



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 27 029 T2 2006.10.19

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 210 113 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 27 029.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/EP00/08784

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 967 654.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/017551

(86) PCT-Anmeldetag: 07.09.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 15.03.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 05.06.2002

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 29.03.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 19.10.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9921146 07.09.1999 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rixensart, BE

(72) Erfinder:

Wettendorff, SmithKline Beecham Bio. s.a.,  
Martine, 1330 Rixensart, BE

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(54) Bezeichnung: KOMBINIERTE IMPFSTOFFZUSAMMENSETZUNGEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Diese Erfindung betrifft neue Impfstoffformulierungen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung in der Therapie. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Kombinationsimpfstoffe zur Verabreichung an Jugendliche.

**[0002]** Papillomaviren sind kleine DNA-Tumoviren, die höchst artenspezifisch sind. Bislang wurden mehr als 70 individuelle humane Papillomavirus-(HPV)-Genotypen beschrieben. HPVs sind allgemein spezifisch entweder für die Haut (z.B. HPV-1 und -2) oder für Schleimhautoberflächen (z.B. HPV-6 und -11) und verursachen gewöhnlich gutartige Tumoren (Warzen), die für mehrere Monate oder Jahre fortbestehen. Solche gutartigen Tumore können bedauerlich für die betroffenen Individuen sein, aber neigen mit einigen wenigen Ausnahmen nicht dazu, lebensbedrohend zu sein.

**[0003]** Einige HPVs sind auch mit Krebsarten assoziiert. Die stärkste positive Assoziation zwischen einem HPV und menschlichem Krebs ist diejenige, die zwischen HPV-16 und HPV-18 und Gebärmutterhalskrebs besteht. Gebärmutterhalskrebs ist der häufigste bösartige Tumor in Entwicklungsländern, wobei circa 500.000 neue Fälle weltweit jedes Jahr auftreten. Es ist jetzt technisch machbar, aktiv primäre HPV-16-Infektionen und sogar bestehende HPV-16-haltige Krebstypen unter Verwendung von Impfstoffen zu bekämpfen. Für eine Übersicht über die Aussichten zur prophylaktischen und therapeutischen Impfung gegen HPV-16 siehe J. Cason, Clin. Immunother. 1994; 1(4) 293-306 und M.E. Hagenesee, Infections in Medicine 1997; 14(7) 555-556, 559-564.

**[0004]** Andere HPVs von besonderem Interesse sind die Serotypen 31, 33 und 45.

**[0005]** Bis heute wurden die unterschiedlichen Typen von HPVs mit Hilfe von Klonierungssystemen in Bakterien und neuerdings durch PCR-Amplifikation isoliert und charakterisiert. Die molekulare Organisation der HPV-Genome wurde auf einer vergleichenden Basis mit derjenigen des gut charakterisierten bovinen Papillomavirus Typ 1 (BPV1) definiert.

**[0006]** Obwohl kleinere Variationen tatsächlich auftreten, haben alle beschriebenen HPV-Genome zumindest sieben frühe Gene, E1 bis E7, und zwei späte Gene, L1 und L2. Zusätzlich beherbergt eine stromaufwärts gelegene regulatorische Region die regulatorischen Sequenzen, die die meisten Transkriptionsereignisse des HPV-Genoms zu kontrollieren scheinen.

**[0007]** E1- und E1-Gene sind an der viralen Vermehrung bzw. Transkriptionskontrolle beteiligt und neigen dazu, durch die virale Integration unterbrochen zu werden. E6 und E7, und kürzliche Nachweise implizieren auch E5, sind an der viralen Transformation beteiligt.

**[0008]** In den im Gebärmutterhalskrebs involvierten HPVs wie HPV-16 und -18 beginnt der onkogene Prozeß nach der Integration von viraler DNA. Die Integration führt zur Inaktivierung von Genen, die für die Kapsidproteine L1 und L2 codieren, und zur Einleitung einer kontinuierlichen Überexpression der zwei frühen Proteine E6 und E7, die zu allmählichem Verlust der normalen zellulären Differenzierung und zur Entwicklung des Karzinoms führen wird.

**[0009]** Gebärmutterhalskrebs ist häufig bei Frauen und entwickelt sich durch eine vorkanzeröse intermediäre Stufe zum invasiven Karzinom, was häufig zum Tod führt. Die intermediären Stadien der Krankheit sind als zervikale intraepitheliale Neoplasie bekannt und werden als I bis III in Bezug auf zunehmende Schwere eingeteilt.

**[0010]** Klinisch manifestiert sich eine HPV-Infektion des weiblichen Anogenitaltrakts als zervikale flache Kondylome, deren Kennzeichen die Koilozytose ist, die vorherrschend die oberflächlichen und intermediären Zellen des zervikalen Pflasterepithels betrifft.

**[0011]** Koilozyten, die das Ergebnis einer zytopathischen Wirkung des Virus ist, erscheinen als mehrkernige Zellen mit einem perinukleären klaren Halo. Das Epithel verdickt sich mit abnormaler Keratinisierung, die für das warzige Erscheinungsbild der Läsion verantwortlich ist.

**[0012]** Solche flachen Kondylome, wenn sie positiv für die HPV-16 oder -18-Serotypen sind, sind Hochrisikofaktoren für die Entwicklung hin zu zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN) und Karzinom in situ (CIS), die selbst als Vorläuferläsionen von invasivem Gebärmutterhalskrebs betrachtet werden.

**[0013]** WO 96/19496 offenbart Varianten der humanen Papillomavirus-E6- und -E7-Proteine, insbesondere Fusionsproteine von E6/E7 mit einer Deletion in sowohl den E6- als auch E7-Proteinen. Diese Deletionsfusionsproteine sollen immunogen sein.

**[0014]** HPV-Impfstoffe auf Basis von L1 werden in WO 94/00152, WO 94/20137, WO 93/02184 und WO 94/05792 offenbart. Ein solcher Impfstoff kann das L1-Antigen als Monomer, Kapsomer oder virusartiges Partikel umfassen. Solche Partikel können zusätzlich L2-Proteine umfassen. Impfstoffe auf L2-Basis werden zum Beispiel in WO 93/00436 beschrieben. Andere HPV-Impfstoffe basieren auf den frühen Proteinen wie E7 oder Fusionsproteinen wie L2-E7.

**[0015]** HSV-2 ist das primäre ätiologische Mittel für Herpes genitalis. HSV-2 und HSV-1 (die Verursacher für Herpes labialis) sind durch ihre Fähigkeit zur Induzierung beider akuter Krankheiten und zur Etablierung einer latenten Infektion, primär in neuronalen Ganglienzellen, gekennzeichnet.

**[0016]** Es wird vermutet, daß Herpes genitalis in circa 5 Millionen Menschen allein in den USA auftritt, wobei jedes Jahr 500.000 klinische Fälle aufgezeichnet werden (primäre und wiederkehrende Infektionen). Die Primärinfektion erfolgt typischerweise nach der Pubertät und ist durch das lokale Auftreten von schmerzhaften Hautläsionen gekennzeichnet, die für einen Zeitraum von 2 bis 3 Wochen andauern. Innerhalb der folgenden sechs Monate nach der Primärinfektion erfahren 50 % der Patienten ein Wiederauftreten der Krankheit. Circa 25 % der Patienten können zwischen 10 und 15 wiederauftretende Episoden der Krankheit jedes Jahr erfahren. In immunbeeinträchtigten Patienten ist das Auftreten von Wiederkehr mit hoher Häufigkeit statistisch höher als in der normalen Patientenpopulation.

**[0017]** Sowohl HSV-1- als auch HSV-2-Viren haben eine Anzahl von Glycoproteinkomponenten, die sich auf der Oberfläche des Virus befinden. Diese sind als gB, gC, gD und gE etc. bekannt.

**[0018]** US 5,855,891 offenbart ein Papillomavirus-artiges Partikel, das ein Papillomavirus L1-Fusionsprodukt umfaßt.

**[0019]** WO 95/17209 offenbart Impfstoffzusammensetzungen, die Öl-in-Wasser-Emulsionen mit 3D-MPL und QS21 umfassen.

**[0020]** WO 99/45957 offenbart kombinierte Impfstoffzusammensetzungen, vorzugsweise zur Verabreichung an Jugendliche, die ein virales Hepatitis B-Antigen und ein virales Herpes simplex-Antigen und gegebenenfalls andere Antigene umfassen, formuliert mit einem Hilfsstoff.

**[0021]** Es besteht ein Bedarf an wirksamen Kombinationsimpfstoffen zur Prävention von Krankheiten, für die Jugendliche besonders anfällig sind.

**[0022]** Die vorliegende Erfindung stellt eine Impfstoffzusammensetzung gemäß Anspruch 1 bereit.

**[0023]** Die Impfstoffzusammensetzung der Erfindung ist von großem Nutzen zur Verabreichung an Jugendliche, die einem besonderen Risiko einer HSV- und/oder HPV-Infektion ausgesetzt sein können.

**[0024]** Gegebenenfalls umfaßt die Impfstoffzusammensetzung der Erfindung zusätzlich ein oder mehrere einer Anzahl anderer Antigene wie nachfolgend beschrieben.

**[0025]** Es wurde festgestellt, daß die erfindungsgemäßen Impfstoffzusammensetzungen überraschend keine Interferenz zeigen, d.h. daß die Immunreaktion auf jedes Antigen in der Zusammensetzung der Erfindung im wesentlichen die gleiche wie diejenige ist, die durch jedes Antigen erhalten wird, das individuell in Verbindung mit einem Hilfsstoff gegeben wird, der ein bevorzugter Stimulator der TH1-Zellreaktion ist.

**[0026]** Der Impfstoff Havrix (Marke), auch von SmithKline Beecham Biologicals, ist ein Beispiel für einen Impfstoff, der zur Prävention von Hepatitis A-Infektion verwendet werden kann. Er wird mit Aluminiumhydroxid als Hilfsstoff formuliert. Dieser Impfstoff umfaßt einen abgeschwächten Stamm des HM-175 Hepatitis A-Virus, inaktiviert mit Formol (Formaldehyd); siehe Andre et al. (Prog. med. Virol., Bd. 37, S.1-24).

**[0027]** Wie hier verwendet wird der Begriff virales Hepatitis A-(HAV)-Antigen zur Bezeichnung entweder eines aus Hepatitis A-Virus stammenden Proteins oder einer abgeschwächten Stämme von HAV, gegebenenfalls inaktiviert mit z.B. Formaldehyd, verwendet. Falls das HAV-Antigen ein aus dem Hepatitis A-Virus stammendes

Protein ist, kann es gegebenenfalls ein rekombinantes Protein sein.

**[0028]** Die erfindungsgemäße Impfstoffzusammensetzung kann zusätzlich zu den HPV- und HSV-Antigenen ein HAV-Antigen umfassen.

**[0029]** Ein solcher Impfstoff ist von großem Nutzen zur Verabreichung an Jugendliche, die einem besonderen Risiko einer HSV- und/oder HPV-Infektion und/oder HAV-Infektion unterliegen können.

**[0030]** Eine Immunreaktion kann allgemein in zwei extreme Kategorien unterteilt werden, die eine humorale oder eine zellvermittelte Immunreaktion sind (herkömmlich gekennzeichnet durch Antikörper- bzw. zelluläre Effektormechanismen des Schutzes). Diese Kategorien der Reaktion wurden als Reaktionen vom TH1-Typ (zellvermittelte Reaktion) und Immunreaktionen vom TH2-Typ (humorale Reaktion) bezeichnet.

**[0031]** Extreme Reaktionen vom TH1-Typ können durch die Erzeugung von Antigenspezifischen, Haplotyp-beschränkten zytotoxischen T-Lymphozyten und natürliche Killerzellreaktionen gekennzeichnet sein. In Mäusen sind Reaktion vom TH1-Typ häufig durch die Erzeugung von Antikörpern des IgG2a-Subtyps gekennzeichnet, während diese im Menschen Antikörpern vom IgG1-Typ entsprechen. Immunreaktionen vom TH2-Typ sind durch die Erzeugung einer Reihe von Immunglobulin-Isotypen gekennzeichnet, die in Mäusen IgG1 einschließen.

**[0032]** Es kann erwogen werden, daß die treibende Kraft hinter der Entwicklung dieser zwei Typen von Immunreaktionen Zytokine sind. Hohe Spiegel von Zytokinen von TH1-Typ neigen dazu, die Induzierung von zellvermittelten Immunreaktionen auf das gegebene Antigen zu begünstigen, während hohe Spiegel von Zytokinen vom TH2-Typ dazu neigen, die Induzierung von humoralen Immunreaktionen gegen das Antigen zu begünstigen.

**[0033]** Die Unterscheidung von Immunreaktion vom TH1- und TH2-Typ ist nicht absolut. In der Realität wird ein Individuum eine Immunreaktion stützen, die als vorherrschend TH1 oder vorherrschend TH2 beschrieben wird. Jedoch ist es häufig zweckmäßig, die Familien von Zytokinen als diejenigen zu betrachten, die in murinen CD4 +ve T-Zellklonen von Mosmann und Coffman beschrieben wurden (T.R. Mosmann und R.L. Coffman (1989), TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, S.145-173). Herkömmlich sind Reaktionen vom TH1-Typ mit der Erzeugung der INF- $\gamma$ -Zytokine durch T-Lymphozyten assoziiert. Andere Zytokine, die häufig direkt mit der Induzierung von Immunreaktion vom TH1-Typ assoziiert sind, werden nicht durch T-Zellen erzeugt, wie IL-12. Im Gegensatz sind Reaktionen vom TH2-Typ mit der Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und Tumornekrosefaktor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) assoziiert.

**[0034]** Es ist bekannt, daß bestimmte Impfstoffhilfsstoffe besonders geeignet zur Stimulation von Zytokinreaktionen vom entweder TH1- oder TH2-Typ geeignet sind. Herkömmlich schließen die besten Indikatoren des TH1:TH2-Gleichgewichts der Immunreaktion nach einer Impfung oder Infektion die direkte Messung der Erzeugung von TH1- oder TH2-Zytokinen durch T-Lymphozyten in vitro nach Restimulation mit Antigen und/oder (zumindest in Mäusen) die Messung des IgG1:IgG2a-Verhältnisses von Antigen-spezifischen Antikörperreaktionen ein.

**[0035]** So ist ein Hilfsstoff vom TH1-Typ einer, der isolierte T-Zellpopulationen zur Erzeugung hoher Mengen von Zytokinen vom TH1-Typ bei Restimulation mit Antigen in vitro stimuliert und Antigen-spezifische Immunglobulinreaktionen induziert, die mit dem Isotyp vom TH1-Typ assoziiert sind.

**[0036]** Hilfsstoffe, die zur bevorzugten Stimulation der TH1-Zellreaktion fähig sind, werden in WO 94/00153 und WO 95/17209 beschrieben.

**[0037]** 3-Des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A (3D-MPL) ist ein solcher Hilfsstoff. Dieses ist aus GB 2,220,211 (Ribi) bekannt. Chemisch ist es eine Mischung aus 3-des-O-acyliertem Monophosphoryllipid A mit 4, 5 oder 6 acylierten Ketten und wird von Ribi Immunochem, Montana hergestellt. Eine bevorzugte Form von 3-des-O-acyliertem Monophosphoryllipid A wird in EP 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA) offenbart.

**[0038]** Bevorzugt sind die Partikel von 3D-MPL klein genug, um durch eine 0,22  $\mu$ m-Membran sterilfiltriert zu werden (wie in EP 0 689 454 beschrieben). 3D-MPL wird im Bereich von 10 bis 100  $\mu$ g, bevorzugt 25 bis 50  $\mu$ g pro Dosis vorhanden sein, worin das Antigen typischerweise in einem Bereich von 2 bis 50  $\mu$ g pro Dosis

vorhanden sein wird.

**[0039]** Ein anderer bevorzugter Hilfsstoff umfaßt QS21, eine HPLC-gereinigte nicht-toxische Fraktion, die aus der Rinde von Quillaja Saponaria Molina stammt. Gegebenenfalls kann dieser mit 3-des-O-acyliertem Mono-phosphoryllipid A (3D-MPL) vermischt werden, gegebenenfalls zusammen mit einem Träger.

**[0040]** Das Verfahren zur Herstellung von QS21 wird in US-PS 5,057,540 offenbart.

**[0041]** Nicht-reaktogene Hilfsstoffformulierungen, die QS enthalten, wurden zuvor beschrieben (WO 96/33739). Es wurde gezeigt, daß solche Formulierungen, die QS21 und Cholesterin umfassen, erfolgreiche TH1-stimulierende Hilfsstoffe bei Formulierung zusammen mit einem Antigen sind. Somit können Impfstoffzusammensetzungen, die einen Teil der vorliegenden Erfindung bilden, eine Kombination aus QS21 und Cholesterin einschließen.

**[0042]** Weitere Hilfsstoffe, die bevorzugte Stimulatoren der TH1-Zellreaktion sind, schließen immunmodulatorische Oligonukleotide ein, z.B. unmethylierte CpG-Sequenzen wie in WO 96/02555 offenbart.

**[0043]** Kombinationen aus unterschiedlichen TH1-stimulierenden Hilfsstoffen, wie z.B. die hier oben genannten, werden auch als Bereitstellung eines Hilfsstoffs erwogen, der ein bevorzugter Stimulator der TH1-Zellreaktion ist. Zum Beispiel kann QS21 zusammen mit 3D-MPL formuliert werden. Das Verhältnis QS21:3D-MPL wird typischerweise in der Größenordnung von 1:10 bis 10:1 sein, bevorzugt 1:5 bis 5:1 und häufig im wesentlichen 1:1. Der bevorzugte Bereich für optimale Synergie ist 2,5:1 bis 1:1 3D-MPL:QS21.

**[0044]** Bevorzugt ist auch ein Träger in der erfindungsgemäßen Impfstoffzusammensetzung vorhanden. Der Träger kann eine Öl-in-Wasser-Emulsion oder ein Aluminiumsalz wie Aluminiumphosphat oder Aluminiumhydroxid sein.

**[0045]** Eine bevorzugte Öl-in-Wasser-Emulsion umfaßt ein metabolisierbares Öl wie Squalen, alpha-Tocopherol und Tween 80. Zusätzlich kann die Öl-in-Wasser-Emulsion Span 85 und/oder Lecithin und/oder Tricaprlylin enthalten.

**[0046]** In einem besonders bevorzugten Aspekt werden die Antigene in der erfindungsgemäßen Impfstoffzusammensetzung mit 3D-MPL und Alaun kombiniert.

**[0047]** Typischerweise werden QS21 und 3D-MPL zur humanen Verabreichung in einem Impfstoff im Bereich von 1 bis 200 µg, wie z.B. 10 bis 100 µg, bevorzugt 10 bis 50 µg, pro Dosis vorhanden sein. Typischerweise wird die Öl-in-Wasser-Emulsion 2 bis 10 % Squalen, 2 bis 10 % alpha-Tocopherol und 0,3 bis 3 % Tween 80 umfassen. Bevorzugt ist das Verhältnis Squalen:alpha-Tocopherol gleich oder weniger als 1, da dies eine stabilere Emulsion liefert. Span 85 kann auch in einer Menge von 1 % vorhanden sein. In manchen Fällen kann es vorteilhaft sein, daß die erfindungsgemäßen Impfstoffe ferner einen Stabilisator enthalten werden.

**[0048]** Nicht-toxische Öl-in-Wasser-Emulsionen enthalten bevorzugt ein nicht-toxisches Öl, z.B. Squalan oder Squalen, einen Emulgator, z.B. Tween 80, in einem wäßrigen Träger. Der wäßrige Träger kann z.B. phosphatgepufferte Kochsalzlösung sein.

**[0049]** Eine besonders wirksame Hilfsstoffformulierung, die QS21, 3D-MPL und Tocopherol in einer Öl-in-Wasser-Emulsion beinhaltet, wird in WO 95/17210 beschrieben.

**[0050]** Das HPV-Antigen in der Zusammensetzung der Erfindung stammt bevorzugt aus HPV-16 und/oder -18 oder aus HPV-6 und/oder -11 oder HPV-31, -33 oder -45.

**[0051]** In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das HPV-Antigen in der erfindungsgemäßen Impfstoffzusammensetzung das Hauptkapsidprotein L1 von HPV und gegebenenfalls das L2-Protein, insbesondere aus HPV-16 und/oder HPV-18. In dieser Ausführungsform ist die bevorzugte Form des L1-Proteins ein trunziertes L1-Protein. Bevorzugt ist das L1, gegebenenfalls in einer L1-L2-Fusion, in Form eines virusartigen Partikels (VLP). Das L1-Protein kann an ein anderes HPV-Protein fusioniert sein, insbesondere an E7 unter Bildung einer L1-E7-Fusion. Chimäre VLPs, die L1-E oder L1-L2-E umfassen, sind besonders bevorzugt.

**[0052]** Die Proteine der vorliegenden Erfindung werden bevorzugt in *E. coli* exprimiert. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Proteine mit einem Histidin-Schwanz exprimiert, der zwischen 5 und 9 und be-

vorzugt 6 Histidinreste umfaßt. Diese sind vorteilhaft zur Unterstützung der Reinigung. Die Beschreibung der Herstellung solcher Proteine wird vollständig in der gleichzeitig anhängigen britischen Patentanmeldung GB 9,717,953.5 beschrieben.

**[0053]** Das HPV-Antigen in der Impfstoffzusammensetzung kann an Al(OH)<sub>3</sub> adsorbiert sein.

**[0054]** Das HSV-Antigen in der Zusammensetzung der Erfindung stammt aus HSV-2, Glycoprotein D. Glycoprotein D befindet sich auf der viralen Membran und wird auch im Zytoplasma von infizierten Zellen gefunden (R.J. Eisenberg et al., J. of Virol. 1980, 35, 428-435). Es umfaßt 393 Aminosäuren, einschließlich eines Signalpeptids, und hat ein Molekulargewicht von circa 60 kD. Unter allen HSV-Hüllglycoproteinen ist dies wahrscheinlich das am besten charakterisierte (Cohen et al., J. of Virology, 60, 157-166). Es ist bekannt, daß es in vivo eine zentrale Rolle in der viralen Anhaftung an Zellmembranen spielt. Außerdem wurde gezeigt, daß Glycoprotein D neutralisierende Antikörper in vivo hervorrufen kann (Eing et al., J. Med. Virology 127, 59-65). Jedoch kann latentes HSV-2-Virus noch reaktiviert werden und ein Wiederauftreten der Krankheit induzieren, trotz Gegenwart hoher neutralisierender Antikörpertiter in den Patientenserien.

**[0055]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das HSV-Antigen ein trunkiertes HSV-2-Glycoprotein D mit 308 Aminosäuren, das Aminosäuren 1 bis 306 des natürlich vorkommenden Glycoproteins unter Addition von Asparagin und Glutamin am C-terminalen Ende des trunkierten Proteins ohne seine Membranankerregion umfaßt. Diese Form des Proteins schließt das Signalpeptid ein, das abgespalten wird, um ein reifes Protein mit 283 Aminosäuren zu liefern. Die Erzeugung eines solchen Proteins in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters wurde in EP-B-139 417 (Genentech) beschrieben.

**[0056]** Das rekombinante reife trunkierte HSV-2-Glycoprotein D wird bevorzugt in den Impfstoffformulierungen der vorliegenden Erfindung verwendet und wird als rgD2t bezeichnet.

**[0057]** Eine Kombination dieses HSV-2-Antigens in Kombination mit dem Hilfsstoff 3D-MPL wurde in WO 92/16231 beschrieben.

**[0058]** Beispiele für Antigene aus zusätzlichen Pathogenen, die in den erfindungsgemäßigen Impfstoffzusammensetzungen eingeschlossen werden können, werden jetzt beschrieben.

**[0059]** Epstein-Barr-Birus (EBV), ein Mitglied der Herpesvirus-Gruppe, verursacht infektiöse Mononukleose als primäre Erkrankung in Menschen. Es betrifft vorherrschend Kinder oder junge Erwachsene. Mehr als 90 % der durchschnittlichen erwachsenen Bevölkerung sind mit EBV infiziert, das lebenslang in peripheren B-Lymphozyten fortbesteht. Das Virus wird lebenslang in der Ohrspeicheldrüse erzeugt und primär durch Austausch von Speichel von Individuen verbreitet, die das Virus abgeben. Mit EBV infizierte Kinder sind weitgehend asymptomatisch oder haben sehr milde Symptome, während Jugendliche und Erwachsene, die infiziert werden, typische infektiöse Mononukleose entwickeln, die durch Fieber, Pharyngitis und Adenopathie gekennzeichnet ist. Menschen, die infiziert wurden, behalten Anti-EBV-Antikörper für den Rest ihres Lebens und sind somit immun gegen weitere Infektion.

**[0060]** Zusätzlich zu seinen infektiösen Eigenschaften wurde gezeigt, daß EBV Lymphozyten zu sich schnell teilenden Zellen umwandelt, und es wurde deshalb mit verschiedenen unterschiedlichen Lymphomen in Verbindung gebracht, die das afrikanische Burkitt-Lymphom (BL) einschließen. EBV kann auch an der Verursachung von Nasopharyngealkarzinom (NPC) involviert sein. Weltweit wird geschätzt, daß 80.000 Fälle von Nasopharyngealkarzinom auftreten, und es ist stärker vorherrschend in ethnischen chinesischen Populationen. Infektiöse Mononukleose ist ein Ergebnis einer Primärinfektion mit EBV. Es ist keine lebensbedrohende Krankheit, falls zusätzliche Risikofaktoren fehlen.

**[0061]** Vier Proteine der EBV-Virushülle, die den sogenannten Membran-Antigen-Komplex darstellen, wurden beschrieben. Sie werden gewöhnlich als gp 220/350 oder gp 250/350 oder einfach als gp 250 oder 350 bezeichnet (siehe EP-A-151079). Es gibt überzeugende Hinweise, daß gp 350 und gp 250 die Erzeugung von neutralisierenden Antikörpern induzieren und daß Antikörper gegen gp 350 und gp 250 neutralisierende Fähigkeit besitzen. Diese Proteine sind deshalb Kandidaten für einen möglichen EBV-Impfstoff. Für weitere Informationen zur Anwendung von gp 250/350 zur Prophylaxe und Behandlung von EBV-bezogenen Krankheiten siehe EP 0 173 254.

**[0062]** Das hauptsächliche EBV-Oberflächenglycoprotein gp 350/220 infiziert humane Zielzellen durch Wechselwirkung mit dem zellulären Membranprotein CD21. gp 350/220 ist das primäre Ziel für EBV-neutralisierende

Antikörper in Menschen, und es wurde gezeigt, daß einige Formen von gp 350/220 gegen EBV-bezogene Erkrankung schützen. Bevorzugt umfaßt eine erfindungsgemäße Impfstoffzusammensetzung gp 350 von EBV, obwohl andere schützende Antigene verwendet werden können.

**[0063]** In einem bevorzugten Aspekt umfaßt die Impfstoffzusammensetzung der Erfindung zusätzlich ein virales Varicella zoster-Antigen (VZV-Antigen). Geeignete Antigene von VZV zum Einschluß in der Impfstoffformulierung schließen gpl-V ein, beschrieben von Longnecker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4303-4307 (1987).

**[0064]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird gpl verwendet (siehe Ellis et al., US-PS 4,769,239). Siehe auch EP-B1-0 405 867.

**[0065]** In einem anderen bevorzugten Aspekt umfaßt die Impfstoffzusammensetzung der Erfindung zusätzlich ein humanes Zytomegalovirus-(HCMV)-Antigen. HCMV ist ein humanes DNA-Virus, das zur Familie der Herpes-Viren gehört. HCMV ist endemisch in den meisten Teilen der Welt. Unter zwei Populationen ist HCMV verantwortlich für ernsthafte medizinische Zustände. HCMV ist eine Hauptursache für angeborene Defekte von Neugeborenen. Die zweite risikobehaftete Population sind immunbeeinträchtigte Patienten wie diejenigen, die an HIV-Infektion leiden, und diejenigen Patienten, die Transplantationen erfahren. Die klinische Erkrankung verursacht eine Vielzahl von Symptomen, die Fieber, Hepatitis, Pneumonitis und infektiöse Mononukleose einschließen. Ein bevorzugtes Antigen zur Verwendung in einem Impfstoff gegen HCMV ist gB685\*\*, wie in WO 95/31555 beschrieben. Immunogene zur Verwendung in HCMV-Impfstoffen werden auch durch pp65 bereitgestellt, ein HCMV-Matrixprotein wie beschrieben in WO 94/00150 (City of Hope).

**[0066]** In einem bevorzugten Aspekt umfaßt die Impfstoffzusammensetzung der Erfindung zusätzlich sowohl ein VZV- als auch ein HCMV-Antigen, insbesondere die oben beschriebenen Antigene.

**[0067]** In einem anderen bevorzugten Aspekt umfaßt die Impfstoffzusammensetzung der Erfindung zusätzlich ein Toxoplasma gondii-Antigen. Toxoplasma gondii ist ein obligatorischer intrazellulärer einzelliger Parasit, der für Toxoplasmose in warmblütigen Tieren, einschließlich Mensch, ist. Obwohl sie allgemein klinisch asymptomatisch bei gesunden Individuen ist, kann Toxoplasmose ernsthafte Komplikationen bei schwangeren Frauen und immunbeeinträchtigten Patienten hervorrufen. Ein bevorzugtes Antigen zur Verwendung in einem Impfstoff gegen Toxoplasma gondii ist SAG1 (auch als P30 bekannt), wie in WO 96/02654 beschrieben, oder Tg34, wie in WO 92/11366 beschrieben.

**[0068]** In einem bevorzugten Aspekt umfaßt die Impfstoffzusammensetzung der Erfindung zusätzlich entweder ein VZV-Antigen oder ein HCMV-Antigen, kombiniert mit einem Toxoplasma gondii-Antigen, insbesondere die oben beschriebenen Antigene.

**[0069]** In einem bevorzugten Aspekt ist die Impfstoffzusammensetzung der Erfindung ein multivalenter Impfstoff, z.B. ein tetra- oder pentavalenter Impfstoff.

**[0070]** Die Formulierungen der vorliegenden Erfindung sind sehr wirksam in der Induzierung von Schutzimmunität, selbst bei sehr geringen Dosen von Antigen (z.B. so gering wie 5 µg rgD2t).

**[0071]** Sie liefern ausgezeichneten Schutz gegen Primärinfektion und stimulieren vorteilhaft sowohl spezifische humorale (neutralisierende Antikörper) als auch Effektorzell-vermittelte (DTH) Immunreaktionen.

**[0072]** Die vorliegende Erfindung stellt in einem weiteren Aspekt eine Impfstoffformulierung wie hier beschrieben zur Verwendung in der medizinischen Therapie bereit, insbesondere zur Verwendung in der Behandlung oder Prophylaxe von Infektionen mit humanem Papillomavirus und Infektionen mit Herpes simplex-Virus.

**[0073]** Der Impfstoff der vorliegenden Erfindung wird eine immunprotektive Menge der Antigene enthalten und kann durch herkömmliche Techniken hergestellt werden.

**[0074]** Die Impfstoffherstellung wird allgemein beschrieben in Pharmaceutical Biotechnology, Bd. 61, Vaccine Design – the subunit und adjuvant approach, herausgegeben von Powell und Newman, Plenum Press, 1995; New Trends and Developments in Vaccines, herausgegeben von Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, USA, 1978. Die Verkapselung in Liposomen wird z.B. von Fullerton beschrieben, US-PS 4,235,877. Die Konjugation von Proteinen mit Makromolekülen wird z.B. von Likhite beschrieben, US-PS 4,372,945, und von Armor et al., US-PS 4,474,757.

**[0075]** Die Proteinmenge in jeder Impfstoffdosis wird als eine Menge ausgewählt, die eine immunprotektive Reaktion ohne signifikante nachteilige Nebenwirkungen in typischen Impflingen induziert. Eine solche Menge wird abhängig davon variieren, welches spezifische Immunogen eingesetzt wird. Allgemein wird erwartet, daß jede Dosis 1 bis 1.000 µg Protein umfassen wird, bevorzugt 2 bis 100 µg, am meisten bevorzugt 4 bis 40 µg. Eine optimale Menge für einen besonderen Impfstoff kann durch Standarduntersuchungen sichergestellt werden, die die Beobachtung von Antikörpertitern und anderen Reaktionen in Testpersonen beinhalten. Nach einer Erstimpfung können Testpersonen eine Auffrischung nach circa 4 Wochen erhalten.

**[0076]** Zusätzlich zur Impfung von Personen, die für Infektionen mit HPV oder HSV anfällig sind, können die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung zur immuntherapeutischen Behandlung von Patienten verwendet werden, die an den viralen Infektionen leiden.

**[0077]** In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Herstellungsverfahren wie hier beschrieben bereitgestellt, worin das Verfahren das Vermischen eines humanen Papillomavirus-Antigens und eines Herpes simplex-Virus-Antigens mit einem TH-1-induzierenden Hilfsstoff, z.B. 3D-MPL, und bevorzugt einem Träger, z.B. Alaun, umfaßt.

**[0078]** Nach Wunsch können andere Antigene in jeder zweckmäßigen Reihenfolge hinzugegeben werden, um multivalente Impfstoffzusammensetzungen wie hier beschrieben bereitzustellen.

**[0079]** Das folgende Beispiel veranschaulicht, aber beschränkt nicht die Erfindung.

Beispiel 1: Vergleichende Immunogenität von HPV-Ags/HBs/gD in monovalenten oder Kombinationsimpfstoffen, die mit AS04 formuliert sind

#### Einleitung

**[0080]** Eine Immunogenitätsstudie wurde in Balb/C-Mäusen unter Verwendung von vier unterschiedlichen Antigenen durchgeführt:

1. HPV16 L1-virusartiges Partikel (VLP-16)
2. HPV18 L1-virusartiges Partikel (VLP-18)
3. gD-Antigen von HSV-2
4. HBsAg

formuliert mit Alaun/3D-MPL (AS04) unter Verwendung von voradsorbierten Monobulks von Antigen oder 3D-MPL an Al(OH)<sub>3</sub> oder AlPO<sub>4</sub>.

**[0081]** 3D-MPL/Al(OH)<sub>3</sub>-Formulierungen werden als AS04D bezeichnet, wohingegen Formulierungen auf 3D-MPL/AlPO<sub>4</sub>-Basis als AS04C bezeichnet werden.

**[0082]** Die folgenden Impfstoffe wurden bewertet:

1. VLP16 + VLP18 AS04D
2. gD AS04D
3. HBs AS04C

und das Potential zur Kombinierung dieser Impfstoffe wurde ausgewertet.

**[0083]** Das Ziel dieses Experiments bestand im Vergleich der Immunogenität von zwei unterschiedlichen AS04-Kombinationen, die hergestellt wurden aus entweder:

1. VLP16 + VLP18 und gD oder
2. VLP16 + VLP18 und gD und HBsAg

**[0084]** Das experimentelle Protokoll wird vollständig im Abschnitt Materialien und Verfahren beschrieben.

**[0085]** Zusammenfassend wurden Gruppen von 10 Mäusen intramuskulär zweimal in 3-wöchigen Intervallen mit verschiedenen Formulierungen auf Ag-Basis immunisiert. Die Antikörperreaktion auf VLPs, gD und HBsAg und das durch die Impfung induzierte Isotypenprofil wurden durch ELISA am Tag 14 post II überwacht. Zum gleichen Zeitpunkt wurde die Zytokinerzeugung (IFNy/IL5) nach Restimulation von Milzzellen in vitro mit entweder VLPs, gD oder HBs-Antigenen analysiert.

## Materialien und Verfahren

## Formulierung

## Formulierungszusammensetzungen

VLP16, VLP18, gD und HBs, formuliert mit 3D-MPL an Aluminiumsalz

## Verwendete Komponenten

Komponente	Konzentration	Puffer
HPV 16 VLP	560 µg/ml	Tris 20mM/NaCl 500mM
HPV 18 VLP	550 µg/ml	NaCl 500mM/NaPO <sub>4</sub> 20mM
Al(OH) <sub>3</sub>	10.380 µg/ml	H <sub>2</sub> O
HBs	1.219 µg/ml	PO <sub>4</sub> 10mM/NaCl 150mM
gD	443 µg/ml	PBS pH 7,4
3D-MPL	1.170 µg/ml	Wasser zur Injektion
AlPO <sub>4</sub>	5 mg/ml	NaCl 150mM

## Adsorption

## a) VLP-Adsorption

Gereinigte Bulk-Versionen von VLP 16 und VLP 18 werden zu Al(OH)<sub>3</sub> gegeben, um ein Verhältnis von 2 µg VLP/10 µg Al(OH)<sub>3</sub> zu erhalten. Die Mischung wird bei 2-8°C bis zur fertigen Formulierung gelagert.

## b) gD-Adsorption

2 µg gD werden mit 10 µg Al(OH)<sub>3</sub> vermischt. Die Mischung wird bei 2-8°C bis zur fertigen Formulierung gelagert.

## c) HBs-Adsorption

2 µg HBs werden mit 10 µg AlPO<sub>4</sub> vermischt. Die Mischung wird bei 2-8°C bis zur fertigen Formulierung gelagert.

## d) 3D-MPL-Adsorption

5 µg 3D-MPL werden mit 10 µg Al(OH)<sub>3</sub> vermischt. Die Mischung wird bei 2-8°C bis zur fertigen Formulierung gelagert.

5 µg 3D-MPL werden mit 10 µg AlPO<sub>4</sub> vermischt. Die Mischung wird bei 2-8°C bis zur fertigen Formulierung gelagert.

## Formulierung

**[0086]** H<sub>2</sub>O und NaCl werden vermischt (10-fach konzentriert), und nach 10 Minuten Rühren bei Raumtemperatur werden die unterschiedlichen Komponenten hinzugegeben: adsorbiertes Antigen, adsorbiertes 3D-MPL und Al(OH)<sub>3</sub> (siehe nachfolgende Tabelle). Sie werden bei Raumtemperatur für 10 Minuten geschüttelt und bei 4°C bis zur Injektion gelagert.

Gruppe	Antigen(e)		Immunstimulatien		Träger	
	Typ	$\mu\text{g}$	Typ	$\mu\text{g}$	Typ	$\mu\text{g}$
A	gD	2	3D-MPL	5	Al(OH) <sub>3</sub>	10
	VLP16	2			Al(OH) <sub>3</sub>	10
	VLP18	2			Al(OH) <sub>3</sub>	10
B	gD	2	3D-MPL	5	Al(OH) <sub>3</sub>	10
	VLP16	2			Al(OH) <sub>3</sub>	10
	VLP18	2			Al(OH) <sub>3</sub>	10
	HBs	2			AlPO <sub>4</sub>	10
C	gD	2	3D-MPL	5	Al(OH) <sub>3</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	30
D	VLP16	2	3D-MPL	5	Al(OH) <sub>3</sub>	10
	VLP18	2			Al(OH) <sub>3</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	20
E	HBs	2	3D-MPL	5	AlPO <sub>4</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	30

## Serologie in Mäusen

## Anti-VLP-16- und Anti-VLP-18-Serologie

**[0087]** Die Quantifizierung von Anti-VLP16- und Anti-VLP18-Antikörpern wurde durch ELISA unter Verwendung von VLP16 503/1 (20/12/99) und VLP18 504/2 (25/10/99F) als Hüllantigene durchgeführt. Die Antigen- und Antikörperlösungen wurden mit 50  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung verwendet. Das Antigen wurde auf eine Endkonzentration von 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C an die Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dänemark) adsorbiert. Die Platten wurden dann bei 37°C für 1 h mit PBS inkubiert, das 1 % Rinderserumalbumin enthielt. Zweifache Verdünnungen von Seren (ausgehend von einer 1/400-Verdünnung) im Sättigungspuffer wurden zu den VLP-beschichteten Platten gegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS 0,1 % Tween 20 gewaschen, und Biotin-konjugiertes Anti-Maus-Ig (Amersham, UK), verdünnt 1/1.500 in Sättigungspuffer, wurde zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschnitt wurde Streptavidinbiotinylierter Peroxidasekomplex (Amersham, UK), verdünnt 1/1.000 in Sättigungspuffer, für weitere 30 min bei 37°C hinzugegeben. Die Platten wurden wie oben gewaschen und für 20 min mit einer Lösung aus o-Phenyldiamin (Sigma) 0,04 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,03 % in 0,1 % Tween 20 0,05 M Citratpuffer pH 4,5 inkubiert. Die Reaktion wurde mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N angehalten und bei 490/630 nm ausgelesen. ELISA-Titer wurden aus einer Referenz durch SoftmaxPro (unter Verwendung einer Gleichung mit vier Parametern) berechnet und in EU/ml ausgedrückt.

## Anti-gD-Reaktion

**[0088]** Die Quantifizierung von Anti-gD-Antikörper wurde durch ELISA unter Verwendung von gD (gD 43B318) als Hüllantigen durchgeführt. Die Antigen- und Antikörperlösungen wurden mit 50  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung verwendet. Das Antigen wurde auf eine Endkonzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C an die Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dänemark) adsorbiert. Die Platten wurden dann für 1 h bei 37°C mit PBS inkubiert, das 1 % Rinderserumalbumin und 0,1 %

Tween 20 enthielt (Sättigungspuffer; 100 µl/Vertiefung). Zweifache Verdünnungen der Seren (ausgehend von einer 1/100-Verdünnung) im Sättigungspuffer wurden zu den gD-beschichteten Platten gegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS 0,1 % Tween 20 gewaschen, und Biotin-konjugiertes Anti-Maus-IgG1, IgG2a, IgG2b oder Ig (Amersham, UK), verdünnt 1/1.000 in Sättigungspuffer, wurde zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschnitt wurde Streptavidin-biotinylierter Peroxidasekomplex (Amersham, UK), verdünnt 1/1.000 in Sättigungspuffer, für weitere 30 min bei 37°C hinzugegeben. Die Platten wurden wie oben gewaschen und für 20 min mit einer Lösung aus o-Phenylendiamin (Sigma) 0,04 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03 % in 0,1 % Tween 20 0,05 M Citratpuffer pH 4,5 inkubiert. Die Reaktion wurde mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N angehalten und bei 490/630 nm ausgelesen. ELISA-Titer wurden aus einer Referenz durch SoftmaxPro (unter Verwendung einer Gleichung mit vier Parametern) berechnet und in EU/ml ausgedrückt.

#### Anti-HBs-Serologie

**[0089]** Die Quantifizierung von Anti-HBs-Antikörper wurde durch ELISA unter Verwendung von HBs (Hep 286) als Hüllantigen durchgeführt. Antigen- und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Das Antigen wurde auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C an die Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dänemark) adsorbiert. Die Platten wurden dann für 1 h bei 37°C mit PBS inkubiert, das 1 % Rinderserumalbumin und 0,1 % Tween 20 enthielt (Sättigungspuffer). Zweifache Verdünnungen von Seren (ausgehend von einer 1/100-Verdünnung) im Sättigungspuffer wurden zu den HBs-beschichteten Platten gegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS 0,1 % Tween 20 gewaschen, und Biotinkonjugiertes Anti-Maus-Ig (Amersham, UK), verdünnt 1/1.500, oder IgG1, IgG2a, IgG2b (IMTECH, USA), verdünnt auf 1/4.000, 1/8.000 bzw. 1/4.000 im Sättigungspuffer, wurden zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschnitt wurde Streptavidin-biotinylierter Peroxidasekomplex (Amersham, UK), verdünnt 1/1.000 in Sättigungspuffer, für weitere 30 min bei 37°C hinzugegeben. Die Platten wurden wie oben gewaschen und für 20 min mit einer Lösung aus o-Phenylendiamin (Sigma) 0,04 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03 % in 0,1 % Tween 20 0,05 M Citratpuffer pH 4,5 inkubiert. Die Reaktion wurde mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N angehalten und bei 490/630 nm ausgelesen. ELISA-Titer wurden aus einer Referenz durch SoftmaxPro (unter Verwendung einer Gleichung mit vier Parametern) berechnet und in EU/ml ausgedrückt.

#### Zytokinerzeugung

**[0090]** Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse getötet, die Milz wurde aseptisch entfernt und vereinigt. Zellsuspensionen wurden in RPMI 1640-Medium (GIBCO) hergestellt, das 2 mM L-Glutamin, Antibiotika, 5 × 10<sup>-5</sup> M 2-Mercaptoethanol und 5 % fötales Kälberserum enthielt. Die Zellen wurden bei einer Endkonzentration von 5 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml in 1 ml pro flachbödiger Platte mit 24 Vertiefungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (10-1 µg/ml) von jedem der Ag (VLPs, gD oder HBs-Antigen) kultiviert. Überstände wurden 96 Stunden später geerntet und bis zur Untersuchung auf Gegenwart von IFNy und IL5 durch ELISA eingefroren.

#### IFNy (Genzyme)

**[0091]** Die Quantifizierung von IFNy wurde durch ELISA unter Verwendung von Reagenzien von Genzyme durchgeführt. Proben und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dänemark) wurden über Nacht bei 4°C mit 50 µl von Hämster-anti-Maus-IFNy beschichtet, verdünnt auf 1,5 µg/ml in Carbonatpuffer pH 9,5. Die Platten wurden dann für 1 h bei 37°C mit 100 µl PBS inkubiert, das 1 % Rinderserumalbumin und 0,1 % Tween 20 enthielt (Sättigungspuffer). Zweifache Verdünnungen des Überstandes aus einer in-vitro-Stimulation (ausgehend von 1/2) in Sättigungspuffer wurden zu den Anti-IFNy-beschichteten Platten gegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS Tween 0,1 % (Waschpuffer) gewaschen, und Biotin-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IFNy, verdünnt in Sättigungspuffer auf eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml, wurde zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschnitt wurde AMDEX-Konjugat (Amersham), verdünnt 1/10.000 in Sättigungspuffer, für 30 min bei 37°C hinzugegeben. Die Platten wurden wie oben gewaschen und mit 50 µl TMB (Biorad) für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4 N angehalten und bei 450/630 nm ausgelesen. Konzentrationen wurden unter Verwendung einer Standardkurve (Maus-IFNy-Standard) durch SoftmaxPro (Gleichung mit vier Parametern) berechnet und in pg/ml ausgedrückt.

**[0092]** Die Quantifizierung von IL5 wurde durch ELISA unter Verwendung von Reagenzien von Pharmingen durchgeführt. Proben und Antikörperlösungen wurden mit 50 µl pro Vertiefung verwendet. Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dänemark) wurden über Nacht bei 4°C mit 50 µl Ratte-anti-Maus-IL5 beschichtet, verdünnt auf 1 µg/ml in Carbonatpuffer pH 9,5. Die Platten wurden dann für 1 h bei 37°C mit 100 µl PBS inkubiert, das 1 % Rinderserumalbumin und 0,1 % Tween 20 enthielt (Sättigungspuffer). Zweifache Verdünnungen des Überstandes aus einer in-vitro-Stimulation (ausgehend von 1/2) in Sättigungspuffer wurden zu den Anti-IL5-beschichteten Platten gegeben und für 1 h 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS Tween 0,1 % (Waschpuffer) gewaschen, und Biotin-konjugiertes Ratte-anti-Maus-IL5, verdünnt in Sättigungspuffer auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml, wurde zu jeder Vertiefung hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschritt wurde AMDEX-Konjugat (Amersham), verdünnt 1/10.000 in Sättigungspuffer, für 30 min bei 37°C hinzugegeben. Die Platten wurden wie oben gewaschen und mit 50 µl TMB (Biorad) für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4 N angehalten und bei 450/630 nm ausgelesen. Konzentrationen wurden unter Verwendung einer Standardkurve (rekombinantes Maus-IL-5) durch SoftmaxPro (Gleichung mit vier Parametern) berechnet und in pg/ml ausgedrückt.

### Gruppen

**[0093]** Gruppen von 10 Balb/C-Mäusen wurden intramuskulär mit den folgenden Formulierungen immunisiert:

Tabelle 1

### Gruppen und Formulierungen

Gruppe	Formulierung
A	VLP16 2 µg / VLP18 2 µg / gD 2 µg / 3D-MPL 5 µg / Al(OH) <sub>3</sub> 50 µg
B	VLP16 2 µg / VLP18 2 µg / HBs 2 µg / gD 2 µg / 3D-MPL 5 µg / Al(OH) <sub>3</sub> 40 µg / AlPO <sub>4</sub> 10 µg
C	gD 2 µg / 3D-MPL 5 µg / Al(OH) <sub>3</sub> 50 µg
D	VLP16 2 µg / VLP18 2 µg / 3D-MPL 5 µg / Al(OH) <sub>3</sub> 50 µg
E	HBs 2 µg / 3D-MPL 5 µg / AlPO <sub>4</sub> 10 µg / Al(OH) <sub>3</sub> 40 µg

**[0094]** Einzelheiten der Formulierungen sind oben in Materialien und Verfahren beschrieben.

### Ergebnisse

#### 1. Serologie

##### a) Anti-VLP16-Reaktion

**[0095]** Humorale Reaktionen (Ig) wurden durch ELISA unter Verwendung von VLP16 503-1 (20/12/99) als Hüllantigen gemessen. Am Tag 14 post II wurden die Seren analysiert.

**[0096]** [Fig. 1](#) zeigt Anti-VLP16-Ig-Antikörperreaktionen, gemessen an individuellen Seren am Tag 14 post II.

**[0097]** Die Anti-VLP16-Titer, erhalten nach Immunisierung mit der Kombination aus VLPs, gD und HBs Ag (Gruppe B), waren geringfügig kleiner als die mit entweder der Kombination aus VLPs und gD (Gruppe A) oder der monovalenten VLPs-Formulierung (Gruppe D) erhaltenen (GMT von 27578 gegenüber 48105 EU/ml bzw. 44448 EU/ml). Vor der statistischen Analyse wurden ein T-Grubbs-Test an jede Population für den Datenausschluß angewendet. Zwei nicht-reagierende Mäuse in den Gruppen A und D wurden zur Analyse eliminiert.

**[0098]** Die zwischen den Gruppen beobachteten Unterschiede wurden als statistisch nicht signifikant unter Verwendung des Student Newman Keuls-Test nachgewiesen.

## b) Anti-VLP18-Reaktion

**[0099]** Humorale Reaktionen (Ig) wurden durch ELISA unter Verwendung von VLP 18 504-2 (25/10/99) als Hüllantigen gemessen. Am Tag 14 post II wurden die Seren analysiert.

**[0100]** [Fig. 2](#) zeigt die Anti-VLP18-Ig-Antikörperreaktion, gemessen an individuellen Seren am Tag 14 post II.

**[0101]** Die nach Immunisierung mit der Kombination aus VLPs, gD und HBs Ag (Gruppe B) erhaltenen Anti-VLP18-Titer waren in der gleichen Größenordnung wie die Titer, die mit entweder der Kombination aus VLPs und gD (Gruppe A) oder der monovalenten VLPs-Formulierung (Gruppe D) erhalten wurden (GMT von 56078 gegenüber 88786 EU/ml bzw. 76991 EU/ml).

**[0102]** Vor der statistischen Analyse wurde ein T-Grubbs-Test an jede Population zum Datenausschluß angewendet. Zwei nicht-reagierende Mäuse in den Gruppen A und D wurden zur Analyse eliminiert.

**[0103]** Die beobachteten Unterschiede wurden als statistisch nicht signifikant unter Verwendung der einfachen Varianzanalyse nachgewiesen.

## c) Anti-gD-Reaktion

**[0104]** Humorale Reaktionen (Ig und Isotypen) wurden durch ELISA unter Verwendung von gD als Hüllantigen gemessen. Am Tag 14 post II wurden die Seren analysiert.

**[0105]** [Fig. 3](#) zeigt die Anti-gD-Antikörperreaktionen, gemessen an individuellen Seren am Tag 14 post II.

**[0106]** In Bezug auf die Anti-gD-Reaktion wurde eine geringfügige Abnahme im GMT beobachtet, erhalten mit der VLPs/gD/HBs-Kombination (Gruppe B), verglichen mit gD allein (Gruppe C) oder einer VLPs/gD-Kombination (Gruppe A) (GMT von 18631 gegenüber 32675 bzw. 27058 EU/ml).

**[0107]** Vor der statistischen Analyse wurde ein T-Grubbs-Test an jede Population zum Datenausschluß angewendet. Zwei nicht-reagierende Mäuse in Gruppe A wurden zur Analyse eliminiert.

**[0108]** Eine einfache Varianzanalyse wurde an Anti-gD-Titern nach logarithmischer Transformation von post II-Daten durchgeführt. Kein statistisch signifikanter Unterschied wurde zwischen den drei Formulierungen beobachtet.

**[0109]** Die an vereinigten Seren analysierte Isotypenverteilung war wie folgt:

	Isotypenverteilung (%)		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
Gruppe A	96	3	2
Gruppe B	96	3	2
Gruppe C	97	1	1

**[0110]** Kein Unterschied wurde im Isotypenprofil beobachtet, das durch die drei Formulierungen induziert wurde: hauptsächlich IgG1-Reaktionen (96-97 % von IgG1) wurden in den 3 Gruppen wie in der nachfolgenden Tabelle angegeben induziert.

## d) Anti-HBs-Reaktion

**[0111]** Humorale Reaktionen (Ig und Isotypen) wurden durch ELISA unter Verwendung von HBsAg (Hep 286) als Hüllantigen gemessen. Am Tag 14 post II wurden die Seren analysiert.

**[0112]** [Fig. 4](#) zeigt die Anti-HBs-Antikörperreaktionen, gemessen an individuellen Seren am Tag 14 post II.

**[0113]** Eine geringfügig niedrigere Anti-HBs-Antikörperreaktion wird in der Kombinationsgruppe B beobachtet, die die VLPs, gD und HBs-Antigene enthält, verglichen mit HBs allein (Gruppe E) (GMT von 28996 EU/ml

gegenüber 20536 EU/ml).

**[0114]** Eine einfache Varianzanalyse wurde an Anti-HBs-Titern nach logarithmischer Umwandlung von post II-Daten durchgeführt. Kein statistisch signifikanter Unterschied wurde zwischen der Gruppe B (VLP/HBs/gD) und der Gruppe E (HBs AS04) unter Verwendung des Student Newman Keuls-Test beobachtet.

**[0115]** Die an vereinigten Seren analysierte Isotypenverteilung war wie folgt und zeigte keine Unterschiede zwischen den 2 Gruppen mit einem im Kombinationsimpfstoff bewahrten Anteil von IgG2a.

	Isotypenverteilung (%)		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
Gruppe B	54	24	21
Gruppe E	56	23	21

## 2. Zellvermittelte Immunreaktion

**[0116]** Zellvermittelte Immunreaktionen (IFNy/IL5-Produktion) wurden am Tag 14 post II nach in-vitro-Restimulation von Milzzellen mit entweder VLPS, gD oder HBs-Antigenen ausgewertet. Für jede Gruppe von Mäusen wurden Sammlungen von 5 Organen eingerichtet. Das experimentelle Verfahren wird vollständig in Materialien und Verfahren beschrieben.

## 3. Zytokinproduktion

### a) In-vitro-Restimulation mit VLP16 und VLP18

**[0117]** [Fig. 5](#) zeigt die Zytokinproduktion, überwacht in Milzzellen nach 96 h in-vitro-Restimulation mit VLP16.

**[0118]** [Fig. 6](#) zeigt die Zytokinproduktion, überwacht in Milzzellen nach 96 h in-vitro-Restimulation mit VLP18.

**[0119]** Keine klare Dosisbereichswirkung wurde unter Verwendung von 10 µg und 1 µg Ag-Dosis zur Restimulation mit einem der VLP-Antigene auf die Zytokinproduktion beobachtet.

**[0120]** Ein klares TH1-Profil wurde mit allen Formulierungen beobachtet.

Tabelle 2

### IFN-γ/IL-5-Verhältnis nach in-vitro-Restimulation mit VLP16 und VLP18

Verhältnis IFN/IL-5	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe D
VLP16 10 µg/ml	5,2	8,9	11,8
VLP16 1 µg/ml	15,1	14,3	16,5
Verhältnis IFN/IL-5	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe D
VLP18 10 µg/ml	19,6	11,1	16,1
VLP18 1 µg/ml	23,2	14,3	18,2

### b) In-vitro-Restimulation mit gD

**[0121]** [Fig. 7](#) zeigt die Zytokinproduktion, überwacht in Milzzellen nach 96 h in-vitro-Restimulation mit gD-Antigenen.

**[0122]** Keine klare Dosisbereichswirkung wurde bei Vergleich der 10- und 1 µg-Ag-Dosis zur Restimulation beobachtet.

**[0123]** Das IFN-γ wird in einer viel höheren Konzentration im Vergleich zu IL-5 (Tabelle 3) erzeugt, was ein

klares TH1-Profil der Immunreaktion in allen ausgewerteten Gruppen anzeigt (monovalent gegenüber Kombination).

Tabelle 3

IFN- $\gamma$ /IL-5-Verhältnis nach in-vitro-Restimulation mit gD

Verhältnis IFN/IL-5	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe D
gD 10 $\mu$ g/ml	6,2	7,2	3,1
gD 1 $\mu$ g/ml	6,2	11,2	2,3

c) In-vitro-Restimulation mit HBs

**[0124]** [Fig. 8](#) zeigt die Zytokinproduktion, überwacht in Milzzellen nach 96 h in-vitro-Restimulation mit HBs.

**[0125]** Eine signifikante Menge von IFN- $\gamma$ , aber keine IL5-Produktion wurde für Gruppe B beobachtet. wie in Tabelle 2 gezeigt, wurde eine höhere Produktion von IFN- $\gamma$  in Gruppe E im Vergleich zu Gruppe B beobachtet. Jedoch wurde ein höherer Hintergrundwert von IFN- $\gamma$  in Gruppe E (HBs monovalent) für die Kontrolle ohne Antigen zur Restimulation beobachtet. Ein sehr hohes IFN- $\gamma$ /IL-5-Verhältnis wurde mit dem monovalenten Impfstoff beobachtet, was anzeigt, daß eine starke TH1-Reaktion induziert wird. In ähnlicher weise wurde ein hohes IFN- $\gamma$ /IL-5-Verhältnis mit dem kombinierten Impfstoff gemessen, was die Fähigkeit dieser Formulierung auch zur Induzierung einer TH-1-Reaktion bestätigt.

Tabelle 4

IFN- $\gamma$ /IL-5-Verhältnis nach in-vitro-Restimulation mit HBs

Verhältnis IFN/IL-5	Gruppe B	Gruppe E
HBs 10 $\mu$ g/ml	15,8	65,3
HBs 1 $\mu$ g/ml	7,6	67,6

#### Schlußfolgerungen

**[0126]** Die Wirkung der Kombination aus VLPs/gD oder VLPs/gD/HBs Ag, formuliert in AS04, auf die Immunogenität wurde in Balb/C-Mäusen ausgewertet:

**[0127]** Bezüglich der serologischen Analyse wurde keine Interferenz der Ag-Kombination auf Anti-VLPs-, Anti-gD- und Anti-HBs-Serologie beobachtet.

**[0128]** Die Kombination von VLPs und gD oder VLPs, gD und HBs-Antigenen wechselwirkte nicht mit dem Isotypenprofil der durch die monovalenten gD- und HBs-Impfstoffe gezeigten Antikörperreaktion.

**[0129]** In der Zytokinauswertung wurde das mit jedem monovalenten Impfstoff beobachtete TH-1-Profil (IFN- $\gamma$ /IL-5-Verhältnis) mit den Kombinationsimpfstoffgruppen bestätigt.

#### Patentansprüche

1. Impfstoffzusammensetzung, die zur Verwendung in der Behandlung oder Prophylaxe von humanen Papillomavirus-Infektionen und Herpes simplex-Virus-Infektionen ist, umfassend:
  - (a) ein Herpes simplex-Virus (HSV) 2 gD-Antigen; und
  - (b) ein humanes Papillomavirus (HPV) L1-Antigen,
 in Verbindung mit einem Hilfsstoff, der ein bevorzugter Stimulator der TH1-Zellreaktion ist, worin die Zusammensetzung kein Hepatitis B-Antigen enthält.
2. Impfstoffzusammensetzung gemäß Anspruch 1, die zusätzlich einen Träger umfaßt.
3. Impfstoffzusammensetzung gemäß Anspruch 1 oder 2, worin der bevorzugte Stimulator der TH1-Zellre-

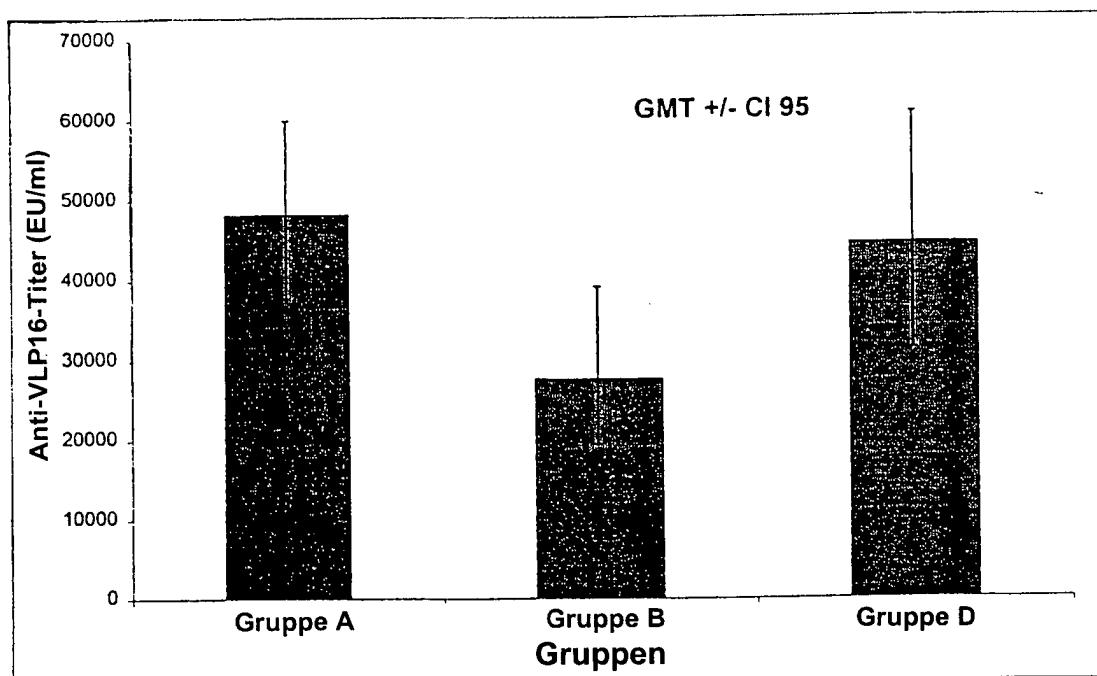
aktion aus der Gruppe von Hilfsstoffen ausgewählt ist, die aus 3-des-O-acyliertem Monophosphoryllipid A, 3-des-O-acyliertem Monophosphoryllipid A, worin die Größe der Teilchen von 3-des-O-acyliertem Monophosphoryllipid A bevorzugt ca. 100 nm oder weniger ist, QS21, einer Mischung aus QS21 und Cholesterin, und einem CpG-Oligonukleotid besteht.

4. Impfstoffzusammensetzung gemäß Anspruch 3, worin der bevorzugte Stimulator der TH1-Zellreaktion 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ist.
5. Impfstoffzusammensetzung gemäß Anspruch 4, die zusätzlich Alaun enthält.
6. Impfstoff gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, worin das HSV-Antigen eine Trunkierung von HSV-2-gD ist.
7. Impfstoffzusammensetzung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das humane Papillomavirus-Antigen aus HPV-6 stammt.
8. Impfstoffzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, worin das humane Papillomavirus-Antigen aus HPV-11 stammt.
9. Impfstoffzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, worin das humane Papillomavirus-Antigen aus HPV-16 stammt.
10. Impfstoffzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, worin das humane Papillomavirus-Antigen aus HPV-18 stammt.
11. Impfstoffzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 10, worin der Träger aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat und Tocopherol und einer Öl-in-Wasser-Emulsion besteht.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

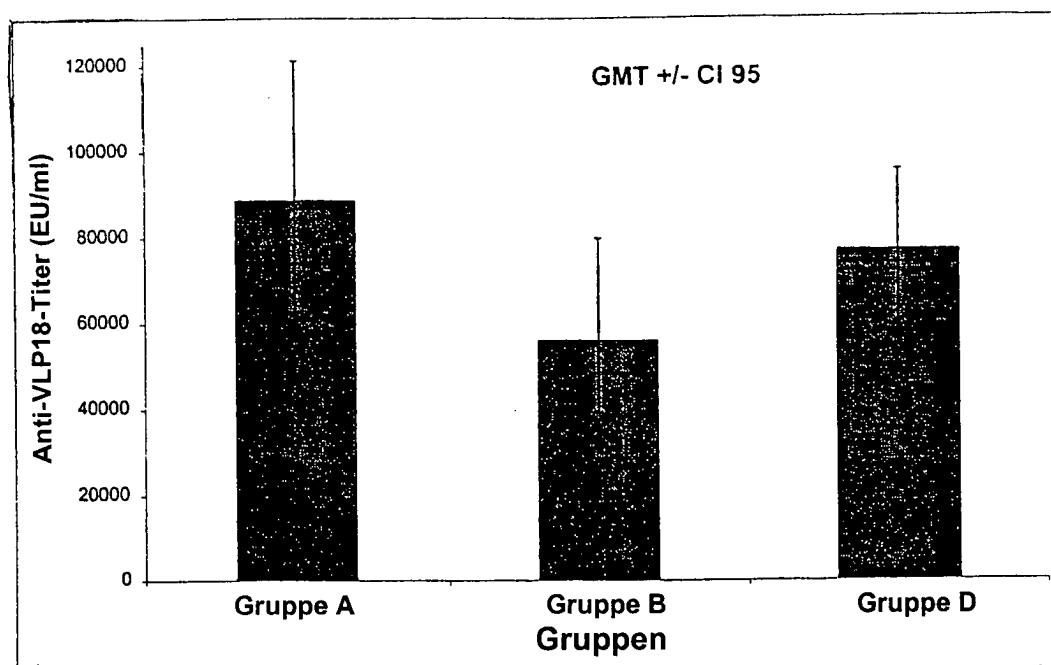
**Figur 1: Anti-VLP16-Reaktion am Tag 14 post II**

Ergebnisse auf individuelle Seren (EU/ml)



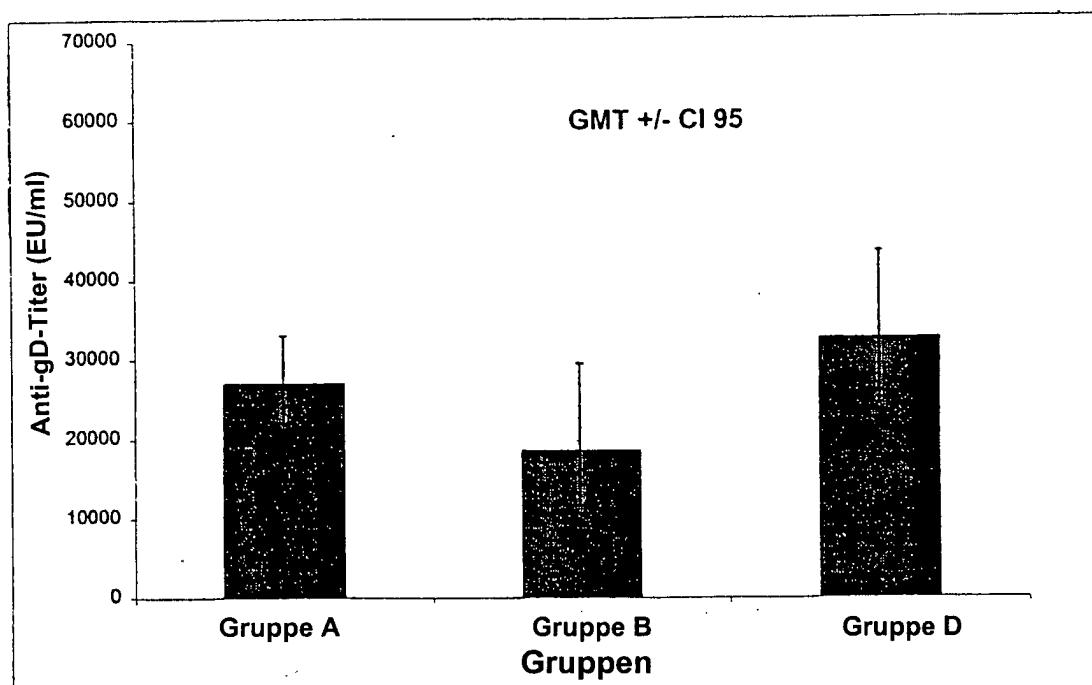
**Figur 2: Anti-VLP18-Reaktion am Tag 14 post II**

**Ergebnisse auf individuelle Seren (EU/ml)**



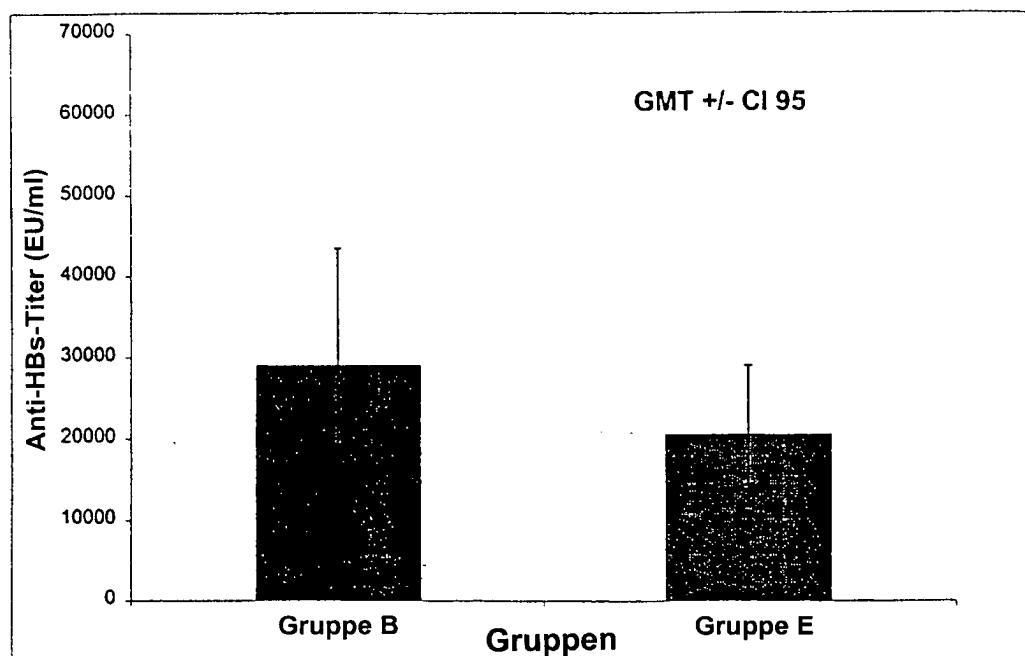
**Figur 3: Anti-gD-Reaktion am Tag 14 post II**

Ergebnisse auf individuelle Seren (EU/ml)



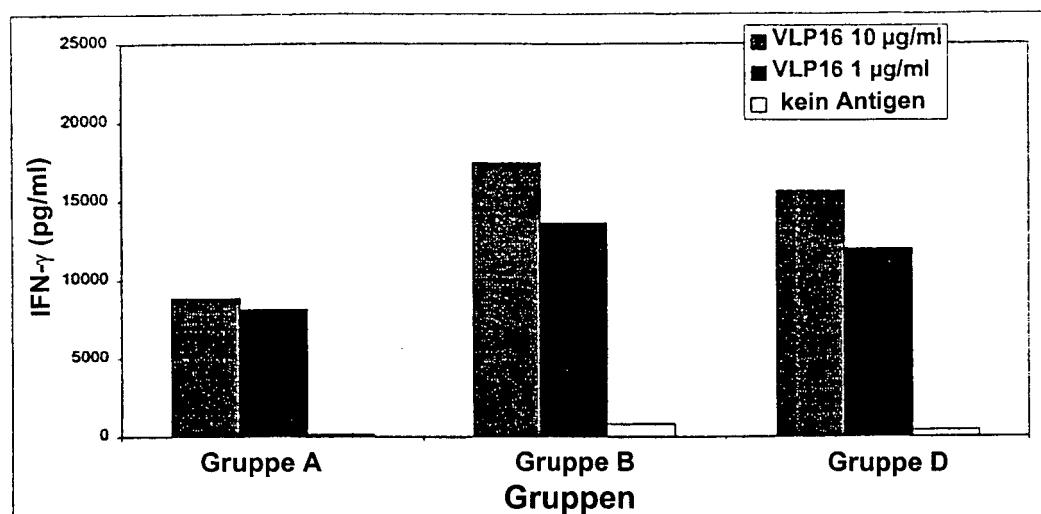
**Figur 4: Anti-HBs-Reaktion am Tag 14 post II**

**Ergebnisse auf individuelle Seren (EU/ml)**

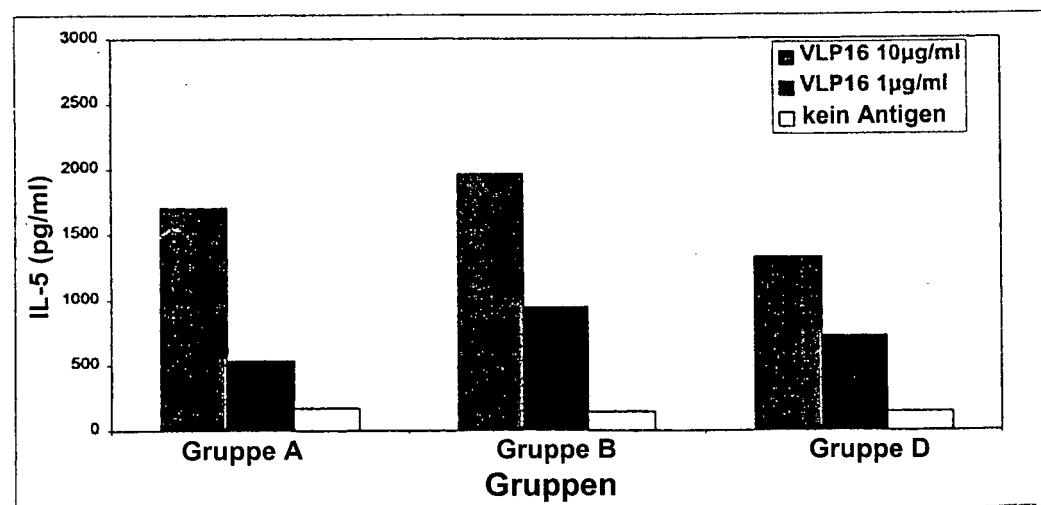


**Figur 5: Zytokinergebnisse - Tag 14 post II**

**IFN- $\gamma$ -Produktion nach in-vitro-Stimulation mit VLP16**

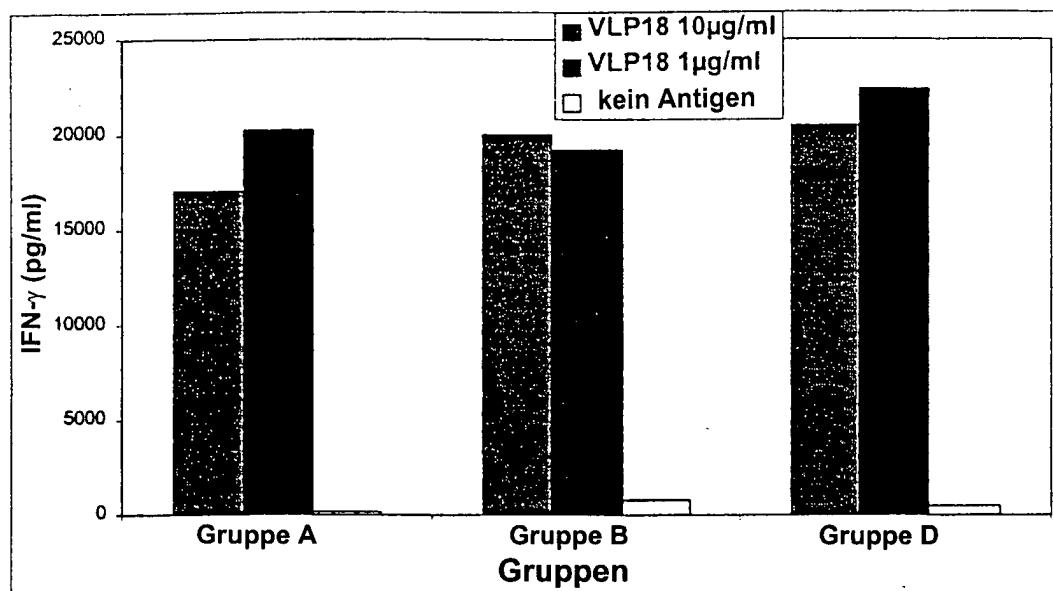


**IL-5-Produktion nach in-vitro-Stimulation mit VLP16**

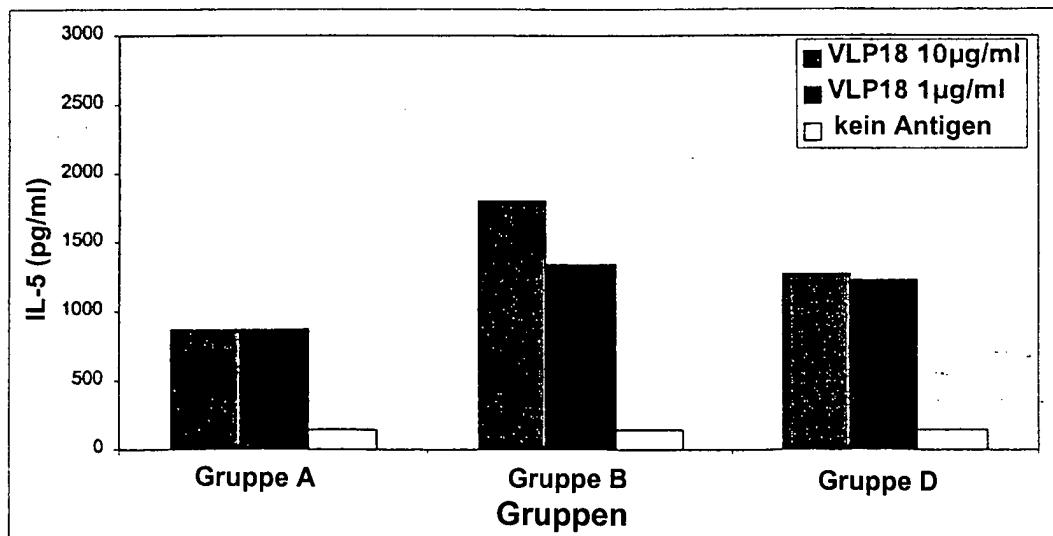


**Figur 6: Zytokinergebnisse - Tag 14 post II**

**IFN- $\gamma$ -Produktion nach in-vitro-Stimulation mit VLP18**

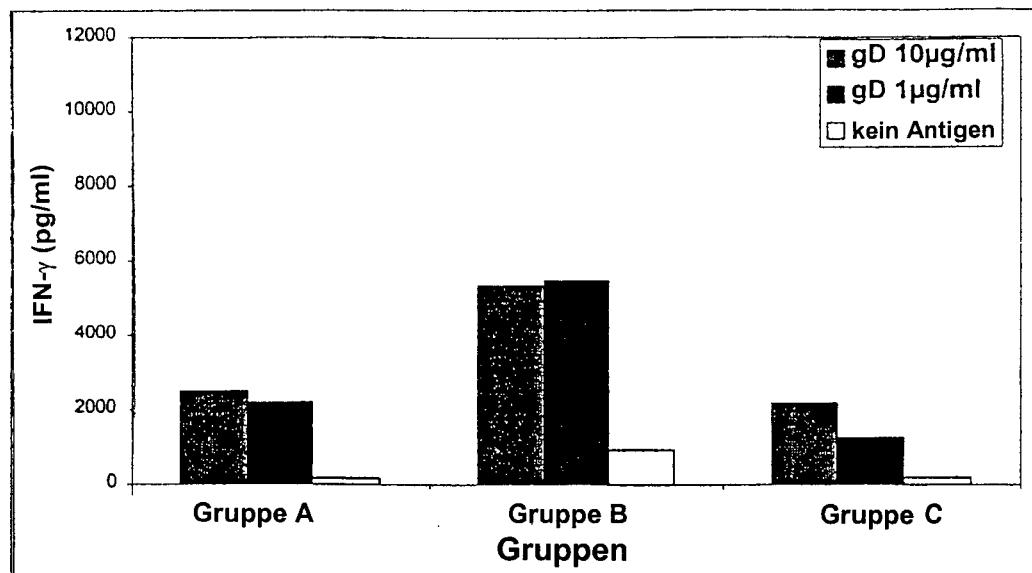


**IL-5-Produktion nach in-vitro-Stimulation mit VLP18**

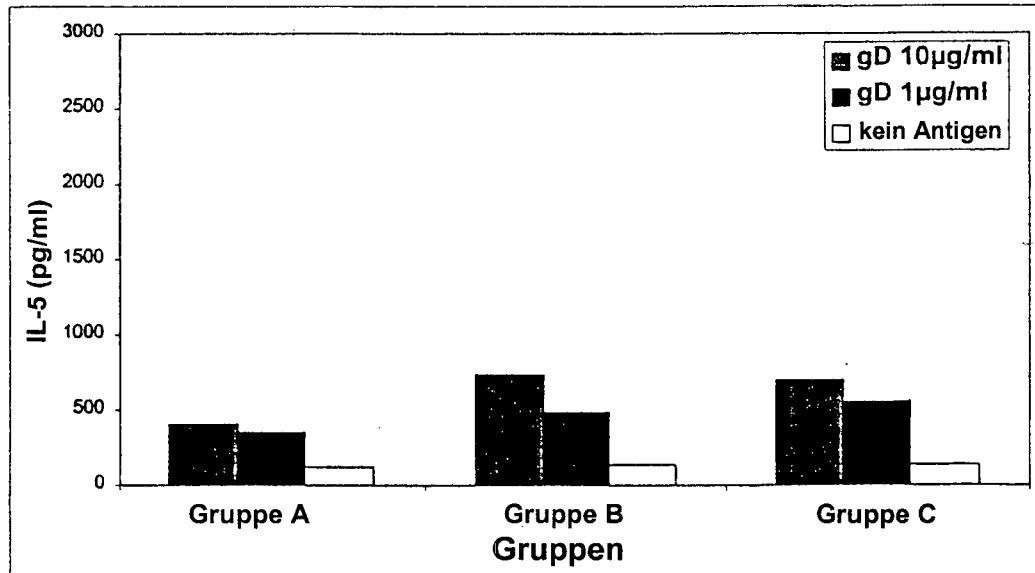


**Figur 7: Zytokinergebnisse - Tag 14 post II**

**IFN- $\gamma$ -Produktion nach in-vitro-Stimulation mit gD**

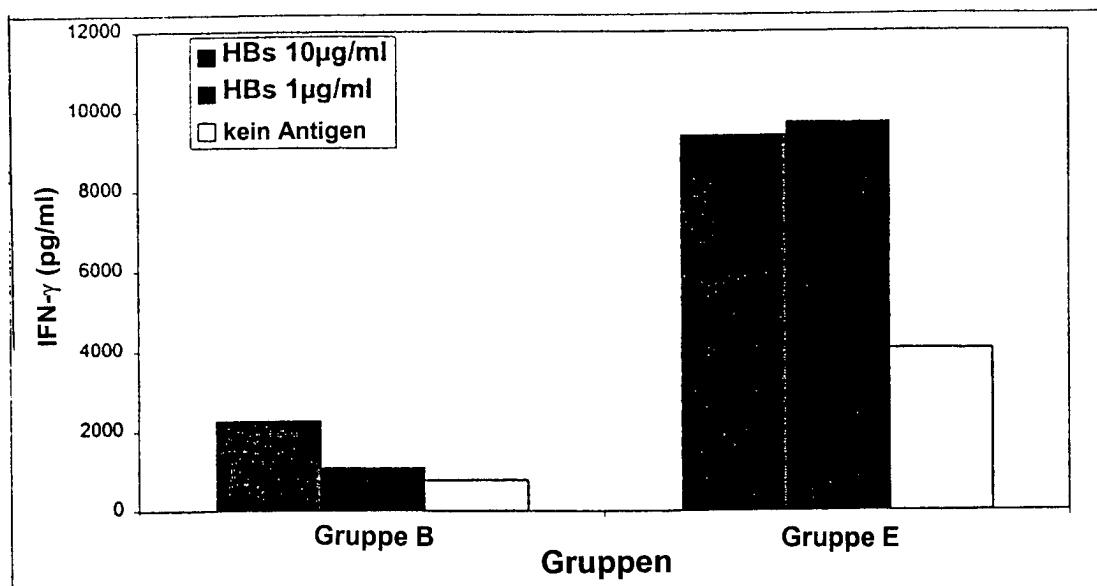


**IL-5-Produktion nach in-vitro-Stimulation mit gD**



**Figur 8: Zytokinergebnisse - Tag 14 post II**

**IFN- $\gamma$ -Produktion nach in-vitro-Stimulation mit HBs**



**IL-5-Produktion nach in-vitro-Stimulation mit HBs**

