



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **332800**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

A61K 39/245 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20021116	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.09.07 PCT/EP2000/08784
(22)	Inng.dag	2002.03.06	(85)	Videreføringsdag	2002.03.06
(24)	Løpedag	2000.09.07	(30)	Prioritet	1999.09.07, GB, 9921146
(41)	Alm.tilgj	2002.04.30			
(45)	Meddelt	2013.01.14			
(73)	Innehaver	GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, BE-1330 RIXENSART, Belgia			
(72)	Oppfinner	Moncef Mohammed Slaoui, c/o Glaxo SmithKline, 709 Swedeland Road, US-PA19406 KING OF PRUSSIA, USA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Vaksinesammensetning egnet for behandling eller profylakse av humanpapillomavirusinfeksjoner og herpes simpleksvirusinfeksjoner			
(56)	Anførte publikasjoner	NO 20004487 A WO 9517209 A US 5855891 A			
(57)	Sammendrag				

Nye kombinerte vaksinesammensetninger er tilveiebragt, som omfatter et herpes simpleks-virus (HSV)-antigen og et HPV-antigen og eventuelt i tillegg en eller flere av følgende: et EBV-antigen, et hepatitt A-antigen eller inaktivert attenuert virus, et hepatitt B viralt antigen, et VZV-antigen, et HCMV-antigen, et Toxoplasma gondii-antigen. Vaksinesammensetningene blir formulert med en adjuvant som fortrinnsvis er en stimulator av TH1-cellerespons slik som 3D-MPL og QS21.

Foreliggende oppfinnelse vedrører nye vaksineformuleringer. Spesielt vedrører foreliggende oppfinnelse kombinasjonsvaksiner for administrering til ungdom.

Papillomavirus er små DNA-tumorvirus, som er svært artsspesifikke. Så langt, har 70
 5 individuelle humane papillomavirus (HPV)-genotyper blitt beskrevet. HPV er generelt spesifikk enten for huden (f.eks. HPV-1 og -2) eller mukøse overflater (f.eks. HPV-6 og -11) og forårsaker vanligvis godartede tumorer (vorter) som kan vedvare i flere måneder eller år. Slike godartede tumorer kan være plagsomme for de involverte individene, men er ikke livstruende, med noen få unntak.

10

Noen HPV er også assosiert med cancer. Den sterkeste positive assosieringen mellom en HPV og human cancer er den som eksisterer mellom HPV-16 og HPV-18 og cervic-
 calt karcinom. Cervical cancer den mest vanlige ondartede cancer i utviklingsland, med omtrent 500 000 nye tilfeller i verden hvert år. Det er nå teknisk mulig å aktivt bekjem-
 15 pe primære HPV-16-infeksjoner, og til og med etablerte HPV-16 inneholdende cancer, ved å bruke vaksiner. For en oversikt over prospektene for profylaktiske og terapeutisk vaksiner mot HPV-16 se Cason, J., Clin. Immunother. 1994; I(4) 293-306 og Hagenessee M.E., Infections in Medicine 1997 14(7) 555-556, 559-564.

20 I dag, er forskjellige typer HPV isolert og karakterisert ved hjelp av kloningssystemer i bakterier og nylig ved PCR-amplifisering. Den molekylære organisering av HPV-genomene har blitt definert på en komparativ basis med den velkarakteriserte bovine papillomavirus type 1 (BPV1).

25 Andre HPV-serotyper av spesiell interesse er 31, 33 og 45.

Skjønt små variasjoner forekommer, har alle HPV-genomer som er beskrevet minst 7 tidlige gener, E1 til E7 og to sene gener L1 og L2. I tillegg, omfatter en oppstrøms regu-
 latorisk region de regulatoriske sekvensene som ser ut til å kontrollere de fleste
 30 transkripsjonelle begivenhetene i HPV-genomet.

E1- og E2-genene er involvert i viral replikasjon og transkripsjonskontroll, respektivt, og tenderer til å være avbrudt ved viral integrering. E6 og E7, og nylig bevist impliserer også E5 i viral transformering.

35

I HPV involvert i cervical karcinom slik som HPV 16 og 18, starter den onkogene prosessen etter integrering av viralt DNA. Integrasjonen resulterer i inaktivering av gener

som koder for kapsidproteinene L1 og L2 og i å få kontinuerlig overekspresjon av de to tidlige proteinene E6 og E7 som vil føre til gradvis tap av normal cellulær differensiering og utvikling av carcinom.

5 Carcinom i livmorhalsen er vanlig hos kvinner og utvikles gjennom et pre-cancerøst intermediært stadium til invasivt carcinom som ofte fører til død. Intermediatstadiene av sykdommen er kjent som cervical epitelneoplasi og er gradert fra I til III når det gjelder økende alvorlighetsgrad.

10 Klinisk, manifesterer HPV-infeksjon i den kvinnelige anogenitale kanal som cervicale flate kondylomer, som er kjennetegnet på på koilocytose som innvirker fortrinnsvis overflate- og intermediatceller i det cervicale plateepitelet.

Koilocytene som er konsekvensen til en cytopatisk effekt hos viruset, fremstår som multikjerneceller med en perinukleær klar ring. Epitelet er fortykket med unormal keratinisering som er ansvarlig for vorteutseendet til lesjonen.

Slike flate kondylomer er når de er positive for HPV 16 eller 18 serotypene, høyrisikofaktorer for utvikling mot cervikal intraepitel neoplasi (CIN) og carcinoma in situ (CIS) som er betraktet som forløperlesjoner for invasiv cervixcarcinom.

WO 96/19496 angir varianter av human papillomavirus E6- og E7-proteiner, spesielt fusjonsproteiner av E6/E7 med en delelesjon i både E6- og E7-proteinene. Disse delsjonsfusjonsproteinene sies å være immunogene.

25 HPV L1-baserte vaksiner er angitt i WO94/00152, WO94/20137, WO93/02184 og WO94/05792. Slike vaksiner kan omfatte L1-antigenet som en monomer, en kapsomer eller en viruslignende partikkel. Slike partikler kan ytterligere omfatte L2-proteiner. L2-baserte vaksiner er beskrevet f.eks. i WO93/00436. Andre HPV-vaksiner er basert på tidlige proteiner, slik som E7 eller fusjonsproteiner slik som L2-E7.

NO20004487 A beskriver kombinerte vaksinesammensetninger som består av antigen-er hentet fra blant andre hepatitt B virus og HSV samt et eller flere av alternativene EBV, hepatitt A virus, HPV og VZV. Vaksinesammensetningene inneholder i tillegg en 35 adjuvant som fortrinnsvis er en stimulator av TH1-cellerepons.

US 5855891 A omhandler papilliomavirus lignende partikler (VLP) med epitoper som består av papillomavirus L1 fusjonsprodukt og eventuelt også papillomavirus L2 produkt. Her tilveiebringes vaksiner som inneholder nevnte VLP. Det foreslås å benytte HPV, spesielt HPV16. VLPene har strukturelle L1 og L2 epitoper som kan fuseres til
 5 andre proteiner for å tilveiebringe vaksiner til lave kostnader med bred utnyttelse.

HSV-2 er det primære etiologiske midlet for herpes genitalis. HSV-2 og HSV-1 (det forårsakende middel for herpes labialis) er kjennetegnet ved deres evne til å indusere både akutte sykdommer og etablere en latent infeksjon, spesielt i neuronale gangliacel-
 10 ler.

Genital herpes er estimert å forekomme i omtrent 5 millioner mennesker i U.S.A. alene med 500 kliniske tilfeller som meldes hvert år (primær og tilbakevendende infeksjon). Primærinfeksjon forekommer oftest etter puberteten og er kjennetegnet ved det lokaliserte
 15 utseende av smertefulle hudlesjoner, som vedvarer i en periode på mellom 2 til 3 uker. Innenfor de etterfølgende seks månedene etter primærinfeksjonen vil 50% av pasientene oppleve en tilbakevending av sykdommen. Omtrent 25% av pasientene kan oppleve mellom 10-15 tilbakevendende episoder av sykdommen hvert år. I immunokompromitterende pasienter, er insidensen av høyfrekvent tilbakevending statistisk høyere enn i den
 20 normale pasientpopulasjonen.

Både HSV-1- og HSV-2-virus har et antall av glykoproteinkomponenter lokalisert på overflaten av viruset. Disse er kjent som gB, gC, gD og gE.

25 Det er et behov for effektive kombinasjonsvaksiner for å forebygge sykdommer som spesielt ungdom er utsatt for.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer en vaksinesammensetning som omfatter:

- 30 (a) et herpes simpleksvirus (HSV)-antigen; og
 - (b) et humant papillomavirus (HPV)-antigen
- i kombinasjon med en adjuvant som fortrinnsvis er en stimulator av TH1-cellerespons.

Vaksinesammensetningen i følge oppfinnelsen er en stor fordel ved administrering til
 35 ungdom som spesielt kan være i risikozonen for HSV, og/eller HPV-infeksjon.

Foreliggende oppfinnelse omfatter vaksinesammensetning egnet for bruk ved behandling eller profylakse av human papillomavirusinfeksjoner og herpes simpleksvirusinfeksjoner, kjennetegnet ved at den omfatter:

- (a) et herpes simpleksvirus (HSV) 2 gD antigen; og
- 5 (b) HPV 16 eller HPV 18 L1 viruslignende partikkel som består av et humant papillomavirus (HPV) L1 antigen;

i forbindelse med en adjuvant som er en foretrukket stimulator av TH1-cellerespons, hvori sammensetningen ikke inneholder et hepatitt B antigen.

- 10 Vaksinesammensetningen i følge oppfinnelsen kan ytterligere omfatte en eller flere av et antall av andre antigener som beskrevet under.

Det har blitt funnet at vaksinesammensetningene ifølge oppfinnelsen overraskende ikke viser noen interferens, det betyr at immunresponsen til hvert antigen i sammensetningen i følge oppfinnelsen idet vesentlige er den samme som den som erverves ved hvert anti-
15 gen som gis individuelt sammen med adjuvant som fortrinnsvis stimulerer THF1-celleresponsen.

Vaksiner for profylaksen av hepatitt B-infeksjonene, som omfatter en eller flere hepatitt
20 B-antigener, er vel kjent. For eksempel, blir vaksinen Engerix-B (varemerke) fra SmithKline Beecham Biologicals brukt for å forebygge hepatitt B. Denne vaksinen omfatter hepatitt B-overflateantigen (spesielt 226 aminosyre S-antigen beskrevet i Harford et al., i Postgraduate Medical Journal, 1987, 63 (suppl. 2), s. 65-70) og er formulert ved å bruke aluminiumhydroksid som adjuvant.

25 Vaksinen Havrix (varemerke), også fra SmithKline Beecham Biologicals er et eksempel på en vaksine som kan brukes for å forebygge hepatitt A-infeksjoner. Den blir formulert med aluminiumhydroksid som adjuvant. Denne vaksinen omfatter en attenuert stamme av HM-175 hepatitt A-virus inaktivert med formol (formaldehyd); se Andre et al.,
30 (Prog. Med. Virol., bind 37, s. 1-24).

Som brukt heri, blir betegnelsen hepatitt A viral (HAV) antigen brukt for å referere til enten et protein avledet fra hepatitt A-virus eller en attenuert stamme av HAV, eventuelt inaktivert, f.eks. med formaldehyd. Hvis HAV-antigenet er et protein avledet fra hepa-
35 tititt A-virus kan den eventuelt være et rekombinant protein.

Vaksinen Twinrix (varemerke) er en kombinasjon av et rekombinant hepatitt B-antigen med det før nevnte inaktiverte attenuerte hepatitt A-viruset. Vaksinen kan anvendes for å beskytte mot hepatitt A og hepatitt B samtidig.

- 5 Europeisk patent 0 339 667 (Chemo Sero) beskriver det generelle konseptet av å kombinere et hepatitt A-antigen og et hepatitt B-antigen for å fremstille en kombinasjonsvaksine. I den beskrivelsen blir det slått fast at adjuvanten som blir brukt ikke er kritisk: den må kun være i stand til å foresterke immunaktiviteten i en ønsket grad og ikke forårsake noen bivirkninger. Det beskrives at aluminiumgel kan anvendes, spesielt aluminiumhydroksidgel og aluminiumfosfatgel.
- 10

Vaksinesammensetningen kan også omfatte, i tillegg til HPV- og HSV-antigenet, et HAV-antigen eller et HBV-antigen eller mer foretrukket kombinasjon av både et HAV- og et HBV-antigen.

15

En slike vaksine har en stor fordel for administrering til ungdom som kan være spesielt i risikozonen for HSV- og/eller HPB-infeksjon, og/eller HAV-infeksjon, og/eller HBV-infeksjon.

- 20 En immunrespons kan grovt deles inn i to ekstreme kategorier, som er humorale eller celledmediert immunrespons (tradisjonelt kjennetegnet ved antistoff og cellulære effektor-mekanismer for beskyttelse respektivt). Disse kategorier av respons har blitt betegnet TH1-typeresponser (cellemediert respons), og TH2-typeimmunresponser (humoral respons).

25

- Ekstreme TH1-typeimmunresponser kan kjennetegnes ved fremstillingen av antigenspesifikke, haplotypebegrensede cytotoksiske T-lymfocytter og naturlige drepecelleresponser. I mus blir TH1-typeresponser ofte kjennetegnet ved generasjonen av antistoffer av IgG2a-subtype, som i mennesket korresponderer til IgG1-typeantistoffer. TH2-
- 30 typeimmunresponser er kjennetegnet ved generasjonen av et spekter av immunoglobulinisotyper som inkluderer i mus IgG1.

- Det skal tas i betraktning at den drivende kraft bak utviklingen av disse to typer av immunresponser er cytokinene. Høye nivåer av TH1-typecytokiner tenderer til å favorisere induksjonen av celledmedierte immunresponser til det gitte antigenet, mens høye nivåer av TH2-typecytokiner tenderer til å favorisere induksjon av humorale immunresponser til antigenet.
- 35

Distinksjonen av TH1- og TH2-typeimmunresponser er ikke absolutt. I realiteten, vil et individ støtte en immunrespons som er beskrevet til å være fortrinnsvis TH1 eller fortrinnsvis TH2. Imidlertid, er det ofte enklest å betrakte familiene av cytokiner i termer som de som er beskrevet i murine CD4+ve T-cellekloner av Mosmann og Coffman (Mosmann, T.R. og Coffman, R.L. (1989) *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology*, 7, s. 145-173). Tradisjonelt, er TH1-typeresponser assosiert med produksjonen av INF- γ -cytokiner ved T-lymfocytter. Andre cytokiner assosieres ofte direkte med induksjonen av TH1-typeimmunresponser som ikke produseres av T-celler, slik som IL-12. I motsetning til TH2-typeresponser assosiert med sekresjon av IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 og tumornekrosefaktor- β (TNF- β).

Det er kjent at visse vaksineadjuvanter er spesielt egnet for stimuleringen av enten TH1- eller TH2-typecytokinresponser. Tradisjonelt, inkluderer de beste indikatorene av TH1:TH2-balansen av immunresponsen etter en vaksine eller infeksjon direkte måling av produksjonen av TH1- eller TH2-cytokiner ved T-lymfocytter *in vitro* etter restimulering med antigen, og/eller (minst i mus) målingen av IgG1:IgG2a-forhold av antigen-spesifikke antistoffresponser.

Derfor, er en TH1-typeadjuvant en som stimulerer isolerte T-cellepopulasjoner til å produsere høye nivåer av TH1-typecytokiner når den blir restimulert ved antigen *in vitro*, og induserer antigenspesifikke immunoglobulinresponser assosiert med TH1-typeisotype.

Adjuvanter som er i stand til fortrinnsvis å stimulere TH1-celleresponsen blir beskrevet i internasjonal patentsøknad nr. WO 94/00153 og WO 95/17209.

3 De-O-acylerte monofosforyllipid A (3D-MPL) er en slik adjuvant. Denne er kjent fra GB 2220211 (Ribi). Kjemisk er det en blanding av 3 De-O-acylert monofosforyllipid A med 4, 5 eller 6 acylerte kjeder og blir fremstilt av Ribi Immunochem, Montana. En foretrukket form av 3 De-O-acylert monofosforyllipid A er angitt i europeisk patent 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

Fortrinnsvis er partiklene til 3D-MPL tilstrekkelig små til å bli sterilfiltrert gjennom en 0,22 mikron membran (som beskrevet i europeisk patent nr. 0 689 454). 3D-MPL vil

være tilstede i området fra 10 µg - 100 µg, fortrinnsvis 25-50 µg pr. dose, hvor antigenet typisk vil være tilstede i et område fra 2-50 µg pr. dose.

En annen foretrukket adjuvant omfatter QS21, en Hplc-renset ikke-toksisk fraksjon av-
5 ledet fra barken til Quillaja Saponaria Molina. Eventuelt kan denne bli blandet med 3
De-O-acylert monofosforyllipid A (3D-MPL), eventuelt sammen med en bærer.

Fremgangsmåte for produksjon av QS21 er angitt i U.S. patent nr. 5,057,540.

10 Ikke-reaktogene adjuvantformuleringer som inneholder QS21 har blitt beskrevet tidligere
(WO 96/33739). Slike formuleringer omfatter QS21 og kolesterol har blitt vist å være
vellykkede TH1-stimuleringsadjuvanter når de formuleres sammen med et antigen.
Skjønt vaksinesammensetninger som danner en del av den foreliggende oppfinnelsen
kan inkludere en kombinasjon av QS21 og kolesterol.

15 Ytterligere adjuvanter som er foretrukkede stimulatorer av TH1-cellerespons inkluderer
immunomodulatoriske oligonukleotider, f.eks. umetylerte CpG-sekvenser som angitt i
WO 96/02555.

20 Kombinasjoner av forskjellige TH1-stimulerende adjuvanter, slik som de som er nevnt
heri over, er også overveiet for å tilveiebringe en adjuvant som fortrinnsvis er en stimu-
lator av TH1-cellerespons. For eksempel, kan QS21 bli formulert sammen med 3D-
MPL. Forholdet av QS21:3D-MPL vil være i størrelsesorden 1:10 til 10:1, fortrinnsvis
1:5 til 5:1 og ofte vesentlig 1:1. Det foretrukkede området for optimal synergi er 2,5:1
25 til 1:1 3D-MPL:QS21.

Fortrinnsvis er bæreren også tilstede i vaksinesammensetningen ifølge oppfinnelsen.
Bæreren kan være en olje-i-vann-emulsjon, eller et aluminiumsalt, slik som aluminium-
fosfat eller aluminiumhydroksid.

30 En foretrukket olje-i-vann-emulsjon omfatter en metaboliserende olje, slik som squalen,
alfa tokoferol og Tween 80. Ytterligere kan olje-i-vann-emulsjonen inneholde span 85
og/eller lecitin og/eller trikaprylin.

35 I et spesielt foretrukket aspekt, blir antigenene i vaksinesammensetningen ifølge opp-
finnelsen kombinert med 3D-MPL og alun.

For human administrering vil QS21 og 3D-MPL være tilstede i en vaksine i området fra 1 µg - 200 µg, slik som 10-100 µg, fortrinnsvis 10 µg - 50 µg pr. dose. Olje-i-vann vil omfatte fra 2 til 10% squalen, fra 2 til 10% alfa tokoferol og fra 0,3 til 3% Tween 80. Fortrinnsvis, er forholdet av squalen:alfa tokoferol lik eller mindre enn 1 siden dette
5 tilveiebringer en mer stabil emulsjon. Span 85 kan også være tilstede på et nivå på 1%. I noen tilfeller, kan det være fordelaktig at vaksinene i følge foreliggende oppfinnelse ytterligere inneholder en stabilisator.

Ikke-toksiske olje-i-vann-emulsjoner inneholder fortrinnsvis en ikke-toksisk, f.eks.
10 squalan eller squalen, en emulgator, f.eks. Tween 80, i en vandig bærer. Den vandige bæreren kan være, f.eks. fosfatbufret saltvann.

En spesiell potent adjuvantformulering som involverer QS21, 3D-MPL og tokoferol i en olje-i-vann-emulsjon er beskrevet i WO 95/17210.

15 HPV-antigenet i sammensetningen i følge oppfinnelsen blir fortrinnsvis avledet fra HPV 16 og/eller 18, eller fra HPV 6 og/eller 11, eller HPV 31, 33 eller 45.

Der er også mulig at HPV-antigenet i vaksinesammensetningen omfatter hovedkapsid-proteinet L1 fra HPV og eventuelt L2-proteinet, spesielt fra HPV 16 og/eller HPV 18.
20 En foretrukket form av L1-proteinet et forkortet L1-protein. L1 kan være, i en L1-L2-fusjon, i form av en viruslignende partikkel (VLP). L1-proteinet kan bli satt sammen med et annet HPV-protein, spesielt E7 for å danne en L1-E7-fusjon. Kimære VLP omfatter L1-E eller L1-L2-E som er spesielt egnet.

25 HPV-antigenet i sammensetningen kan også være avledet fra et E6- eller E7-protein, spesielt E6 eller E7 koblet til en immunologisk fusjonspartner som har T-celleepitoper.

Videre er det mulig at den immunologiske fusjonspartneren er avledet fra protein D av
30 *Haemophilus influenza* B. Fortrinnsvis, omfatter protein D-derivatet omtrent den første 1/3 av proteinet, spesielt omtrent fra de første N-terminale 100-110 aminosyrene.

Egnede fusjonsproteiner omfatter protein D-E6 fra HPV 16, protein D - E7 fra HPV 16, protein D - E7 fra HPV 18 og protein D - E6 fra HPV 18. Protein D-delen omfatter fort-
35 rinnsvis den første 1/3 av protein D.

HPV-antigenet i form av en L2-E7-fusjon, spesielt fra HPV 6 og/eller HPV 11 er også en mulighet.

Proteinene fra den foreliggende oppfinnelse blir fortrinnsvis uttrykt i *E. coli*. Proteinene
5 kan uttrykkes med en Histidin-hale som omfatter mellom 5 til 9 og fortrinnsvis 6 histidinrester. Dette er fordelaktig i opprensningen. Beskrivelsen av fremstilling av slike proteiner er fullstendig beskrevet i "co-pending" UK patentsøknad nr. GB 9717953.5.

HPV-antigenet i vaksinesammensetningen kan absorberes på $\text{Al}(\text{OH})_3$.

10

HSV-antigenet i sammensetningen av oppfinnelsen blir fortrinnsvis avledet fra HSV-2, spesielt glykoprotein D. Glykoprotein D er lokalisert på den virale membranen, og blir også funnet i cytoplasma hos infiserte celler (Eisenberg, R.J., et al., *J. of Virol.* 1980, 35, 428-435). Den omfatter 393 aminosyrer som inkluderer et signalpeptid har en mole-
15 kylvækt på omtrent 60 kD. Av alle HSV-kappeglykoproteinene er dette antagelig det best karakteriserte (Cohen et al., *J. of Virology*, 60, 157-166). In vivo er den kjent å spille en sentral rolle i viral tilfesting til cellemembranene. Dessuten, har glykoprotein D blitt vist å være i stand til å reise nøytraliserende antistoffer in vivo (Eing et al., *J. Med. Virology* 127: 59-65). Imidlertid, kan latente HSV-2-virus fortsatt bli reaktivert og
20 indusere tilbakevendelse av sykdommen på tross av tilstedeværelse av høye nøytraliserende antistofftitere i pasientenes sera.

I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, er HSV-antigenet et forkortet (trunkert) HSV-2-glykoprotein D på 308 aminosyrer som omfatter aminosyrene 1 til 306 naturlig
25 forekommende glykoprotein med addisjon av asparagin og glutamin i den C-terminale ende av det forkortede proteinet blottet for dets membranankerregion. Denne formen av proteinet inkluderer signalpeptidet som blir kuttet for å gi et modent 283 aminosyreprotein. Produksjonen av et slikt protein i kinesiske hamsteroverieceller har blitt beskrevet i Genentech's europeiske patent EP-B-139 407.

30

Det rekombinante modne HSV-2-glykoprotein D trunkeringen blir fortrinnsvis brukt i vaksineformuleringene til den foreliggende oppfinnelsen og kalles rgD2t.

En kombinasjon av dette HSV-2-antigenet i kombinasjon med adjuvanten 3D-MPL har
35 blitt beskrevet i WO 92/16231.

Det er mulig å inkludere et hepatitt B-viralt (HBV) antigen i sammensetningen, gjøres det er det typisk hepatitt B overflateantigen.

Fremstillingen av hepatitt B overflateantigen (HBsAg) er godt dokumentert. Se f.eks.
 5 Harford et al., i Develop. Biol. Standard 54, side 125 (1983), Gregg et al., i Biotechnology, 5, s. 479 (1987), EP-A-0 226 846, EP-A-0 299 108 og referanser heri.

Som brukt heri, er uttrykket "hepatitt B-overflateantigen" forkortet heri til "HBsAg" eller "HBS" som inkluderer et hvilket som helst HBsAg-antigen eller fragment derav
 10 som utviser antigenisiteten til HBV-overflateantigenet. Det skal forstås at i tillegg til den 226 aminosyresekvensen fra HBsAg S-antigenet (se Tiollas et al., Nature, 317, 489 (1985) og referanser deri) kan HBsAg som beskrevet heri, hvis ønskelig, inneholde hele eller en del av pre-S-sekvensen som beskrevet i de ovenfor nevnte referanser og i EP-A-0 278 940. HBsAg som beskrevet heri kan også referere seg til varianter, f.eks. "unn-
 15 slippelsesmutant" beskrevet i WO 91/14703. I et ytterligere aspekt kan HBsAg omfatte et protein beskrevet som L* i europeisk patentsøknad nr. 0 414 374, det betyr et protein, hvis aminosyresekvens består av deler av aminosyresekvensen til hepatitt B-virus store (L) protein (ad eller ay subtype), kjennetegnet ved at aminosyresekvensen til proteinet består av enten:

- 20
- (a) restene 12-52, etterfulgt av restene 133-145, etterfulgt av restene 175-400 av nevnte L-protein; eller
 - (b) resten 12, etterfulgt av restene 14-52, etterfulgt av restene 133-145, etterfulgt av restene 175-400 av nevnte L-protein.

25 HBsAg refererer også til polypeptidene beskrevet i EP 0 198 474 eller EP 0 304 578.

Normalt vil HBsAg være i en partikkelform. Den kan omfatte S-proteinet alene eller være som sammensatte partikler, f.eks. (L*,S) hvori L* er som definert over og S betegner S-proteinet fra hepatitt B-overflateantigenet.
 30

HBsAg kan absorberes på aluminiumfosfat som beskrevet i WO 93/24148.

Hepatitt B (HBV)-antigenet som kan brukes i formuleringen kan være HBsAg S-
 35 antigenet som brukes i det kommersielle produktet Engerix-B (varemerke; SmithKline Beecham Biologicals).

En vaksine som omfatter hepatitt B-overflateantigen sammen med 3D-MPL ble beskrevet i europeisk patentsøknad 0 633 784.

Eksempler på antigener fra ytterligere patogener som kan inkluderes i sammensetningene ifølge oppfinnelsen blir nå beskrevet.

Epstein Barr virus (EBV), et medlem av herpes virus-gruppen, forårsaker infektøs mononukleose som en primær sykdom i mennesker. Fortrinnsvis, angriper den barn og unge voksne. Mer enn 90% av den gjennomsnittlige voksne populasjonen er infisert med EBV som vedvarer hele livet i de perifere B-lymfocytene. Viruset blir produsert hele livet i spyttkjertelen ved øret og spres primært ved bytte av spytt fra individer som har viruset. Barn infisert med EBV er i hovedsak asymptomatiske eller har svært milde symptomer, mens ungdom og voksne som blir infisert utvikler typisk infektøs mononukleose, kjennetegnet ved feber, faryngitt, og adenopati. Mennesker som har blitt infisert opprettholder anti-EBV-antistoffer i resten av livet, og er dermed immune mot ytterligere infeksjon.

I tillegg til dets infeksjose kvaliteter, har EBV blitt vist å transformere lymfocytter til raskt delende celler og har derfor blitt implisert i flere forskjellige lymfomer, som inkluderer afrikansk Burkitt's lymfom (BL). EBV er også involvert i å forårsake nasofaryngialt karcinom (NPC). På verdensbasis er det estimert 80 000 tilfeller av nasofaryngialt karcinom og er mer hyppig i etniske kinesiske populasjoner. Infektøs mononukleose er en konsekvens av primær infeksjon ved EBV. Det er ikke en livstruende sykdom hvis ytterligere risikofaktorer er fraværende.

Fire proteiner fra den EBV-virale kappen som består av såkalte membranantigenkomplekser har blitt beskrevet. De blir vanligvis referert til som gp 220/350 eller gp 250/350 eller simpelthen som gp 250 eller 350 (se EP-A-151079). Det er overbevisende bevis for at gp 350 og gp 250 induserer produksjonen av nøytraliserende antistoffer og at antistoffene mot gp 350 og gp 250 har nøytraliserende kapasitet. Disse proteinene er dermed kandidater for en mulig EBV-vaksine. For ytterligere informasjon om anvendelsen av gp 250/350 for profylakse og behandling av EBV-relaterte sykdommer, se EP 0 173 254.

Hoved EBV-overflateglykoproteinet gp350/220 infiserer humane målceller gjennom interaksjon med det cellulære membranproteinet CD21. Gp350/220 er det primære målet for EBV-nøytraliserende antistoffer i mennesker og noen former av gp350/220 har

blitt vist å beskytte mot EBV-relatert sykdom. Fortrinnsvis omfatter en vaksinesammensetning gp 350 fra EBV, skjønt andre beskyttende antigener kan anvendes.

Vaksinesammensetningen kan ytterligere omfatte et Varicella Zoster viralt antigen (VZV-antigen). Egnede antigener for VZV for inklusjon i vaksineformuleringen inkluderer gpI-V beskrevet av Longnecker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4303-4307 (1987).

Det er mulig å anvende gpI (se Ellis et al., US patent 4,769,239) . Se også europeisk patent nr. 0 405 867 B1.

En annen mulighet er at vaksinesammensetningen i følge oppfinneslen omfatter ytterligere et humant cytomegalovirus (HCMV)-antigen. HCMV er et humant DNA-virus som tilhører familien herpes-virus. HCMV er endemisk de fleste steder i verden. Blant to populasjoner, er HCMV ansvarlig for alvorlig medisinske tilstander. HCMV er hovedårsaken for kongenitale defekter hos nyfødte. Den andre populasjonen i risikosonen er immunokompromitterende pasienter slik som de som har HIV-infeksjon og de pasienter som gjennomgår transplantasjoner. Den kliniske sykdommen forårsaker forskjellige symptomer som inkluderer feber, hepatitt, pneumotitt og infeksøs mononukleose. Et foretrukket antigen for anvendelse i en vaksine mot HCMV er gB685** som beskrevet i WO 95/31555. Immunogener for anvendelse i HCMV-vaksiner er også mulig å tilveiebringe fra pp65, et HCMV-matriksprotein som beskrevet i WO 94/00150 (City of Hope).

Videre kan vaksinesammensetningen i følge oppfinnelsen ytterligere omfatte både et VZV- og et HCMV-antigen, spesielt de antigenene beskrevet over.

Vaksinesammensetningen i følge oppfinnelsen kan ytterligere omfatte et *Toxoplasma gondii*-antigen. *Toxoplasma gondii* er en obligat intracellulær protozoisk parasitt ansvarlig for toksoplasmose i varmblodige dyr, inklusiv mennesket. Skjønt den er generelt kliniske asymptomatisk i friske individer, så kan toksoplasmose forårsake alvorlige komplikasjoner hos gravide kvinner og i immunokompromitterende pasienter. Et foretrukket antigen for anvendelse i en vaksine mot *Toxoplasma gondii* er SAG1 (også kjent som P30) som beskrevet i WO96/02654 eller Tg34 som beskrevet i WO92/11366.

Vaksinesammensetningen i følge oppfinnelsen kan ytterligere omfatte enten et VZV-antigen eller et HCMV-antigen kombinert med et *Toxoplasma gondii*-antigen, spesielt de antigenene som beskrevet over.

- 5 Vaksinesammensetningen i følge oppfinnelsen kan være en multivalent vaksine, f.eks. en tetra- eller pentavalent vaksine.

Formuleringene fra den foreliggende oppfinnelse er svært effektive i å indusere beskyttende immunitet, selv med svært lave doser av antigen (f.eks. så lave som 5 µg rgD2t).

10

De tilveiebringer utmerket beskyttelse mot primærinfeksjon og stimulerer, fordelaktig både spesifikk humoral (nøytraliserende antistoffer) og også effektorcellemedierte (DTH) immunresponser.

- 15 Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer en vaksineformulering som heri beskrevet for anvendelse i medisinsk terapi, spesielt for anvendelse i behandling eller profylakse av humane papillomavirusinfeksjoner og herpes simpleks-virusinfeksjoner.

- 20 Vaksinene fra den foreliggende oppfinnelse vil inneholde en immunobeskyttende mengde av antigenene og kan fremstilles ved konvensjonelle teknikker.

- Vaksinefremstillingen blir generelt beskrevet i Pharmaceutical Biotechnology, bind 61, Vaccine Design - the subunit and adjuvant aproach, utgitt av Powell og Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developmens in Vaccines, utgitt av Voller et al.,
 25 University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. Innkapsling inne i liposomer er beskrevet, f.eks. av Fullerton, U.S. patent 4,235,877. Konjugasjon av proteiner til makromolekyler er angitt, f.eks., av Likhite, U.S. patent 4,372,945 og av Armor et al., U.S. patent 4,474,757.

- 30 Mengden av protein i hver vaksinedose er selektert som en mengde som induserer en immunobeskyttende respons uten signifikante bivirkninger hos den vaksinerte. Slik mengde vil variere avhengig av hvilket spesifikt immunogen som anvendes. Generelt, er det forventet at hver dose vil omfatte 1-1 000 µg av protein, fortrinnsvis 2-100 µg, mest foretrukket 4-40 µg. En optimal mengde for en spesiell vaksine kan fastslås ved standardstudier som involverer observasjon av antistoff-titere og andre responser i individe-
 35 ne. Etter en initial vaksinering, kan individene motta en "boost" etter omtrent 4 uker.

I tillegg til vaksinering av personene som er følsomme for HPV- eller HSV-infeksjoner, kan de farmasøytiske sammensetningene fra den foreliggende oppfinnelsen bli brukt for å behandle, immunoterapeutiske, pasienter som lider av nevnte virale infeksjoner.

- 5 Det er mulig å frembringe en fremgangsmåte for å fremstille som heri beskrevet, hvor fremgangsmåten omfatter å blande et humant papillomavirusantigen og et herpes simplex-virusantigen med en TH-1-induserende adjuvant, f.eks. 3D-MPL og, fortrinnsvis, en bærer, f.eks. alun.
- 10 Hvis ønskelig, kan andre antigener tilsettes, i en hvilken som helst rekkefølge, for å tilveiebringe multivalente vaksinesammensetninger som beskrevet heri.

Eksempel 1: Komparativ immunogenitet av HPV Ags/HBs/gD i monovalente eller kombinasjonsvaksiner formulert med AS04.

15

INTRODUKSJON

En immunogenitetsstudie ble utført i Balb/C-mus ved å bruke fire forskjellige antigener:

- 20 1. HPV16 L1 viruslignende partikkel (VLP-16)
2. HPV18 L1 viruslignende partikkel (VLP-18)
3. gD antigen fra HSV-2
4. HBsAG

formulert med alun/3D-MPL (AS04) ved å bruke preabsorberte monobulker av antigen
25 eller 3D-MPL på $\text{Al}(\text{OH})_3$ eller AlPO_4 .

3D-MPL/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ -formuleringene blir referert til som AS04D mens 3D-MPL/ AlPO_4 -baserte formuleringer blir referert til som AS04C.

30 Følgende vaksine ble vurdert:

1. VLP16+VLP18 AS04D;
2. gD AS04D;
3. HBs AS04C
- 35 og potensialet for å kombinere disse vaksinene som evaluert.

Målet for dette eksperimentet var å sammenligne immunogeniteten til to forskjellige AS04-kombinasjoner som ble fremstilt av enten:

1. VLP16+VLP18 og gD.
- 5 2. VLP16+VLP18 og gD og HBs Ag.

Den eksperimentelle protokollen er fullstendig beskrevet i materialer og fremgangsmåteavsnittet.

- 10 Som en oppsummering, blir grupper på 10 mus immunisert intramuskulært to ganger med 3 ukers intervaller med forskjellige Ag-baserte formuleringer. Antistoffrespons mot VLP, gD og HBs Ag og den isotype profilen induisert ved vaksinen ble målt ved ELISA på dag 14 post II. På det samme tidspunktet, ble cytokinproduksjonen (IFN γ /IL5) analysert etter *in vitro* restimulering av miltceller med enten VLPs, gD eller
- 15 HBs-antigener.

MATERIALER OG METODER

Formulering

20 Formuleringssammensetninger

VLP16, VLP18, gD og HBs formulert med 3D-MPL på aluminiumsalt.

Komponenter som ble brukt

Komponent	Konsentrasjon	Buffer
HPV 16 VLP	560 $\mu\text{g/ml}$	Tris 20 mM/NaCl 500 mM
HPV 18 VLP	550 $\mu\text{g/ml}$	NaCl 500 mM/NaPO ₄ 20 mM
Al(OH) ₃	10 380 $\mu\text{g/ml}$	H ₂ O
HBs	1 219 $\mu\text{g/ml}$	PO ₄ 10 mM/NaCl 150 mM
gD	443 $\mu\text{g/ml}$	PBS pH 7,4
3D-MPL	1 170 $\mu\text{g/ml}$	Vann for injeksjon
AlPO ₄	5 mg/ml	NaCl 150 mM

25

Absorbsjon

a) VLP-absorbsjon

VLP16 og VLP 18 rensset bulk ble tilsatt til Al(OH)₃ for å erverve et forhold på 2 μg VLP/10 μg Al(OH)₃. Blandingen blir lagret mellom 2-8°C inntil sluttformulering.

b) gD-absorbsjon

2 µg gD blir blandet med 10 µg Al(OH)₃. Blandingen blir lagret mellom 2-8°C inntil sluttformuleringen.

5

c) HBs-absorbsjon

2 µg HBs blir blandet med 10 µg AlPO₄. Blandingen blir lagret mellom 2-8°C inntil sluttformuleringen.

10 *d) 3D-MPL-absorbsjon*

5 µg 3D-MPL blir blandet med 10 µg Al(OH)₃. Blandingen blir lagret mellom 2-8°C inntil sluttformuleringen.

5 µg 3D-MPL blir blandet med 10 µg AlPO₄. Blandingen blir lagret mellom 2-8°C inntil sluttformuleringen.

15

Formulering

H₂O og NaCl blir blandet (10x konsentrert) og etter 10 minutter med risting ved romtemperatur, blir de forskjellige komponentene tilsatt: absorbert antigen, absorbert 3D-MPL og Al(OH)₃ (se tabell under). De blir ristet ved romtemperatur i 10 minutter og

20 lagret ved 4°C inntil injeksjon.

Gruppe	Antigen(er)		Immunostimulanter		Bindemiddel	
	Type	µg	Type	µg	Type	µg
A	gD	2			Al(OH) ₃	10
	VLP16	2			Al(OH) ₃	10
	VLP18	2			Al(OH) ₃	10
			3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
						10
B	gD	2			Al(OH) ₃	10
	VLP16	2			Al(OH) ₃	10
	VLP18	2			Al(OH) ₃	10
	HBs	2			AlPO ₄	10
			3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
C	gD	2			Al(OH) ₃	10
			3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	30

D	VLP16	2			Al(OH) ₃	10
	VLP18	2			Al(OH) ₃	10
			3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	20
E	HBs	2			AlPO ₄	10
			3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	30

Museserologi

Anti-VLP-16- og anti-VLP18-serologi

- 5 Kvantifisering av anti-VLP16- og anti-VLP18-antistoffer ble utført med ELISA ved å bruke VLP16 503/1 (20/12/99) og VLP18 504/2 (25/10/99F) som belegningsantigener. Antigen og antistoffløsningene ble brukt ved 50 µl pr. brønn. Antigenet ble fortynnet til en sluttkonsentrasjon på 0,5 µg/ml i PBS og ble absorbert over natt ved 4°C til brønnene i 96 brønners mikrotiterplater (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Danmark). Platene ble
- 10 deretter inkubert i 1 time ved 37°C med PBS som inneholder 1% bovint serumalbumin. To gangers fortynninger av sera (som startet ved 1/400 fortynning) i metningsbufferen ble tilsatt til VLP-betrukkede plater og inkubert i 1 time og 30 minutter ved 37°C. Platene ble vasket i 4 timer med PBS 0,1% Tween 20 og biotin-konjugert anti-muse Ig (Amersham, UK) fortynnet 1/1500 i metningsbuffer som blir tilsatt til hver brønn og
- 15 inkubert i 1 time og 30 minutter ved 37°C. Etter et vasketrinn, ble streptavidin-biotinylert peroksidasekompleks (Amersham, UK) fortynnet 1/1000 i metningsbuffer tilsatt i ytterligere 30 minutter ved 37°C. Platene ble vasket som over og inkubert i 20 minutter med en løsning av o-fenylendiamin (Sigma) 0,04% H₂O₂ 0,03% i 0,1% Tween 20, 0,05 M sitratbuffer pH 4,5. Reaksjonen ble stoppet med H₂SO₄ 2N og lest ved
- 20 490/630 nm. ELISA-titerene ble beregnet fra en referanse med SoftmaxPro (ved å bruke en fire parameters ligning) og uttrykt i EU/ml.

Anti-gD-respons:

- Kvantifisering av anti-gD-antistoff ble utført med ELISA ved å bruke gD (gD 43B318) som belegningsantigen. Antigenet og antistoffløsninger ble brukt ved 50 µl pr. brønn. Antigenet ble fortynnet ved en sluttkonsentrasjon på 1 µg/ml i PBS og ble absorbert over natt ved 4°C til brønnene på 96 brønners mikrotiterplater (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Danmark). Platene ble deretter inkubert i 1 time ved 37°C med PBS som inneholdt 1% bovint serumalbumin og 0,1% Tween 20 (metningsbuffer; 100 µl/brønn).
- 30 To gangers fortynninger av sera (som starter ved 1/100 fortynning) i metningsbufferen

ble tilsatt til gD-betrukkede plater og inkubert i 1 time og 30 minutter ved 37°C. Platene ble vasket fire ganger med PBS 0,1% Tween 20 og biotinkonjugert anti-mus IgG1, IgG2a, IgG2b eller Ig (Amersham, UK) fortynnet 1/1000 i metningsbuffer ble tilsatt til hver brønn og inkubert i 1 time og 30 minutter ved 37°C. Etter et vasketrinn, ble streptavidin-biotinylert peroksidasekompleks (Amersham, UK) fortynnet 1/1000 i metningsbuffer tilsatt i ytterligere 30 minutter ved 37°C. Platene ble vasket som over og inkubert i 20 minutter med en løsning av o-fenylendiamin (Sigma) 0,04% H₂O₂, 0,03% i 0,1% Tween 20, 0,05M sitratbuffer pH 4,5. Reaksjonen ble stoppet med H₂SO₄ 2N og lest ved 450/630 nm. ELISA-titerene ble beregnet fra en referanse med SoftmaxPro (ved å bruke en fire parameters ligning) og uttrykt i EU/ml.

Anti-HBs-serologi

Kvantifisering av anti-HBs-antistoffer ble utført med ELISA ved å bruke HBs (Hep 286) som belegningsantigen. Antigen og antistoffløsningene ble brukt ved 50 µl pr. brønn. Antigenet ble fortynnet til en sluttkonsentrasjon på 1 µg/ml i PBS og ble absorbert over natt ved 4°C til brønnene i 96 brønners mikrotiterplater (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Danmark). Platene ble deretter inkubert i 1 time ved 37°C med PBS som inneholdt 1% bovint serumalbumin og 0,1% Tween 20 (metningsbuffer). To gangers fortynninger av sera (som startet ved 1/100 fortynning) i metningsbufferen ble tilsatt til de HBs-betrukkede platene og inkubert i 1 time og 30 minutter ved 37°C. Platene ble vasket fire ganger med PBS 0,1% Tween 20 og biotin-konjugert anti-muse Ig (Amersham, UK) fortynnet 1/1500 i IgG1, IgG2a, IgG2b (IMTECH, USA) fortynnet respektivt ved 1/4000, 1/8000, 1/4000 i metningsbuffer og tilsatt til hver brønn og inkubert i 1 time og 30 minutter ved 37°C. Etter et vasketrinn, ble streptavidin-biotinylert peroksidasekomplekset (Amersham, UK) fortynnet 1/1000 i metningsbuffer tilsatt i ytterligere 30 minutter ved 37°C. Platene ble vasket som over og inkubert i 20 minutter med en løsning av o-fenylendiamin (Sigma) 0,04% H₂O₂, 0,03% i 0,1% Tween 20, 0,05 M sitrabutter pH 4,5. Reaksjonen ble stoppet med H₂SO₄ 2N og lest ved 490/630 nm. ELISA-titerene ble beregnet fra en referanse med SoftmaxPro (ved å bruke en fire parameters ligning) og uttrykt i EU/ml.

Cytokinproduksjon

To uker etter andre immunisering, ble musene avlivet, miltene ble fjernet aseptisk og samlet sammen. Cellesuspensjonene ble preparert i RPMI 1640 medium (GIBCO) som inneholdt 2 mM L-glutamin, antibiotika, 5x10⁻⁵ M 2-merkaptotanol, og 5% fetalt kalveserum. Cellene ble dyrket ved en sluttkonsentrasjon på 5x10⁶ celler/ml, i 1 ml pr. flatbunnet 24 brønners plater med forskjellige konsentrasjoner (10-1 µg/ml) av hver av

Ag (VLPs, gD eller HBs-antigen). Supernatantene ble høstet 96 timer senere og frosset inntil de ble testet ut for tilstedeværelse av IFN γ og IL5 med ELISA.

IFN γ (Genzym)

- 5 Kvantifisering av IFN γ ble utført med ELISA ved å bruke reagenser fra Genzyme. Prøvene og antistoffløsningene ble brukt ved 50 μ l pr. brønn. 96 brønners mikrotiterplater (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Danmark) ble betrukket over natt ved 4°C med 50 μ l hamster anti-muse IFN γ fortynnet ved 1,5 μ g/ml i karbonatbuffer pH 9,5. Platene ble deretter inkubert i 1 time ved 37°C med 100 μ l PBS som inneholdt 1% bovint serumalbumin og 0,1% Tween 20 (metningsbuffer). To gangers fortynninger av supernatant fra
- 10 *in vitro* stimulering (som startet ved 1/2) i metningsbuffer ble tilsatt til anti-IFN γ -betrukkede plater og inkubert i 1 time og 30 minutter ved 37°C. Platene ble vasket fire ganger med PBS Tween 0,1% (vaskebuffer) og biotinkonjugert geite anti-muse IFN γ fortynnet i metningsbuffer til en sluttkonsentrasjon på 0,5 μ g/ml ble tilsatt til hver brønn
- 15 og inkubert i 1 time ved 37°C. Etter et vasketrinn, ble AMDEX-konjugat (Amersham) fortynnet 1/10000 i metningsbuffer tilsatt i 30 minutter ved 37°C. Platene ble vasket som over og inkubert med 50 μ l TMB (Biorad) i 10 minutter. Reaksjonen ble stoppet med H₂SO₄ 0,4N og lest ved 450/630 nm. Konsentrasjonene ble beregnet ved å bruke en standard kurve (muse IFN γ -standard) med SoftmaxPro (fire parameters ligning) og
- 20 uttrykt i pg/ml.

IL5 (Pharmingen)

- Kvantifisering av IL5 ble utført ved ELISA ved å bruke reagenser fra Pharmingen. Prøver og antistoffløsninger ble brukt ved 50 μ l pr. brønn. 96 brønners mikrotiterplater
- 25 (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Danmark) ble betrukket over natt ved 4°C med 50 μ l rotte anti-muse IL5 fortynnet ved 1 μ g/ml i karbonatbuffer pH 9.5. Platene ble deretter inkubert i 1 time ved 37°C med 100 μ l PBS som inneholdt 1% bovint serumalbumin og 0,1% Tween 20 (metningsbuffer). To gangers fortynninger av supernatant fra *in vitro* stimulering (som startet ved 1/2) i metningsbuffer ble tilsatt til anti-IL-5-betrukkede
- 30 plater og inkubert i 1 time og 30 minutter ved 37°C. Platene ble deretter vasket fire ganger med PBS Tween 0,1% (vaskebuffer) og biotinkonjugert rotte anti-muse IL5 fortynnet i metningsbuffer til en sluttkonsentrasjon på 1 μ g pr. ml ble tilsatt til hver brønn og inkubert i 1 time ved 37°C. Etter et vasketrinn, ble AMDEX-konjugat (Amersham) fortynnet 1/10000 i metningsbuffer tilsatt i 30 minutter ved 37°C. Platene ble vasket
- 35 som over og inkubert med 50 μ l TMB (Biorad) i 15 minutter. Reaksjonen ble stoppet med H₂SO₄ 0,4N og lest ved 450/630 nm. Konsentrasjonene ble beregnet ved å bruke

en standardkurve (rekombinant muse IL-5) ved SoftmaxPro (fire parameters ligning) og uttrykt i pg/ml.

GRUPPER

- 5 Grupper av 10 Balb/C-mus ble immunisert intramuskulært med følgende formuleringer:

Tabell 1: Grupper og formuleringer

GRUPPE	FORMULERING
A	VLP16 2 µg/VLP18 2 µg/gD 2 µg/ 3D-MPL 5 µg/Al(OH) ₃ 50 µg
B	VLP16 2 µg/VLP18 2 µg/HBs 2 µg/gD 2 µg/ 3D-MPL 5 µg/Al(OH) ₃ 40 µg/AlPO ₄ 10 µg
C	gD 2 µg/3D-MPL 5 µg/Al(OH) ₃ 50 µg
D	VLP16 2 µg/VLP18 2 µg/3D-MPL 5 µg/Al(OH) ₃ 50 µg
E	HBs 2 µg/3D-MPL 5 µg/AlPO ₄ 10 µg/Al(OH) ₃ 40 µg

- 10 Detaljer for formuleringene er beskrevet over i materialer og metoder.

RESULTATER

1. Serologi

15

a) Anti-VLP16-respons:

Humorale responser (Ig) ble målt med ELISA ved å bruke VLP16 503-1 (20/12/99) som belegningsantigen. Dag 14 post II sera ble analysert.

- 20 **Figur 1** viser anti-VLP16 Ig-antistoffresponsene målt på individuelt sera på dag 14 post II.

- 25 Anti-VLP16-titerene ervervet etter immunisering med kombinasjonen av VLPs, gD og HBs Ag (gruppe B), ble svakt lavere enn den oppnådd med enten kombinasjon av VLPs og gD (gruppe A) eller den monovalente VLPs-formuleringen (gruppe D) (GMT respektivt av 27 578 versus 48 105 EU/ml versus 44 448 EU/ml). Før statistisk analyse av T-Grubbs-test ble anvendt på hver populasjon for dataeksklusjon. De to ikke-responderende musene i gruppene A og D ble eliminert for analyse.

Forskjellene observert mellom gruppene ble vist statistisk ikke å være signifikante ved å bruke Student Newman Keuls-test.

b) Anti-VLP18-respons:

- 5 Humorale responser (Ig) ble målt med ELISA ved å bruke VLP18 504-2 (25/10/99) som overtrekningsantigen. Dag 14 post II-sera ble analysert.

Figur 2 viser anti-VLP-18 Ig-antistoffrespons målt på individuelt sera på dag 14 post II.

- 10 Anti-VLP18-titere ervervet etter immunisering med kombinasjonen av VLPs, gD og HBs Ag (gruppe B), var i den samme størrelsen som titerene ervervet med enten kombinasjonen av VLPs og gD (gruppe A) eller den monovalente VLPs-formuleringen (gruppe D) (GMT respektivt for 56 078 versus 88 786 EU/ml versus 76 991 EU/ml).
- 15 Før statistisk analyse ble en T-Grubbs-test anvendt på hver populasjon for dataeksklusjon. To ikke-responderende mus i gruppene A og D ble eliminert for analyse.

Forskjellene som ble observert viste seg å være statistisk ikke signifikant ved å bruke enveisanalyse av varianstesten.

20

c) Anti-gD-respons:

Humorale responser (Ig og isotyper) ble målt med ELISA ved å bruke gD som overtrekksantigen. Dag 14 post II-sera ble analysert.

- 25 **Figur 3** viser anti-gD-antistoffresponser målt på individuelt sera på dag 14 post II:

- Når det gjelder anti-gD-responsen, ble en svak økning observert i GMT ervervet med VLPs/gD/HBs-kombinasjonen (gruppe B) sammenlignet til gD alene (gruppe C) eller VLPs/gD-kombinasjonen (gruppe A) (GMT respektivt fra 18 631 versus 32 675 versus
- 30 27 058 EU/ml).

Før statistisk analyse ble en T-Grubbs-test anvendt på hver populasjon for dataeksklusjon. To ikke-responderende mus i gruppe A ble eliminert for analyse.

- 35 En enveisanalyse av variansen ble utført på anti-gD-titerene etter log-transformasjon av post II-data. Ingen statistisk signifikant forskjell ble observert mellom de tre formuleringene.

Isotypisk nyfordeling analysert på oppsamlet sera var som følger:

	Isotypisk ny fordeling (%)		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
Gruppe A	96	3	2
Gruppe B	96	3	2
Gruppe C	97	1	1

- 5 Ingen forskjell ble observert i isotypisk profil induisert av de tre formuleringene: i hovedsak ble IgG1-respons (96-97% av IgG1) induisert i de tre gruppene som rapportert i tabellen under.

d) Anti-HBs-respons:

- 10 Humorale responser (Ig og isotyper) ble målt med ELISA ved å bruke HBsAg (Hep286) som belegningsantigen. Dag 14 post II sera ble analysert.

Figur 4 viser anti-HBs-antistoffresponser målt på individuelt sera på dag 14 post II.

- 15 En noe svakere anti-HBs-antistoffrespons blir observert i kombinasjonsgruppe B som inneholder VLPs, gD og HBs-antigener sammenlignet med HBs alene (gruppe E) (GMT av 28 996 EU/ml versus 20 536 EU/ml).

- 20 En enveis analyse av varians ble utført på anti-HBs-titere etter log-transformasjon og post II-data. Ingen statistisk signifikant forskjell ble observert mellom gruppen B (VLP/HBs/gD) versus gruppen E (HBs AS04) ved å bruke Student Newman Keuls-test.

- 25 Den isotype nyfordelingen analysert på det oppsamlede sera var som følger og viste ingen forskjeller mellom de to gruppene med en proporsjon av IgG2a bevart i kombinasjonsvaksinen.

	Isotypisk ny fordeling (%)		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
Gruppe B	54	24	21
Gruppe E	56	23	21

2. Cellemediert immunrespons

Cellemedierte immunresponser (IFN γ /IL5-produksjon) ble evaluert på dag 14 post II etter *in vitro* restimulering av miltceller med enten VLPs, gD eller HBs-antigener. For
5 hver gruppe av mus, ble oppsamlinger av 5 organer utført.

Den eksperimentelle prosedyren er fullstendig beskrevet i materialer og metoder.

3. Cytokinproduksjon

10

a) *In vitro* restimulering med VLP16 og VLP18

Cellemedierte immunresponser (lymfoproliferering, IFN γ /IL5-produksjon) ble evaluert på dag 14 post II etter *in vitro* restimulering av miltceller med enten HBs, E7 eller VLPs-antigener. For hver gruppe av mus, ble oppsamlinger av 5 organer satt sammen.

15

Den eksperimentelle prosedyren er fullstendig beskrevet over i materialer og metoder.

3. Cytokinproduksjon

20 a) *In vitro* restimulering med HBs

Figur 5 viser cytokinproduksjon målt i miltceller i 96 timer *in vitro* restimulering med HBs.

25

Figur 6 viser cytokinproduksjon målt i miltceller etter 96 timer *in vitro* restimulering med VLP18.

Ingen klar doseområdeeffekt har blitt observert ved å bruke 10 μ g og 1 μ g Ag-dose for restimulering med enten begge VLP-antigenene på begge cytokinproduksjonene.

30 En klar TH1-profil ble observert med alle formuleringene.

Tabell 2: IFN- γ /IL-5-forhold etter *in vitro* restimulering med VLP16 og VLP18

Forhold IFN/IL-5	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe D
VLP16 10 μ g/ml	5,2	8,9	11,8
VLP 16 1 μ g/ml	15,1	14,3	16,5

Forhold IFN/IL-5	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe D
VLP18 10 μ g/ml	19,6	11,1	16,1
VLP18 1 μ g/ml	23,2	14,3	18,2

5 **b) *In vitro* restimulering med gD**

Figur 7 viser cytokinproduksjonen målt i miltceller etter 96 timer *in vitro* restimulering med gD-antigen.

Ingen klar doseområdeeffekt ble observert når en sammenligner 10 og 1 μ g Ag dose for
10 restimulering.

IFN- γ blir produsert i mye høyere konsentrasjon sammenlignet med IL-5 (tabell 3) som indikerer en klar TH-1-profil av immunresponsen i alle gruppene som ble evaluert (monovalent versus kombinasjon).

15

Tabell 3: IFN- γ /IL-5-forhold etter *in vitro* restimulering med gD.

Forhold IFN/IL-5	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
gD 10 μ g/ml	6,2	7,2	3,1
gD 1 μ g/ml	6,2	11,2	2,3

c) *In vitro* restimulering med HBs

20 **Figur 8** viser cytokinproduksjonen målt i miltceller etter 96 timer *in vitro* restimulering med HBs.

Et signifikant nivå av IFN- γ , men ingen IL5-produksjon ble observert for gruppe B. Som vist i tabell 2 ble en høyere produksjon av IFN- γ observert i gruppe E sammenlignet med gruppe B. Imidlertid ble høy bakgrunnsverdi av IFN- γ observert i gruppe E (HBs-monovalent) for kontrollen med ingen antigen for restimulering. Et svært høyt IFN- γ /IL-5-forhold ble observert med monovalent vaksine som indikerer at en sterk TH1-respons blir induert. På samme måte, ble et høyt IFN- γ /IL-5-forhold målt med
25

den kombinerte vaksinen som bekrefter evnen til denne formuleringen og også indusere en TH-1-respons.

Tabell 4: IFN- γ /IL-5-forhold etter in vitro restimulering med HBs

5

Forhold IFN/IL-5	Gruppe B	Gruppe E
HBs 10 μ g/ml	15,8	65,3
HBs 1 μ g/ml	7,6	67,6

KONKLUSJONER

- 10 Effekten av kombinasjonen av VLPs/gD eller VLPs/gD/HBS Ag formulert i AS04 på immunogenitet ble evaluert i Balb/C-mus:

Når det gjelder den serologiske analysen, ble ingen interferens av Ag-kombinasjonen observert på anti-VLPs, anti-gD og anti-HBs-serologi.

15

Kombinasjonen av VLPs og gD eller VLPs, gD og HBs-antigener interfererte ikke med den isotype profilen av antistoffresponsen som ble utvist av gD og HBs-monovalente vaksiner.

- 20 I cytokinevaluering, ble TH-1-profilen (IFN- γ /IL-5 forhold) observert med hver monovalent vaksine bekreftet med kombinasjonsvaksinegruppen.

P a t e n t k r a v

1.

Vaksinesammensetning egnet for bruk ved behandling eller profylakse av human papillomavirusinfeksjoner og herpes simpleksvirusinfeksjoner, k a r a k -
5 t e r i s e r t v e d at den omfatter:

(a) et herpes simpleksvirus (HSV) 2 gD antigen; og

(b) HPV 16 eller HPV 18 L1 viruslignende partikkel som består av et humant papillomavirus (HPV) L1 antigen;

10 i forbindelse med en adjuvant som er en foretrukket stimulator av TH1-cellerespons, hvori sammensetningen ikke inneholder et hepatitt B antigen.

2.

Vaksinesammensetning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
15 v e d at den ytterligere omfatter en bærer.

3.

Vaksinesammensetning ifølge krav 1 eller krav 2, hvor den fortrinnsvis stimulatoren av TH1-celleresponsen er valgt fra gruppen av adjuvanter, k a r a k -
20 t e r i s e r t v e d at de omfatter: 3D-MPL, 3D-MPL hvor størrelsen av partiklene av 3D-MPL fortrinnsvis er omtrent eller mindre enn 100 nm, QS21, en blanding av QS21 og kolesterol, og et CpG-oligonukleotid.

4.

25 Vaksinesammensetning ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at den fortrinnsvis stimulatoren av TH1-cellerespons er 3D-MPL.

5.

Vaksinesammensetning ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t
30 v e d at den ytterligere omfatter alum.

6.

Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at HSV-antigenet er en trunkert form av HSV 2
35 gD.

7.

Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at vaksinen omfatter humant HPV 16 og HPV
18 L1 viruslignende partikkel som består av et humant papillomavirus (HPV) L1 anti-
5 gen.

8.

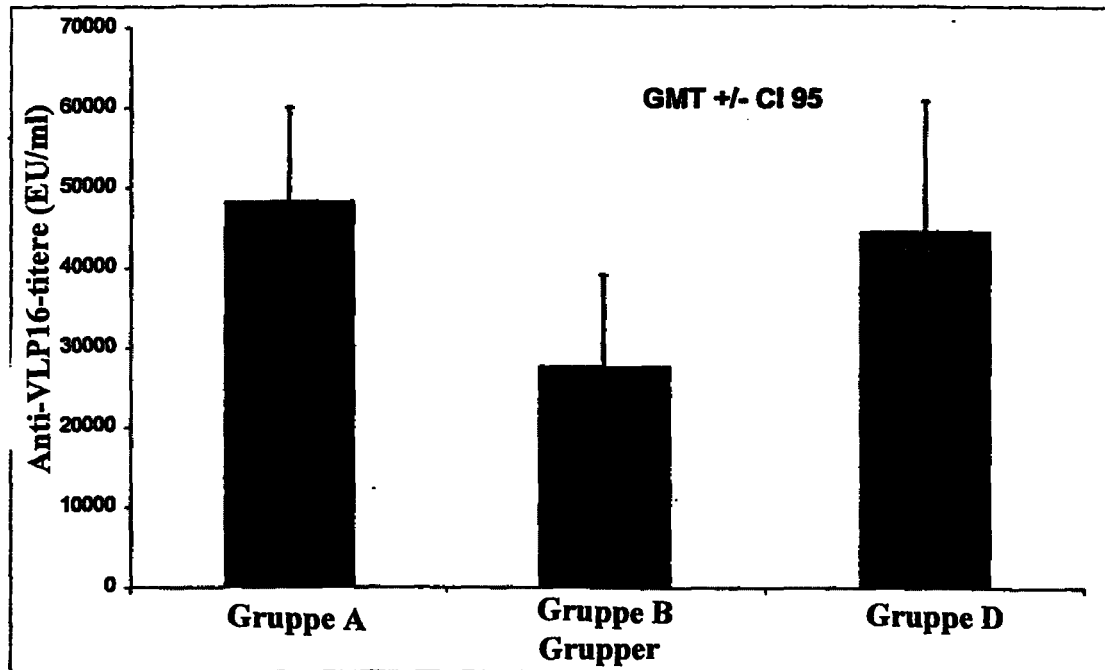
Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at nevnte viruslignende partikkel ikke omfatter
10 HPV L2.

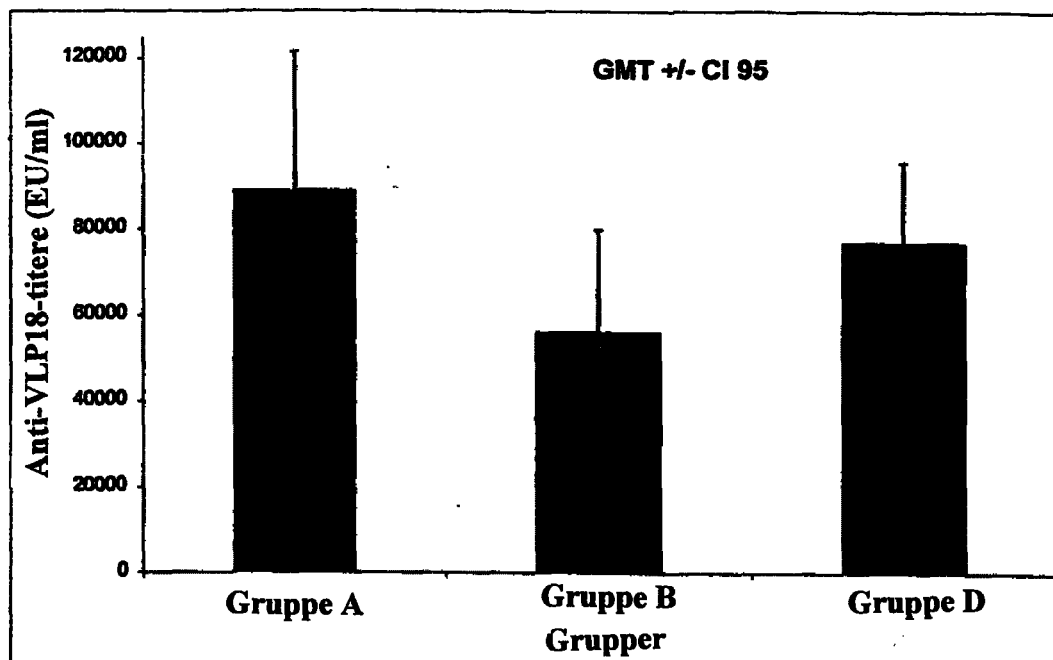
9.

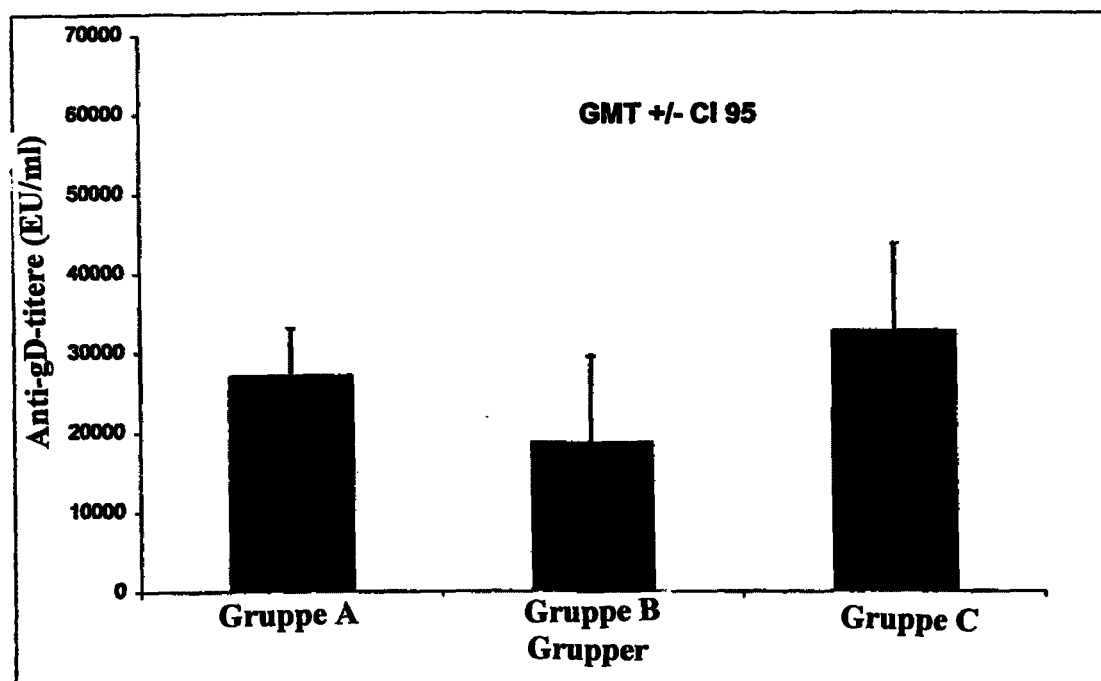
Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 2 til 8, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at bæreren er valgt fra gruppen som består av
15 aluminiumhydroksid, aluminiumfosfat og tokoferol og en olje-i-vann-emulsjon.

FIGUR 1: Anti-VLP16-respons på dag 14 post II

Resultater på individuelt sera (EU/ml)

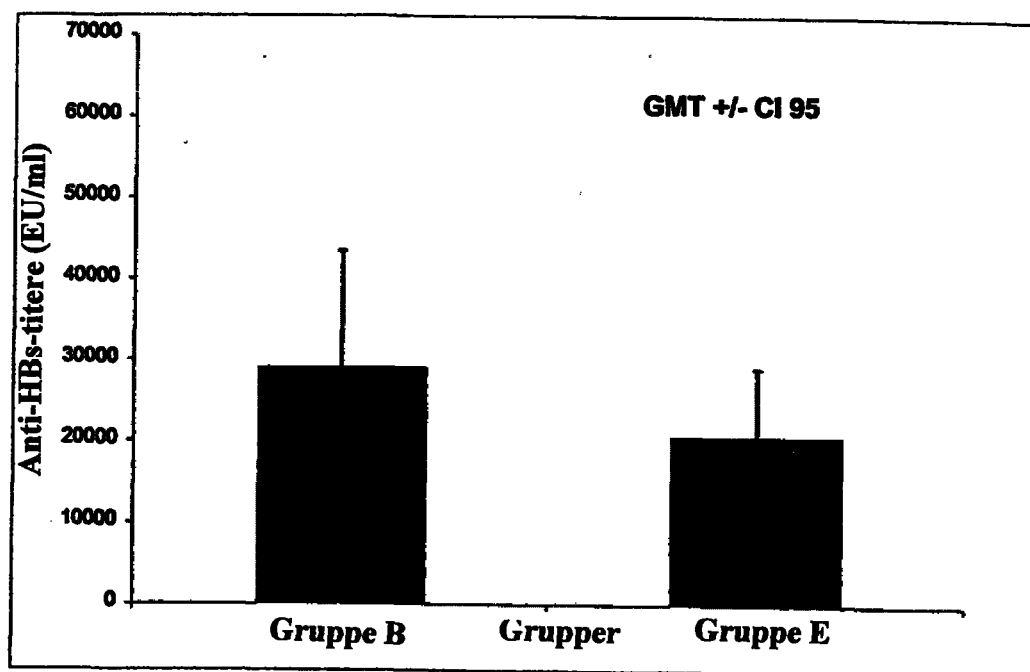


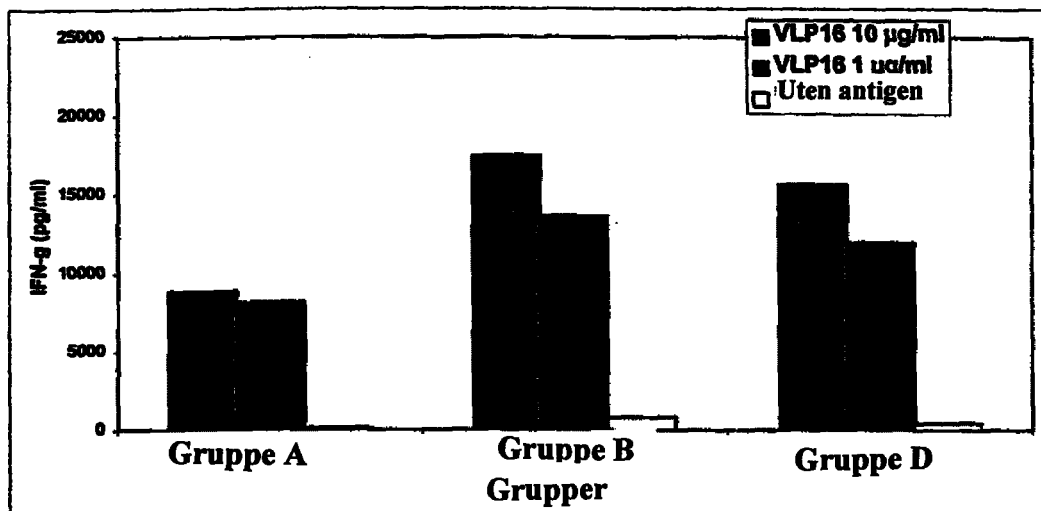
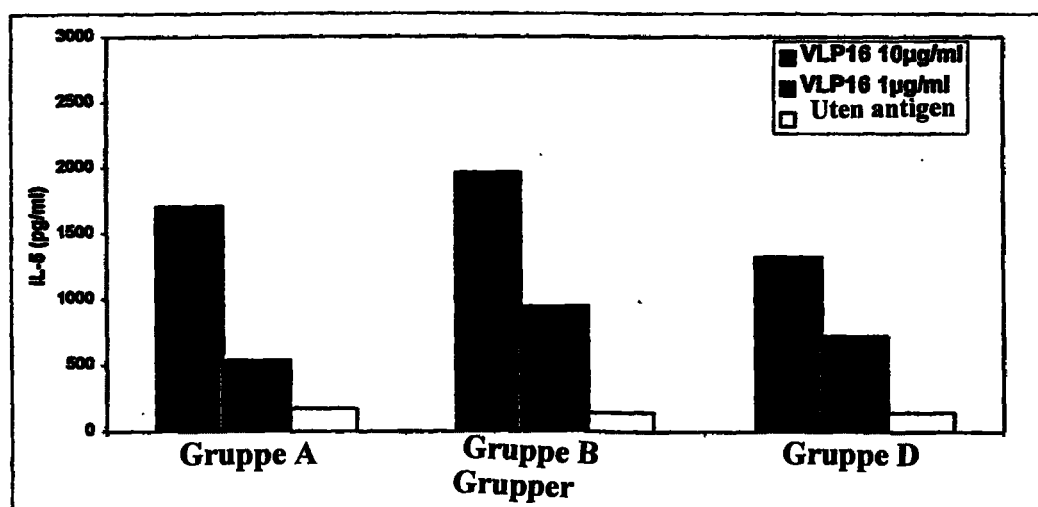
FIGUR 2: Anti-VLP18-respons på dag 14 post 11**Resultater på individuelt sera (EU/ml)**

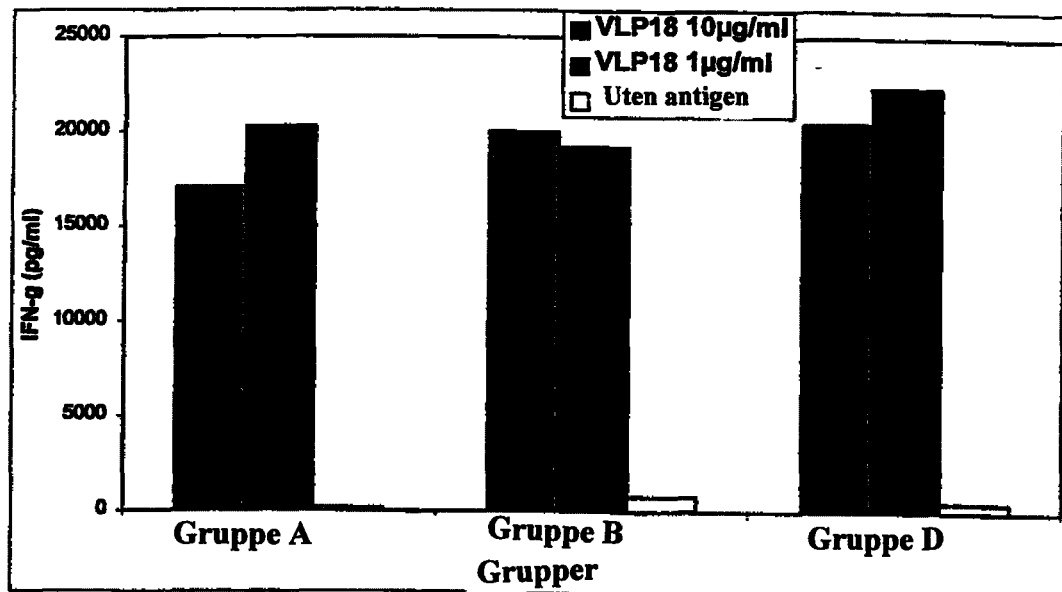
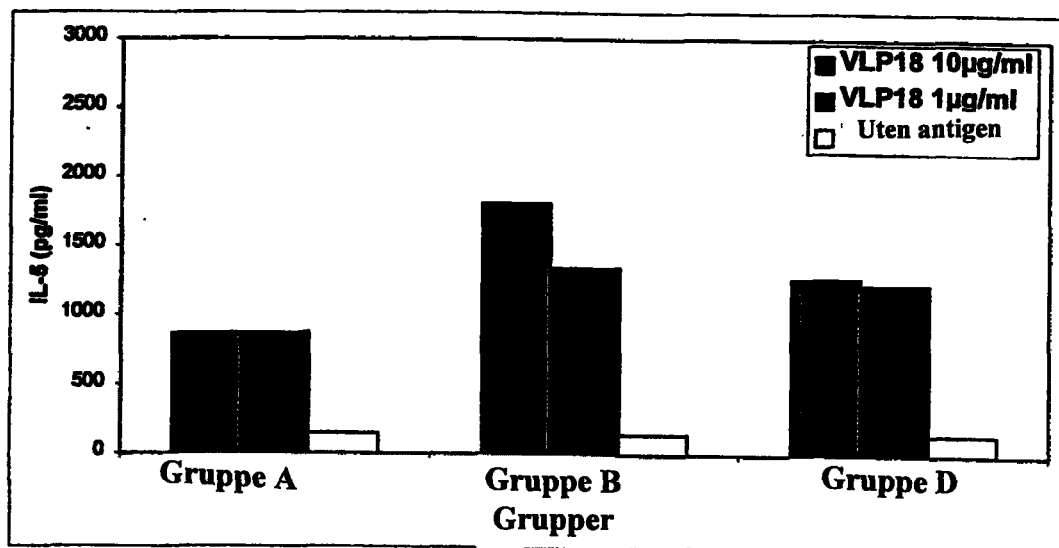
FIGUR 3: Anti-gD-respons på dag 14 post II**Resultater på individuelt sera (EU/ml)**

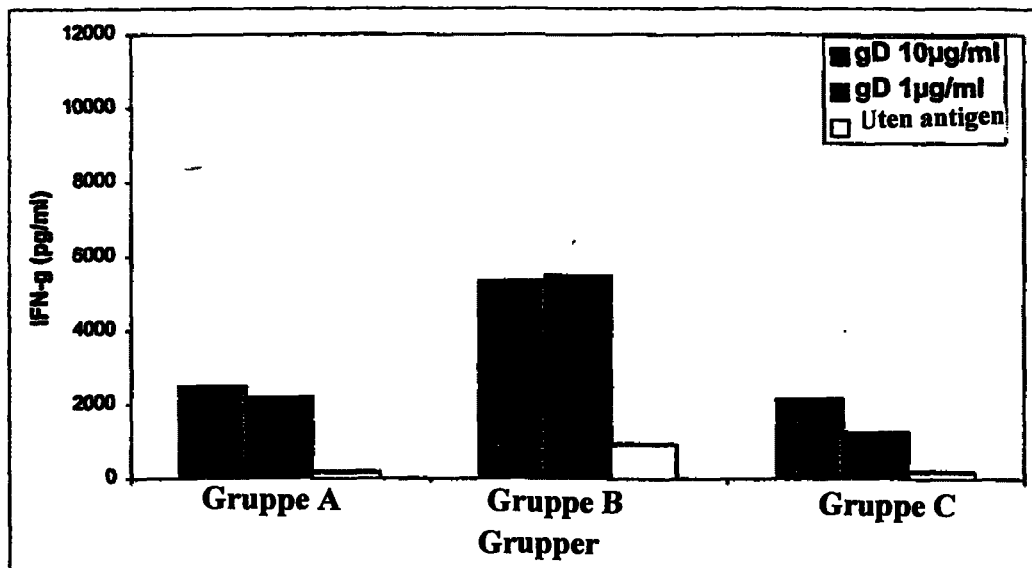
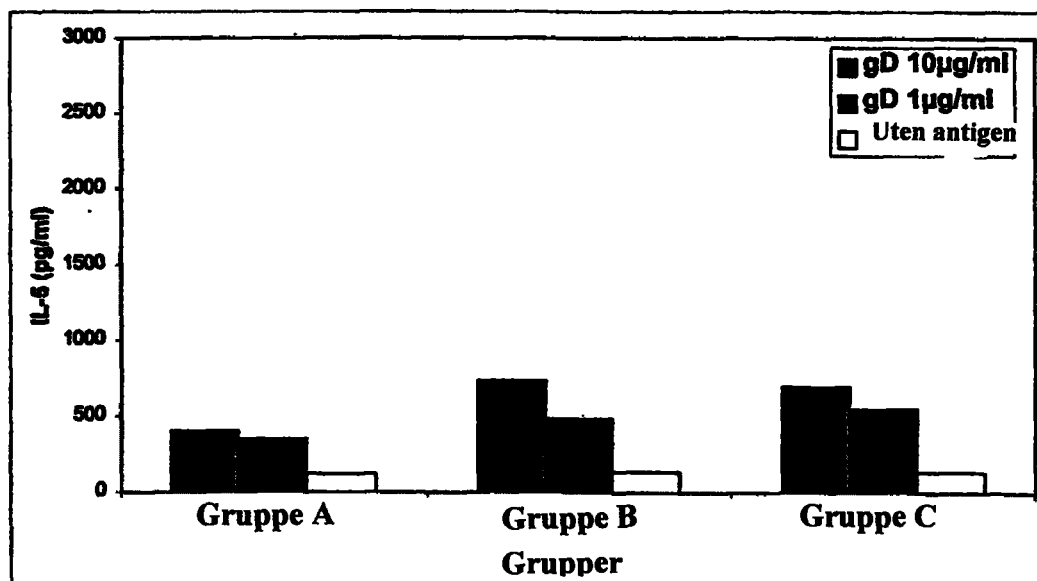
FIGUR 4: Anti-HBs-respons på dag 14 post II

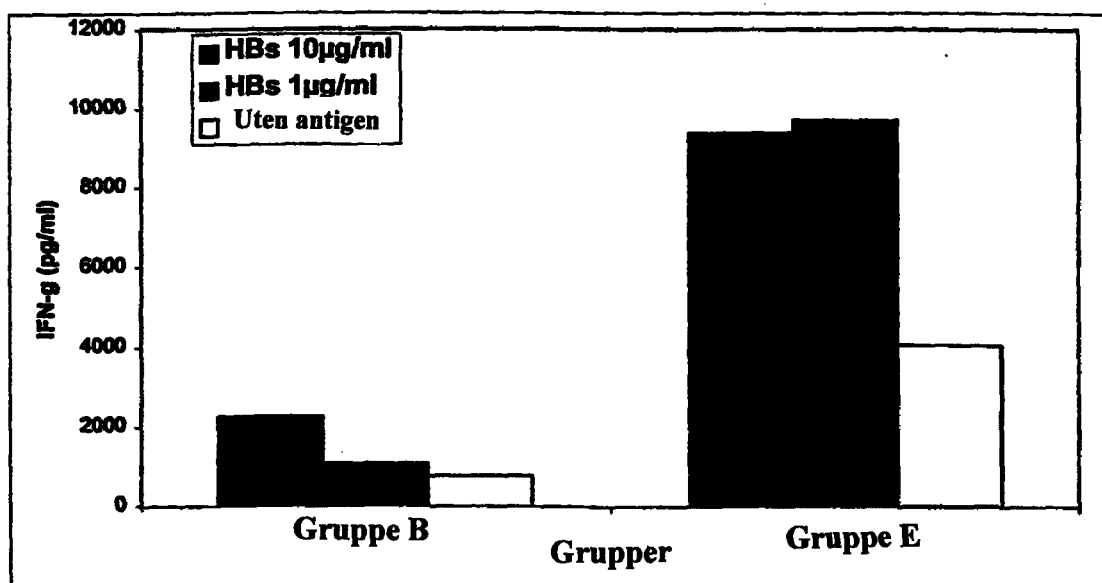
Resultater på individuelt sera (EU/ml)



FIGUR 5: Cytokinresultater – dag 14 post II**IFN-g-produksjon etter in vitro stimulering med VLP16****IL-5-produksjon etter in vitro stimulering med VLP16**

FIGUR 6: Cytokinresultater dager 14 post II**IFN-g-produksjon etter in vitro stimulering med VLP18****IFN-g-produksjon etter in vitro stimulering med VLP18**

FIGUR 7: Cytokinresultater – dag 14 post II**IFN-g-produksjon etter in vitro stimulering med gD****IL-6-produksjon etter in vitro stimulering med gD**

FIGUR 8: Cytokinresultater – dag 14 post II**IFN-g-produksjon etter in vitro stimulering med HBs****IL-5-produksjon etter in vitro stimulering med HBs**