse av et reaksjonskompleks mellom et biotinyllert ssDNA-bindende protein, et urease-konjugert anti-ssDNA-antistoff og DNA. Alle assaykomponentene er lagt ved det fullstendige Total DNA Assay Kit som er tilgjengelig fra produsenten. Forskjellige kommersielle aktører tilbyr kvantitative PCR-assayer for å påvise rest-DNA fra vertcellen, f.eks. AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies osv. En sammenligning av et kjemiluminescerende hybridisasjonsassay og total DNA Threshold™-systemet for å måle

15 forurensningen med vertcelle-DNA i en human viral vaksine finnes i litteraturhenvisning 62.

[0060] Forurensende DNA kan fjernes under fremstilling av vaksinen ved bruk av standard renseprosedyrer, f.eks. kromatografi osv. Fjerning av rest-vertcelle-DNA kan forbedres ved behandling med nuklease, f.eks. ved bruk av et DNase. En bekvem metode for å redusere forurensningen med vertcelle-DNA beskrives i litteraturhenvisningene 63 og 64, omfattende en to-trinns behandling, først med et DNase (f.eks.

25 Benzonase), som kan brukes under den virale vekst, og deretter et kationisk rensemiddel (f.eks. CTAB), som kan brukes under virionutløsningen. Behandling med et alkyleringsmiddel, så som β -propiolakton, kan også brukes for å fjerne vertcelle-DNA, og kan med fordel også brukes til å inaktivere virioner [65].

[0061] Vaksiner som inneholder <10 ng (f.eks. <1 ng, <100 pg) vertcelle-DNA per 15 μ g hemagglutinin foretrekkes, slik som også vaksiner som inneholder <10 ng (f.eks. <1 ng, <100 pg) vertcelle-DNA per 0,25 ml volum. Vaksiner som inneholder <10 ng (f.eks. <1 ng, <100 pg) vertcelle-DNA per 50 μ g hemagglutinin er mest foretrukket, slik som også vaksiner som inneholder <10 ng (f.eks. <1 ng, <100 pg) vertcelle-DNA per 0,5 ml volum.

Adjuvant(er)

[0062] En sammensetning ifølge oppfinnelsen kan omfatte en adjuvant for å forsterke

35 immunresponsen (humoral og/eller cellulær) som utløses i en pasient som mottar sammensetningen.

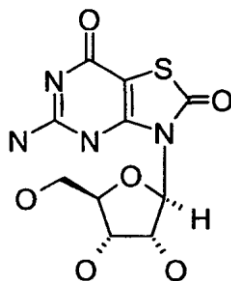
[0063] Det foretrekkes at både vaksinen med den første klade og den andre vaksinen med den andre klade er vaksiner med adjuvant(er). De kan benytte seg av samme adjuvant eller forskjellige adjuvanter. Hvis kun én av de to vaksinene inneholder adjuvant, er dette fortrinnsvis den andre.

[0064] Egnede adjuvanter for bruk med oppfinnelsen omfatter, men er ikke begrenset til:

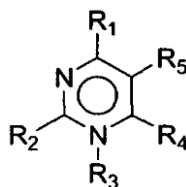
- En mineralholdig sammensetning, medregnet kalsiumsalter og aluminiumsalter (eller blandinger derav). Kalsiumsalter omfatter kalsiumfosfat (f.eks. "CAP"-partiklene som beskrives i litteraturhenvisning 66). Aluminiumsalter omfatter hydroksider, fosfater, sulfater osv., hvor saltene kan foreligge i enhver egnet form (f.eks. gel, krystallinsk, amorf osv.). Adsorpsjon til disse salter

foretrekkes. De mineralholdige sammensetninger kan også formuleres som en partikkel av metallsalt [67]. Aluminiumsaltadjuvanter skal beskrives i større detalj i det følgende.

- En olje-i-vann-emulsjon, slik som skal beskrives i større detalj i det følgende.
- Et immunostimulatorisk oligonukleotid, slik som det skal beskrives i større detalj i det følgende.
- 5 • 3-O-deacylert monofosforyllipid A ("3dMPL" også kjent som MPL™), slik som det skal beskrives i større detalj i det følgende.
- En imidazokinolinforbindelse, så som Imiquimod ("R-837") [68,69], Resiquimod ("R-848") [70] og deres analoger; og salter derav (f.eks. saltsyresalter). Nærmere detaljer om de immunostimulatoriske imidazokinoliner finnes i litteraturhenvisningene 71 til 75.
- 10 • En tiosemikarbazonforbindelse, så som de som beskrives i litteraturhenvisning 76. Metoder for å formulere, fremstille og teste for aktive forbindelser beskrives også i litteraturhenvisning 76. Tiosemikarbazonene er spesielt nyttige for å stimulere humane perifere blod-mononukleære celler til å fremstille cytokiner, så som TNF- α .
- En nukleosidanalogue, så som: (a) Isatorabine (ANA-245; 7-tia-8-oksoguanosin):



og prodroger derav; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) forbindelsene som beskrives i litteraturhenvisningene 77 til 79; (f) en forbindelse med formel:

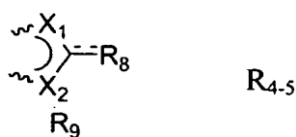


hvor:

20 R_1 og R_2 hver uavhengig er H, halo, $-NR_aR_b$, $-OH$, C_{1-6} -alkoksy, substituert C_{1-6} -alkoksy, heterocyklyl, substituert heterocyklyl, C_{6-10} -aryl, substituert C_{6-10} -aryl, C_{1-6} -alkyl eller substituert C_{1-6} -alkyl;

R_3 er fraværende, H, C_{1-6} -alkyl, substituert C_{1-6} -alkyl, C_{6-10} -aryl, substituert C_{6-10} -aryl, heterocyklyl eller substituert heterocyklyl;

25 R_4 og R_5 hver uavhengig er H, halo, heterocyklyl, substituert heterocyklyl, $-C(O)-R_d$, C_{1-6} -alkyl, substituert C_{1-6} -alkyl eller bundet sammen for å danne en 5-leddet ring slik som i R4-5:

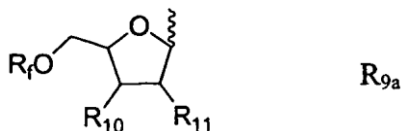


hvor bindingen oppnås ved bindingene vist med tegnet 

X_1 og X_2 hver uavhengig er N, C, O eller S;

R_8 er H, halo, -OH, C_{1-6} -alkyl, C_{2-6} -alkenyl, C_{2-6} -alkynyl, -OH, -NR_aR_b, -(CH₂)_n-O-R_c, -O-(C₁₋₆-alkyl), -S(O)_pR_e eller -C(O)-R_d;

R_9 er H, C_{1-6} -alkyl, substituert C_{1-6} -alkyl, heterocyklyl, substituert heterocyklyl eller R_{9a}, hvor R_{9a} er:



hvor bindingen oppnås ved bindingene vist med tegnet 

R_{10} og R_{11} hver uavhengig er H, halo, C_{1-6} -alkoksy, substituert C_{1-6} -alkoksy, -NR_aR_b eller -OH;

hver R_a og R_b uavhengig er H, C_{1-6} -alkyl, substituert C_{1-6} -alkyl, -C(O)R_d, C₆₋₁₀-aryl;

hver R_c uavhengig er H, fosfat, difosfat, trifosfat, C_{1-6} -alkyl eller substituert C_{1-6} -alkyl;

hver R_d uavhengig er H, halo, C_{1-6} -alkyl, substituert C_{1-6} -alkyl, C_{1-6} -alkoksy, substituert C_{1-6} -alkoksy, -NH₂, -NH(C_{1-6} -alkyl), -NH(substituert C_{1-6} -alkyl), -N(C_{1-6} -alkyl)₂, -N(substituert C_{1-6} -alkyl)₂, C₆₋₁₀-aryl eller heterocyklyl;

hver R_e uavhengig er H, C_{1-6} -alkyl, substituert C_{1-6} -alkyl, C₆₋₁₀-aryl, substituert C₆₋₁₀-aryl, heterocyklyl eller substituert heterocyklyl;

hver R_f uavhengig er H, C_{1-6} -alkyl, substituert C_{1-6} -alkyl, -C(O)R_d, fosfat, difosfat eller trifosfat;

hver n uavhengig er 0, 1, 2 eller 3;

hver p uavhengig er 0, 1 eller 2; eller

eller (g) et farmasøytisk akseptabelt salt av hvilken som helst av (a) til (f), en tautomer av hvilken som helst av (a) til (f), eller et farmasøytisk akseptabelt salt av tautomerer.

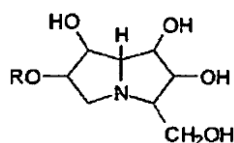
- En tryptantrinforbinding, så som de som beskrives i litteraturhenvisning 80. Metoder for å formulere, fremstille og teste for aktive forbindelser beskrives også i litteraturhenvisning 80. Tiosemikarbazonene er spesielt effektive for å stimulere humane perifere blod-mononukleære celler til å produsere cytokiner, så som TNF- α .
- Loxoribine (7-allyl-8-oksoguanosin) [81].
- Forbindelser som beskrives i litteraturhenvisning 82, medregnet: acylpiperazinforbindinger, indoldionforbindinger, tetrahydraisokinolin (THIQ)-forbindinger, benzocyklodionforbindinger, aminoazavinylforbindinger, aminobenzimidazolkinolinon (ABIQ)-forbindinger [83,84], hydraftalamidforbindinger, benzofenonforbindinger, isoksazolforbindinger, sterolforbindinger, kinazilinonforbindinger, pyrrolforbindinger [85], antrakininonforbindinger, kinoksalinforbindinger, triazinforbindinger, pyrazalopyrimidinforbindinger og benzazolforbindinger [86].
- Forbindelser som beskrives i litteraturhenvisning 87, medregnet 3,4-di(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrol-2,5-dioner, staurosporinanaloger, derivatiserte pyridaziner, kromen-4-oner, indolinoner, kinazoliner og nukleosidanaloger.
- Et aminoalkylglukosaminidfosfatderivat, så som RC-529 [88,89].
- Et fosfazen, så som poly[di(karboksylatofenoksy)fosfazen] ("PCPP") som for eksempel beskrives i litteraturhenvisningene 90 og 91.
- Småmolekylære immunopotentiatorer (SMIP'er) så som:
 - N2-metyl-1-(2-metylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin
 - N2,N2-dimetyl-1-(2-metylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin
 - N2-etyl-N2-metyl-1-(2-metylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin

N2-metyl-1-(2-metylpropyl)-N2-propyl-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin
 1-(2-metylpropyl)-N2-propyl-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin
 N2-butyl-1-(2-metylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin
 N2-butyl-N2-metyl-1-(2-metylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin
 5 N2-metyl-1-(2-metylpropyl)-N2-pentyl-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin
 N2-metyl-1(2-metylpropyl)-N2-prop-2-enyl-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin
 1-(2-metylpropyl)-2-[(fenylmetyl)tio]-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-4-amin
 1-(2-metylpropyl)-2-(propyltio)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-4-amin
 2-[[4-amino-1-(2-metylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2-yl](metyl)amino]etanol
 10 2-[[4-amino-1-(2-metylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2-yl](metyl)amino]etylacetat
 4-amino-1-(2-metylpropyl)-1,3-dihydro-2H-imidazo[4,5-c]kinolin-2-on
 N2-butyl-1-(2-metylpropyl)-N4,N4-bis(fenylmetyl)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin
 N2-butyl-N2-metyl-1-(2-metylpropyl)-N4,N4-bis(fenylmetyl)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin
 N2-metyl-1-(2-metylpropyl)-N4,N4-bis(fenylmetyl)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin
 15 N2,N2-dimetyl-1-(2-metylpropyl)-N4,N4-bis(fenylmetyl)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin
 1-{4-amino-2-[metyl(propyl)amino]-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-1-yl}-2-metylpropan-2-ol
 1-[4-amino-2-(propylamino)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-1-yl]-2-metylpropan-2-ol
 N4,N4-dibenzyl-1-(2-metoksy-2-metylpropyl)-N2-propyl-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-2,4-diamin.

- Saponiner [kapittel 22 av litteraturhenvisning 133], som er en heterolog gruppe av sterolglykosider og triterpenoidglykosider som finnes i barken, bladene, stammen, røttene og til og med blomstene av et bredt utvalg av plantearter. Saponin fra barken av *Quillaia saponaria* "Molina"-tre er blitt omfattende undersøkt som adjuvanter. Saponin kan også erverves i handelen fra *Smilax ornata* (sarsaparille), *Gypsophilla paniculata* ("brides veil") og *Saponaria officinalis* ("soap root"). Saponinadjuvantformuleringer omfatter rensede formuleringer, så som QS21, samt lipidformuleringer, så som ISCOM'er. QS21 markedsføres som Stimulon™. Saponinsammensetninger er blitt rensed ved bruk av HPLC og RP-HPLC. Spesifikke rensede fraksjoner ved bruk av disse teknikker er blitt identifisert, medregnet QS7, QS17, QS 18, QS21, QH-A, QH-B og QH-C. Fortrinnsvis er saponinet QS21. En produksjonsmetode for QS21 beskrives i litteraturhenvisning 92. Saponinformuleringer kan også omfatte en sterol, så som kolesterol [93]. Kombinasjoner av saponiner og kolesteroler kan brukes til å danne ensartede partikler som benevnes immunostimulerende komplekser (ISCOM'er) [kapittel 23 av litteraturhenvisning 133]. ISCOM'er omfatter typisk også et fosfolipid så som fosfatidyletanolamin eller fosfatidylkolin. Ethvert kjent saponin kan brukes i ISCOM'er. Fortrinnsvis omfatter ISCOM'et ett eller flere stoffer valgt fra QuilA, QHA og QHC. ISCOM'er beskrives nærmere i litteraturhenvisningene 93-95. Valgfritt kan ISCOM'ene være frie for ytterligere rensemiddel [96]. En oversikt over utviklingen av saponin-baserte adjuvanter finnes i litteraturhenvisningene 97 og 98.
- Bakterielle ADP-ribosylerende toksiner (f.eks. *E.coli*-varmelabilt enterotoksin "LT", koleratoksin "CT" eller pertussistoksin "PT") og detoksifiserte derivater derav, så som de mutante toksiner som er kjent som LT-K63 og LT-R72 [99]. Anvendelse av detoksifiserte ADP-ribosylerende toksiner som mukosale adjuvanter beskrives i litteraturhenvisning 100, og som parenterale adjuvanter i litteraturhenvisning 101.
- Bioadhesiver og mukoadhesiver, så som forestret hyaluronsyre-mikrosfærer [102] eller kitosan og dets derivater [103].
- Mikropartikler (dvs. partikler fra ~100 nm til ~150 µm i diameter, mer foretrukket ~200 nm til ~30 µm i diameter eller ~500 nm til ~10 µm i diameter) dannet fra materialer som er biologisk nedbrytbare og ikke-toksiske (f.eks. en poly(α-hydroksysyre), en polyhydroksysmørsyre, en polyortoester, et polyanhydrid, et polykaprolakton osv.), hvor poly(laktid-ko-glykolid) foretrekkes,

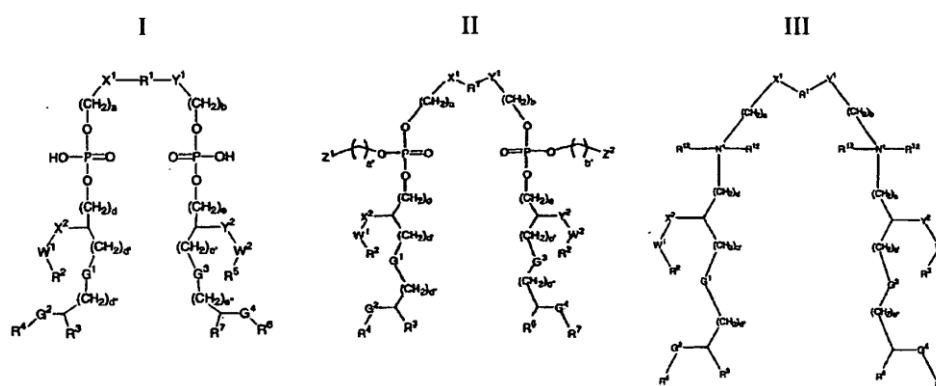
valgfritt behandlet slik at de har en negativt ladet overflate (f.eks. med SDS) eller en positivt ladet overflate (f.eks. med et kationisk rensemiddel, så som CTAB).

- Liposomer (kapitlene 13 og 14 av litteraturhenvisning 133). Eksempler på liposomformuleringer som er egnet for bruk som adjuvanter, beskrives i litteraturhenvisningene 104-106.
- Polyoksyetylenetere og polyoksyetylenestere [107]. Slike formuleringer omfatter også polyoksyetylenorbitanestersurfaktanter i kombinasjon med en oktoksynol [108] samt polyoksyetylenalkyleter- eller -ester-surfaktanter i kombinasjon med minst én ytterligere ikke-ionisk surfaktant så som en oktoksynol [109]. Foretrukne polyoksyetylenetere er valgt fra den følgende gruppe: polyoksyetylen-9-lauryleter (laureth 9), polyoksyetylen-9-steoryleter, polyoksyetylen-8-steoryleter, polyoksyetylen-4-lauryleter, polyoksyetylen-35-lauryleter og polyoksyetylen-23-lauryleter.
- Muramylpeptider, så som N-acetylmuramyl-L-treonyl-D-isoglutamin ("thr-MDP"), N-acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (nor-MDP), N-acetylglukosaminy-N-acetylmuramyl-L-A1-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoksypropylamid ("DTP-DPP" eller Theramide™), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminy-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroksyfosforyloksy)etylamin ("MTP-PE").
- Et preparat av ytre membranproteinproteosom fremstilt fra en første Gram-negativ bakterie i kombinasjon med et liposakkarid (LPS)-preparat avledet fra en andre, Gram-negativ bakterie, hvor det ytre membranproteinproteosom og LPS-preparater danner et stabilt, ikke-kovalent adjuvantkompleks. Slike komplekser omfatter "IVX-908", et kompleks omfattende ytre membran fra *Neisseria meningitidis* og LPS. De er blitt brukt som adjuvanter for influensavaksiner [110].
- En polyoksidoniumpolymer [111,112] eller et annet N-oksidert polyetylen-piperazinderivat.
- Metylinosin-5'-monofosfat ("MIMP") [113].
- En polyhydroksylert pyrrolizidinforbindelse [114], så som en som har formel:

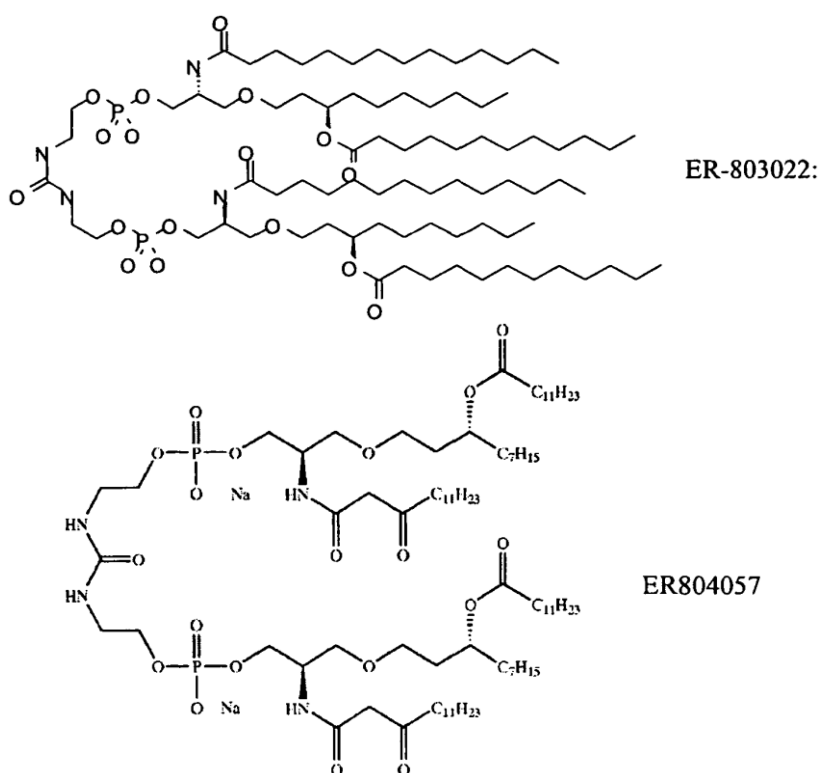


hvor R er valgt fra gruppen som omfatter hydrogen, rettkjedet eller forgrenet, usubstituert eller substituert, mettet eller umettet acyl, alkyl (f.eks. cykloalkyl), alkenyl, alkynyl og aryl, eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller derivat derav. Eksempler omfatter, men er ikke begrenset til: casuarin, casuarin-6- α -D-glukopyranose, 3-*epi*-casuarin, 7-*epi*-casuarin, 3,7-*diepi*-casuarin osv.

- En CD1d-ligand, så som et α -glykosylceramid [115-122] (f.eks. α -galaktosylceramid), fytosfingosinholdige α -glykosylceramider, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galaktopyranosyl)-2-(N-heksacosanoylamino)-1,3,4-oktadekantriol], CRONY-101, 3"-O-sulfo-galaktosylceramid osv.
- Et gamma-inulin [123] eller derivat derav, så som algammulin.
- En forbindelse med formel I, II eller III, eller et salt derav:



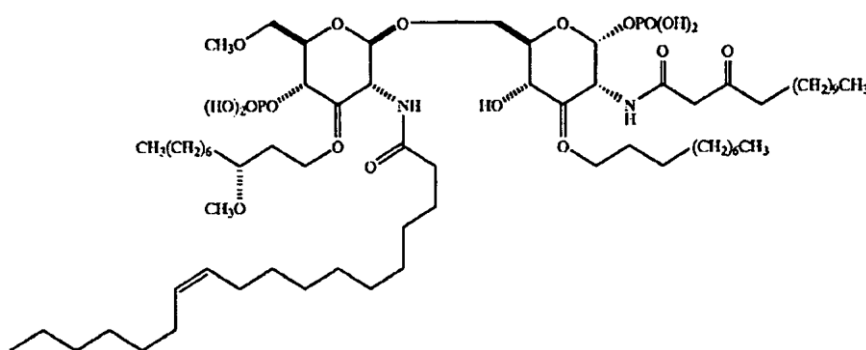
slik som definert i litteraturhenvisning 124, så som "ER 803058", "ER 803732", "ER 804053", "ER 804058", "ER 804059", "ER 804442", "ER 804680", "ER 804764", "ER 803022" eller "ER 804057", f.eks.:



5

- Derivater av lipid A fra *Escherichia coli* så som OM-174 (beskrevet i litteraturhenvisningene 125 og 126).
- En formulering av et kationisk lipid og et (vanligvis nøytralt) ko-lipid, så som aminopropyl-dimetyl-myristoleylloksy-propanaminiumbromid-difytanoylfosfatidyl-etanolamin ("Vaxfectin™") eller aminopropyl-dimetyl-bis-dodekylloksy-propanaminiumbromid-dioleoylfosfatidyl-etanolamin ("GAP-DLRIE:DOPE"). Formuleringer som inneholder (±)-N-(3-aminopropyl)-N,N-dimetyl-2,3-bis(syn-9-tetradeceneyloksy)-1-propanaminiumsalter er foretrukket [127].
- Forbindelser som inneholder lipider bundet til en fosfat-holdig acyklisk grunnstruktur, så som TLR4-antagonisten E5564 [128,129]:

10



[0065] Disse og andre adjuvant-aktive substanser diskuteres i større detalj i litteraturhenvisningene 133 og 134.

[0066] Ajuvant(er) for bruk ifølge foreliggende oppfinnelse kan være modulatorer og/eller agonister av Toll-Lignede Receptorer (TLR). De kan for eksempel være agonister av ett eller flere humane proteiner valgt fra TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 og/eller TLR9. Foretrukne midler er agonister av TLR7 (f.eks. imidazokinoliner) og/eller TLR9 (f.eks. CpG-oligonukleotider). Disse midler er nyttige for å aktivere de naturlige immunitetsbaner.

[0067] En enkelt vaksine kan omfatte to eller flere slike adjuvanter.

[0068] Antigener og adjuvanter i en sammensetning vil typisk være blandet sammen.

Aluminiumsaltadjuvanter

[0069] Adjuvantene som er kjent som aluminiumhydroksid og aluminiumfosfat, kan også brukes. Disse navnene er konvensjonelle, men brukes kun for enkelthetens skyld, idet ingen av delene er noen nøyaktig beskrivelse av den faktiske kjemiske forbindelse som foreligger (se f.eks. kapittel 9 av litteraturhenvisning 133). Oppfinnelsen kan benytte seg av hvilke som helst "hydroksid-" eller "fosfat-" adjuvanter som det er vanlig å bruke som adjuvant.

[0070] Adjuvantene kjent som "aluminiumhydroksid" er typisk aluminiumoksyhydroksidsalter, som vanligvis er i det minste delvis krystallinske. Aluminiumoksyhydroksid, som kan representes ved formel $\text{AlO}(\text{OH})$, kan skjelnes fra andre aluminiumforbindelser, så som aluminiumhydroksid $\text{Al}(\text{OH})_3$, ved bruk av infrarød (IR)-spektroskopi, spesielt avhengig av nærværet av et adsorpsjonsbånd ved 1070 cm^{-1} og en sterk skulder ved $3090\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ [kapittel 9 av litteraturhenvisning 133]. Krystallinitetsgraden av en aluminiumhydroksidadjuvant gjenspeiles i bredden av diffraksjonsbåndet ved halv høyde (WHH), hvor svakt krystallinske partikler viser en større linjebredde grunnet mindre krystallittstørrelser. Overflatearealet øker med økende WHH, og adjuvanter med høyere WHH-verdier har vist seg å ha større kapasitet for antigenadsorpsjon. En fibrøs morfologi (f.eks. slik som man observerer i transmisjonselektronmikrografer) er typisk for aluminiumhydroksidadjuvanter. pH av aluminiumhydroksidadjuvanter er typisk ca. 11, dvs. at adjuvantene selv har en positiv overflateladning ved fysiologisk pH. Adsorptive evner på mellom 1,8–2,6 mg protein per mg Al^{+++} ved pH 7,4 er blitt rapportert for aluminiumhydroksidadjuvanter.

[0071] Adjuvantene kjent som "aluminiumfosfat" er typisk aluminiumhydroksyfosfater, som ofte også inneholder en liten mengde sulfat (dvs. aluminiumhydroksyfosfatsulfat). De kan erholdes ved felning, og reaksjonsbetingelsene og konsentrasjonene under felningen påvirker erstatningsgraden av hydroksyl med fosfat i saltet. Hydroksyfosfater har generelt et molart PO_4/Al -forhold mellom 0,3 og 1,2. Hydroksyfosfater kan skjelnes fra rent AlPO_4 ved at det foreligger hydroksylgrupper. For eksempel tyder et IR-spekterbånd ved 3164 cm^{-1} (f.eks. oppvarmet til 200°C) på et nærvær av strukturelle hydroksyler [kap. 9 av litteraturhenvisning 133].

[0072] Det molare $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ -forhold i en aluminiumfosfatadjuvant vil generelt være mellom 0,3 og 1,2, fortrinnsvis mellom 0,8 og 1,2, og mer foretrukket $0,9 \pm 0,1$. Aluminiumfosfatet vil generelt være amorf, og mer foretrukket amorf, og mer foretrukket amorf, og mer foretrukket amorf.

spesielt hydroksyfosfatsalter. En typisk adjuvant er amorft aluminiumhydroksyfosfat med et molart PO_4/Al -forhold mellom 0,84 og 0,92, medregnet ved 0,6 mg Al^{3+} /ml. Aluminiumfosfatet vil generelt være partikkelformet (f.eks. plate-lignende morfologi ifølge observasjoner i en transmisjonselektronmikrograf). Typiske diametere av partiklene er i området 0,5-20 μm (f.eks. ca. 5-10 μm) etter en eventuell antigen-adsorpsjon. Adsorptive kapasiteter mellom 0,7-1,5 mg protein per mg Al^{+++} ved pH 7,4 er blitt rapportert for aluminiumfosfatadjuvanter.

[0073] Punktet med null ladning ("point of zero charge", PZC) av aluminiumfosfat står i inverst forhold til graden av substitusjon av hydroksyl med fosfat, og denne substitusjonsgrad kan variere avhengig av reaksjonsbetingelsene og konsentrasjonen av reagensmidlene som brukes for å fremstille saltet ved felning. PZC kan også endres ved å endre konsentrasjonen av frie fosfationer i oppløsning (mer fosfat = mer surt PZC) eller ved å tilsette en buffer så som en histidinbuffer (gjør PZC mer basisk). Aluminiumfosfater som brukes ifølge oppfinnelsen, vil generelt ha en PZC-verdi mellom 4,0 og 7,0, mer foretrukket mellom 5,0 og 6,5, f.eks. omtrent 5,7.

[0074] Suspensjoner av aluminiumsalter som brukes til å fremstille sammensetninger ifølge oppfinnelsen, kan inneholde en buffer (f.eks. en fosfat- eller en histidin- eller en Tris-buffer), men dette er ikke alltid nødvendig. Suspensjonene er fortrinnsvis sterile og pyrogen-frie. En suspensjon kan omfatte frie vandige fosfationer som f.eks. kan foreligge i en konsentrasjon mellom 1,0 og 20 mM, fortrinnsvis mellom 5 og 15 mM og mer foretrukket ca. 10 mM. Suspensjonene kan også omfatte natriumklorid.

[0075] Oppfinnelsen kan bruke en blanding av et aluminiumhydroksid og et aluminiumfosfat, slik som i DARONRIX™. I dette tilfelle kan det foreligge mer aluminiumfosfat enn hydroksid, f.eks. i et vektforhold på minst 2:1, f.eks. $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$ osv.

[0076] Konsentrasjonen av Al^{+++} i en sammensetning for administrasjon til en pasient er fortrinnsvis under 10 mg/ml, f.eks. ≤ 5 mg/ml, ≤ 4 mg/ml, ≤ 3 mg/ml, ≤ 2 mg/ml, ≤ 1 mg/ml osv. Et foretrukket område er mellom 0,3 og 1 mg/ml. Maksimalt 0,85 mg/dose er foretrukket.

Olje-i-vann-emulsjonsadjuvanter

[0077] Olje-i-vann-emulsjoner har vist seg å være spesielt godt egnet som adjuvanter i influensavirusvaksiner. Forskjellige slike emulsjoner er kjent, og de omfatter typisk minst én olje og minst én surfaktant, hvor oljen(e) og surfaktanten(e) er biologisk nedbrytbare (metaboliserbare) og biokompatible. Oljedråpene i emulsjonen er typisk mindre enn 5 μm i diameter, og kan til og med ha en diameter under én mikron, hvor disse små størrelsene oppnås med en mikrofluidiserer for å tilveiebringe stabile emulsjoner. Dråper med en størrelse under 220 nm foretrekkes, i det de kan underkastes filtreringssterilisering.

[0078] Oppfinnelsen kan brukes med oljer så som oljer fra et dyr (så som fisk) eller fra en vegetabilsk kilde. Kilder for vegetabiliske oljer omfatter nøtter, frø og korn. Jordnøttolje, soyabønneolje, kokosnøttolje og olivenolje, de lettest tilgjengelige, er eksempler på nøtteoljer. Jojobaolje kan brukes, for eksempel erholdt fra jojobabønner. Frøoljer omfatter saffranolje, bomullsfrøolje, solsikkefrøolje, sesamfrøolje og lignende. I korngruppen er maisolje lettest tilgjengelig, men olje fra andre kornslag så som hvete, havre, rug, ris, teff, triticale og lignende kan også brukes. 6-10-karbonfettsyreestere av glycerol og 1,2-propandiol kan, selv om de ikke forekommer naturlig i frøoljer, fremstilles ved hydrolyse, separasjon og forestring av de egnede materialer utgående fra nøtte- og frøoljer. Fetter og oljer fra pattedyrmelk er metaboliserbare og kan derfor brukes ved utøvelse av foreliggende oppfinnelse. Prosedyrene for separasjon, rensing, forsåpning og andre nødvendige prosedyrer for å erholde rene oljer fra animalske kilder er velkjent innen faget. De fleste fiskearter inneholder metaboliserbare oljer som lett kan isoleres. For eksempel er torskaleverolje, haileverolje og hvalolje så som spermasett eksempler på de mange fiskeoljer som kan brukes heri. Et antall forgrenede oljer syntetiseres biokjemisk i 5-karbonisopren-enheter og benevnes generelt terpenoider. Haileverolje inneholder et forgrenet,

umettet terpenoid kjent som skvalen, 2,6,10,15,19,23-heksametyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaen, som er spesielt foretrukket heri. Skvalan, den mettede analog til skvalen, er også en foretrukken olje. Fiskeoljer, medregnet skvalen og skvalan, er lett tilgjengelige fra kilder i handelen eller kan erholdes ved bruk av metoder som er kjent innen faget. Andre foretrukne oljer er tokoferolene (se nedenfor). Blandinger av oljer kan brukes.

[0079] Surfaktanter kan klassifiseres i henhold til sin "HLB" (hydrofil/lipofil-balanse). Foretrukne surfaktanter ifølge oppfinnelsen har en HLB-verdi på minst 10, fortrinnsvis minst 15 og mer foretrukket minst 16. Oppfinnelsen kan brukes med surfaktanter omfattende, men ikke begrenset til: polyoksyetylenorbitan-estersurfaktanter (vanligvis benevnt Tween'er), spesielt polysorbat 20 og polysorbat 80; kopolymerer av etylenoksid (EO), propylenoksid (PO) og/eller butylenoksid (BO), solgt under varebetegnelsen DOWFAX™, så som rettkjedede EO/PO-blokk-kopolymerer; oktoksynoler, som kan ha forskjellig antall gjentatte etoksy- (oksy-1,2-etandiyl)-grupper, hvor oktoksynol-9 (Triton X-100 eller t-oktylfenoksy-polyetoksyetanol) er av spesiell interesse; (oktylfenoksy)-polyetoksyetanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolipider så som fosfatidylkolin (lecitin); nonylfenoletoksylder, så som Tergitol™ NP-serien; polyoksyetylenfettsyreeter avledet fra lauryl-, cetyl-, stearyl- og oleylalkoholer (kjent som Brij-surfaktanter), så som trietylglykolmonolauryleter (Brij 30); og sorbitanestere (vanlig kjent som SPAN's), så som sorbitantrioleat (Span 85) og sorbitanmonolaurat. Ikke-ioniske surfaktanter foretrekkes. Foretrukne surfaktanter for innlemmelse i emulsjonen er Tween 80 (polyoksyetylenorbitanmonooleat), Span 85 (sorbitantrioleat), lecitin og Triton X-100.

[0080] Blandinger av surfaktanter kan brukes, f.eks. Tween 80/Span 85-blandinger. En kombinasjon av en polyoksyetylenorbitanester så som polyoksyetylenorbitanmonooleat (Tween 80) og en oktoksynol så som t-oktylfenoksy-polyetoksyetanol (Triton X-100) er også egnet. En annen nyttig kombinasjon omfatter laureth 9 pluss en polyoksyetylenorbitanester og/eller en oktoksynol.

[0081] Foretrukne surfaktantmengder (vekt%) er: polyoksyetylenorbitanestere (så som Tween 80) 0,01 til 1%, spesielt ca. 0,1%; oktyl- eller nonylfenoksy-polyoksyetanoler (så som Triton X-100 eller andre rensemidler i Triton-serien) 0,001 til 0,1%, spesielt 0,005 til 0,02%; polyoksyetylenetere (så som laureth 9) 0,1 til 20%, fortrinnsvis 0,1 til 10% og spesielt 0,1 til 1% eller omtrent 0,5%.

[0082] Bestemte olje-i-vann-emulsjonsadjuvanter som er nyttige med oppfinnelsen omfatter, men er ikke begrenset til:

- En submikronisk emulsjon av skvalen, Tween 80 og Span 85. Sammensetningen av emulsjon beregnet på volum kan være ca. 5% skvalen, ca. 0,5% polysorbat 80 og ca. 0,5% Span 85. Beregnet på vekten, blir disse forhold 4,3% skvalen, 0,5% polysorbat 80 og 0,48% Span 85. Denne adjuvant er kjent som "MF59" [130-132], slik som det beskrives i større detalj i kapittel 10 av litteraturhenvisning 133 og kapittel 12 av litteraturhenvisning 134. MF59-emulsjonen omfatter med fordel citrater, f.eks. 10 mM natriumcitratbuffer.
- En emulsjon av skvalen, en tokoferol og Tween 80. Emulsjonen kan omfatte fosfatbuffer saltvann. Den kan også omfatte Span 85 (f.eks. 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 mellom skvalen:tokoferol er fortrinnsvis ≤ 1 (f.eks. 0,90), ettersom dette gir en mer stabil emulsjon. Skvalen og Tween 80 kan foreligge i et volumforhold på ca. 5:2, eller i et vektforhold på ca. 11:5. Én slik emulsjon kan fremstilles ved å løse opp Tween 80 i PBS for å gi en 2% oppløsning, deretter blande 90 ml av denne oppløsning med en blanding av (5g DL- α -tokoferol og 5ml skvalen), og deretter mikrofluidisere blandingen. Den dannede emulsjon kan ha oljedråper i størrelsesorden submikron, f.eks. med en midlere diameter mellom 100 og 250 nm, fortrinnsvis omtrent 180 nm.
- En emulsjon av skvalen, en tokoferol og et Triton-rensemiddel (f.eks. Triton X-100). Emulsjonen kan også omfatte et 3d-MPL (se nedenfor). Emulsjonen kan inneholde en fosfatbuffer.

- En emulsjon som omfatter et polysorbat (f.eks. polysorbat 80), et Triton-rensemiddel (f.eks. Triton X-100) og en tokoferol (f.eks. et α -tokoferolsuksinat). Emulsjonen kan omfatte disse tre komponenter i et vektforhold rundt 75:11:10 (f.eks. 750 $\mu\text{g/ml}$ polysorbat 80, 110 $\mu\text{g/ml}$ Triton X-100 og 100 $\mu\text{g/ml}$ α -tokoferolsuksinat), og disse konsentrasjonene bør innbefatte et hvert bidrag av disse komponenter fra antigenene. Emulsjonen kan også omfatte skvalen. Emulsjonen kan også omfatte et 3d-MPL (se nedenfor). Den vandige fase kan inneholde en fosfatbuffer.
- En emulsjon av skvalen, polysorbat 80 og poloksamer 401 ("Pluronic™ L121"). Emulsjonen kan formuleres i fosfatbufret saltvann, pH 7,4. Denne emulsjon er et nyttig leveringsvehikkel for muramyl-dipeptider og er blitt brukt med treonin-MDP i adjuvanten "SAF-1" [135] (0,05-1% Thr-MDP, 5% skvalen, 2,5% Pluronic L121 og 0,2% polysorbat 80). Den kan også brukes uten Thr-MDP, slik som i adjuvanten "AF" [136] (5% skvalen, 1,25% Pluronic L121 og 0,2% polysorbat 80). Mikrofluidisering foretrekkes.
- En emulsjon som omfatter skvalen, et vandig løsemiddel, en hydrofil, ikke-ionisk polyoksyetylenalkyleter-surfaktant (f.eks. polyoksyetylen (12)-cetostearyleter) og en hydrofob, ikke-ionisk surfaktant (f.eks. en sorbitanester eller mannidester, så som sorbitanmonoleat eller "Span 80"). Emulsjonen er fortrinnsvis termoreversibel og/eller minst 90% av oljedråpene (beregnet på volum) er av mindre størrelse enn 200 nm [137]. Emulsjonen kan også omfatte ett eller flere midler valgt fra: alditol; et kryobeskyttende middel (f.eks. et sukker, så som dodekylmaltosid og/eller sakkarose); og/eller et alkylpolyglykosid. Slike emulsjoner kan lyofiliseres.
- En emulsjon med fra 0,5-50% olje, 0,1-10% fosfolipid og 0,05-5% ikke-ionisk surfaktant. Slik som det beskrives i litteraturhenvisning 138, er foretrukne fosfolipidkomponenter fosfatidylkolin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol, fosfatidylglycerol, fosfatidinsyre, sfingomyelin og kardiolipin. Dråper i størrelsesorden submikron er fordelaktige.
- En submikronisk olje-i-vann-emulsjon av en ikke-metaboliserbar olje (så som lett mineralolje) og minst én surfaktant (så som lecitin, Tween 80 eller Span 80). Additiver kan innlemmes, så som QuilA-saponin, kolesterol, et saponin-lipofil-konjugat (så som GPI-0100, beskrevet i litteraturhenvisning 139, fremstilt ved tilsetning av alifatisk amin til desacylsaponin via karboksylgruppen av glucuronsyre), dimetyldioktadekylammoniumbromid og/eller N,N-dioktadekyl-N,N-bis(2-hydroksyetyl)propandiamin.
- En emulsjon hvor et saponin (f.eks. QuilA eller QS21) og en sterol (f.eks. en kolesterol) er forbundet som heliske miceller [140].
- En emulsjon som omfatter en mineralolje, en ikke-ionisk lipofil etoksylert fettsyrealkohol, og en ikke-ionisk hydrofil surfaktant (f.eks. en etoksylert fettsyrealkohol og/eller polyoksyetylen-polyoksypropylen-blokk-kopolymer) [141].
- En emulsjon som omfatter en mineralolje, en ikke-ionisk hydrofil etoksylert fettsyrealkohol og en ikke-ionisk lipofil surfaktant (f.eks. en etoksylert fettsyrealkohol og/eller polyoksyetylen-polyoksypropylen-blokk-kopolymer) [141].

[0083] Foretrukne olje-i-vann-emulsjoner ifølge oppfinnelsen omfatter skvalen.

[0084] Emulsjonene kan blandes med antigen ekstemporert, på leveringstidspunktet. Dermed kan adjuvant og antigen holdes atskilt i en forpakket eller distribuert vaksine, klar for endelig formulering på brukstidspunktet. Antigenet vil generelt foreligge i vandig form, slik at vaksinen prepareres endelig ved å blande sammen to væsker. Volumforholdet mellom de to væsker for blanding kan variere (f.eks. mellom 5:1 og 1:5), men er generelt ca. 1:1. Hvis emulsjonen og antigenet lagres atskilt i et flerdosesett, da kan produktet presenteres som et medisinglass som inneholder 2,5 ml emulsjon, og et medisinglass som inneholder 2,5 ml vandig antigen, for å blandes sammen for å gi 5 ml adjuvenert vaksine f.eks. 10 x 0,5 ml doser.

[0085] Etter sammenblanding av antigenet og adjuvanten, vil hemagglutininantigen generelt forbli i vandig oppløsning, men kan fordele seg langs olje/vann-grensen. Generelt vil lite eller intet hemagglutinin tre inn i oljefasen av emulsjonen.

[0086] Hvor en sammensetning omfatter en tokoferol, kan hvilken som helst α -, β -, γ -, δ -, ϵ - eller ζ - tokoferol brukes, men α -tokoferolene foretrekkes. Tokoferolen kan foreligge i forskjellige former, f.eks. forskjellige salter og/eller isomerer. Salter omfatter organiske salter, så som suksinat, acetat, nikotinat osv. Både D- α -tokoferol og DL- α -tokoferol kan brukes. Tokoferoler innlemmes med fordel i vaksiner for bruk i eldre pasienter (f.eks. i en alder på 60 år eller eldre) fordi det er blitt rapportert at vitamin E har en positiv virkning på immunresponsen i denne pasientgruppe [142]. De har også antioksidierende egenskaper som kan hjelpe med å stabilisere emulsjonene [143]. En foretrukken α -tokoferol er DL- α -tokoferol, og det foretrukne salt av denne tokoferol er suksinatet. Suksinatsaltet har vist seg å kooperere med TNF-relaterte ligander *in vivo*. Videre er det kjent at α -tokoferolsuksinat er kompatibelt med influensavaksiner og er nyttige konserveringsstoffer som et alternativ til merkurialforbindelser [13].

Immunostimulatoriske oligonukleotider

[0087] Immunostimulatoriske oligonukleotider kan omfatte nukleotidmodifikasjoner/analoger så som fosforotioatmodifikasjoner, og kan være dobbeltkjedet eller (unntatt RNA) enkeltkjedet. Litteraturhenvisningene 144, 145 og 146 beskriver mulige analogsubstitusjoner, f.eks. erstatning av guanosin med 2'-deoksy-7-deazaguanosin. Adjuvantvirkningene av CpG-oligonukleotider diskuteres nærmere i litteraturhenvisningene 147-152. En CpG-sekvens kan rettes mot TLR9, så som motivet GTCGTT eller TTCGTT [153]. CpG-sekvensen kan spesifikt indusere en Th1-immunrespons, så som et CpG-A-ODN (oligodeoksy-nukleotid), den kan mer spesifikt indusere en B-cellerespons, så som et CpG-B-ODN. CpG-A- og CpG-B-ODN'er diskuteres i litteraturhenvisningene 154-156. Fortrinnsvis er CpG'et et CpG-A-ODN. Fortrinnsvis er CpG-oligonukleotidet konstruert slik at 5'-ende er tilgjengelig for receptorgjenkjenning. Valgfritt kan to CpG-oligonukleotidsekvenser være forbundet i sin 3'-ende for å danne "immunomerer". Se for eksempel litteraturhenvisningene 153 og 157-159. En nyttig CpG-adjuvant er CpG7909, også kjent som ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.).

[0088] Som et alternativ, eller i tillegg, til bruk av CpG-sekvenser, kan det brukes TpG-sekvenser [160]. Disse oligonukleotider kan være frie for umetylerte CpG-motiver.

[0089] Det immunostimulatoriske oligonukleotid kan være rikt på pyrimidin. Det kan for eksempel omfatte flere enn ett tymidinnukleotid på rad (f.eks. TTTT, slik som det beskrives i litteraturhenvisning 160), og/eller det kan ha en nukleotidsammensetning med >25% tymidin (f.eks. >35%, >40%, >50%, >60%, >80% osv.). Det kan for eksempel omfatte flere enn ett cytosinnukleotid på rad (f.eks. CCCC, slik som det beskrives i litteraturhenvisning 160), og/eller det kan ha en nukleotidsammensetning med >25% cytosin (f.eks. >35%, >40%, >50%, >60%, >80% osv.). Disse oligonukleotider kan være frie for umetylerte CpG-motiver.

[0090] Immunostimulatoriske oligonukleotider vil typisk omfatte minst 20 nukleotider. De kan omfatte færre enn 100 nukleotider.

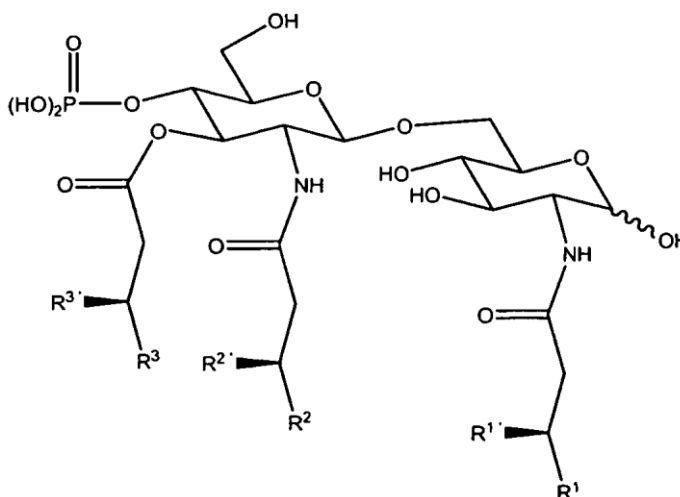
[0091] En spesielt nyttig adjuvant basert på immunostimulatoriske oligonukleotider er kjent som IC31™ [161]. Således kan en adjuvant som brukes med oppfinnelsen, omfatte en blanding av (i) et oligonukleotid (f.eks. mellom 15-40 nukleotider) omfattende minst ett (og fortrinnsvis flere) Cpl-motiver, og (ii) en polykationisk polymer, så som et oligopeptid (f.eks. mellom 5-20 aminosyrer) omfattende minst én (og fortrinnsvis flere) Lys-Arg-Lys-tripeptidsekvens(er). Oligonukleotidet kan være et deoksynukleotid som omfatter 26-mer sekvens 5'-(IC)₁₃-3' (SEQ ID NO: 14). Den polykationiske polymer kan være et peptid som omfatter 11-mer aminosyresekvens KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 15).

3 de-O-acylert monofosforyllipid A

[0092] 3dMPL (også kjent som 3 de-O-acylert monofosforyllipid A eller 3-O-desacyl-4'-monofosforyllipid A) er en adjuvant hvor posisjon 3 av glukosamin-reduserende ende i monofosforyllipid A er blitt de-acylert. 3dMPL er blitt preparert fra heptosemanglende mutant av *Salmonella minnesota*, og har

5 kjemisk likhet med lipid A, men mangler en syrelabil fosforylgruppe og en base-labil acylgruppe. Det aktiverer celler fra monocytt/makrofag-linje og stimulerer frigivning av flere cytokiner, medregnet IL-1, IL-12, TNF- α og GM-CSF (se også litteraturhenvisning 162). Fremstilling av 3dMPL ble opprinnelig beskrevet i litteraturhenvisning 163.

[0093] 3dMPL kan ha form av en blanding av beslektede molekyler med forskjellig acylering (f.eks. med 3, 4, 5 eller 6 acylkjeder, som kan ha forskjellig lengde). De to glukosamin- (også kjent som 2-deoksy-2-aminoglukose) monosakkarider er N-acylert i sine karboner i 2-posisjon (dvs. i posisjon 2 og 2'), og det foreligger også O-acylering i 3'-posisjon. Gruppen bundet til karbon 2 har formel $\text{-NH-CO-CH}_2\text{-CR}^1\text{R}^{1'}$. Gruppen bundet til karbon 2' har formel $\text{-NH-CO-CH}_2\text{-CR}^2\text{R}^{2'}$. Gruppen bundet til karbon 3' har formel $\text{-O-CO-CH}_2\text{CR}^3\text{R}^{3'}$. En representativ struktur er:

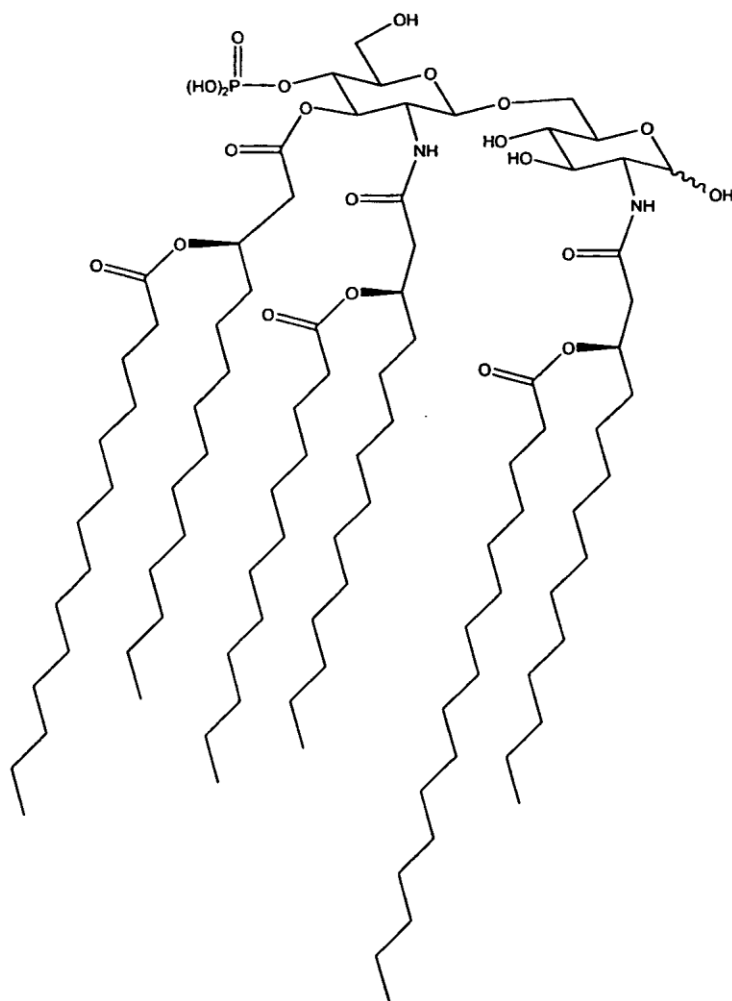


[0094] Hver av gruppene R^1 , R^2 og R^3 er uavhengig $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH}_3$. Verdien av n er fortrinnsvis mellom 8 og 16, mer foretrukket mellom 9 og 12, og er mest foretrukket 10.

[0095] Hver gruppe $R^{1'}$, $R^{2'}$ og $R^{3'}$ kan uavhengig være: (a) -H; (b) -OH eller (c) -O-CO-R^4 , hvor R^4 er enten -H eller $\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{-CH}_3$, hvor verdien av m fortrinnsvis er mellom 8 og 16, og mer foretrukket er 10, 12 eller 14. I 2-posisjon er m fortrinnsvis 14. I 2'-posisjon er m fortrinnsvis 10. I 3'-posisjon er m fortrinnsvis 12. Gruppene $R^{1'}$, $R^{2'}$ og $R^{3'}$ er dermed fortrinnsvis -O-acylgrupper fra dodekanoinsyre, tetradekanoinsyre eller heksadekanoinsyre.

[0096] Når hver $R^{1'}$, $R^{2'}$ og $R^{3'}$ er -H, da har 3dMPL'et kun 3 acylkjeder (én hver i posisjon 2, 2' og 3'). Når kun to av $R^{1'}$, $R^{2'}$ og $R^{3'}$ er -H, da kan 3dMPL'et ha 4 acylkjeder. Når kun én av $R^{1'}$, $R^{2'}$ og $R^{3'}$ er -H, da kan 3dMPL'et ha 5 acylkjeder. Når ingen av $R^{1'}$, $R^{2'}$ og $R^{3'}$ er -H, da kan 3dMPL'et ha 6 acylkjeder. 3dMPL-adjuvant som brukes i henhold til oppfinnelsen, kan være en blanding av disse former, med fra 3 til 6 acylkjeder, men det foretrekkes å innlemme 3dMPL med 6 acylkjeder i blandingen, og spesielt å sikre at heksaacylkjedeformen utgjør minst 10 vekt% av det samlede 3dMPL, f.eks. $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$ eller mer. 3dMPL'er med 6 acylkjeder har vist seg å være den mest adjuvant-aktive form.

[0097] Den mest foretrukne form for 3dMPL for innlemmelse i sammensetninger ifølge oppfinnelsen er således:



[0098] Når 3dMPL brukes i form av en blanding, da viser henvisninger til mengder eller konsentrasjoner av 3dMPL i sammensetninger ifølge oppfinnelsen, til den samlede mengde 3dMPL-arter i blandingen.

[0099] I vandige betingelser kan 3dMPL danne micellære aggregater eller partikler med forskjellige størrelser, f.eks. med diameter <150 nm eller >500 nm. Hver av disse eller begge deler kan brukes med oppfinnelsen, og rutinemessige assayer vil kunne gi utsagn om hvilke partikler som er bedre egnet. Mindre partikler (f.eks. tilstrekkelig små til å gi en klar vandig suspensjon av 3dMPL) foretrekkes for bruk ifølge oppfinnelsen, på grunn av sin overlegne aktivitet [164]. Foretrukne partikler har en midlere diameter under 220 nm, mer foretrukket under 200 nm eller under 150 nm eller under 120 nm, og kan til og med ha en midlere diameter under 100 nm. I de fleste tilfeller vil den midlere diameter imidlertid ikke være mindre enn 50 nm. Disse partikler er tilstrekkelig små til å være egnet for filtrasjonssterilisering. Partikkeldiameteren kan bedømmes ved bruk av rutinemessige teknikker for dynamisk lysspredning, som viser den midlere partikkeldiameter. Når det sies at en partikkel har en diameter på x nm, vil det generelt foreligge en fordeling av partikler rundt denne midlere størrelse, men minst 50% av antallet partikler (f.eks. ≥60%, ≥70%, ≥80%, ≥90% eller mer) av partiklene vil ha en diameter i området ±25%.

[0100] 3dMPL kan med fordel brukes i kombinasjon med en olje-i-vann-emulsjon. I det vesentlige alle 3dMPL'er kan være lokalisert i den vandige fase av emulsjonen.

[0101] 3dMPL'et kan brukes alene eller i kombinasjon med én eller flere ytterligere forbindelser. Det er for eksempel kjent å bruke 3dMPL i kombinasjon med saponinet QS21-saponin [165] (også i en olje-i-vann-emulsjon [166]), med et immunostimulatorisk oligonukleotid, med både QS21 og et immunostimulatorisk

oligonukleotid, med aluminiumfosfat [167], med aluminiumhydroksid [168] eller med både aluminiumfosfat og aluminiumhydroksid.

Farmasøytiske sammensetninger

[0102] Sammensetninger ifølge oppfinnelsen er farmasøytisk akseptable og foreligger typisk i vandig form. De kan omfatte komponenter i tillegg til antigenet (og, hvor passende, adjuvanten), f.eks. omfatter de typisk én eller flere farmasøytiske bærer(e) og/eller ekspiens(er). En grundig diskusjon av slike komponenter finnes i litteraturhenvisning 169.

[0103] Sammensetningen kan omfatte konserveringsmidler så som tiomersal (f.eks. i mengden 10 µg/ml) eller 2-fenoksyetanol. Det foretrekkes imidlertid at vaksinen er i det vesentlige fri for (dvs. mindre enn 5 µg/ml) merkurielmateriale, f.eks. tiomersal-fritt [13,170]. Vaksiner som ikke inneholder noe kvikksølv er mer foretrukket. Vaksiner som er frie for konserveringsmidler, er spesielt foretrukne.

[0104] For å regulere tonisiteten, foretrekkes det å innlemme et fysiologisk salt, så som et natriumsalt. Natriumklorid (NaCl) er foretrukket, og kan foreligge i en mengde mellom 1 og 20 mg/ml. Andre salter som kan foreligge, omfatter kaliumklorid, kaliumdihydrogenfosfat, dinatriumfosfatdehydrat, magnesiumklorid, kalsiumklorid osv.

[0105] Sammensetninger vil generelt ha en osmolalitet mellom 200 mOsm/kg og 400 mOsm/kg, fortrinnsvis mellom 240-360 mOsm/kg, og vil mer foretrukket ligge i området 290-310 mOsm/kg. Det er tidligere blitt rapportert at osmolalitet ikke har noen innvirkning på smerter forårsaket av vaksinasjon [171], men det foretrekkes allikevel å holde osmolaliteten i dette området.

[0106] Sammensetninger kan omfatte én eller flere buffere. Typiske buffere omfatter: en fosfatbuffer; en Tris-buffer; en boratbuffer; en suksinatbuffer; en histidinbuffer (spesielt med en aluminiumhydroksidadjuvant); eller en citratbuffer. Buffere vil typisk innlemmes i mengdeområdet 5-20 mM.

[0107] pH av en sammensetning vil generelt være mellom 5,0 og 8,1, og mer typisk mellom 6,0 og 8,0, f.eks. mellom 6,5 og 7,5 eller mellom 7,0 og 7,8. En fremgangsmåte kan derfor omfatte et trinn hvor pH av bulkvaksinen justeres før forpakning.

[0108] Sammensetningen er fortrinnsvis steril. Sammensetningen er fortrinnsvis ikke-pyrogen, idet den f.eks. inneholder <1 EU (endotoksinenhet, et standardmål) per dose og fortrinnsvis <0,1 EU per dose. Sammensetningen er fortrinnsvis glutenfri.

[0109] Sammensetningen kan omfatte materiale for én enkelt immunisering, eller kan omfatte materiale for flere immuniseringer (dvs. et "flerdose"-sett f.eks. for 10 doser). Innlemmelse av et konserveringsmiddel er å foretrekke i flerdosearrangementer. Som et alternativ (eller i tillegg) til å innlemme et konserveringsmiddel i flerdosesammensetninger, kan sammensetningene foreligge i en beholder som har en aseptisk adaptor for uttak av materiale.

[0110] Influensavaksiner administreres typisk i et doseringsvolum rundt 0,5 ml, selv om det kan administreres en halv dose (dvs. ca. 0,25 ml), for eksempel til barn (f.eks. opptil en alder på 36 måneder).

[0111] Sammensetninger og sett lagres fortrinnsvis ved mellom 2°C og 8°C. De bør ikke fryses. De bør ideelt holdes unna direkte lysstråling.

Sett

[0112] Sett kan inneholde flere enn én sammensetning ifølge oppfinnelsen, f.eks. en primersammensetning og en boostersammensetning. De to komponentene av settet vil holdes atskilt, i det de administreres til pasienten på vesentlig forskjellige tidspunkter.

[0113] Hver enkelt vaksine i et sett kan være klar for bruk eller kan være klar for ektemporær klargjøring på leveringstidspunktet. Dette ektemporære arrangement gjør det mulig å holde adjuvanten og antigenet atskilt inntil brukstidspunktet, hvilket er spesielt nyttig når en benytter seg av en olje-i-vann-emulsjonsadjuvant.

[0114] Når en vaksine fremstilles ektemporært, er dens komponenter fysisk atskilte fra hverandre i settet, og denne atskillelse kan oppnås på forskjellige måter. For eksempel kan de to komponenter foreligge i to atskilte beholdere, så som medisinglass, f.eks. et antigenglass og et emulsjonsglass. Innholdet i de to glassene kan deretter blandes f.eks. ved å fjerne innholdet i ett glass og tilsette det til det andre glass, eller ved å atskilt fjerne innholdet i begge glassene og blande dem sammen i en tredje beholder. I et foretrukket arrangement foreligger én av settets komponenter i en sprøyte og den andre i en beholder så som et medisinglass. Sprøyten kan brukes (f.eks. med en nål) til å innføre sitt innhold i den andre beholder for sammenblanding, og blandingen kan deretter trekkes ut i sprøyten. Det blandede innhold i sprøyten kan deretter administreres til en pasient, typisk via en ny steril nål. Forpakning av én komponent i en sprøyte fjerner behovet for å bruke en separat sprøyte for administrasjon til pasienten.

[0115] I et annet foretrukket arrangement, holdes de to komponentene sammen men atskilt i samme sprøyte, f.eks. en tokammers sprøyte, slik som hva som beskrives i litteraturhenvisningene 172-179 osv. Når sprøyten aktueres (f.eks. under administrasjon til en pasient), blandes innholdet i de to kamrene sammen. Dette arrangement unngår behovet for et atskilt blandetrinn på brukstidspunktet.

[0116] Når en vaksine fremstilles ektemporært, vil dens bestanddeler generelt foreligge i vandig form. I enkelte arrangementer foreligger en komponent (typisk antigenkomponenten heller enn adjuvantkomponenten) i tørr form (f.eks. i lyofilisert form), mens den andre komponent foreligger i vandig form. De to komponentene kan blandes for å reaktivere den tørre komponent og gi en vandig sammensetning for administrasjon til en pasient. En lyofilisert komponent vil generelt plasseres i et glass, heller enn en sprøyte. Tørkede komponenter kan inneholde stabilisatorer så som laktose, sakkarose eller mannitol, samt blandinger derav, f.eks. laktose/sakkarose-blandinger, sakkarose/mannitol-blandinger osv. Ett mulig arrangement benytter seg av en vandig adjuvantkomponent i en forhåndsfylt sprøyte, og en lyofilisert antigenkomponent i et glass.

Forpakning av sammensetninger eller bestanddelene i et sett

[0117] Egnede beholdere for sammensetninger ifølge oppfinnelsen (eller bestanddelene i et sett) omfatter medisinglass, sprøyter (f.eks. éngangssprøyter), nesesprayer osv. Disse beholdere bør være sterile.

[0118] Når en sammensetning/komponent plasseres i et medisinglass, er dette fortrinnsvis lagd av et glass- eller plastmateriale. Medisinglasset steriliseres fortrinnsvis før sammensetningen fylles i den. For å unngå problemer med lateks-følsomme pasienter, forsegles glass fortrinnsvis med lateks-fri kork, og fravær av lateks i alt forpakkingsmateriale er å foretrekke. Glasset kan omfatte én enkelt dose av vaksine, eller den kan omfatte flere enn én dose (et "flerdose"-glass), f.eks. 10 doser. Foretrukne medisinglass er fremstilt av fargeløst glass.

[0119] Et glass kan ha en kork (f.eks. en Luer-lås) tilpasset slik at en forhåndsfylt sprøyte kan innføres i korken, innholdet i sprøyten kan sprøytes inn i glasset (f.eks. for å rekonstituere lyofilisert materiale deri), og innholdet i glasset kan fjernes tilbake inn i sprøyten. Etter fjerning av sprøyten fra glasset, kan det festes en nål, og sammensetningen kan administreres til en pasient. Lokket er fortrinnsvis plassert i en forsegling eller et deksel, slik at forseglingen eller dekselet må fjernes for å få tilgang til lokket. Et glass kan ha et lokk som muliggjør aseptisk fjerning av dets innhold, spesielt for flerdoseglass.

[0120] Når en sammensetning/komponent pakkes i en sprøyte, kan sprøyten ha en nål festet på seg. Hvis det ikke er festet noen nål, kan det leveres en atskilt nål med sprøyten for sammensetning og bruk. En slik nål kan være forsynt med kappe. Sikkerhetsnåler foretrekkes. 1-inch 23-gauge, 1-inch 25-gauge og 5/8-inch 25-gauge nåler er typiske. Sprøyter kan utstyres med avtakbare etiketter hvor batchnumret, influensasesongen og

utløpsdatoen kan være trykket på, for å forenkle dokumentasjonen. Stempelet i sprøyten har fortrinnsvis en plugg for å hindre at stempelet fjernes ved et uhell under aspirasjonen. Sprøytene kan ha en kapsel og/eller et stempel av lateksgummi. Énveis sprøyter inneholder én enkelt vaksinedose. Sprøyten vil generelt ha en kapsel rundt tuppen for å forsegle tuppen før nålen festes, og tupp-kapselen er fortrinnsvis fremstilt av butylgummi.

- 5 Hvis sprøyten og nålen forpakkes atskilt, da er nålen fortrinnsvis utstyrt med en butylgummikappe. Foretrukne sprøyter er slike som markedsføres under handelsbetegnelsen "Tip-Lok"TM. Butylgummi er også et egnet materiale for korker til medisinglass, f.eks. i flerdosesett.

[0121] Beholderne kan merkes for å vise et halvdosevolum, f.eks. for å forenkle levering til barn. For eksempel kan en sprøyte som inneholder en 0,5 ml-dose, ha en markering som viser et 0,25 ml volum.

- 10 [0122] Når det brukes en glassbeholder (f.eks. en sprøyte eller et medisinglass), da foretrekkes det å bruke en beholder av et borsilikatglass heller enn av et sodakalkglass.

[0123] Et sett eller en sammensetning kan forpakkes (f.eks. i samme eske) med en brosjyre som inneholder detaljer om vaksinen, f.eks. veiledning for administrasjon, detaljer om antigenene i vaksinen osv. Veiledningene kan også omfatte en advarsel, f.eks. om å holde en oppløsning av adrenalin lett tilgjengelig i tilfelle anafylaktisk reaksjon etter vaksinasjonen osv.

15

Administrasjon av vaksinen

[0124] Sammensetninger ifølge oppfinnelsen er egnet for administrasjon til humane pasienter.

- [0125] Immunresponsen som utløses ifølge oppfinnelsen, vil generelt omfatte en antistoffrespons, fortrinnsvis en beskyttende antistoffrespons. Fremgangsmåter for å bedømme antistoffresponser, den nøytraliserende evne og beskyttelsen etter vaksinasjon mot influensavirus, er velkjent innen faget. Undersøkelser på mennesker har vist at antistofftitere mot hemagglutinin av humant influensavirus korrelerer med beskyttelsen (en hemagglutinasjons-inhiberingstiter rundt 30-40 i en serumprøve gir ca. 50% beskyttelse mot smitte med et homologt virus) [180]. Antistoffresponser måles typisk i henhold til hemagglutinasjonsinhibering, mikronøytralisasjon, ved "single radial immunodiffusion" (SRID) og/eller ved "single radial hemolysis" (SRH). Disse assayteknikkene er velkjent innen faget.

25

[0126] Sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan administreres på forskjellige måter. Den mest foretrukne immuniseringsrute er via intramuskulær injeksjon (f.eks. i armen eller benet), men andre tilgjengelige ruter omfatter subkutan injeksjon, intranasal [181-183], oral [184], intradermal [185,186], transkutan, transdermal [187] osv.

30

[0127] Vaksiner ifølge oppfinnelsen kan brukes til å behandle både barn og voksne. Influensavaksiner anbefales for tiden for bruk ved pediatrik og voksenimmunisering, fra en alder på 6 måneder. Dermed kan pasienten være mindre enn 1 år gammel, 1-5 år gammel, 5-15 år gammel, 15-55 år gammel eller minst 55 år gammel. Foretrukne pasienter for å motta vaksinene er eldre (f.eks. ≥ 50 år gammel, ≥ 60 år gammel, fortrinnsvis ≥ 65 år gammel), unge (f.eks. ≤ 5 år gammel), sykehuspasienter, helsepersonell, væpnet og militært personell, gravide kvinner, kronisk syke, pasienter med immunsvikt, pasienter som har tatt en antiviral forbindelse (f.eks. en oseltamivir- eller zanamivirforbindelse; se nedenfor) de 7 siste dagene før de mottar vaksinen, personer med eggeallergi og personer som skal reise til utlandet. Vaksinene er imidlertid ikke egnet bare for disse gruppene, og kan brukes mer generelt i en populasjon. For pandemiske stammer foretrekkes en administrasjon til alle aldersgrupper.

35

- 40 [0128] Foretrukne sammensetninger ifølge oppfinnelsen tilfredsstiller 1, 2 eller 3 av CPMP-kriteriene for virkning. I voksne (18-60 år) er disse kriteriene: (1) $\geq 70\%$ serobeskyttelse; (2) $\geq 40\%$ serokonversjon; og/eller (3) en $\geq 2,5$ -foldig heving av GMT. I eldre (> 60 år) er disse kriteriene: (1) $\geq 60\%$ serobeskyttelse; (2) $\geq 30\%$ serokonversjon; og/eller (3) ≥ 2 -foldig hevet GMT. Disse kriteriene baserer seg på åpne studier med minst 50 pasienter.

[0129] I primer-booster-utførelser ifølge oppfinnelsen underkastes en pasient en flerdosekur. I en flerdosekur kan de forskjellige dosene gis via samme eller forskjellige ruter, f.eks. en parenteral primer og mukosal booster, en mukosal primer og parenteral booster osv. Flere doser vil typisk administreres med minst 1 ukes mellomrom (f.eks. ca. 2 uker, ca. 3 uker, ca. 4 uker, ca. 6 uker, ca. 8 uker, ca. 10 uker, ca. 12 uker, ca. 16 uker osv.).

[0130] Når oppfinnelsen omfatter å immunisere (booste) en pasient som tidligere er blitt immunisert mot en annen H5-klade, kan booster dosen gis flere måneder etter den forrige dosen, f.eks. minst 6 måneder, 9 måneder, 12 måneder, 18 måneder, 24 måneder, 36 måneder, 48 måneder, 60 måneder eller mer.

[0131] I utførelser hvor en sammensetning omfatter HA fra flere enn én klade av H5-influenza A-virus, kan denne sammensetningen administreres ved bruk av en enkeltdose- eller flerdosebehandling. Administrasjon av flere doser enn én (typisk to doser) er spesielt nyttig i immunologisk naive pasienter, f.eks. for mennesker som aldri har blitt vaksinert mot influensa tidligere, eller for å vaksinere mot en ny HA-subtype så som H5. Slik som ovenfor, vil flere doser typisk administreres med minst 1 ukes mellomrom (f.eks. ca. 2 uker, ca. 3 uker, ca. 4 uker, ca. 6 uker, ca. 8 uker, ca. 10 uker, ca. 12 uker, ca. 16 uker osv.).

[0132] Sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan administreres til pasienter i det vesentlige samtidig som (f.eks. under samme medisinske konsultasjon eller besøk hos en helsemedarbeider eller et vaksinasjonssenter) andre vaksiner, f.eks. i det vesentlige samtidig som en vaksine mot meslinger, kusma, røde hunder, MMR, vannkopper, MMRV, difteri, tetanus, kikhoste, DTP, en vaksine av konjugert *H.influenzae*-type b, en vaksine med inaktivert poliovirus, en vaksine mot hepatitt B-virus, en meningokokk-konjugatvaksine (så som en fireverdig A-C-W135-Y-vaksine), en respiratorisk syncytialvirusvaksine, en pneumokokk-konjugatvaksine osv. Administrasjon på i det vesentlige samme tidspunkt som en pneumokokkvaksine eller en meningokokkvaksine er spesielt nyttig i eldre pasienter.

[0133] På lignende måte kan sammensetninger ifølge oppfinnelsen administreres til pasienter i det vesentlige samtidig som (f.eks. under samme medisinske konsultasjon eller besøk hos en helsemedarbeider) en antiviral forbindelse, og spesielt en antiviral forbindelse som er aktiv mot influensavirus (f.eks. oseltamivir og/eller zanamivir). Disse antivirale stoffer omfatter neuraminidaseinhibitorer, så som (3R,4R,5S)-4-acetylamino-5-amino-3-(1-etylpropoksy)-1-cykloheksen-1-karboksytsyre eller 5-(acetylamino)-4-[(aminoiminometyl)amino]-2,6-anhydro-3,4,5-trideoksy-D-glycero-D-galaktonon-2-enonsyre, medregnet estere derav (f.eks. etylestere) og salter derav (f.eks. fosfatsalter). En foretrukket antiviral forbindelse er (3R,4R,5S)-4-acetylamino-5-amino-3-(1-etylpropoksy)-1-cykloheksen-1-karboksytsyreetylester, fosfat (1:1), også kjent som oseltamivirfosfat (TAMIFLU™).

Generelt

[0134] Begrepet "omfatter" omfavner både "inneholder" og "består av", f.eks. kan en sammensetning "som omfatter" X bestå utelukkende av X, eller kan omfatte noe mer, f.eks. X + Y.

[0135] Begrepet "i det vesentlige" utelukker ikke "fullstendig", f.eks. kan en sammensetning som er "i det vesentlige fri" for Y være fullstendig fri for Y. Hvor det er nødvendig, kan begrepet "i det vesentlige" utelates fra definisjonen ifølge oppfinnelsen.

[0136] Begrepet "omtrent" eller "ca." i sammenheng med en numerisk verdi x betyr for eksempel $x \pm 10\%$.

[0137] Hvis intet annet er uttrykkelig nevnt, krever en prosess som omfatter et trinn med å blande sammen to eller flere komponenter, ingen bestemt blanderekkefølge. Dermed kan komponentene blandes sammen i hvilken som helst rekkefølge. Når det finnes tre komponenter, da kan to komponenter blandes sammen med hverandre og deretter kan kombinasjonen slås sammen med den tredje komponent osv.

[0138] Når det brukes animalske (og spesielt bovine) materialer ved dyrking av celler, bør disse erverves fra kilder som er frie for overførbare spongiforme encefalopatier "transmissible spongiform encephalopathies" (TSE'er), og spesielt frie for bovin spongiform encefalopati (BSE). På det hele foretrekkes det å dyrke celler i fullstendig fravær av dyreavledede materialer.

[0139] Når en forbindelse administreres til kroppen som en del av en sammensetning, da kan denne forbindelsen alternativt erstattes med en egnet prodroge.

[0140] Når et cellesubstrat brukes for reassortering eller reversgenetiske prosedyrer, er det fortrinnsvis blitt godkjent for bruk ved fremstilling av vaksiner for mennesker, f.eks. slik som i Ph Eur general kapittel 5.2.3.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

[0141] Fig 1 og 2 viser fylogenetiske tre av H5-stammer, hentet fra litteraturhenvisningene 3 og 189.

MÅTER Å UTØVE OPPFINNELSEN

Studie I på mennesker

[0142] Pasienter ble immunisert med en influensavaksine fremstilt fra H5N3-stamme A/and/Singapore/1997 (klade 0). Vaksinen var enten uten adjuvant (gruppe 2) eller med MF59-olje-i-vannemulsjon som adjuvant (gruppe 1). En tredje gruppe pasienter (gruppe 3) fikk ingen H5N3-vaksine.

[0143] I en senere influensasesong (minst 6 år senere) ble pasienter immunisert med en influensavaksine fremstilt fra en H5N1-stamme (A/Vietnam/1194/2004 = klade 1; klade 2 kunne også brukes). To doser ble administrert, på dag 0 og 21, som hver inneholdt 7,5 µg hemagglutinin og MF59-adjuvant. Pre- og post-vaksinasjonsantistoffer mot antigen diverse H5-virus ble målt i henhold til hemagglutinasjonsinhibisjon (HAI), nøytraliserende antistoff (MN) og "single radial hemolysis" (SRH).

[0144] Resultatene vises i tabell I. I korthet bygget pasienter som tidligere var blitt primet med klade 0-vaksinen, opp en bedre og raskere immunrespons mot den nye kladen, enn de ikke-primede pasientene. I den primede gruppen, kunne pasienter som hadde mottatt en primende dose med adjuvant, bygge opp en bedre immunrespons enn pasienter som hadde mottatt en primende dose uten adjuvant.

[0145] Geometriske midlere antistofftitere og seroresponser var signifikant høyere i primede individer enn i ikke-primede individer. På dag 7 etter én vaksinedose, hadde ≥80% av pasientene i gruppe 1 oppnådd serobeskyttende HAI-titere ≥1:40 mot alle testede fugle-H5-virusklader 1, 2.1, 2.2 og 2.3, liksom også mot det opprinnelige A/and/Singapore/97-klade 0-antigen. Videre var det ingen tegn som tydet på at primede individer reagerte foretrukket mot sitt opprinnelige primende antigen, hvilket mildnet bekymringer om "original antigenic sin" [190].

[0146] Det er dermed mulig å raskt indusere beskyttende antistoffresponser mot forskjellige influensa H5N1-virus etter én vaksinedose i individer som er blitt primet flere år tidligere med vaksine fremstilt fra en stamme i en annen H5-klade, som ligger antigen og genetisk fjernt.

[0147] Ytterligere detaljer om denne kliniske studie finnes i litteraturhenvisning 191. Slik som det bemerkes deri var de geometriske midlere titere av antistoffer mot en klade 1-stamme eller en klade 2.2-stamme signifikant høyere blant de primede individene (gruppene 1 og 2) enn blant de ikke-primede individene (gruppe 0). Fra dag 14 og videre, var titerne av antistoffer mot begge virusene signifikant høyere i den adjuvant-primede gruppen (gruppe 1) enn i gruppen som ble primet uten adjuvant (gruppe 2). De høyeste titerne ble observert på dag 14 i gruppe 1. Man observerte intet forhold mellom post-vaksinasjonstiteren og

antallet tidligere doser av H5N3-vaksine eller deres antigeninnhold. På dag 7 hadde minst 80% av pasientene i gruppe 1 titere på minst 1:40 mot alle de testede villtypevirusene ifølge et hemagglutinasjonsinhibisjonsassay.

[0148] Modellering av pandemisk spredning viser at den maksimale reduksjon av viral overføring oppnås ved å indusere en respons innen 2 uker etter utbrudd av pandemien. Ettersom det ville være
 5 nødvendig med to doser av vaksinen, ville en rask vaksineutdeling dermed bli vanskelig. Denne studie på mennesker tyder imidlertid på at priming av individer med H5-antigen (spesielt H5-antigen med adjuvant) induserer en raskt mobilisert, langvarig immunhukommelse etter administrasjon av en lavt dosert, antigenet forskjellig (en annen H5-HA-klade) vaksine.

[0149] I videre undersøkelser påviste man hukommelses-B-celler som var kryssreaktive mot
 10 A/Vietnam/1194/2004-klade 1-H5N1 med en sammenlignbar hyppighet i blodet av alle tre pasientgruppene på bunnlinjen. Tre uker etter den første boosterdose, oppviste imidlertid pasientene i gruppe 1 signifikant flere H5N1-spesifikke hukommelses-B-celler enn gruppe 2 og 3, hvilket tydet på at tidlig priming med H5N3-vaksine med adjuvant hadde indusert en samling av hukommelses-B-celler med en høyere kryssreaktivitet med H5N1. Gjennomgående hadde pasienter i gruppe 1 raskere og sterkere antistoffresponser enn pasientene i gruppe 2
 15 og 3, og pasientene i gruppe 1 og 2 reagerte signifikant bedre og raskere enn pasienter i gruppe 3. På dag 7 etter én dose av klade 1-vaksinen, hadde alle pasientene i gruppe 1 oppnådd serokonversjon mot flere antigenet forskjellige og høyt patogene villtypevirus fra kladene 0, 1, 2.1.3, 2.2 og 2.3.4, mens lignende serokonversjon i gruppe 2 ikke ble observert før på dag 14. Omvendt var det for pasientene i gruppe 3 nødvendig med to doser av klade 1-vaksinen for å oppnå 80% serokonversjonsrater mot klade 0- og klade 1-virus.

20 **Studie II på mennesker**

[0150] Voksne og eldre pasienter fikk to primende doser (dag 0 og dag 21) av en H5N1-vaksine med MF59-adjuvant. Virusstammen var A/Vietnam/1194/2004, som klassifiseres som klade 1. Immunresponsene ble bedømt på dag 43, og alle tre CPMP-kriteriene var tilfredsstillende: både serobeskyttelsen og serokonversjonen var minst 80%, og GMT-hevingen var minst 5-foldig.

[0151] Omtrent 18 måneder etter de to primende dosene, fikk 60 pasienter en ytterligere dose av
 25 H5N1-vaksine med MF59-adjuvant, men basert på stammen A/kalkun/Tyrkia/1/05, som er klassifisert i klade 2. Serumprøver ble samlet umiddelbart før denne dosen og deretter både 7 og 21 dager senere. Immunogenisiteten ble bedømt ifølge HI-, SRH- og MN-tester på serumprøvene.

Studier III og IV på mennesker

[0152] Test NCT00703053 benytter seg av en klade 1-vaksine (A/VietNam/1203/04) og/eller en klade
 30 2-vaksine (A/Indonesia/05/05). Voksne som ikke tidligere er blitt utsatt for H5-stammer, mottar: (a) klade 1-vaksinen på dag 0 og klade 2-vaksinen på dag 28, (b) klade 1-vaksinen på dag 0 og klade 2-vaksinen på dag 180; eller (c) en kombinasjon av klade 1- og klade 2-vaksine på dag 0 og 28. Egnede kontroller omfatter også (d), å motta kun klade 1-vaksine eller klade 2-vaksine, men ikke begge. Den samlede antigendose hver gang er 90 µg HA, som er enten 90 µg fra én enkelt stamme for gruppene (a) og (b), eller 2x45 µg fra hver stamme for gruppe (c). Studien benytter seg av inaktiverte subvirionvaksiner uten adjuvant. Studien vil ikke være fullført før i 2010.

[0153] Test NCT00680069 omfatter å administrere én enkelt dose av en klade 2-vaksine
 (A/Indonesia/05/05) til pasienter som tidligere har mottatt en klade 1-vaksine (A/VietNam/1203/04). Antigendosen er enten 15 µg eller 90 µg inaktivert subvirionvaksine. Studien vil ikke være fullført før i 2009.

Musestudier I og II (DNA-immunisering; for sammenligning)

[0154] I urelaterte eksperimenter [192], konstruerte man adenovirale vektorer som uttrykte HA fra A/Vietnam/1203/04 (klade 1)-virus og A/Indonesia/05/05 (klade 2)-virus.

[0155] Vektorene ble brukt både hver for seg og i kombinasjon for å immunisere BALB/c-mus. Den samlede dose var 10^8 pfu av vektorer, hvor kombinasjonsgruppen fikk 5×10^7 pfu av hver vektor. Fire uker senere fikk musene en boosterdose som inneholdt samme vaksinekonstrukt(er), og blod ble innhentet 3 uker senere for å påvise nøytraliserende antistoffer og hemagglutinasjonsinhiberende antistoffer.

[0156] Mus som var vaksinert med kun én av vektorene, produserte hemagglutinasjonsinhibisjon og nøytraliserende antistoffer, men man kunne ikke påvise noen kryssreaktivitet. Mus vaksinert med begge vektorene utløste imidlertid beskyttende nøytraliserende antistofftitere mot virus fra begge kladene.

[0157] I en lignende studie [193] fikk mus en kombinasjon av enten 5 eller 10 hemagglutinin-DNA-immunogener som plasmidekspresjonsvektorer. En første kombinasjon av 5 HA'er var fra stammer i klader 0, 2.2 (3 stammer) og 2.5. En andre kombinasjon av 5 HA'er var fra stammer i klader 0, 1, 2.1.3, 2.2 og 2.3.4. Den 10-verdige vaksinen var en kombinasjon av disse 10 stammene. Vaksinene utløste antistoffer som nøytraliserte flere stammer av HPAI-H5N1.

[0158] Kylling ble også testet ved bruk av 3-verdige DNA-vaksiner av denne type [193]. Stammene var A/VietNam/1203/04 (klade 1), A/Anhui/1/05 (klade 2.3.4) og A/Indonesia/05/05 (klade 2.1.3). Kyllingene var beskyttet mot sykdom.

Musestudie III

[0159] Slik som det beskrives i detalj i litteraturhenvisning 8, fikk mus en toverdig vaksine omfattende H5-hemagglutinin fra stamme A/VietNam/1203/2004 (klade 1) eller A/Indonesia/05/2005 (klade 2). To typer toverdig vaksine ble testet: én basert på rekombinant H5-hemagglutinin og én basert på VLP'er. Ingen av vaksinene inneholdt noen ytre adjuvant, men sammenlignet med de rekombinante proteinene, kan en VLP tilveiebringe en indre adjuvantvirkning grunnet sin partikkelformede natur. Hver énverdige VLP ble brukt som kontroll. Antigener ble uttrykt i Sf9-insektceller fra bacmid. Antigener i de toverdige vaksinene ble blandet i HA-vektforhold 1:1.

[0160] Immunresponsen ble bedømt ifølge kvantitativt ELISA og HAI. Alle musene som var blitt vaksinert med den toverdige VLP-blanding, utløste HAI-antistoffer mot både VietNam/1203/2004-virus (GMT 115 ± 36) og Indonesia/05/2005-virus (80 ± 0). Derimot hadde kun 33% av musene som var blitt vaksinert med en blanding av de rekombinante proteiner uten adjuvant, noen HAI-titer mot Indonesia/05/2005-virus (36 ± 12).

[0161] Immunresponsene ble også bedømt i en studie med dødelig dose. Angrepsstammene var PR8/34-reassortanter av de to vaksinestammene. Uvaksinerte mus som ble angrepet med hvilket som helst av disse virusene hadde tapt $\geq 20\%$ av sin kroppsvekt innen 6 dager etter smitten. Mus vaksinert med den toverdige blanding av rekombinante HA-proteiner mistet ca. 15% av sin opprinnelige kroppsvekt når de ble angrepet med enten klade 1- eller klade 2-angrepsstammen. Mus som var vaksinert med klade 1-VLP'ene, klade 2-VLP'ene eller en VLP-blanding og deretter ble angrepet med klade 1-virus, oppviste intet vekttap og heller ingen kliniske tegn til smitte. Mus som var vaksinert med klade 1-VLP'er og deretter angrepet med klade 2-virus, var ikke beskyttet for angrep og døde innen dag 6 etter angrepet. Alle musene vaksinert med klade 2-VLP'er eller VLP-blanding var beskyttet mot angrepet med klade 2-virus.

[0162] Dermed var både klade 1- og klade 2-VLP'ene immunogene i mus og beskyttet mot virusangrep med den homologe stamme. Immunogenisiteten ble bevart dersom man brukte en toverdig blanding av VLP'ene. Videre var mus som hadde fått toverdige VLP'er beskyttet mot angrep med enten klade 1- eller klade 2-virus. Slik rapporteres det i litteraturhenvisning 8 at: "Disse resultatene er høyt signifikante og

demonstrerer at en flerverdig vaksine mot H5N1 virker å være en plausibel strategi for å bekjempe diversiteten av klader og subklader av H5N1-influenza."

[0163] Det vil forstås at oppfinnelsen er blitt beskrevet kun eksempelvis, og at det kan gjøres modifikasjoner mens man holder seg innen rammen for oppfinnelsen.

5 **Tabell I**

Mål	G 1	G 2	G 3
% av pasienter med HI-titer ≥ 40 på dag 0	0	0	3
på dag 8	75	56	12
på dag 15	90	60	9
på dag 22	75	58	13
på dag 43	75	58	45
% av pasienter med serokonversjon på dag 8	75	56	8
på dag 15	90	60	10
på dag 22	75	58	14
på dag 43	75	58	45
Geometrisk midlere HI på dag 1	4	4	4,9
dag 8	72	51	5,9
dag 15	256	79	7,3
dag 22	112	52	8,0
dag 43	95	44	26
Forhold mellom HI på dag 1 og på dag 8	18	13	1,3
på dag 15	64	20	1,56
på dag 22	28	13	1,8
på dag 43	24	11	5,9
% av pasienter med MN-titer ≥ 80 på dag 0	0	0	0
på dag 8	9	5	1
på dag 15	9	9	1
på dag 22	12	9	1
på dag 43	12	10	5
Geometrisk midlere MN-titer på dag 1	10	10	10
dag 8	219	151	11
dag 15	1145	473	12
dag 22	375	324	12
dag 43	415	241	33
Forhold mellom MN på dag 1 og på dag 8	22	15	1,1
på dag 15	115	47	1,2
på dag 22	37	32	1,2
på dag 43	41	24	3,3

LITTERATURENVISSNINGER

- [1] Riley et al. (2007) PLoS Med. 4(6):e218.
- [2] Felsenstein (1989) Cladistics 5: 164-166.
- [3] Emerging Infectious Diseases 11 (10):1515-21.
- [4] WO96/37624.
- [5] WO98/46262.
- [6] WO95/18861.
- [7] Bright et al. (2008) PLoS ONE 3:e1501.
- [8] Crevar & Ross (2008) Virology Journal 5:131.
- [9] WO02/28422.
- [10] WO02/067983.
- [11] WO02/074336.
- [12] WO01/21151.
- [13] WO02/097072.
- [14] WO2005/113756.
- [15] Huckriede et al. (2003) Methods Enzymol 373:74-91.
- [16] WO2005/107797.
- [17] Herlocher et al. (2004) J Infect Dis 190(9):1627-30.
- [18] Hoffmann et al. (2002) Vaccine 20:3165-3170.
- [19] Subbarao et al. (2003) Virology 305:192-200.
- [20] Liu et al. (2003) Virology 314:580-590.
- [21] Ozaki et al. (2004) J. Virol. 78:1851-1857.
- [22] Webby et al. (2004) Lancet 363:1099-1103.
- [23] WO00/60050.
- [24] WO01/04333.
- [25] US 6649372.
- [26] WO2007/002008.
- [27] Neumann et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:16825-9.
- [28] WO2006/067211.
- [29] WO01/83794.
- [30] Hoffmann et al. (2000) Virology 267(2):310-7.
- [31] WO97/37000.
- [32] Brands et al. (1999) Dev Biol Stand 98:93-100.
- [33] Halperin et al. (2002) Vaccine 20: 1240-7.
- [34] Tree et al. (2001) Vaccine 19:3444-50.
- [35] Kistner et al. (1998) Vaccine 16:960-8.
- [36] Kistner et al. (1999) Dev Biol Stand 98:101-110.
- [37] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19:1149-58.
- [38] Pau et al. (2001) Vaccine 19:2716-21.
- [39] WO03/076601.
- [40] WO2005/042728.
- [41] WO03/043415.
- [42] WO01/85938.
- [43] WO2006/108846.
- [44] EP-A-1260581 (WO01/64846).
- [45] WO2006/071563.
- [46] WO2005/113758.
- [47] WO2006/027698.
- [48] WO97/37000
- [49] WO03/023021
- [50] WO03/023025
- [51] WO97/37001.
- [52] WO01/22992.
- [53] Hehme et al. (2004) Virus Res. 103(1-2):163-71.
- [54] Treanor et al. (1996) J Infect Dis 173:1467-70.
- [55] Keitel et al. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10.
- [56] Zangwill et al. (2008) J Infect Dis. 197(4):580-3.
- [57] Lundblad (2001) Biotechnology and Applied Biochemistry 34:195-197.
- [58] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food

and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001.

- [59] Ji et al. (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7.
- [60] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol*. 45:7-12.
- [61] Lahijani et al. (1998) *Hum Gene Ther*. 9:1173-80.
- [62] Lokteff et al. (2001) *Biologicals*. 29:123-32.
- [63] EP-B-0870508.
- [64] US 5948410.
- [65] WO2007/052163.
- [66] US patent 6355271.
- [67] WO00/23105.
- [68] US 4,680,338.
- [69] US 4,988,815.
- [70] WO92/15582.
- [71] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [72] Wu et al. (2004) *Antiviral Res*. 64(2):79-83.
- [73] Vasilakos et al. (2000) *Cell Immunol*. 204(1):64-74.
- [74] US patents 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 and 6924293.
- [75] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [76] WO2004/060308.
- [77] US 6,924,271.
- [78] US2005/0070556.
- [79] US 5,658,731.
- [80] WO2004/064759.
- [81] US patent 5,011,828.
- [82] WO2004/87153.
- [83] US 6,605,617.
- [84] WO02/18383.
- [85] WO2004/018455.
- [86] WO03/082272.
- [87] WO2006/002422.
- [88] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [89] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [90] Andrianov et al. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [91] Payne et al. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [92] US 5,057,540.
- [93] WO96/33739.
- [94] EP-A-0109942.
- [95] WO96/11711.
- [96] WO00/07621.
- [97] Barr et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [98] Sjolander et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [99] Pizza et al. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [100] WO95/17211.
- [101] WO98/42375.
- [102] Singh et al] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [103] WO99/27960.
- [104] US 6,090,406
- [105] US 5,916,588
- [106] EP-A-0626169.
- [107] WO99/52549.
- [108] WO01/21207.
- [109] WO01/21152.
- [110] WO02/072012.
- [111] Dyakonova et al. (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.

- [112] FR-2859633.
- [113] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
- [114] WO2004/064715.
- [115] De Libero et al. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496.
- [116] US patent 5,936,076.
- [117] Oki et al, *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640
- [118] US2005/0192248
- [119] Yang et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 3818-3822
- [120] WO2005/102049
- [121] Goff et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 13602-13603
- [122] WO03/105769
- [123] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
- [124] WO03/011223.
- [125] Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [126] Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [127] US-6586409.
- [128] Wong et al. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
- [129] US2005/0215517.
- [130] WO90/14837.
- [131] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [132] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [133] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [134] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [135] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [136] Hariharan et al. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- [137] US-2007/014805.
- [138] WO95/11700.
- [139] US patent 6,080,725.
- [140] WO2005/097181.
- [141] WO2006/113373.
- [142] Han et al. (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference*, Paris, 9-10 June 2005.
- [143] US- 6630161.
- [144] Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [145] WO02/26757.
- [146] WO99/62923.
- [147] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [148] McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [149] WO98/40100.
- [150] US patent 6,207,646.
- [151] US patent 6,239,116.
- [152] US patent 6,429,199.
- [153] Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [154] Blackwell et al. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [155] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [156] WO01/95935.
- [157] Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [158] Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [159] WO03/035836.
- [160] WO01/22972.
- [161] Schellack et al. (2006) *Vaccine* 24:5461-72.
- [162] Thompson et al. (2005) *J Leukoc Biol* 78:1273-80.
- [163] UK patent application GB-A-2220211.
- [164] WO 94/21292.
- [165] WO94/00153.
- [166] WO95/17210.

- [167] WO96/26741.
- [168] WO93/19780.
- [169] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [170] Banzhoff (2000) Immunology Letters 71:91-96.
- [171] Nony et al. (2001) Vaccine 27:3645-51.
- [172] WO2005/089837.
- [173] US patent 6,692,468.
- [174] WO00/07647.
- [175] WO99/17820.
- [176] US patent 5,971,953.
- [177] US patent 4,060,082.
- [178] EP-A-0520618.
- [179] WO98/01174.
- [180] Potter & Oxford (1979) Br Med Bull 35: 69-75.
- [181] Greenbaum et al. (2004) Vaccine 22:2566-77.
- [182] Zurbriggen et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:295-304.
- [183] Piascik (2003) J Am Pharm Assoc (Wash DC). 43:728-30.
- [184] Mann et al. (2004) Vaccine 22:2425-9.
- [185] Halperin et al. (1979) Am J Public Health 69:1247-50.
- [186] Herbert et al. (1979) J Infect Dis 140:234-8.
- [187] Chen et al. (2003) Vaccine 21:2830-6.
- [188] WO2008/115785.
- [189] *Towards a unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses.* WHO/OIE/FAO H5N1 evolution working group.
- [190] Haaheim (2003) Dev Biol 115: 49-53.
- [191] Stephenson et al. (2008) N Engl J Med 359:1631-33.
- [192] Hoelscher et al. (2008) J Infect Dis 197 :1185-8.
- [193] Rao et al. (2008) PLoS ONE 3(6):e2432.

SEKVENSOPLISTING

<110> NOVARTIS AG
 <120> VACCINATION WITH MULTIPLE CLADES OF H5 INFLUENZA A VIRUS
 <130> P049768W0
 <140> PCT/IB2008/_____
 <141> 2008-11-25
 <150> US 61/004334
 <151> 2007-11-26
 <150> GB 0810305.3
 <151> 2008-06-05
 <160> 16
 <170> SeqWin99, version 1.02
 <210> 1
 <211> 1707
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus (A/Hong Kong/213/03)

```

<400> 1
atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaaaca ctcgacagag cagggttgaca caataatgga aaagaacgtt 120
actgttacac atgccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
gatggagtga agcctctaata tttgagagat tgtagtgtag ctggatggct cctcgaaac 240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggctctt acatagtggg gaaggccaat 300
ccagccaatg acctctgtta cccaggggat ttcaacgact atgaagaatt gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaaattc ttggtccagt 420
catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc aaggaaaagtc ctcttttttc 480
aggaatgtgg tatggcttat caaaaagaac aatgcatacc caacaataaa gaggagctac 540
aataatacca accaagaaga tcttttggtt ttgtggggga ttcacccatcc taatgatgcy 600
gcagagcaga ctaggctcta tcaaaaacca accacctaca tttccgttgg gacatcaaca 660
ctaaccaga gattgggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaaatgga 720
aggatggagt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagcaat 780
ggaaatttca ttgtccaga atatgcatac aaaattgtca agaaaagggga ctacgaatt 840
atgaaaagtg aatttgaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaaactc aatgggggcy 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcy actgggtcca gaaatagccc tcaagagag 1020
agaagaagaa aaaagagagg attatttggg gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
cagggaatgg tagatgggtg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac 1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcy 1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttgga ggggaatttaa taacttagaa 1260
agggaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacggat tcctagatgt ctggacttat 1320
aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt 1440
aacggttgtt tcgagttcta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaa gtaagaaac 1500
ggaaacgtat actaccgcga gtattcagaa gaagcaagac taaaaagaga ggaataaagt 1560
ggagtaaaat tggagtcaat aggaacttac caaatactgt caatttatc tacagtggcy 1620
agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatggg 1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707
  
```

<210> 2
 <211> 1707
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus (A/Indonesia/5/05)

```

<400> 2
atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaaaca ttcaacagag cagggttgaca caatcatgga aaagaacgtt 120
actgttacac atgccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
  
```

```

gatggagtga agcctctaata ttaagagat ttagtgtag ctggatggct cctcgggaac 240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtaccg gaatggctct acatagtgga gaaggccaat 300
ccaaccaatg acctctgtta cccagggagt ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattht tgagaaaatt caaatcatcc caaaaagttc ttggtccgat 420
catgaagcct catcaggagt gagctcagca tgtccatacc tgggaagtcc ctcttttttt 480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaaaagctac 540
aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtggggaa ttcaccatcc taatgatgcg 600
gcagagcaga caaggctata tcaaaaccca accacctata ttccatttgg gacatcaaca 660
ctaaaccaga gattgtgacc aaaaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaaagtga 720
aggatggagt tcttctggac aattttaaaa cctaagtatg caatcaactt cgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctacagcaatt 840
atgaaaagtg aattggaata tggttaactgc aacaccaagt gtcaaaactc aatgggggag 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccacggggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtccttgca acagggctca gaaatagccc tcaaaagagag 1020
agcagaagaa aaaagagagg actatattgga gctatagcag gttttataga gggagggatgg 1080
caggggaatgg tagatgggtt gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac 1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactca 1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttgga ggggaattta taacttagaa 1260
aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt ttctagatgt ctggacttat 1320
aatgccgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
gttaagaacc tctacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt 1440
aacggttggt tcgagtctta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag tataagaaac 1500
ggaacgtaca actatccgca gtattcagaa gaagcaagat taaaaagaga ggaataaagt 1560
ggggtaaaat tggaaatcaat aggaacttac caaatactgt caatttatc aacagtggcg 1620
agttccctag cactggcaat catgatggct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga 1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

```

```

<210> 3
<211> 1654
<212> DNA
<213> Influenza A virus (A/Chicken/Hong Kong/SF219/01)

```

```

<400> 3
agtcttggtta aaagtgatca gatttgcatt gggtaccatg caaacaactc gacagagcag 60
ggtgacacaa taatggaaaa gaacgttact gttacacatg cccaagacat attggaaaaag 120
acacacacaa ggaagctctg cgatctagat ggagtgagc ctctaatttt gagagattgt 180
agtgtagctg gatggctcct cggaaaaccca atgtgtgacg aattcatcaa tgtgccggaa 240
tggtcttaca tagtgagaa ggccagtcga gccaatgacc tctgttacc aggggatttc 300
aacgactatg aagaactgaa acacctattg agcagaataa accattttga gaaaattcag 360
atcatcccca aaagtctctt gtccaatcat gaagcctcat caggggtgag ctacagatgt 420
ccatcccttg ggaagctctc ctttttcaga aatgtggtat ggcttatcaa aaagaacagt 480
acatacccaa caataaagag gagctataat aataccaacc aagaagatct ttgtgactg 540
tggggggattc accatcctaa tgatgcggca gagcagacaa agctctatca aaacccaacc 600
acctatattt ccgttggaac atcaacacta aaccagagat tggtagcaaa aatagctact 660
agatccaaag taaacgggca aagtggagaa atggagttct tctggacaa tttaaagccg 720
aatgatgcta tcaatttcga gagtaatgga aatttcattg ctccagaata tgcatacaaa 780
attgtcaaga aaggggactc atcaattatg aaaagtgaat tgggaatatg taactgcaac 840
accaagtggc aaactccaat gggggcgata aactctagta tgccattcca caacatacac 900
cctctacca tcggggaatg ccccaaatat gtgaaatcaa acagattagt ccttgcgact 960
ggactcagaa ataccctca aagagagaga agaagaaaaa agagaggact atttggagct 1020
atagcaggtt ttatagaggg aggatggcag ggaatggtag atggttggta tgggtaccac 1080
catagcaatg agcaggggag tggatagcgt gcagacaaag aatccactca aaaggcaata 1140
gatggagtta ccaataaagt caactcgatc attgacaaaa tgaacactca gtttgaggcc 1200
gttggaaagg aatttaataa cttagaagg agaatagaaa atttaaaaca gaagatggaa 1260
gacggattcc tagatgtctg gacttataat gctgaacttc tgggttctcat ggaatatgag 1320
agaactctag actttcacga ctcaaatgtc aagaaccttt acgacaaggc ccgactacag 1380
cttagggata atgcaaaagg gctgggtaac ggctgtttcg agttctatca caaatgtgat 1440
aatgaatgta tggaaagtgt aaaaaacgga acgtatgact acccgagta ttcagaagaa 1500
gcaagactaa acagagagga aataaagtga gtaaaattgg aatcaatggg aacttaccaa 1560
atactgtcaa tttattcaac agtggcgagt tccctagcac tggcaatcat ggtagctggg 1620
ctatctttat ggatgtgctc caatggatcg ttac 1654

```

```

<210> 4
<211> 1668
<212> DNA

```

<213> Influenza A virus (A/chicken/Guiyang/441/2006)

```

<400> 4
atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata atcagtccttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaacaa ctgcacagtg cagggttgaca cgataatgga aaagaatgtt 120
actgtaacac atgcccaga catactggaa aagacacaca atgggaagct ctgcagtcta 180
gatggagtga agcctctaata tttaagagat tgtagtgtag ctggatggct cctcgaaac 240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggctctt acatagtggg gaaggccagt 300
ccagccaatg acctctgtta cccaggggat ttcaacgact acgaagaact gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggcccaat 420
catgaagcct cactaggggt gagctcagca tgtccatacc tgggggagtc ctcccttttc 480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtccatacc caacaataaa gaggagctac 540
aataatacca accaagaaga tcttttagta ttgtggggga tccatcacc taatgatgag 600
gcagagcaga taaagcttta tcaaaaccca aacacctata ttccggttg aacatcaaca 660
ctaaaccaga ggttggtacc aacaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaatgtga 720
aggatggagt tcttctggac aatttttaag ccgaatgata ctatcaattt cgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctacagcaatt 840
atgaaaagtg aattgggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaaactc aatgggggag 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtccttgca actggactca gaaataacct tcaaaagagag 1020
agaaggagaa aaaagagagg actatttgga gccatagcag gttttattga gggaggatgg 1080
cagggaatgg tagacggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtggatag 1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggaa tcaccaataa ggtcaactcg 1200
atcattaaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggac ggggaatttag taacttagaa 1260
aggagaatag aaaatttaaa caagaagatg gaagacggat tcctagatgt ctggacttat 1320
aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gaaagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
gtcaagaacc tttacgacaa agtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa agagctgggt 1440
aacggttgtt tcgagttcta tcacaaatgt gatgatgaat gtatggaaag tgtaaaaaac 1500
ggaaactgat actaccgca gtattcagaa gaagctagac taaacagaga ggagataaat 1560
ggagtaaaat tggaaatcaat gggaaactac caaatactgt caatttactc aacagtggcg 1620
agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatg 1668

```

<210> 5

<211> 1698

<212> DNA

<213> Influenza A virus (A/duck/Guangxi/1681/2004)

```

<400> 5
atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtccttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaacaa ctgcacagag cagggttgata caataatgga aaagaatgtt 120
actgttacac atgcccaga catactggaa aagacacaca acgggaaact ctgcgatcta 180
gatggagtga agcctctaata tttagagatg tgtagtgttg cgggatggct cctcgaaac 240
ccaatgtgtg atgaattcat caatgtgccg gaatggctctt acatagtggg gaaggccagt 300
ccagccaatg acctctgtta cccaggggat ttcaacgact atgaagaact aaaacaccta 360
ttgagcagaa taaatcattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccaat 420
catgaagcct catcaggggt gagctcagca tgtccatacc aggggaggcc ctcccttttc 480
aggaaatgtg tatggcttat caaaaagaac agtgcatacc ctacaataaa gaggagctac 540
aataatacca gtcaagaaga tcttttggtg actgtggggg ttcaccatcc taatgatgag 600
gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca actacctata ttccggttg aacatcaaca 660
ctaaaccaga gatttggtacc aaaaaatagc actagatcca aagtaaacgg gcaagatgga 720
agaatggagt tcttctggac aatttttaag ccgaatgatg ctatcaactt cgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcctac aaaattgtca agaaagggga ctacagcaatt 840
atgaaaagtg aattgggaata tggtaactgc aacaccaaat gtcaaaactc aatgggggag 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaa 960
tatgtgaaat caagcagatt agtccttgag acagggctca ggaatagccc tcaaaagagag 1020
ataagaagaa aaaagagagg actatttgga gctatagcag gctttataga gggaggatgg 1080
cagggaatgg tagatgggtg gtatgggtac caccatagca acgagcaggg gagtggatag 1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa agtcaattcg 1200
atcattgaca aaatgaacac tcaatttgag gccgttggaa ggggaatttaa taatttagaa 1260
aggagaatag agaatttaaa caaaaagatg gaggacggat tcctagatgt ctggacttat 1320
aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
gtcaagaacc tttacgacag ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt 1440
aacggttgtt tcgagttcta tcacaagtgt gacaatgaat gcatggaaag tgtaaagaac 1500
ggaaactgat actaccgca gtattcagaa gaagcaagac taaagagaga ggaataaagt 1560
ggagtaaaat tggaaatcgat aggaacttac caaataattg caatttatcc aacagtggcg 1620

```

agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga 1660
tcgttacaat gcagaatt 1678

<210> 6
<211> 1707
<212> DNA
<213> Influenza A virus (A/tree sparrow/Henan/4/2004)

<400> 6
atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaacaa ctgcacagag cagggttgaca caataatgca aaagaacgtt 120
actgttacac atgcccaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
gatggagtga aacctctaatt ttaagagat tgtagttag ctggatggct cctcgaaac 240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggtctt acatagtga gaaggccagt 300
ccagccaatg acctctgtta cccaggggat ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagtcc ttggtccgat 420
catgaagcct catcaggggt gagctcagca tgtccatacc aggggagtcc ctctttttc 480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtgcatacc caacaataaa gaggagctac 540
aataatacca accaagaaga tcttttggtg ctgtggggga ttcaccatcc taatgatcg 600
gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata tttccgttg aacatcaaca 660
ctaaaccaga gattggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaatgg gcaaaagtga 720
agaatggagt tcttctggac aattttaaag ccgaatgacg ctatcaactt cgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaaggga ctacgaatt 840
atgaaaagt aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaaactc aatggggcg 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtctctcgc acagggctca gaaatagccc tcaagagag 1020
agaagaagaa aaaagagagg actatttggg gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
cagggaatgg tagatggtt gtatgggtac caccatagca atgagcagg gagtggatc 1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtgttag gccgttggaa gggaaattta taacttagaa 1260
aggagaatg aaaatttaaa caagaagatg gaggaaggat tcctagatgt ctggacttat 1320
aatgctgaac ttctggttct catggaatat gagagaactc tagactttca tgaactcaat 1380
gtcaagaacc tttagcaaaa ggtccgacta caacttaggg ataatgcaaa ggaactgggt 1440
aacggttgtt tcgagttcta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaa tgtaaaaaac 1500
ggaaactgat actaccgca gtattcagaa gaagcaagac taaacagaga ggaataagt 1560
ggagtaaaat tggaatcaat aggaacttac caaatactgt caatttatc aacagtgggt 1620
agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga 1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

<210> 7
<211> 1707
<212> DNA
<213> Influenza A virus (A/chicken/Shanxi/2/2006)

<400> 7
atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata atcggctcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
gttggttacc atgcaaacaa ctcaacagag cagggttgaca caataatgga aaagaacgtt 120
actgttacac atgctcaaga catactggag aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
gatggagtga agcctctcat tttgaaagat tgtagttag ctggatggct cctcgaaac 240
cctatgtgtg acgaatttat caatgtgtcg gaatggtctt acatagtga gaaggccagt 300
ccagccaatg gcctctgtta cccaggggat ttcaatgact atgaagaact gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt aagatcatcc ccaaaagtcc ttggtccaat 420
catgaagcct catcaggggt gagctcagca tgttctatc tggggaagcc ctctttttc 480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaat aatacatacc caccaataaa ggtgaactac 540
accaatacca accaagaaga tcttttggtg ctgtggggga ttcaccatcc caacgatgag 600
acagagcaga taaagatcta tcaaaaccca accacctata tttccgttg aacatcaaca 660
ctaaaccaga gattggtacc aaaaatagct actaaatccc aagtgaacgg gcaaaagtga 720
agaatggagt tcttctggac aattttaaag ccgaatgatg ctatcaattt cgatagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaaggga ctacagcatt 840
atgaaaagt aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaaactc aatggggcg 900
ataaattcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtctctcgc actggactca gaaatgccc tcaagagag 1020
ggaaagaaga aaaagagagg actatttggg gccatagcag ggtttataga gggaggatgg 1080
cagggaatgg tagatggtt gtatgggtac caccatagca atgagcagg gagtggatc 1140
tctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200

atcattgaca	aaatgaacac	tcagtttgag	ggcgttgta	gggaaattaa	taacttagaa	1260
aggagaatag	agaattttaa	caaaaagatg	gaagacggat	tcctagatgt	ctggacttat	1320
aacgctgaac	ttctggttct	catggaaaat	gagagaactc	tagactttca	tgactcaa	1380
gtcaagaacc	tttacgacaa	ggcccgactg	cagcttaggg	ataatgcaaa	ggagctgggt	1440
aacggttggt	tcgaattcta	tcacaaatgt	gataatgaat	gtatggaaag	tgtaaaaaac	1500
ggaacgtatg	actaccgcga	gtattcagaa	gaagcaagac	taaacagaga	ggaaataaag	1560
ggagtataat	tggaatcaat	ggtaacttac	caataactgt	caatttattc	aacagtggcg	1620
agttccctag	cattggcaat	catgggtggc	ggcttatctt	tatggatgtg	ctccaatgga	1680
tcgttacaat	gcagaatttg	catttga				1707

<210> 8
 <211> 1707
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus (A/Chicken/Henan/12/2004)

<400>	8						
atggagaaaa	tagtgcttct	tcttgcaata	gtcagtcctg	ttaaaagtga	tcagatttgc	60	
attggttacc	atgcaaacaa	ctcgacagag	caggttgaca	caataatgga	aaagaacggt	120	
actgttacac	atgccaaga	catactggaa	aagacacaca	acgggaagct	ctgcgactta	180	
gatggagtga	agcctcta	tttgagagat	tgtagtgtag	ctggatggct	cctcggaaac	240	
ccaatgtgtg	acgaattcat	caatgtgctg	gaatggctct	acatagtggg	gaaggccagt	300	
ccagccaatg	gcctctgtta	cccaggggat	ttcaacgact	atgaagaact	gaaacaccta	360	
ttgagcagaa	taaaccat	tgagaaaatt	cagatcatcc	ccaaaagt	ttggtccaat	420	
catgaagcct	catcaggggt	gagctcagca	tgcccatacc	agggaaagtc	ctcctttttc	480	
agaaatgtgg	tatggcttat	caaaaagaac	agtacatacc	caacaataaa	gaggagctac	540	
aataatacca	accaagaaga	tcttttggtg	ctgtggggga	ttcaccatcc	taatgatgag	600	
gcagagcaga	caaggctcta	tcaaaaccca	accacctata	tttcggttgg	aacatcaaca	660	
ctaaaccaga	gatttgtacc	aaaaatagct	actagatcca	aagtaaacgg	gcaaatgtga	720	
aggatggagt	tcttctggac	aattttaaaa	ccgaatgatg	caatcaactt	cgagagtaat	780	
ggaaatttca	ttgctccaga	atatgcatac	aaaattgtca	agaaagggga	ctcagcaatt	840	
atgaaaagtg	aattggaata	tggttaactgc	aacaccaagt	gtcaaaactcc	aatgggggca	900	
ataaaactcta	gtatgccatt	ccacaacata	caccctctca	ccatcgggga	atgccccaaa	960	
tatgtgaaat	caaacagatt	agtccttgctg	actgggctca	gaaatagccc	tcaaagagag	1020	
agaagaagaa	aaaagagagg	actatattgga	gctatagcag	gttttataga	gggaggatgg	1080	
cagggaatgg	tagatgggtg	gtatgggtac	caccatagca	atgagcaggg	gagtggtatc	1140	
gtcgcagaca	aagaatccac	tcaaaaaggca	atagatggag	tcaccaataa	ggtaactcag	1200	
atcattgaca	aaatgaacac	tcagtttgag	ggcgttgga	gggaatttaa	taacttagaa	1260	
aggagaatag	agaattttaa	caagaagatg	gaagacggat	tcctagatgt	ctggacttat	1320	
aatgctgaac	ttctggttct	catggaaaat	gagagaactc	tagactttca	tgactcaaat	1380	
gtcaagaacc	tttacgacaa	ggcccgacta	cagcttaggg	ataatgcaaa	ggagctgggt	1440	
aacggttggt	tcgagtctta	tcacaaatgt	gataatgaat	gtatggaaag	tgtaaaaaac	1500	
ggaacgtatg	actaccgcga	gtattcagaa	gaagcaagac	taaaaagaga	ggaaataaag	1560	
ggagtataat	tggaatcaat	aggaacttac	caataactgt	caatttattc	aacagtggcg	1620	
agttccctag	cactggcaat	catggtagct	ggcttatctt	tatggatgtg	ctccaatgga	1680	
tcgttacaat	gcagaatttg	catttga				1707	

<210> 9
 <211> 1695
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus (A/duck/Guangxi/2775/2005)

<400>	9						
atggagaaaa	tagtgcttct	tcttgcaata	gtcagtcctg	ttaaaagtga	tcagatttgc	60	
attggttacc	atgcaaacaa	ctcgacagag	caggttgaca	caataatgga	aaagaacggt	120	
actgttacac	atgccaaga	catactggaa	aagacacaca	atgggaagct	ctgcgactta	180	
gatgggggtga	agcctcta	tttgagagat	tgtagtgtag	ctggatggct	cctcgggaac	240	
ccaatgtgtg	acgaattcat	caatgtacgg	gaatggctct	acatagtggg	gaaggccagt	300	
ccagccaatg	acctctgtta	cccaggtgat	ttcaacgatt	atgaagaact	gaaacaccta	360	
ttgagcagaa	taaaccat	tgagaaaatt	cagatcatcc	ccaaaagt	ttggcccaac	420	
catgaagcct	catcaggggt	gagctcagca	tgcccatacc	tgggaaagcc	ctcctttttc	480	
agaaatgtgg	tatggcttat	caaaaagaac	agtgcatacc	caacaataaa	gaggagctac	540	
aataatacca	accaagaaga	tcttttggtg	ctgtggggga	ttcaccatcc	taatgatgag	600	
acagagcaga	caaaagctcta	tcaaaaccca	accacttata	tttcggttgg	aacatcaaca	660	
ctaaaccaga	gatttgtacc	aaaaatagct	accagatcca	aagtaaacgg	gcaaatgtga	720	
aggatggagt	tcttctggac	aattttaaaa	ccgaatgatg	caatcaactt	cgagagtaat	780	


```

ggaaatttca ttgctccaga atatgcctac aaaattgtca agaaagggga ctacgaatt 840
atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaa atgcaaaactcc aatggggg 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccacgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actgggctca gaaatagccc tcaaaggag 1020
agaagaagaa aaaagagagg actatattgga gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
caggggaatgg tagatgggtg gtacgggatac caccatagca atgagcaggg gagtggatgc 1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttgga ggggaatttaa taacttagaa 1260
aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat 1320
aatgctgaac ttctgggttct catggaaaaa gagcgaactc tagactttca tgactcaaat 1380
gtcaagaacc ttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa agagctgggt 1440
aacggttggt tcgagttcta tcacaaatgt gataatgaat gcatggaaag tgaagaaac 1500
ggaacgtatg actaccgca ttattcagaa gaagcaaggc taaaagaga ggaataaagt 1560
ggagtaaaat tggaatcaat aggaacttac caataactgt caatttattc aacagtggc 1620
agttccctag cgctggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgg 1680
tcgttacaat gcaga

```

```

<210> 10
<211> 1707
<212> DNA
<213> Influenza A virus (A/Hong Kong/156/97)

```

```

<400> 10
atggaaagaa cagtgttct tcttgcaaca gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaacaa ctgcacagag caggttgaca caataatgga aaagaatgtt 120
actgttacac atgccaaga catactggaa aggacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
aatggagtga agcctctcat tttgagggat tgtagtgtag ctggatggct cctcgaaac 240
cctatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggctct acatagtggg gaaggccagt 300
ccagccaatg acctctgtta tccagggaat tcaaacgact atgaagaact gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc caaaagttc ttggtccaat 420
catgatgcct catcaggggt gagctcagca tgtccatacc ttggggaggtc ctcttttttc 480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtgcatacc caacaataaa gaggagctac 540
aataatacca accaagaaga tcttttggtg ctgtgggggg ttccaccatc taatgatgcg 600
gcagagcaga caaagctcta tcaaaatcca accacctaca tttccgttgg aacatcaaca 660
ctgaaccaga gattgggttc agaaatagct actagacca aagtaaacgg gcaaaagtga 720
agaatggagt tcttctggac aattttaaag ccgaatgatg ccatcaattt cgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt 840
atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaa atgcaaaactcc aatggggg 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccacgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actggactca gaaataaccc tcaaagagag 1020
agaagaagaa aaaagagagg actatattgga gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
caggggaatgg tagatgggtg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgtgctac 1140
tctgcagaca aagaatccac tcaaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200
atcattaaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttgga ggggaatttaa taacttgga 1260
aggaggatag agaatttaaa caagaagatg gaagacggat tcctagatgt ctggacttac 1320
aatgctgaac ttctgggttct catggaaaaa gagagaactc tcgactttca tgactcaaat 1380
gtcaagaacc ttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggaactgggt 1440
aatggttggt tcgaattcta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag tgaaaaaac 1500
ggaacgtatg actaccgca gtattcagaa gaagcaagac taaacagaga ggaataaagt 1560
ggagtaaaat tggaatcaat gggaaacttac caataactgt caatttattc aacagtggc 1620
agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga 1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa

```

```

<210> 11
<211> 1704
<212> DNA
<213> Influenza A virus (A/Anhui/1/2005)

```

```

<400> 11
atggagaaaa tagtgttct tcttgcaata gtcagccttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaacaa ctgcacagag caggttgaca caataatgga aaagaactgt 120
actgttacac atgccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
gatggagtga agcctctgat ttaagagat tgtagtgtag ctggatggct cctcgaaac 240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggctct acatagtggg gaaggccaac 300
ccagccaatg acctctgtta cccagggaat tcaaacgact atgaagaact gaaacaccta 360

```

```

ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccgat 420
catgaagcct catcaggggt gagctcagca tgtccatacc aggggaacgcc ctccctttttc 480
agaaaatgtg tatggcttat caaaaagaac aatacatacc caacaataaa gagaagctac 540
aataatacca accaggaaga tcttttgata ctgtggggga ttcattcattc taatgatgcy 600
gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata tttccgttgg gacatcaaca 660
ctaaaccaga gatttggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaaagtga 720
aggatggatt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaagcaatt 840
gttaaaagtg aagtgggaata tggtaactgc aacacaaagt gtcaaaactcc aataggggcy 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccacgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacaattt agtccttgcg actgggctca gaaatagtc tctaagagaa 1020
agaagaagaa aaagaggact atttgagct atagcagggt ttatagaggg aggatggcag 1080
ggaaatggtag atgggtggta tgggtaccac catagcaatg agcaggggag tgggtacgct 1140
gcagacaaag aatccactca aaaggcaata gatggagtca ccaataaggt caactcgatc 1200
attgacaaaa tgaacactca gtttgaggcc gttggaagg aatttaataa cttagaaagg 1260
agaatagaga atttaaacaa gaaaatggaa gacggattcc tagatgtctg gacttataat 1320
gctgaacttt tggttctcat ggaaaatgag agaactctag acttccatga ttcaaatgtc 1380
aagaaccttt acgacaaggc ccgactacag cttagggata atgcaaaagg gctgggtaac 1440
ggttgtttcg agttctatca caaatgtgat aatgaatgta tggaaagtgt aagaaacgga 1500
acgtatgact acccgagta ttcagaagaa gcaagattaa aaagagagga aataagtggg 1560
gtaaaattgc aatcaatagg aacttaccaa atactgtcaa tttattcaac agttgcgagt 1620
tctctagcag tggcaatcat ggtggctggt ctatctttgt ggatgtgctc caatgggctc 1680
ttacaatgca gaatttgcac ttaa 1704

```

```

<210> 12
<211> 1707
<212> DNA
<213> Influenza A virus (A/turkey/Turkey/1/05)

```

```

<400> 12
atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagccttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaacaa ctgcacagag cagggttgaca caataatgga aaagaacgctc 120
actgttacac acgccaaga catactggaa aagacacaca acgggaaact ctgcgatcta 180
gatggagtga agcctctaatt ttaagagat tbtagtgtag ctggatggct cctcgggaac 240
ccaatgtgtg acgaattcct caatgtgccc gaatggctct acatagtggg gaagatcagt 300
ccagccaatg acctctgtta cccagggaat ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccgat 420
catgaagcct cagcaggggt gagctcagca tgtccatacc aggggaaggct ctccctttttc 480
agaaaatgtg tatggcttat caaaaaggac aatgcatacc caacaataaa gagaagtac 540
aataatacca accaagaaga tcttttggtt ttgtggggga ttcaccatcc aatgatgcy 600
gcagagcaga caaggtctta tcaaaaccca actacctata tttccgttgg gacatcaaca 660
ctaaaccaga gatttggtacc aaaaatagcc actagatcta aggtaaacgg gcaaaagtga 720
aggatggagt tcttttggac aattttaaaa ccgaatgatg caataaactt tgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga aaatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt 840
atgaaaagtg agttggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaaactcc aataggggcy 900
ataaactcta gtatgccatt ccacaacatc caccctctca ccacgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caagcagatt agtccttgc actgggctca gaaatagccc tcaaggagag 1020
agaagaagaa aaaagagagg actatttggg gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca acgagcaggg gagtgggtac 1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaaggc atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gctgttggaa gggaatttaa taacttagaa 1260
aggagaatag aaaaatttaa caagaagatg gaagacggat tcctagatgt ctggacttat 1320
aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
gtcaagaacc tttagacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagcttgg 1440
aacggttgtt tcgagttcta tcacagatgt gataatgaat gtatggaaa gtaagaaac 1500
ggaagtatg actaccgca gtattcagaa gaagcaagat taaaaagaga gaaaataagt 1560
ggagtaaaat tggaaatcaat aggaacttac caataactgt caatttattc aacagtggcy 1620
agctccctag cactggcaat catggtggct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga 1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

```

```

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Influenza A virus

```

<400> 13
 Arg Glu Gly Arg Arg Arg Lys Arg
 1 5

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Adjuvant oligonucleotide

<220>
 <221> N
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25
 <223> N is inosine

<400> 14
 ncnncncnc ncnncncnc ncnncnc

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Adjuvant polycationic peptide

<400> 15
 Lys Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Lys
 1 5 10

<210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus

<400> 16
 Gly Glu Arg Arg Arg Arg Lys Arg
 1 5

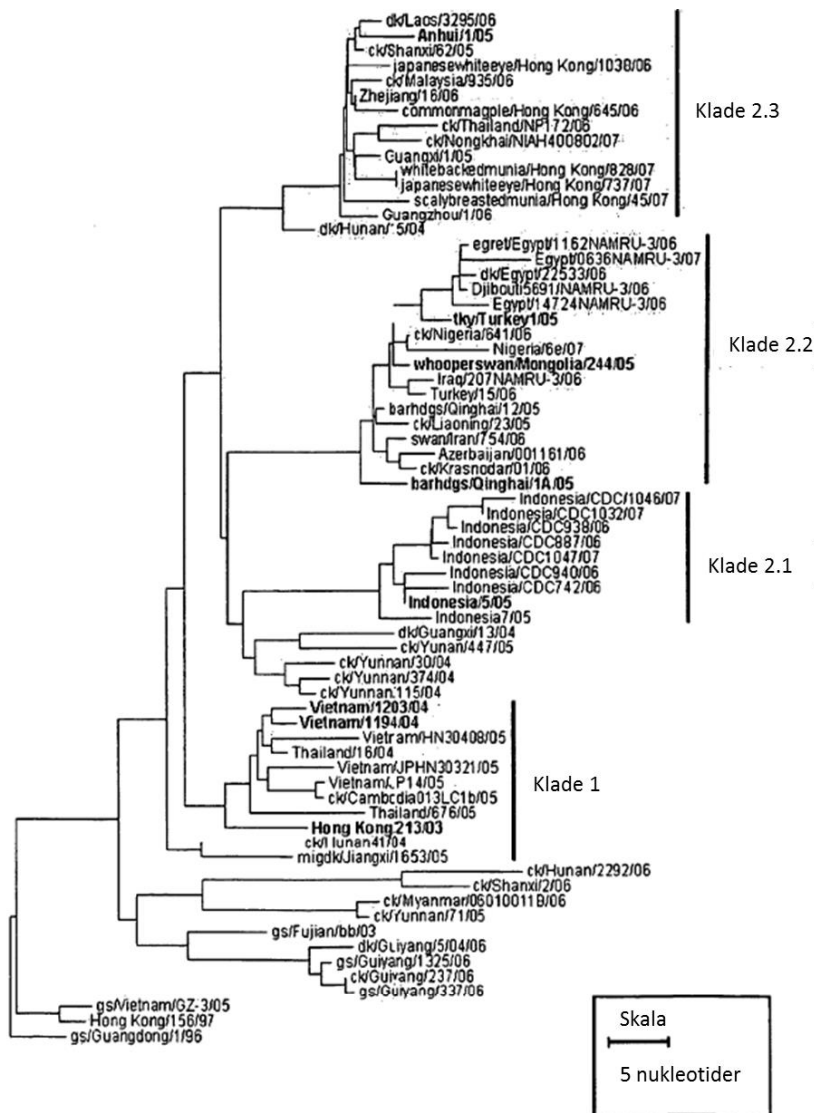
26

Patentkrav

1. Immunogen sammensetning som omfatter hemagglutininantigen fra en første klade av H5-influenza A-virus, for anvendelse i en metode for å immunusere et individ mot influensavirus, omfattende trinnene å (i) administrere til individet den immunogene sammensetning som omfatter hemagglutininantigen fra den første klade av H5-influenza A-virus, og senere (ii) administrere til individet en immunogen sammensetning som omfatter hemagglutininantigen fra en andre klade av H5-influenza A-virus, hvor den første og andre klade er forskjellige fra hverandre, og hvor:
 - (a) sammensetningen som omfatter antigenet fra første klade, omfatter en adjuvant, og/eller sammensetningen som omfatter antigenet fra andre klade, omfatter en adjuvant;
 - (b) antigenet fra første klade og/eller fra andre klade omfatter neuraminidase fra H5-virus;
 - (c) den første klade ikke er klade 0; eller
 - (d) sammensetningen som omfatter antigenet fra første klade, inneholder 0,1-15 µg hemagglutinin fra H5-influenza A-viruset fra første klade, og/eller sammensetningen som omfatter antigenet fra andre klade, inneholder 0,1-15 µg hemagglutinin H5-influenza A-virus fra andre klade.
2. Immunogen sammensetning som omfatter hemagglutininantigen fra en andre klade av H5-influenza A-virus, for anvendelse i en fremgangsmåte for å immunisere et individ mot influensavirus, omfattende trinnene å (i) administrere til individet en immunogen sammensetning som omfatter hemagglutininantigen fra en første klade av H5-influenza A-virus, og senere (ii) administrere til individet den immunogene sammensetning som omfatter hemagglutininantigen fra den andre klade av H5-influenza A-virus, hvor første og andre klader er forskjellige, og hvor:
 - (a) sammensetningen som omfatter antigenet fra første klade, omfatter en adjuvant, og/eller sammensetningen som omfatter antigenet fra andre klade, omfatter en adjuvant;
 - (b) antigenet fra første klade og/eller fra andre klade omfatter neuraminidase fra H5-virus;
 - (c) den første klade ikke er klade 0; eller
 - (d) sammensetningen som omfatter antigenet fra første klade, omfatter 0,1-15 µg hemagglutinin fra H5-influenza A-virus fra første klade, og/eller sammensetningen som omfatter antigenet fra den andre klade, omfatter 0,1-15 µg hemagglutinin fra H5-influenza A-virus fra andre klade.
3. Immunogen sammensetning ifølge krav 1 eller 2, hvor:
 - den første klade er klade 1 og den andre klade er klade 2,
 - den første klade er klade 2 og den andre klade er klade 1,
 - den første klade er klade 1 og den andre klade er ikke klade 2,
 - den første klade er klade 2 og den andre klade er ikke klade 1.

4. Immunogen sammensetning ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, hvor i det minste én av de immunogene sammensetningen er et virus med splittet virion.
5. Immunogen sammensetning ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, hvor minst én av de immunogene sammensetninger omfatter influensa A-virus-neuraminidase.
- 5 6. Immunogen sammensetning ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, hvor sammensetningen som omfatter antigenet fra første klade, omfatter adjuvant.
7. Immunogen sammensetning ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, hvor sammensetningen som omfatter antigenet fra andre klade, omfatter adjuvant, f.eks. hvor sammensetningen som omfatter antigenet fra første klade, omfatter adjuvant, og sammensetningen som omfatter antigenet fra andre klade, omfatter adjuvant.
- 10 8. Immunogen sammensetning som omfatter hemagglutininantigener fra flere enn én klade av H5-influensa A-virus.
9. Sammensetning ifølge krav 8, som omfatter hemagglutinin fra klader 1 og 2 av H5-influensa A-virus.
10. Sammensetning ifølge krav 8 eller 9, hvor sammensetningen omfatter adjuvant (f.eks. en submikronisk olje-i-vann-emulsjon).
- 15 11. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 8 til 10, hvor sammensetningen omfatter mellom 0,1 og 50 µg hemagglutinin per H5-klade.
12. Sammensetning ifølge krav 11, hvor sammensetningen omfatter 0,1-15 µg hemagglutinin per H5-klade, f.eks. 7,5 µg per klade eller 3,75 µg per klade.
- 20 13. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 10 til 12, omfattende helvirusantigener og en aluminiumsaltadjuvant (f.eks. et aluminiumhydroksid og/eller et aluminiumfosfat).
14. Sammensetning ifølge krav 13, hvor virusene som brukes som kilde for antigenene, er dyrket på cellekultur (f.eks. Vero-celler) og sammensetningen er fri for ovalbumin og ovomucoid.
15. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 10 til 12, omfattende splittet virionantigen eller rensset overflateantigen; og en submikronisk olje-i-vann-emulsjon som adjuvant.
- 25 16. Sammensetning ifølge krav 10 eller 15, hvor emulsjonen omfatter skvalen.
17. Sammensetning ifølge krav 16, hvor sammensetningen inneholder 7,5 µg HA per H5-klade eller 3,75 µg HA per H5-klade.
18. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 8-17, som er en 2-verdig vaksinesammensetning.

FIGUR 1

Oversettelser:Common magpie: *Pica pica* (skjære)

Iraq: Irak

Japanese whiteeye: *Zosterops japonicus*Scalybreasted munia: *Lonchura punctulata*Swan: *Cygnus* (svane)

Turkey: Tyrkia

Whitebacked munia: *Lonchura striata*Whooperswan: *Cygnus cygnus* (sangsvane)

FIGUR 2

