



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **328680**

(13) **B1**

**NORGE**

(51) Int Cl.

*A61K 39/125 (2006.01)*

*A61K 39/13 (2006.01)*

### Patentstyret

|      |                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |      |                           |                              |
|------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------------------|------------------------------|
| (21) | Søknadsnr             | 20016211                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | (86) | Int.inng.dag og søknadsnr | 2000.03.17<br>PCT/FI00/00220 |
| (22) | Inng.dag              | 2001.12.18                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | (85) | Videreføringsdag          | 2001.12.18                   |
| (24) | Løpedag               | 2000.03.17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | (30) | Prioritet                 | 1999.06.24, US, 140872       |
| (41) | Alm.tilgj             | 2002.02.20                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |      |                           |                              |
| (45) | Meddelt               | 2010.04.26                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |      |                           |                              |
| (73) | Innehaver             | Heikki Hyöty, Minna Canthin katu 3 B, SF-33230 Tammerfors, FI-, Finland                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |      |                           |                              |
| (72) | Oppfinner             | Mikael Knip, Palomäentie 11 A, SF-33230 Tammerfors, FI-, Finland                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      |                           |                              |
| (74) | Fullmektig            | Heikki Hyöty, Minna Canthin katu 3 B, SF-33230 Tammerfors, FI-, Finland<br>Mikael Knip, Palomäentie 11 A, SF-33230 Tammerfors, FI-, Finland<br>Håmsø Patentbyrå ANS, Postboks 171, 4302 SANDNES, Norge                                                                                                                                                                                 |      |                           |                              |
| (54) | Benevnelse            | <b>Anvendelse av oral poliovirusvaksine (OPV) og ikke-polio enterovirusvaksine mot ikke-polio virussykdommer slik som type 1 diabetes og et vaksinepreparat omfattende nevnte virus.</b>                                                                                                                                                                                               |      |                           |                              |
| (56) | Anførte publikasjoner | M. HILTUNEN ET AL., "Immunisation and type 1 diabetes mellitus", Drug safety, vol. 20, nr. 3, 1999, side 207-212 , S. JUHELA ET AL., "Enterovirus infections and enterovirus specific T-cell responses in infancy", J. Med. Virology, vol. 54, 1998, side 226-232 , R. K. Zimmerman ET AL, "Poliovirus vaccine options", American family physician, vol. 59, nr. 1, 1999, side 113-118 |      |                           |                              |
| (57) | Sammendrag            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |      |                           |                              |

Levende virusvaksiner som omfatter svekkede vimser, mens andre vaksiner omfatter avlivede vimser eller deler derav. Det er nu funnet at immunresponsen som induseres av oralt poliovirusvaksine (OPV) som er en levende vaksine, er kryssreaktiv med ikke-polio enteroviruser. OPV er derfor brukbar ved prevensjon av ikke-polio enterovirus sykdommer, særlig type I diabetes mellitus (IDDM). OPV er også brukbar i kombinasjon med avlivede/subenhet ikke-polio enterovirusvaksiner, hvorved den forhindrer skadelige bivirkninger av den avlivede/subenhetvaksine ved å skifte immunresponsen fra en skadelig Th2-type-respons til en Th1-type-respons.

ANVENDELSE AV ORAL POLIOVIRUSVAKSINE (OPV) OG IKKE-POLIO ENTEROVIRUSVAKSINE MOT IKKE-POLIO VIRUSSYKDOMMER SLIK SOM TYPE 1 DIABETES, OG ET VAKSINEPREPARAT OMFATTENDE NEVNTE VIRUS

**Oppfinnelsens område**

- 5 Foreliggende oppfinnelse angår prevensjon av type 1 diabetes og andre ikke-polio enterovirus sykdommer ved et nytt vaksinasjonsregime basert på utstrakt immunisering ved i dag tilgjengelig oral poliovirus vaksine (OPV) og/eller ved nye ikke-polio enterovirusvaksiner.
- 10 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer prevensjon av type 1 diabetes mellitus (IDDM) og andre ikke-polio enterovirus sykdommer ved å eliminere risikoen for enterovirusinfeksjoner. Dette oppnås ved et nytt immuniseringsregime som er basert på induksjon av systemisk og lokal mukosal Th1-type T-celle immunitet ved orale poliovirusvaksineringer og eventuell induk-
- 15 sjon av Th2-type humoral immunitet ved en ny enterovirusvaksine som induserer nøytralisering av antistoffer mot egnede enterovirusserotyper. Disse to regimer kan benyttes separat eller i kombinasjon.
- 20 Mer spesielt angår oppfinnelsen anvendelsen av oral poliovirusvaksine (OPV) for fremstilling av en vaksine mot ikke-polio enterovirus sykdommer og særlig mot type 1 diabetes mellitus (IDDM). Når OPV benyttes sammen med en vaksine som induserer serotypespesifikk immunitet mot ikke-polio entero-

viruser, kan skadelige bivirkninger ved ikke-polio enterovirusvaksinen unngås. Foreliggende oppfinnelse gir således en vaksineblanding som omfatter de nevnte to vaksiner.

### Oppfinnelsens bakgrunn

5 Enterovirusinfeksjoner er vanligvis subkliniske, men forårsaker også forskjellige sykdomstyper. Typiske enterovirus sykdommer er meningitt, paralyse, myokarditt, generaliserte infeksjoner hos nyfødte, hånd-, fot- og munnsykdommer (munn- og klovtsyke), herpangina, pleurodynia, hepatitt, utslett, eksan-  
10 tema og respiratoriske sykdommer inkludert pneumonia. I tillegg er enterovirusinfeksjoner mistenkt for å spille en rolle i patogenesen av dilatert kardiomyopati, aterosklerose, postviral fatigue syndrom og type 1 diabetes mellitus.

Gruppen av enteroviruser inkluderer til sammen 64 forskjellige serotyper. Polioviruser er de mest kjente enteroviruser  
15 og omfatter 3 forskjellige serotyper (poliovirustypene 1, 2 og 3) som alle kan forårsake meningitt og typisk paralytiske poliomyelitt (flakidparalyse). Meningitt forårsakes hyppig av diverse ikke-polio enteroviruser som er den vanligste årsaken til aseptisk meningitt. Myokarditt forårsakes hovedsakelig av  
20 coxsackie B serotyper, men også andre enterovirus serotyper kan være involvert. Hånd-, fot- og munnsykdom forårsakes hovedsakelig av visse coxsackie A-serotyper, og alvorlige infeksjoner hos barn er relatert til coxsackie B serotyper. Pa-  
25 ralytiske sykdommer kan også forårsakes av noen andre serotyper enn poliovirusserotyper. Serotypene relatert til aterosklerose og type 1 diabetes er ikke kjent. I type 1 diabetes har den mest mistenkte vært coxsackievirusene B4 og B5, men også andre enn coxsackie B serotypene kan være involvert.

30 Den eneste enterovirusvaksine som har vært benyttet på mennesker, er poliovirusvaksinen. Denne vaksine inkluderer alle

tre poliovirus serotyper og gir effektiv prevensjon mot paralytisk poliomyelitt. Beskyttelsen er basert på induksjonen av nøytraliserende antistoffer mot disse serotyper og er serotype spesifikke. Således beskytter ikke nøytraliserende antistoffer som induseres av poliovirusvaksiner, mot noen andre enterovirus serotyper enn de tre poliovirus serotyper. Rollen til T-cellemediert immunrespons i beskyttelsen mot poliovirusinfeksjoner er ikke kjent. Det generelt aksepterte syn er at de kun spiller en mindre rolle, mens antistoffer er viktige med henblikk på eliminering av infeksjon og ved beskyttelse mot reinfeksjoner.

To forskjellige typer poliovirusvaksiner er utviklet. Den drepte, inaktiverede poliovirusvaksine (IPV; Salk-vaksinen) inkluderer formalininaktiverede polioviruser (alle 3 serotyper). Denne vaksine gis parenteralt ved bruk av subkutane injeksjoner. Den induserer en Th2-type immunrespons som karakteriseres ved sterk antistoffrespons og høye nivåer av nøytraliserende antistoffer mot alle poliovirus-serotyper og gir effektiv beskyttelse mot paralytisk poliomyelitt. Imidlertid induserer den kun svake lokale immunresponser i tarmen. Da tarmassosiert lymfoidvev er det primære replikasjonssete for polioviruser, kan IPV vaksine ikke beskytte mot poliovirusinfeksjon, men kun mot infeksjonskomplikasjonene. IPV kan kun indusere svake cytotoksiske T-celle immunresponser.

Den andre poliovirusvaksine er oralpoliovirusvaksine (OPV; Sabins vaksine) som inkluderer levende svekkede polioviruser (alle tre serotyper). Denne vaksine gis per os, og virusen replikerer på samme måte som villpolioviruser i legemet. Da vaksinen gis per os på samme måte som naturlige enterovirusinfeksjoner erverves, induserer den sterk lokal immunitet i innvollene, noe som forhindrer senere poliovirusinfeksjoner.

Således blir OPV-vaksinerte individer vanligvis ikke infisert med polioviruser på grunn av at virusen ikke er i stand til replikering i innvollene. Arten av denne beskyttelse er ikke fullstendig forstått, men er sannsynligvis avhengig både av  
5   nøytraliserende antistoffer og T-celle mediert immunitet. OPV inducerer sterkere T-celle-responser enn IPV og innfører hovedsakelig Th1-type T-celle-responser som karakteriseres ved sterke cytotoksiske T-celle-responser. Zimmerman et al., 1999, spekulerer omkring kombinasjoner av IPV og OPV vaksiner.  
10   

Vaksiner mot ikke-polio-enteroviruser er ikke tilgjengelige for humananvendelse. Grunnen er at det store antall enterovirus-serotyper gjør det vanskelig å lage en pan-enterovirus-vaksine, og på den annen side er serotypene som forårsaker de  
15   fleste alvorlige ikke-polio-enterovirus sykdommer, meget variable. Myokarditt og kardiomyopati har vært assosiert med coxsackie B-gruppe-viruser, meningitt og neonatal infeksjon med flere forskjellige serotyper, og praktisk talt intet er kjent om hvorvidt serotypene muligens er relatert til utviklingen av aterosklerose. I type 1 diabetes er de ansvarlige serotyper ikke kjent, bortsett fra at polioviruser ikke er involvert. Det generelle syn er at poliovirusvaksiner ikke skulle være effektive ved prevensjon av type 1 diabetes eller andre ikke-polio enterovirus sykdommer, men at prevensjon av  
20   ikke-polio-enterovirus-sykdommer vil kreve nye vaksiner som skulle indusere nøytraliserende antistoffer mot serotypene som skal beskyttes. En annen grunn for mangelen på human ikke-polio-enterovirus-vaksiner er at sikkerheten hos slike vaksiner ikke pålitelig er bekreftet. Således er det ingen  
25   effektiv vaksine eller noen annen behandling for prevensjon av ikke-polio-enterovirus-sykdommer hos mennesker. Det har vært allmenn og vitenskapelig bekymring for at poliovirusvaksiner faktisk kunne øke risikoen for diabetes. Hiltunen et  
30

al., 1999, drøftet disse mistankene, men de fant ikke belegg for en negative effekt av poliovaksiner på IDDM.

Inaktiverte og subenhetvaksiner som inkluderer visse coxsackie B-viruser, har vært testet i dyremodeller. De har induisert gode antistoffnivåer i mus og kaniner og beskyttet effektivt fra infeksjoner forårsaket av de serotyper som var inkludert i vaksinen ("Fholman et al.", 1990 og 1993; "See and Tilles", 1994 og 1997). Imidlertid har disse vaksiner ikke vært testet på menneskelige vesener. Hovedgrunnen til dette er at dagens kunnskap til mekanismer ved immunbeskyttelse mot enteroviruser er begrenset, og sikkerheten ved slike vaksiner ikke kan garanteres. Sikkerhetsaspektet er blitt meget viktig etter oppdagelsen av de uventede bivirkninger forbundet med bruken av inaktivert, respiratorisk syncytial-virus (RSV) og meslingsvaksiner i mennesker ("Fulginiti et al.", 1967, "Harris et al.", 1969; "Kapikian et al.", 1969). Disse vaksiner øket paradoksalt alvoret eller modulerte forløpet av naturlige infeksjoner. Den mest sannsynlige forklaring på disse ugunstige virkninger er at disse typer av inaktiverte vaksiner generelt inducerer god antistoffrespons, men meget dårlig cytotoxisk T-celle-respons. Således kan de ha induisert et skift mot Th2-type antistoff-mediert immunitet som resulterte i atypiske symptomer. Dette antyder behovet for meget detaljerte data når det gjelder effekten av vaksinen på forløpet av naturlige infeksjoner og en omhyggelig evaluering av sikkerhetsaspektene.

Et annet problem har vært at beskyttelsen som oppnås ved vaksiner av denne type, avhenger av induksjonen av nøytraliserende antistoffer, og beskyttelsen er derfor serotype spesifikk. I henhold til dette bør vaksinen inneholde de serotyper som skal forhindres. Som beskrevet ovenfor, varierer, i ikke-polio enterovirus sykdommer, spekteret av ansvarlige seroty-

per ganske mye fra sykdom til sykdom, og selv innen en sykdom som type 1 diabetes, er de eksakte serotyper av ansvarlige viruser ennå ikke identifiserte. Således er sammensetningen for enterovirus-serotypene som skal beskyttes, ikke kjent og  
5 kan variere fra en sykdom til den neste.

Fordelen ved immuniseringsregimet ifølge foreliggende oppfinnelse er at det er basert på den orale poliovirusvaksine (OPV) som i ekstensiv grad har funnet anvendelse i så å si alle verdens land, og som har vist seg å være meget sikker og  
10 effektiv. Poliovirusvaksinene er i virkeligheten noen av de mest effektive og sikreste vaksiner som noen gang er utviklet og har ført til en så å si fullstendig utryddelse av poliovirusinfeksjoner fra jordens overflate. Den eneste klinisk relevante komplikasjon ved OPV er risikoen for vaksineassosiert  
15 paralyse. Imidlertid er denne frekvensen ekstremt lav (cirka 1 per 1-10 millioner vaksiner).

Det generelle syn er at immunitet mot enterovirus-infeksjon er basert på nærværet av nøytraliserende antistoffer mot virusen. Disse antistoffer kan effektivt nøytralisere virusen  
20 når den trer inn i legemet. Signifikansen ved nøytraliserende antistoffer reflekteres ved det faktum at pasienter som har unormalt lave nivåer av antistoffer på grunn av en immunmangel, er særlig ømfintlige overfor enterovirusinfeksjoner. Nøytraliserende antistoffer kan detekteres for forlengede  
25 tidsrom etter infeksjonen. Disse bidrar til utryddelsen av virusen under primærenteroinfeksjon og beskytter mot reinfeksjoner. Imidlertid kan de ikke beskytte mot infeksjoner som forårsakes av andre serotyper. Således er beskyttelsen ved hjelp av disse antistoffer, serotypespesifikk. I henhold til  
30 dette antas det generelt at det er vesentlig for effektiviteten ved enterovirus-vaksiner at vaksinen er i stand til å inducere høye nivåer av nøytraliserende antistoffer mot seroty-

pene som det skal beskyttes mot. Den eneste i dag i utstrakt grad benyttede enterovirusvaksine er poliovirusvaksine som inkluderer alle tre poliovirus-serotyper.

Foreliggende oppfinnelse er basert på det funn at i motset-  
5 ning til det generelle paradigme kan orale poliovirusvaksiner også beskytte mot andre enterovirusinfeksjoner enn poliovirusinfeksjoner og kan derfor benyttes for prevensjon av forskjellige ikke-polio- enterovirus-sykdommer som har vært beskrevet i detalj i avsnittene ovenfor, og sykdommer der  
10 rollen til enterovirusene ikke har vært mistenkt for å inkludere type 1 diabetes mellitus, kronisk fatigue syndrom eller aterosklerose. Beskyttelsen skulle baseres på effektiv induksjon av T-celle-responser og lokal mukosal immunitet ved gjentatte OPV-vaksinasjoner. T-celle immunresponser er kjente  
15 for å kryss-reagere mellom visse enterovirus-serotyper når de analyseres *in vitro* ved T-celle proliferasjonsanalyse ("Beck and Tracy", 19909; "Graham et al.", 1993). Imidlertid var det ikke kjent hvorvidt denne kryssreaktivitet hadde noen biologisk signifikans *in vivo*. Det var heller ikke kjent i hvilken  
20 grad T-celle-responsene som induseres ved OPV vaksinasjonene, kan kryssreagere med ikke-polio-enteroviruser, og hvorvidt dette hadde noen klinisk relevans.

Foreliggende oppfinnere har tidligere evaluert disse spørsmål ved å analysere enterovirus spesifikke T-celle-responser hos  
25 unge barn. Det ble funnet at det hos enkelte barn som aldri hadde hatt noen coxsackievirus B infeksjon, i henhold til mangelen på nøytraliserende antistoffer hadde sterk T-celle-proliferasjonsrespons mot renset coxsackievirus B4 antigenet, noe som sannsynligvis reflekterer kryssreaktiviteten for T-celler som til å begynne med har vært induert av andre enterovirusinfeksjoner ("Juhela et al.", 1998). I tillegg indu-  
30 serte poliovaksinering i en alder av 6 måneder sterkere T-

celle respons mot renset coxsackievirus B4 og poliovirusantigener hos barn som hadde serologiske tegn på en tidligere enterovirusinfeksjon sammenlignet med barn som ikke hadde noen tidligere enterovirusinfeksjoner ("Juhela et al.", 1998).

5 Dette antyder at T-celler kan kryssreagere mellom polioviruser og ikke-polio-enteroviruser.

Foreliggende formål er å benytte denne T-celle kryssreaktivitet ved priming av kryssreaktiv T-celle hukommelse ved bruk av OPV-vaksinasjoner. I sin tur vil dette gjøre immunresponsen til andre enteroviruser sterkere og hurtigere

10 (sekundær-type-responser), og på denne måte øker utryddelses-hastighetene for virusen under akutte ikke-polio enterovirusinfeksjoner. OPV kan ikke totalt beskytte mot disse infeksjoner da det ikke inkluderer nøytraliserende antistoffer mot

15 de ikke-polio enteroviruser, men kan beskytte mot viremia og alvorlig sykdom ved potensiering av T-celle-responsene ved induksjon av kryssreaktiv hukommelses T-celler. Denne type T-celle-hjelp kan potensierte både produksjonen av nøytraliserende antistoffer under infeksjonen så vel som cytotoksiske

20 T-celle-responser mot ikke-polio enteroviruser. Det kan også utløse antistoffer mot andre enteroviruser enn den serotype som forårsaker den akutte infeksjon ved å elicitere anamnesticke immunresponser. Induksjon av anamnesticke responser betyr at OPV stimulerer hukommelses T-celle-klonene som stammer fra tidligere enteroviruseksponeringer og fører på denne

25 måte til deres aktivering og induksjon av antistoffer mot alle disse serotyper. Denne type anamnesticke respons benyttes i foreliggende regime for å øke enterovirus antistoffnivåene hos gravide kvinner for derved å gi deres barn beskyttelse.

### Oppsummering av oppfinnelsen

En gjenstand for foreliggende oppfinnelser er å tilveiebringe midler for prevensjon av ikke-polio-enterovirus sykdommer og særlig type 1 diabetes (IDDM).

- 5 En annen gjenstand for oppfinnelsen er å tilveiebringe en vaksine eller en vaksineblanding som kan benyttes for prevensjon av disse sykdommer.

Nok en gjenstand for oppfinnelsen er å unngå skadelige bivirkninger av avlivede eller subenhet enterovirus vaksiner  
10 som induserer serotype spesifikk immunitet.

Nok en gjenstand for oppfinnelsen er anvendelsen av en polio-vaksine og/eller en ikke-polio-enterovirus-vaksine ved fremstilling av en vaksine mot enterovirus-sykdommer og særlig type 1 diabetes (IDDM).

- 15 Det beskrives en fremgangsmåte for prevensjon av ikke-polio-enterovirus-sykdommer eller prevensjon av type 1 diabetes mellitus (IDDM) omfattende administrering av en effektiv mengde av en oral poliovirus-vaksine til et menneskelig individ.

- 20 Oppfinnelsen tilveiebringer videre anvendelsen av oral poliovirus vaksine (OPV) for fremstilling av en vaksine mot ikke-polio-enterovirus-sykdommer og særlig for fremstilling av en vaksine mot type 1 diabetes mellitus (IDDM).

Oppfinnelsen er også rettet mot en vaksineblanding omfattende  
25 oral poliovaksine (OPV) og en vaksine som induserer serotype spesifikk immunitet mot ikke-polio enteroviruser. Fortrinnsvis omfatter ikke-polio-enterovirus-vaksinen enterovirus-antigener som representerer diabetogene enterovirus-serotyper eller en cocktail derav.

Oppfinnelsen angår videre anvendelsen av en vaksine som inducerer serotype spesifikk immunitet mot en eller flere serotyper av diabetogenisk ikke-polio enteroviruser valgt fra gruppen omfattende coxsackievirus B-serotyper 1, 2, 3, 4, 5 og 6, 5 echovirus serotyper 3, 4, 6, 9, 11, 22 og 30 og coxsackievirus A-serotyper 9 og 16 for fremstilling av en vaksine mot type 1 diabetes mellitus (IDDM). Det beskrives videre en metode for prevensjon av ikke-enterovirale sykdommer, særlig IDDM, omfattende administrering av en effektiv mengde av vaksinen til et menneskelig individ. 10

De nevnte vaksiner kan også anvendes for en fremgangsmåte for prevensjon av ikke-polio-enterovirus-sykdommer, særlig type 1 diabetes mellitus (IDDM) i avkom omfattende administrering av en effektiv mengde av en oral poliovirus-vaksine (OPV) til en 15 svanger kvinne, eller omfatter administrering av en effektiv mengde av oral poliovirus-vaksine (OPV) pernatalt til den svangre kvinne og postnatalt til babyen.

En metode for prevensjon av ikke-polio-enterovirus-sykdommer, særlig IDDM, er fremskaffet ved administrering av gjentatte 20 doser av en effektiv mengde av oral poliovirus vaksine (OPV) til barn.

Vaksinene kan anvendes til en fremgangsmåte for å unngå skadelige bivirkninger av ikke-polio-enterovirus-vaksiner og som inducerer serotype spesifikk immunitet mot ikke-polio- 25 enteroviruser, omfattende administrering av en effektiv mengde av nevnte ikke-polio-enterovirus-vaksine samtidig, før eller etter administrering av en effektiv mengde oral poliovirus-vaksine (OPV) til et menneskelig individ.

## Kort beskrivelse av figuren

Figur 1 viser den kumulative prevalens av IDDM i kohorter som aldri har mottatt OPV, eller som har fått en dose OPV i barndommen eller *in utero*.

## 5 Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

"OPV" er en forkortelse for oral poliovirus vaksine og betyr en vaksine som omfatter levende svekkede polioviruser av en, to eller alle de tre serotyper eller infeksiose cDNA eller RNA derav. Ved siden av å kunne administreres oralt, kan OPV  
 10 også gis ved en hvilken som helst annen mukosal vei som *per rektum* eller intranasalt eller kan også gis parenteralt. OPV omfattende svekkede virusser av alle tre serotyper er kommersielt tilgjengelige og kalles også Sabins vaksine.

"IPV" er en annen kommersielt tilgjengelig poliovaksine som  
 15 omfatter avlivede, inaktiverte polioviruser av alle tre serotyper. Denne vaksine kalles Salks vaksine.

"IDDM" betyr insulinavhengig diabetes mellitus som er det samme som type 1 diabetes mellitus eller type 1 diabetes.

"Ikke-polio-enterovirus-sykdommer" betyr en hvilken som helst  
 20 sykdom som er forårsaket av ikke-polio enteroviruser som meningitt, paralyse, myokarditt, generaliserte infeksjoner hos nyfødte, hånd-, fot- og munnsykdom, herpangina, pleurodynia, hepatitt, utslett, exantemas, respiratoriske sykdommer inkludert pneumonia, dilatert kardiomyopati, aterosklerose,  
 25 postviral fatigue-syndrom og type 1 diabetes mellitus.

"En effektiv mengde" av en vaksine er en mengde som er i stand til å elisitere en beskyttende immunrespons hos resipienten, enten ved å elisitere nøytraliserende antistoffer eller en cellemediert respons, eller begge deler.

En vaksine som induserer "serotype spesifikk immunitet" er det samme som en vaksine som induserer nøytraliserende anti-stoffer. Slike vaksiner kan være avlivede vaksiner, subenhetvaksiner eller cDNA- eller RNA fragmentvaksiner, der fragmentet koder en antigenisk del av en inaktivert form av virusen.

En "avlivet vaksine" er det samme som en inaktivert vaksine, det vil si en vaksine omfattende viruser som er behandlet slik at de har mistet sin infektivitet. En "subenhetvaksine" omfatter kun en antigenisk del eller deler av virusene, ikke hele virusene.

En "diabetogenisk enterovirus" er en enterovirus som er assosiert med induksjonen av diabetes. Disse viruser representeres ved gruppen bestående av coxsackievirus B serotypene 1, 2, 3, 4, 5 og 6, echovirus serotypene 3, 4, 6, 9, 11, 22 og 30, og coxsackievirus A serotypene 9 og 16. Imidlertid kan også andre serotyper av ikke-polio enteroviruser være involvert i induksjonen av diabetes.

Hver av alle tre poliovirus serotyper kan forårsake paralytisk sykdom. Oral poliovirus-vaksine som benyttes ifølge oppfinnelsen, kan inneholde kun en av disse eller deres forskjellige kombinasjoner. Fortrinnsvis inneholder den en cocktail av alle disse tre serotyper (serotypene 1-3). Vaksinevirusene av OPV som benyttes, er svekkede polioviruser hvis virulens er redusert. Dette kan gjennomføres ved forskjellige metoder inkludert seriepassasje av virusen i cellekulturer, antigenisk modifikasjon ved kjemiske behandlinger, konstruksjon av rekombinante eller chimerviruser, mutagenisering av viral genom, delesjon av visse genområder, seleksjon av temperatursensitive mutanter eller bestråling. Alternativt kan vaksinevirusene være svekkede naturlige polyvirusisolater eller infeksiose polivirus cDNA eller RNA med redusert evne til

å forårsake klinisk sykdom. Karakteristisk er det presenterte immuniseringsregime basert på bruken av kommersielt tilgjengelige og utstrakt brukte orale Sabin poliovirus vaksine som inneholder alle tre poliovirus serotyper i hver vaksinedose.

5 Den administreres oralt og replikeres i innvollene, men forårsaker ikke paralytisk polio eller andre kliniske manifestasjoner.

Hver immuniseringsdose av OPV inkluderer infektive viruser eller infektiv RNA eller cDNA i en mengde som er i stand til  
10 å gi infeksjoner hos mennesker. Denne dose ville tilsvare det som benyttes i den tradisjonelle Sabin-type levende orale poliovirus-vaksine som inkluderer minimum  $10^{5,5} - 10^6$  TCID<sub>50</sub> for poliovirus type 1,  $10^5$  TCID<sub>50</sub> for poliovirus type 2 og  $10^{5,5} - 10^{5,8}$  TCID<sub>50</sub> for poliovirus type 3, alt levende svekkede Sabin-stammer av polioviruser. Dosene kan også være andre hvis  
15 de er bekreftet sikre og infeksijøse. (TCID = tissue culture infectious dose; TCID<sub>50</sub> = den dose som infekterer 50 % av kulturene.)

De nye ikke-polio enterovirus vaksiner i henhold til det her-  
20 værende immuniseringsregime kan inkludere enten hele viruser hvis infektivitet er inaktivert, eller subenhetvaksiner inneholdende visse antigeniske strukturer av virusene eller deres kombinasjon eller fragmenter av viral RNA eller cDNA som koder for antigeniske strukturer av virusen. Inaktiverte virus-  
25 ser kan fremstilles ved propagering av virusen i cellekulturer og ved rensing fra infekte celler og kulturmedia ved høyhastighetssentrifugering i en densitetsgradient dannet av sukrose eller et annet høydensitetsmedium. Alternativt kan virusen renses ved kromatografi. Infektiviteten for de rense-  
30 de viruser ødelegges ved inaktivering av virusene ved kjemisk behandling (for eksempel formalininaktivering lik den som benyttes for å fremstille IPV), bestråling eller varmebehand-

ling. Sub-enhet-vaksiner kan bestå av rensede virale proteiner eller rekombinante virale proteiner, syntetiske peptider tilsvarende virale antigeniske epitoper eller tomme virale kapsider som fremstilles under infeksjon, men som mangler det  
5 virale genom. Disse subenhetvaksiner kan administreres enten som sådanne eller konjugert til haptener eller bærere (for eksempel ISCOM-partikler).

De nye ikke-polio enterovirus-vaksiner kan gis parenteralt eller mukosalt som *per os*, *per rektum* eller intranasalt. Hver  
10 immuniseringsdose inkluderer virale strukturer i en titer som er i stand til å indusere riktig immunrespons hos mennesker. Denne dose vil tilsvare det som benyttes i inaktivert Salk-type poliovirus-vaksine inkludert 1,8 - 2 µg viralt protein per hver dose og 20 - 40 antigenisk D-enheter av poliovirus-  
15 type 1, 4 - 8 antigeniske D-enheter av poliovirus-type 2 og 16 - 32 antigeniske D-enheter av poliovirus-type 3. Dosen kan også være en annen hvis det er bekreftet at den er sikker og immunogenisk.

I tillegg til de aktive bestanddeler som eliciterer en immun-  
20 respons kan OPV og ikke-polio enterovirus-vaksinene som benyttes ifølge oppfinnelsen, omfatte farmasøytisk akseptable drøyemidler, bærere, haptener og adjuvanter. Eksipienter, bærere, haptener og adjuvanter kan omfatte for eksempel fenoksyetanol, magnesiumklorid, sukrose, tiomersal, formaldehyd,  
25 fenol, antibiotika (preservativer) eller aluminiumsalter, ISCOM-partikler, bærerproteiner (for eksempel koleratoksin), liposomer eller proteinmiceller (haptener/adjuvanter).

Et nytt immuniseringsregime for prevensjon av sykdommer forårsaket av ikke-polio enteroviruser vises i tabell 1.

---

**Tabell 1. Hovedregime**

---

**Aksjon 1. OPV under graviditet**

- 5 Gis fortrinnsvis i det første trimester, men kan også gis senere under graviditet. Kan også gis til kvinner som er i fertil alder, men ikke gravide.

**Aksjon 2. OPV i barndommen**

- 10 Gis i alderen 0, 6, 10 og 14 uker, boostere ved høyere alder (for eksempel hvert 5. år).

**Aksjon 3. Avlivede/subenhetvaksiner**

Gis i en alder av 3, 6 og 12 måneder, boostere ved høyere alder. Kan også gis gravide mødre.

- 
- 15 Aksjonene 1, 2 og 3 kan benyttes separat eller i forskjellige kombinasjoner. Timing av barndoms OPV-vaksinasjoner i aksjon 2 kan variere, men de første bør fortrinnsvis gis i en alder av 3 måneder.

- 20 Avlivede eller subenhetvaksiner inkluderer en eller flere av de følgende enterovirus serotyper eller deres antigeniske strukturer: coxsackievirus B serotypene 1, 2, 3, 4, 5 og 6, echovirus serotyper 3, 4, 6, 9, 11, 22 og 30, coxsackievirus A serotypene 9 og 16. Disse kan gis ved graviditet og i varierende aldre i barndommen med boostere senere i livet. Avlivede eller subenhet enterovirusvaksiner kan gis samtidig, før
- 25 eller etter at OPV er gitt.

---

Beskyttelse mot ikke-polio-enteroviruser induseres ved utsøkt immunisering ved gjentatte doser av levende, svekkede orale

poliovirus-vaksiner (OPV). Regimet inkluderer prenatale og postnatale OPV-vaksinasjoner som kan benyttes i kombinasjon eller separat. Prenatal vaksinasjon gjennomføres ved å gi OPV til gravide kvinner for å beskytte barnet *in utero* og i spe-  
 5 barnsalderen (aksjon 1 i tabell 1). Denne beskyttelse er basert på anamnestisk immunrespons som induseres av OPV-vaksinasjon. Anamnestisk respons skyldes aktiveringen av kryssreaktiv enterovirus spesifikke hukommelses T-celle kloner og fører til økninger i antistoffnivåene mot disse enterovirus serotyper hvortil mødrene har vært eksponert før OPV-  
 10 vaksinasjon. Anamnestisk antistoffrespons hos moren beskytter barnet fordi IgG klassen maternale antistoffer overføres til føtus via placenta og beskytter således barnet inntil en alder på 6-12 måneder når maternelle antistoffer forsvinner fra  
 15 barnets kretsløp.

Postnatal vaksinasjon, virkning 2, gjennomføres som OPV vaksinasjonsoppsett generelt, men kan være mer ekstensiv for å få maksimal stimulering av kryssreaktiv T-celle immunitet (tabell 1). Den inkluderer gjentatte vaksinasjoner, først de  
 20 som gis ved fødsel og under de første uker av livet fulgt av booster vaksiner i barndommen med noen års intervaller (som i WHO EPI-programmet). OPV-vaksinasjon *per os* inkluderer også en sterk lokal immunrespons i mukosale overflater og særlig i tarmen. Dette er viktig fordi primær replikasjonssete for en-  
 25 teroviruser er tarmassosiert lymfoidvev. Denne lokale immunitet søkes også for ikke-polio enteroviruser på grunn av den OPV induserte kryss-reaktive T-celle-respons og induksjonen av lokalproduksjon av interferoner.

Aksjonene 1 og 2 i dette regimet kan kombineres med nye ikke-  
 30 polio enterovirusvaksiner som induserer serotype spesifikk immunitet for å oppnå maksimal protektiv effekt mot ikke-polio enteroviruser (aksjon tabell 3 i tabell 1). Serotype

spesifikk immunitet kan induseres av avlivede enterovirus partikler eller subenhetvaksiner som bærer visse enterovirus strukturer eller peptider. Denne serotype spesifikke vaksine kan gis gravide mødre så vel som barn som beskrevet i tabell

1. Den serotype spesifikke vaksine inkluderer fortrinnsvis en av de følgende enterovirus-serotyper (coxsackievirus B serotypene 1, 2, 3, 4, 5 og 6, echovirus-serotypene 3, 4, 6, 9, 11, 22 og 30, og coxsackievirus A serotypene 9 og 16). Denne type avlivede eller subenhetvaksiner induserer effektiv anti-

stoffrespons, men beskyttelsen er spesifikk for de virusser som er inkludert i vaksinen (beskyttelse ved nøytralisering av antistoffer er serotype spesifikk). I en slik kombinasjon kan OPV benyttes for å gi ytterligere beskyttelse ved kryss-

reaktiv T-celle respons mot serotypene som ikke er inkludert i den avlivede/subenhetvaksine. OPV kan også benyttes for å

booste antistoffresponsene som induseres av avlivede/subenhetvaksiner. OPV kan også benyttes for å styre immunresponsene som induseres av avlivede/subenhetvaksiner til Th1-type responser heller enn Th2-type responser. Th2-type responser

induseres karakteristisk av avlivede/subenhetvaksiner og kan assosieres med alvorlige bivirkninger som fører til alvorlige forløp av naturlige infeksjoner i vaksinerte individer (slik det ble observert hos individer vaksinert med avlivede RSV eller meslingvaksiner). OPV inkluderer på samme måte som andre

levende vaksiner hovedsakelig Th1-type respons som fører til cytotoksisk T-celle responser og således kan motvirke Th2-type responsene som induseres av avlivede/subenhetvaksiner ved å indusere kryssreaktiv Th1-type T-celler. For å unngå Th2-responsene kan OPV gis enten før, samtidig med eller

etter at de avlivede/subenhetvaksiner er gitt.

Således inkludere det foreliggende regimet OPV-vaksinasjoner for å indusere systemisk T-celle responser og lokal mukosal immunitet så vel som anamnesticke antistoffrespons hos gra-

vide mødre (aksjoner 1 og 2). OPV vaksinasjoner kan kombineres med nye inaktiverte eller subenhetenterovirus vaksiner (aksjon 3). Denne kombinasjon vil gi maksimal preventiv effekt (nøytralisering av antistoffer induisert av avlivede/subenhetvaksiner er de første barrierer mot infeksjoner, og T-celle immunitet induisert av OPV understøtter utryddelse av infeksjon). OPV kan også benyttes i kombinasjon med inaktivert eller subenhert vaksine for å styre eller booste deres virkning eller å forhindre mulige skadelige bivirkninger forårsaket av Th2-type bias i immunresponsene på enteroviruser som kan være forårsaket av inaktiverte eller subenhetvaksiner.

Det er funnet at det foreligger uventede bivirkninger ved IPV vaksiner som øker risikoen for komplikasjoner av ikke-polio enterovirusinfeksjoner som type 1 diabetes ved å rette en immunrespons mot ikke-polio enteroviruser i Th2-retning. Imidlertid er OPV fordelaktig, fordi den reduserer risikoen for komplikasjoner ved ikke-polio enterovirusinfeksjoner og vaksinasjoner av inaktivert/subenhet ikke-polio enterovirusvaksiner (for eksempel mot diabetes) ved å inducere kryssreaktive hukommelses-T-celler, ved å styre immunresponsen til ikke-polio enteroviruser inn i tabell 1h-retning og ved å innføre lokal beskyttelse i de mukosale vev.

En fordel ved oppfinnelsen er at den er basert på en utstrakt brukt og meget sikker vaksine (OPV), men gir en ny indikasjon for denne vaksine som til nu ikke har vært foreslått. De nye aspekter er også at oppfinnelsen benytter sterke T-celle-responser som indueres av levende OPV-vaksine, kryssreaktiviteten for disse responser mellom forskjellige enterovirus serotyper, induksjon av lokal immunrespons ved OPV i mukosale overflater i farynx og i tarm, vaksinasjon av både gravide kvinner og barn, og eventuell kombinasjon av OPV og nye sero-

type spesifikke avlivet/subenhet vaksiner for å booste deres virkning og å unngå bivirkningene som er relatert Th2-baserte responser. Et ytterligere nytt aspekt er at den inaktiver-  
te/subenhetvaksine inkluderer serotyper som er av den største  
5 betydning i patogenese av alvorlige ikke-polio enterovirus-  
sykdommer inkludert type 1 diabetes.

Vaksinasjonsregimet kan benyttes i hele befolkningen eller i spesifikke høyrisikogrupper som barn med genetisk risiko alleler for type 1 diabetes, barn med diabetes i første grads  
10 slektninger eller barn som er positive for diabetesrelaterte autoantistoffer.

Vaksinasjonsregimet er det eneste som er mulig og som i dag er tilgjengelig for prevensjon av ikke-polio enterovirus sykdommer hos mennesker. Det kan implementeres til klinisk arbeid umiddelbart, da det er basert på i dag tilgjengelig ut-  
15 strakt viten og en godt tolerert vaksine (OPV). Den kan kobles med inaktivert eller subenhet enterovirus vaksiner for å øke deres preventive effekt og å unngå bivirkningene.

I Finland ble praktisk talt hele befolkningen vaksinert med  
20 en dose OPV i februar - mars 1985 for å utrydde den siste polioepidemi ("Hovi et al.", 1986; "Harjulehto-Mervaala et al.", 1994). Dette gir en utmerket mulighet til å analysere mulige virkninger av OPV vaksinasjon på risikoen for type 1 diabetes, fordi IPV har vært benyttet som den eneste poliovirusvaksine i dekadene og har også vært brukt etter epidemien.  
25 OPV vaksinasjon ble også gitt gravide kvinner ("Harjulehto-Mervaala et al.", 1993). Søker har analysert den kumulative prevalens av type 1 diabetes i fødselskohorter som har fått OPV vaksinasjoner i år 1985 enten i barndommen eller in utero  
30 og sammenlignet dette med den kumulative prevalens i fødselskohorter som aldri fikk OPV (figur 1). Figuren viser at den kumulative prevalens av type 1 diabetes (IDDM) per 100 000

barn i en alder av 8 år i Finland i fødselskohorter som enten aldri har mottatt oral poliovirus vaksine (OPV) eller har vært vaksinert med en dose OPV i barndommen eller *in utero* under massevaksinasjonsfelttoget i 1985. Den kumulative prevalens av type 1 diabetes var signifikant lavere i OPV-vaksinerte kohorter sammenlignet med ikke-vaksinerte slike. Den midlere prevalens i OPV vaksinerte kohorter født i årene 1980-1985 var 272 sammenlignet med 326 i ikke-vaksinerte kohorter født i 1986 til 1989 ( $p < 0,01$  i student's t-test). Prevalensen av diabetes var også lav hos barn hvis mor hadde vært vaksinert under graviditet (261 per 100 000; figur 1). Disse funn indikerer at både virkning 1 og virkning 2 i det foreslåtte immuniseringsregime (se tabell 1) har en beskyttende effekt mot type 1 diabetes.

Det er også funnet at insidensen av type 1 diabetes korrelerer med typene poliovirus vaksine som benyttes i de forskjellige land. Denne korrelasjon er ikke absolutt, men det er en generell tendens til å redusere insidensen av type 1 diabetes i land der OPV er benyttet sammenlignet med land der inaktive (avlivede) poliovirusvaksiner (IPV) er benyttet. I Finland er insidensen av type 1 diabetes den høyeste i verden, og Finland er også et av de meget få land der IPV har vært benyttet som den eneste poliovirus vaksine i flere dekaner (bortsett fra året 1985 som nevnt ovenfor).

En mulig rolle for de forskjellige polivaksinasjonsregimer som en årsak til den internasjonale forskjell i insidensen av type 1 diabetes støttes også av foreliggende søkeres funn i forbindelse med barn fra Estland og Finland. I Estland der insidensen av type 1 diabetes er en tredjedel av den i nabolandet Finland, benyttes OPV som den eneste poliovirus vaksine i motsetning til Finland der IPV benyttes. Søker har analysert T-celle- prolifereringsresponsene på tetanus toxoid,

poliovirus type 1, coxsackievirus B4 (CBV4) og adenovirus antigener i 9-måneders-gamle barn i begge land. Responsen på poliovirus og CBV4 var signifikant høyere i Estland enn i Finland ( $p < 0,05$ ), mens responsen på andre antigener ikke kunne  
 5 adskilles mellom gruppene. Nøytralisering av antistoffer mot CBV-gruppe enteroviruser skilte seg ikke mellom gruppene, noe som antyder at den observerte forskjell i T-celle-responsen ikke skyldes forskjellige eksponeringer av barn til enterovirus i de to land. I henhold til dette reflekterer den høyere  
 10 T-celle respons på renset CBV4 virus hos estlandske barn muligens kryssreaktiviteten av T-celler primet ved tidligere OPV vaksinasjoner. I Finland benyttes det en IPV vaksine som ikke induserer en så høy T-celle-respons som OPV, og som også gis i høyere alder enn OPV i Estland (estlandske barn mottok  
 15 tre doser OPV sammenlignet med en dose IPV til finske barn i en alder av 9 måneder). Dette antyder at OPV-vaksinasjons oppsettet i Estland induserer sterkere kryss-reaktiv immunrespons på ikke-polio enteroviruser enn IPV vaksinasjonsoppsettet som benyttes i Finland. Dette antyder at aksjon 2 i  
 20 foreliggende søkeres immuniseringsregime (se tabell 1) har protektiv effekt mot type 1 diabetes.

I den finske "Diabetes Prediction and Prevention study (DIPP) har søker analysert frekvensen og serotypen av enterovirusinfeksjoner hos 21 barn som har vært fulgt fra fødselen, og som  
 25 var manifestert med klinisk type 1 diabetes eller blitt positive med henblikk på diabetes-relaterte autoantistoffer som en markør for subklinisk beta-celle-skade. Enterovirusinfeksjoner var hyppigere hos disse barn enn i 104 kontrollbarn tilpasset for fødselstidspunkt, kjønn og HLA-risiko alleler  
 30 for type 1 diabetes ( $p < 0,03$ ). Denne forskjell var spesielt klar i infeksjoner som opptrådte 0-6 måneder før autoantistoffene opptrådte: 57 % av autoantistoffpositive individer hadde en enterovirus infeksjon i denne periode sammenlignet

med 31 % av kontrollindividene av samme alder (OR 3,7, 95 % CI 1,2-11,4) (ikke-publisert observasjon). Under dette tidsrom var 29 % autoantistoffpositive barn positive for enterovirus RNA i serum sammenlignet med 6 % kontrollindivider (OR 8,4, 95 % CI 1,7-40,2). Disse resultater antyder at enterovirusinfeksjoner er viktige risikofaktorer for type 1 diabetes og i stand til å initiere  $\beta$ -celle skadeprosesser i genetisk ømfintlige individer. Den midlere alder for disse dyr ved opptredenen av autoantistoffene var 9 måneder, noe som antyder at diabetogeniske enterovirusinfeksjoner kan inntre allerede under de aller første levemåneder.

Serotypen av enterovirusinfeksjoner relatert til induksjon av autoantistoffer eller manifestasjon av klinisk diabetes har vært analysert i DIPP studien og i den tidlige "Childhood Diabetes in Finland" (DiMe) studie. Disse serotyper er inkludert i den avlivede/subenhetsvaksine i det foreliggende immuniseringsregime (aksjon 3 i tabell 1).

OPV-vaksinasjoner kan kombineres ikke bare med serotype spesifikke vaksiner, men også med passive immuniseringsregimer mot enteroviruser. Denne type passiv immunisering kan inkludere for eksempel immunoglobuliner som inneholder enterovirus spesifikke antistoffer, og som gis intravenøst eller oralt.

#### **Eksempel 1**

Søker har analysert virkningen av OPV-vaksinasjon i løpet av etterfølgende coxsackievirus B3- (CBV3)-infeksjon i mus. I disse studier ble det benyttet en transgenisk BALB/c-stamme som uttrykker human poliovirus-reseptor, og som derfor kan infekteres med human polioviruser (Horie et al., 1994).

Transgeniske BALB/c-mus ble først immunisert med levende poliovirusvaksine (Sabin-stamme av poliovirus type 1) eller in-

aktivert poliovirus vaksine IPV, og senere utfordret med en pankreas-tropisk stamme av coxsackievirus B3 (Nancy stammen). (IPV var den kommersielt tilgjengelige poliovirusvaksine Novum ervervet fra "National Public Health Institute of Holland").

- 5 To doser av levende poliovirus vaksine stamme type 1 (Sabin) ble gitt intramuskulært med to ukers intervaller ( $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mus, første injeksjon ved 8 ukers alder). To doser av livet poliovirus-vaksine ble gitt intramuskulært på samme måte (0,1 µg per mus). To uker etter den siste poliovirus-
- 10 injeksjon ble musene infektert med coxsackievirus B3. T-celle-prolifereringsresponsene ble analysert to uker etter coxsackievirus-B3-utfordringen ved bruk av standard blast-transformasjonstest og høyrensede virusser som antigener. T-celle responsene uttrykkes som spesifikke tellinger (gjennomsnitt cpm), og resultatene er vist i tabell 2.
- 15

**Tabell 2. Virkning av forutgående poliovirus immunisering på T-celle prolifereringsresponser under etterfølgende coxsackievirus B3-infeksjon i transgeniske mus som uttrykker humanpoliovirusreseptor.**

|                   | Prolifereringsrespons i forskjellige immuniseringsgrupper (midlere cpm verdier) |              |                |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------|
| Virus antigen     | PBS<br>(N=5)                                                                    | IPV<br>(N=5) | Sabin<br>(N=5) |
| Coxsackievirus B3 | 1444                                                                            | 3669         | 6485           |
| Poliovirus type 1 | 1927                                                                            | 4898         | 6738           |

20

En gradering av coxsackievirus B3-indusert pankreatitt og myokarditt så vel som detekteringen av viremia ble gjennomført to uker etter coxsackievirus B3-utfordringen. Nærværet av viremia ble analysert samtidig ved detektering av viral

RNA i serum ved bruk av en sensitiv RT-PCR metode. Resultatene er vist i tabell 3.

**Tabell 3. Virkning av forutgående poliovirusimmunisering på patogenesen av etterfølgende coxsackievirus B3-infeksjon i transgenisk mus som uttrykker humanpoliovirusreseptor.**

|                  | Immuniseringsgruppe |              |                |
|------------------|---------------------|--------------|----------------|
|                  | PBS<br>(N=5)        | IPV<br>(N=5) | Sabin<br>(N=5) |
| Pancreatitis +++ | 2                   | 0            | 4              |
| ++               | 3                   | 2            | 1              |
| +                | 0                   | 1            | 0              |
| -                | 0                   | 2            | 0              |
| Myocarditis +++  | 0                   | 0            | 0              |
| ++               | 0                   | 0            | 1              |
| +                | 3                   | 2            | 3              |
| -                | 2                   | 3            | 1              |
| Viremia +        | 2                   | 3            | 1              |
| -                | 3                   | 2            | 4              |

I forsøkene øket levende poliovirusvaksine (Sabin stamme) *in vitro* T-celle-proliferering responser under etterfølgende coxsackievirus B3-infeksjon. Denne økning ble observert i prolifereringsresponsene mot både renset coxsackievirus B3 og poliovirus type 1 (Tabell 2). Dette antyder at forutgående levende poliovirusvaksine kan øke cellulærimmunresponser under etterfølgende ikke-polio enterovirus infeksjon. Forutgående IPV-vaksinasjon øket også T-celle responsene under etterfølgende coxsackievirus B3-infeksjon, men effekten var svakere enn den til levende vaksine (Tabell 2).

Forutgående immunisering med levende poliovirusvaksine (poliovirus type 1, Sabin-vaksine-stamme) øket T-celle infiltreringen i pankreas under etterfølgende infeksjon med en pankreas-tropisk stamme av coxsackievirus B3 (Tabell 3). I motsetning til dette ble forutgående IPV-vaksinasjon assosiert med svak T-celle-infiltrasjon i pankreas sammenlignet med det som ble observert etter levende poliovirusvaksine eller det i kontrollmus. Disse resultater antyder at levende poliovirusvaksinasjon øker *in vivo* T-celle-responsene under etterfølgende ikke-polio-enterovirusinfeksjoner mens avlivet poliovirusvaksine kan ha en motsatt virkning.

Det var også en tendens til en lav frekvens i viremi hos mus som på forhånd var immunisert med levende poliovirus. Dette antyder at levende poliovirusvaksinasjon retter eradikasjon av etterfølgende ikke-polio enterovirusinfeksjoner.

I et annet forsøk ble det funnet at totalt 9 (92 %) av de tolv poliovaksinerte mus hadde T-celle-infiltrasjon i hjertet sammenlignet med 7 (53 %) av de femten ikke-vaksinerte mus. Dette antyder at forutgående utfordring med levende poliovirus exaggerer T-celle respons under CBV3-infeksjon *in vivo*.

## Eksempel 2

Det ble produsert og utprøvet formalininaktiverte coxsackievirus B vaksiner i mus. Disse vaksiner ble produsert ved inaktivering av sukrosgradientrensede viruser ved 14 dagers inkubering ved +37 °C i 0,01 % formalin i PBS.

Midlere IgG1 antistoffnivåer mot renset coxsackievirus B3 ble bestemt i Balb/c mus som var immunisert ved 3 gjentatte intramuskulære injeksjoner med formalin-inaktivert coxsackievirus B3-vaksine eller fosfatbufret saltoppløsning (PBS). Injeksjoner ble gitt med to ukers intervaller (først en i 8 ukers alderen), og antistoffer ble målt 2 uker etter den sis-

te vaksinasjon. Antistoffnivåene er uttrykt som OD<sub>492</sub>-verdier i EIA (Tabell 4).

**Tabell 4. Antistoffnivåer induisert av inaktivert coxsackievirus B3-vaksine i mus**

| Serum-fortynning | Immuniseringsgruppe |                                    |
|------------------|---------------------|------------------------------------|
|                  | PBS<br>(N=5)        | Coxsackievirus B3-vaksine<br>(N=5) |
| 1/1600           | 0,12                | 0,95                               |
| 1/6400           | 0,13                | 0,47                               |
| 1/25600          | 0,14                | 0,28                               |

5

Nærværet av viremi (virus i serum) ble bestemt i BALB/c-mus som var immunisert med tre gjentatte intramuskulære injeksjoner med formalininaktivert coxsackievirus B3-vaksine eller med fosfatbufret saltoppløsning (PBS) og deretter infektet med en pankreas-tropisk stamme av coxsackievirus B3 (Nancy stammen, 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mus). Immuniseringer skjedde med to ukers intervaller (først en ved 8 ukers alderen), og musene ble infektet 2 uker etter den siste injeksjon. Nærværet av virus i serum, viremi, ble analysert tre dager etter infeksjon ved bruk av sluttpunktfortynningsanalysen på infektivitet. Sluttpunktsfortynningen for infektivitet i LLC-cellekulturer er vist i tabell 5.

10

15

**Tabell 5. Beskyttelse mot viremi ved immunisering med en inaktivert coxsackievirus B3-vaksine**

|                                           | Immuniseringsgruppe |                           |
|-------------------------------------------|---------------------|---------------------------|
| Mus                                       | PBS                 | Coxsackievirus B3 vaksine |
| 1.                                        | $10^{-3}$           | ND                        |
| 2.                                        | $10^{-3}$           | ND                        |
| 3.                                        | $10^{-1}$           | ND                        |
| 4.                                        | $10^{-4}$           | ND                        |
| 5.                                        | $10^{-1}$           | ND                        |
| ND: Ikke detekterbar (mengde $<10^{-1}$ ) |                     |                           |

- Som vist i tabell 4, induserte immunisering med inaktivert coxsackievirus B3-vaksine høye nivåer av antistoffer målt mot rensset coxsackievirus B3 i EIA testen. Man fant også at vaksinasjonen fullstendig beskyttet mus mot infeksjon med en pankreas-tropisk stamme av coxsackievirus B3. Virus kunne ikke detekteres i serum for noen av de vaksinerte dyr, mens alle kontrollmusene var positive for virusen (Tabell 5). Denne vaksine beskyttet også musene mot virus-indusert pankreatitt: Ingen av de vaksinerte dyr hadde T-celle infiltrasjon i pankreas, mens alle kontroll dyr hadde meget sterkt inflammatorisk respons.
- Disse resultater antyder at inaktiverte ikke-polio enterovirus-vaksiner er effektive i beskyttelse mot ikke-polio enterovirusinfeksjoner. Denne beskyttelse medieres sannsynligvis av nøytraliserende antistoffer indusert av vaksinen.

**Eksempel 3**

SJL/J mus ble først immunisert enten med formalin-inaktivert poliovirusvaksine (IPV; 01, µg/mus), eller med saltoppløsning (PBS). Etter 14 dager ble musene infektert intramuskulært med coxsackievirus B3 ( $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mus). Histopatologi av pankreas ble analysert 14 dager etter infeksjonen. Resultatene er vist i tabell 6.

**Tabell 6. Inflammasjonsreaksjon (T-celle infiltrasjon) i pankreas av SJL/J mus infektert intramuskulært med en pankreas-tropisk stamme av coxsackievirus B3 (Nancy-stamme).**

|                          | Vaksine      |              |
|--------------------------|--------------|--------------|
| Pankreatisk inflammasjon | PBS<br>(N=5) | IPV<br>(N=5) |
| Sterk                    | 1            | 4            |
| Moderat                  | 2            | 1            |
| Ikke detektert           | 2            | 0            |

Observasjoner antyder at IPV øker alvorret av ikke-polio enterovirusinfeksjoner. Det er funnet at mus som først immuniseres ved IPV og deretter infekteres med en ikke-polio enterovirus, nemlig en pankreas-tropisk Nancy-stamme av coxsackievirus B3, hadde mer alvorlig pankreatit enn mus som på forhånd ikke var immunisert med IPV (tabell 6).

Midlere IgG1 antistoffnivåer mot renset coxsackievirus B3 ble bestemt i BALB/c mus som var immunisert ved tre intramuskulære injeksjoner med formalin-inaktivert poliovirus-vaksine (IPV; 0,1 µg per mus) eller med fosfatbufret saltoppløsning (PBS) og deretter infektert med en pankreas-tropisk stamme av coxsackievirus B3 (Nancy-stamme,  $10^6$  TCIC<sub>50</sub>/mus). Immunise-

ringer skjedde med to ukers intervaller (først en ved 8 ukers alder), mus ble infektet 2 uker etter den siste injeksjon og antistoffer målt 2 uker etter infeksjon. Antistoffnivåene uttrykkes som midlere OD<sub>492</sub>-verdier i EIA (tabell 7). IPV var  
 5 den kommersielt tilgjengelige poliovirusvaksine Novum ervervet fra "National Public Health Institute of Holland".

**Tabell 7. Effekt av immunisering med inaktivert poliovirusvaksine på antistoffrespons under etterfølgende coxsackievirus B3-infeksjon**

| Serum-fortynning | Immuniseringsgruppe |              |
|------------------|---------------------|--------------|
|                  | PBS<br>(N=5)        | IPV<br>(N=5) |
| 1/1600           | 0,50                | 0,37         |
| 1/6400           | 0,36                | 0,11         |
| 1/25600          | 0,32                | 0,08         |

10

IPV-vaksinasjon ble assosiert med abnormt lavt antistoffrespons under etterfølgende coxsackievirus B3-infeksjon i BALB/c mus (tabell 7). Dette antyder at immuniseringen med drept poliovirusvaksine kan svekke antistoffresponser under  
 15 etterfølgende ikke-polio-enterovirusinfeksjoner *in vivo*. Dette kan i sin tur øke alvorret av ikke-polio-enterovirusinfeksjoner.

Det antas at den skadelige effekt av IPV skyldes dens evne til å indusere Th2-type immunresponser. Det er vist tidligere  
 20 at inaktiverte vaksiner induserer hovedsakelig Th2-type responser, og at denne type Th2-bias kan øke alvorret av naturlige infeksjoner (som i tilfellet inaktivert respiratorisk syncytialvirus og meslingvaksine). Denne skadelige virkning

manifesteres særlig ved infeksjoner forårsaket av andre serotyper enn det som benyttes i vaksinen, mens infeksjoner med samme serotype som benyttes i vaksinen, totalt er beskyttet av vaksinen (som vist i museforsøkene beskrevet i tabell 5).

5 Denne serotype spesifikke beskyttelse er basert på vaksineindusert nøytraliserende antistoffer. Således primer IPV-vaksinasjon i barndommen poliovirus spesifikke immunresponser i retning Th2, noe som trykker T-celle hukommelse i senere enterovirusinfeksjoner. På grunn av kryssreaktive T-celler vil denne Th2-bias spre seg til immunnresponser mot ikke-polio-enteroviruser og derved øke alvorhet av ikke-polio-enterovirusinfeksjoner og risikoen for deres komplikasjoner lik type 1 diabetes.

I motsetning til den skadelige virkning av IPV på immunbeskyttelsen mot ikke-polio-enterovirusinfeksjoner, har OPV en fordelaktig virkning. Som en levende vaksine induserer OPV sterkere T-celle responser enn IPV. I tillegg er denne immunrespons mer balansert og minner om det som observeres i naturlige enterovirusinfeksjoner inkludert både Th1- og Th2-type immunresponser. Denne respons er tilsiktet i både strukturelle og ikke-strukturelle virusproteiner, mens IPV kun induserer respons på strukturelle virusproteiner. Ved å inducere sterke T-celle-responser aktiverer OPV også hukommelses T-celler som kan kryssreagere mellom polio- og ikke-polio enteroviruser og initiere både T-celle- og antistoffresponser mot ikke-polio enteroviruser. Ved denne mekanisme letter OPV klaringen av ikke-polio enterovirusinfeksjoner og forhindrer derved deres komplikasjoner. Således kan risikoen for komplikasjoner av ikke-polio enterovirusinfeksjoner (som type 1 diabetes) forhindres ved OPV.

I tillegg til de naturlige ikke-polio enterovirusinfeksjoner kan OPV også benyttes for å konvertere immunresponser som er

indusert av inaktiverte eller subenhetenterovirusvaksiner, fra Th2-type responser i Th1-retning. På denne måte kan OPV benyttes for å beskytte mot Th2-avhengige bivirkninger av inaktiverte eller subenhet ikke-polio enterovirusvaksiner.

5 Denne type bivirkninger er beskrevet i konteksten ved anvendelsen av inaktiverte respiratorisk synsyttialvirus og meslingvirusvaksiner, og de inkluderer abnormalt forløp av infeksjoner, øket alvor ved infeksjonen, øket risiko for komplikasjoner ved infeksjonen og mulig utvikling av allergier og astma.

I henhold til dette kan OPV benyttes for å diktere immunresponsen som induseres av inaktiverte eller subenhet enterovirusvaksiner på Th1-type responser og derved beskytte mot bivirkningene ved slike vaksiner. I motsetning kan IPV ha en  
15 motsatt virkning ved å øke risikoen for komplikasjoner av ikke-polio enterovirusinfeksjoner ved å diktere immunresponsen i Th2-retning.

En ytterligere fordel ved OPV i forhold til IPV er at som en levende virus induserer den produksjon av interferon- $\alpha$ . Dette induseres kun under virusinfeksjoner og er det mest potente antivirale cytokin (del av den medfødte immunitet). Den beskytter spesifikt mot virusinfeksjoner og gir beskyttelse før antigen-spesifikke immunresponser induseres. Som en levende virus, induserer OPV interferon- $\alpha$ , og denne induksjon  
25 skjer både i mukosale overflater og systemisk. Vaksinevirus replikerer i tarmen i flere uker, noe som betyr at lokalproduksjon av interferon- $\alpha$  forblir i lengre tidsrom hos barn som gjentatte ganger er vaksinert med OPV. Dette vil øke den beskyttende virkning av OPV mot ikke-polio enterovirusinfeksjoner.

## Referanser

MA Beck, SM Tracy; "Evidence for group specific enterovirus antigens recognized by human T-cells", "J Clin Microbiol" 28: 1822-1827, (1990).

5 J Fohlman, K Pauksen, B Morein, U Bjare, NG Ilback, G. Friman; "High yield production of an inactivated coxsackie B3 adjuvant vaccine with protective effect against experimental myorcarditis", "Scan J Infect Dis Suppl" 88:103-8, (1993).

10 J Fohlman, NG Ilback, G Friman, B Morein; "Vaccination of Balb/c mice against enteroviral mediated myocarditis", "Vaccine" 8:381-4, (1990).

15 VA Fulginiti, JJ Eller, AW Downie, CH Kempe; "Altered reactivity to measles virus. Atypical measles in children previously immunized with inactivated measles virus vaccines", "JAMA", 202: 1075-1080, (1967).

S Graham, ECY Wang, O Jenkins, LK Borysiewicz; "Analysis of the human T-cell response to picornaviruses: identification of T-cell epitopes in poliovirus", "J Virol" 67: 1627-1637, (1993).

20 T Harjulehto-Mervaala, T Aro, VK Hiilesmaa, T Hovi, H Saxen, L Saxen; "Oral polio vaccination during pregnancy: lack of impact on fetal development and perinatal outcome", "Clin Infect Dis" 18:414-20, (1994).

25 T Harjulehto-Mervaala, T Aro, VK Hiilesmaa, H Saxen, T Hovi, L Saxen; "Oral polio vaccination during pregnancy: no increase in the occurrence of congenital malformations", "Am J Epidemiol" 138:407,14, (1993).

RW Harris, P Isacson, DT Karzon; "Vaccine-induced hypersensitivity: reactions to live measles and mumps vaccine in

prior recipients of inactivated measles vaccine", "J Pediatr" 74:552-63, (1969).

M Hiltunen, M Lönnrot, H Hyöty; "Immunisation and type 1 diabetes mellitus. Is there a link?", "Drug Safety" 20:207-  
5 212, (1999).

H Horie, S Koike, T Kurata, et al.; "Transgenic mice carrying human poliovirus receptor; New animal model for study of poliovirus neurovirulence", "J. Virol" 68:681-688, (1994).

10 T Hovi, K Cantell, A Huovilainen, E Kinnunen, T Kuronen, K Lapinleimu, T Poyry, M Roivainen, N Salama, M Stenvik, et al.; "Outbreak of paralytic poliomyelitis in Finland: widespread circulation of antigenically altered poliovirus type 3 in a vaccinated population", "Lancet" 1:1427-32, (1986).

15 S Juhela, H Hyöty, M Lönnrot, M Roivainen, O Simell, J Ilonen; "Enterovirus infections and enterovirus specific T-cell responses in infancy", "J Med Virol" 54: 226-232, (1998).

AZ Kapikian, RH Mitchell, RM Chanock, RA Shvedoff, CE  
20 Stewart; "An epidemiological study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine", "Am J Epidemiol" 89: 405-421, (1969).

DM See, JG Tilles; "Occurrence of coxsackievirus hepatitis in baby rabbits and protection by a formalin-inactivated polyvalent vaccine", "Proc Soc Exp Biol Med" 216:52-6,  
25 (1997).

DM See, JG Tilles; "Efficacy of a polyvalent inactivated-virus vaccine in protecting mice from infection with

clinical strains of group B coxsackieviruses", "Scand J Infect Dis" 26:739-47, (1994).

RK Zimmerman, SJ Spann; "Poliovirus vaccine options", "Am. Fam. Physician", 59:113-118, (1999).

## P a t e n t k r a v

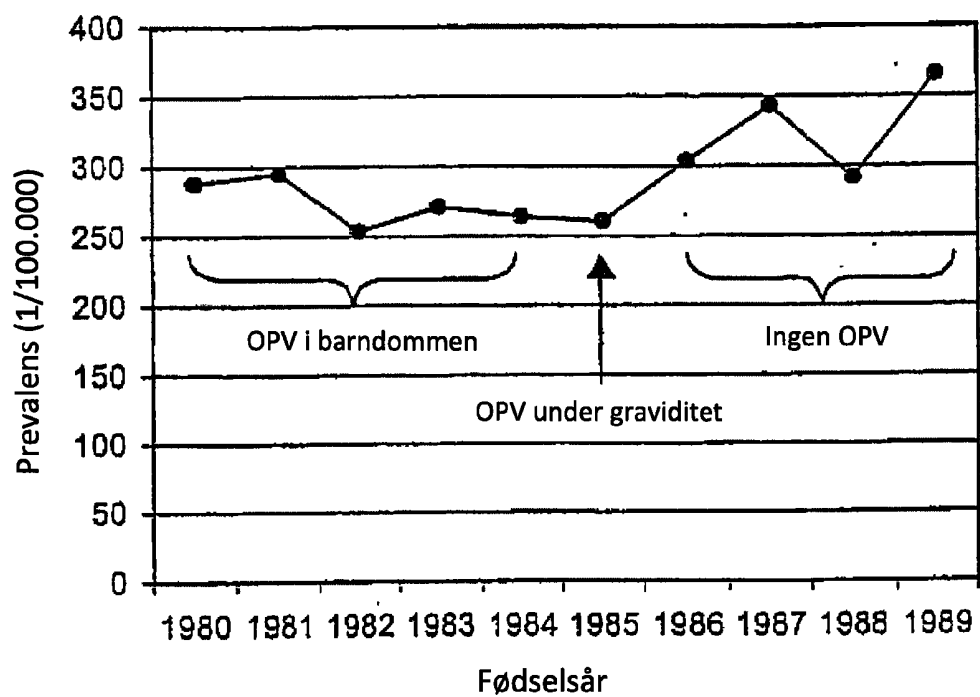
1. Anvendelse av oralpoliovirusvaksine (OPV) for fremstilling av en vaksine mot ikke-polio enterovirus sykdommer.
- 5 2. Anvendelse i henhold til krav 1 for fremstilling av en vaksine mot type 1 diabetes mellitus (IDDM).
3. Anvendelse ifølge krav 1 eller 2 for fremstilling av en vaksine for administrering i gjentatte doser til barn.
- 10 4. Anvendelse ifølge krav 3 for fremstilling av en vaksine for administrering ved 3 måneders alderen.
5. Anvendelse ifølge krav 4 for fremstilling av en vaksine for administrering i alderen rundt 0, 6, 10 og 14 uker og som initiatorer ved høyere alder.
- 15 6. Anvendelse ifølge krav 1 eller 2 for fremstilling av en vaksine for administrering til svangre kvinner for å beskytte deres avkom mot de nevnte sykdommer.
7. Anvendelse ifølge krav 6 for fremstilling av en vaksine for administrering prenatalt til gravide kvinner og postnatalt til barnet.
- 20 8. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7 for fremstilling av en vaksine for administrering i kombinasjon med en vaksine som induserer serotype spesifikk immunitet mot ikke-polio enteroviruser.
- 25 9. Anvendelse ifølge krav 8 der den serotype spesifikke immunitetsinduserende vaksine er en avlivet enterovirusvaksine eller en subenhetvaksine.

10. Anvendelse ifølge krav 8 der nevnte serotype spesifikke immunitetsinduserende vaksine omfatter enterovirusantigener som representerer diabetogeniske enterovirus serotyper eller en cocktail derav.
- 5 11. Anvendelse ifølge krav 8 der nevnte serotype spesifikke immunitetsinduserende vaksine er en vaksine mot en eller flere serotyper valgt blant gruppen bestående av coxsackievirus B serotyper 1, 2, 3, 4, 5 og 6, echovirus serotyper 3, 4, 6, 9, 11, 22 og 30 og coxsackievirus A serotyper 9 og 16.
- 10 12. Vaksinepreparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter oralpoliovirusvaksine (OPV) og en ikke-polio enterovirusvaksine som induserer serotypespesifikk immunitet mot ikke-polio enteroviruser.
- 15 13. Vaksinepreparat ifølge krav 12, k a r a k - t e r i s e r t v e d at den serotypespesifikke immunitetsinduserende vaksine er en avlivet ikke-polio enterovirusvaksine eller en subenhetvaksine.
- 20 14. Vaksinepreparat ifølge krav 12, k a r a k - t e r i s e r t v e d at nevnte serotype spesifikke immunitetsinduserende vaksine omfatter enterovirusantigener som representerer diabetogeniske enterovirus serotyper eller en cocktail derav.
- 25 15. Vaksinepreparat ifølge krav 14, k a r a k - t e r i s e r t v e d at den serotype spesifikke immunitetsinduserende vaksine er en vaksine mot en eller flere serotyper valgt blant gruppen bestående av coxsackievirus B serotyper 1, 2, 3, 4, 5 og 6, echovirus serotyper 3, 4, 6, 9, 11, 22 og 30 og coxsackievirus A serotyper 9 og 16.
- 30

16. Anvendelse av en vaksine som induserer serotypespesi-  
fikk immunitet mot en eller flere serotyper av diabe-  
togenisk ikke-polio enteroviruser valgt fra gruppen  
bestående av coxsackievirus B serotyper 1, 2, 3, 4, 5  
og 6, echovirus serotyper 3, 4, 6, 9, 11, 22 og 30 og  
coxsackievirus A serotyper 9 og 16 for fremstilling av  
en vaksine mot type 1 diabetes mellitus (IDDM).
17. Anvendelse ifølge krav 16 for fremstilling av en vak-  
sine for administrering til gravide kvinner eller  
barn.
18. Anvendelse ifølge krav 16 for fremstilling av en vak-  
sine for administrering prenatalt til gravide kvinner  
og postnatalt til barnet.

1/1

**Kumulativ prevalens av IDDM  
ved 8 års alder**



Figur 1