



(12) PATENT

(19) NO

(11) 337659

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 1/14 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
C07K 14/02 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20130773	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.08.07 PCT/EP2001/009100
(22)	Inng.dag	2013.06.04	(85)	Videreføringsdag	2013.06.04
(24)	Løpedag	2001.08.07	(30)	Prioritet	2000.08.10, GB, 0019728.5
(41)	Alm.tilgj	2003.04.01			
(45)	Meddelt	2016.05.30			
(62)	Avdelt fra	20030635, med inndato 2003.02.07			
(73)	Innehaver	GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, BE-1330 RIXENSART, Belgia Peter Schu, c/o GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, BE-1330 RIXENSART, Belgia Michelle Serantoni, c/o GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, BE-1330 RIXENSART, Belgia Omer van Opstal, c/o GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, BE-1330 RIXENSART, Belgia Koen de Hayder, c/o GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, BE-1330 RIXENSART, Belgia Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig				
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av en vaksine			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9945957 A2 EP 0314240 A2			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse angår en metode for fremstilling av en stabil, immunogen hepatitt B vaksine uten spor av tiomersal.

Foreliggende oppfinnelse angår en ny fremgangsmåte for fremstilling av en hepatitt B-vaksine for anvendelse ved behandling eller forebygging av hepatitt B-virus-(HBV) infeksjoner.

Kronisk hepatitt B-virus-(HBV) infeksjon som det for tiden er begrenset behandling for, utgjør et globalt offentlig helseproblem av enorme dimensjoner. Kroniske bærere av HBV, beregnet til et antall på mer enn 300 millioner verden over, har risiko for utvikling av kronisk aktiv hepatitt, cirrhose og primært hepatocellulært karsinom.

Mange vaksiner som for tiden er tilgjengelige krever et konserveringsmiddel for å forhindre forringelse. Et ofte anvendt konserveringsmiddel er tiomersal som er en kvikksølv-inneholdende forbindelse.

WO 9945957 A2 vedrører kombinerte vaksinepreparater som omfatter hepatitt B virus antigen (HBsAg) og et herpes simplex virus antigen (HSV) og en TH1 induserende adjuvans slik som 3D-MPL og QS21.

EP 314240 omhandler et preparat av HBsAg hvor tiomersal er inkludert i det endelige vaksinepreparatet.

Noe bekymring er fremsatt omkring anvendelse av kvikksølv i vaksiner, selv om kommentatorer har understreket at de potensielle faremomenter med tiomersal-inneholdende vaksiner ikke bør overdrives (Offit; P.A. JAMA Vol,283; Nr:16). Allikevel ville det være fordelaktig å finne nye og potensielt sikrere fremgangsmåter for fremstilling av vaksiner for å erstatte anvendelse av tiomersal i fremstillingsprosessen. Det er således et behov for å utvikle vaksiner som er tiomersal-frie, spesielt hepatitt B-vaksiner.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for fremstilling av en stabil, immunogen hepatitt B vaksine uten spor av tiomersal, som omfatter:

- (a) å uttrykke hepatitt B overflateantigen (HBsAg) som et rekombinant protein i *Saccharomyces cerevisiae*;
- (b) bearbeide gjærcellene for å tilveiebringe et urensset antigenpreparat;
- (c) underkaste det urensede antigenpreparatet for gelpermeasjonskromatografi, hvor elueringsbufferen som anvendes i gelpermeasjonskromatografien ikke inneholder tiomersal;
- (d) underkaste den antigen-inneholdende eluat fra trinn (c) for ionebytterkromatografi;
- (e) tilsette cystein til den antigen-inneholdende eluat-samling oppnådd etter trinn (d);
- (f) underkaste preparatet fra trinn (e) for cesiumklorid ultrasentrifugering; og
- (g) kombinere det rensede HBsAg med en farmasøytisk akseptert eksipiens for å fremstille en stabil, immunogen hepatitt B vaksine; hvor ikke noe tiomersal er tilsatt til den oppnådde vaksinen.

Antigenpreparatet er generelt uten spor av tiomersal når tiomersal ikke er detekterbar i det rensede antigenprodukt ved anvendelse av absorpsjonsspektrofotometri for kvikksølv, som beskrevet her.

5 Rensingen blir utført i fravær av tiomersal, og det rensede antigen er fullstendig fritt for tiomersal.

Fortrinnsvis er antigenet stabilt, hensiktsmessig i det vesentlige like stabilt som et hepatitt-antigen renses i nærvær av tiomersal, som for eksempel beskrevet i Referanseeksempel 1 her.

Vaksinen fremstilt ifølge oppfinnelsen omfattende hepatitt-antigenet er en immunogen vaksine.

10 Reduksjonsmiddel blir tilsatt i løpet av antigen-rensesprosessen etter vekst av celler som uttrykker antigenet.

Reduksjonsmidlet er cystein.

15 Følgelig tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av en stabil immunogen hepatitt B-antigen vaksine uten spor av tiomersal som omfatter rensning av antigenet i nærvær av cystein.

Fortrinnsvis blir rensning utført i nærvær av en cysteinløsning.

Fortrinnsvis blir cysteinet, i løsning- eller pulver-form, tilsatt i løpet av prosessen til en endelig konsentrasjon på mellom 1 og 10 mM, fortrinnsvis 1 til 5 mM. Mer fortrinnsvis blir cysteinet tilsatt til en endelig konsentrasjon på ca. 2 mM.

20 Fortrinnsvis er cysteinet L-cystein.

Oppfinnelsen tilveiebringer en fremgangsmåte for fremstilling av en stabil hepatitt B-antigen vaksine uten spor av tiomersal hvor det rå antigen blir underkastet gelpermeasjonskromatografi, underkastet ionebytterkromatografi og blandet med et reduksjonsmiddel slik som cystein som har en fri -SH gruppe.

25 Fortrinnsvis er ionebytterkromatografi anionbytterkromatografi.

Fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen tilveiebringer således en vaksine omfattende et hepatitt B-antigen, som er fri for tiomersal og hvor antigenet er minst like immunogent og antigen som hepatitt B-antigenet fremstilt i nærvær av tiomersal.

30 Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen tilveiebringer således en vaksine omfattende et immunogent hepatitt B-antigen som har et gjennomsnittlig ELISA proteinforhold større enn 1,5 og et RF1-innhold med minst en 3-ganger lavere IC50-verdi enn den til hepatitt B-overflateantigen fremstilt i nærvær av tiomersal.

35 Den oppnådde vaksinen omfattende hepatitt B-antigenet kan anvendes enten for behandling eller forebygging av hepatitt B-infeksjoner, spesielt behandling eller forebygging av for eksempel kroniske hepatitt B-infeksjoner.

Vaksinen kan videre kombineres med et adjuvans. Fortrinnsvis er adjuvanset et aluminiumsalt eller en preferensiell stimulator av TH1-celle-respons.

40 Fremstilling av hepatitt B-overflate-antigen er veldokumentert. Se for eksempel Harford et. al. i Develop. Biol. Standard 54, side 125 (1983), Gregg et. al. i Biotechnology, 5, side 479 (1987), EP-A- 0 226 846, EP-A-0 299 108 og referanser der.

Som anvendt her omfatter uttrykket "hepatitt B-overflateantigen" eller "HBsAg" hvilket som helst HBsAg-antigen eller fragment derav som oppviser antigenisiteten til HBV-overflateantigen. Det vil forstås at i tillegg til 226 aminosyresekvensen av HBsAg S-antigen (se Tiollais et. al. Nature, 317, 489 (1985) og referanser deri) kan HBsAg som her beskrevet, om ønsket, inneholde alle eller en del av en pre-S-sekvens som beskrevet i referansene ovenfor og i EP-A-0 278 940. HBsAg som her beskrevet kan også referere til varianter, for eksempel "fluktmutanten" beskrevet i WO 91/14703.

HBsAg kan også referere til polypeptider beskrevet i EP 0 198 474 eller EP 0 304 578.

Normalt vil HBsAg være i partikkelform. I en spesielt foretrukket utførelsesform vil HbsAg bestå i det vesentlige av HbsAg S-antigenet nevnt ovenfor.

Vaksinen kan som nevnt fordelaktig omfatte et farmasøytisk akseptabelt tilsetningsmiddel så som et egnet adjuvans. Egnede adjuvantia er kommersielt tilgjengelige så som for eksempel Freund's ukomplette adjuvans og komplette adjuvans (Difco Laboratories, Detroit, MI); Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); aluminiumsalter så som aluminiumhydroksydgel (alun) eller aluminiumfosfat; salter av kalsium, jern eller sink; en uoppløselig suspensjon av acylert tyrosin; acylerte sukkere; kationiske eller anioniske derivatiserte polysakkarider; polyfosfazener; bionedbrytbare mikrokuler; monofosforyl-lipid A og quil A. Cytokiner, så som GM-CSF eller interleukin-2, -7, eller -12, kan også anvendes som adjuvantia.

Vaksinen kan omfatte en adjuvans som fremkaller en immunrespons overveiende av TH1-type. Høye nivåer av Th1-type cytokiner (f.eks. IFN- γ , TNF α , IL-2 og IL-12) tenderer til å favorisere fremkalling av celledierte immunresponser på et administrert antigen. I det tilfellet hvor en respons er overveiende Th1-type, vil nivået av Th1-type cytokiner øke i større grad enn nivået av Th2-type cytokiner. Nivåene av disse cytokiner kan lett bedømmes ved anvendelse av standard forsøk. For en oversikt over familiene av cytokiner, se Mosmann og Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.

Egnede adjuvantia for anvendelse for fremkalling av en overveiende Th1-type respons inkluderer for eksempel en kombinasjon av monofosforyl-lipid A, fortrinnsvis 3-de-O-acylert monofosforyl-lipid A (3D-MPL) sammen med et aluminiumsalt. Andre kjente adjuvantia som preferensielt fremkaller en TH1-type immunrespons omfatter CpG-inneholdende oligonukleotider. Oligonukleotidene er karakterisert ved at CpG-dinukleotidet er umetylert. Slike oligonukleotider er velkjente og er beskrevet i for eksempel WO 96/02555. Immunostimulerende DNA-sekvenser er også beskrevet, for eksempel av Sato et al., *Science* 273:352, 1996. Et annet foretrukket adjuvans er et saponin, fortrinnsvis QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), som kan anvendes alene eller i kombinasjon med andre adjuvantia. For eksempel involverer et forbedret system kombinasjonen av et monofosforyl-lipid A og saponin-derivat, så som kombinasjonen av QS21 og 3D-MPL som beskrevet i WO 94/00153, eller et mindre reaktogent preparat hvor QS21 blir dempet med kolesterol, som beskrevet i WO 96/33739. Andre foretrukne preparater omfatter en olje-i-vann emulsjon og tocopherol. Et spesielt kraftig adjuvanspreparat som omfatter QS21, 3D-MPL og tocopherol i en olje-i-vann-emulsjon er beskrevet i WO 95/17210.

En spesielt kraftig adjuvansformulering som omfatter QS21, 3D-MPL & tokoferol i en olje-i-vann emulsjon er beskrevet i WO 95/17210 og er en foretrukket formulering.

Følgelig, i én utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en vaksine omfattende et hepatitt B-overflateantigen som i tillegg omfatter TH-1-induserende adjuvans. Det TH-1-induserende adjuvans er valgt fra gruppen adjuvantia som omfatter: 3D-MPL, QS21, en blanding av QS21 og kolesterol, og et CpG-oligonukleotid. En vaksine omfattende et hepatitt B-overflate-antigen kan ha fått tilsatt monofosforyl-lipid A eller derivat derav, QS21 og tokoferol i en olje-i-vann-emulsjon.

En vaksine kan i tillegg omfatte et saponin, mer foretrukket QS21. En annen spesiell egnet adjuvans-formulering omfattende CpG og et saponin er beskrevet i WO 00/09159 og er en foretrukket formulering. Mest foretrukket er saponin i den spesielle formuleringen QS21. Fortrinnsvis omfatter formuleringen i tillegg en olje-i-vann-emulsjon og tokoferol.

En vaksine fremstilt ifølge oppfinnelse omfattende et hepatitt B-overflate-antigen sammen med et adjuvans kan i tillegg omfatte ett eller flere antigener valgt fra gruppen bestående av: difteritoksoid (D), tetanustoksoid (T) acellulære pertussis-antigener (Pa), inaktivert poliovirus (IPV), haemophilus influenzae antigen (Hib), hepatitt A-antigen, herpes simplex virus (HSV), chlamydia, GSB, HPV, streptococcus pneumoniae- og neisseria-antigener. Antigener som gir beskyttelse for andre sykdommer kan også inkluderes i vaksinen.

Vaksinen omfattende et hepatitt B-overflateantigen kan omfatte et adjuvans og et inaktivert poliovirus.

Behandling og/eller forebygging av hepatitt B-virusinfeksjoner er beskrevet, som omfatter administrering til et menneske eller dyr, som lider av eller er mottagelig for, hepatitt B-virusinfeksjon, av en sikker og effektiv mengde av en vaksine fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse for forebygging og/eller behandling av hepatitt B-infeksjon.

Et hepatitt B-overflateantigen kan anvendes for behandling av pasienter som lider av en hepatitt B-virusinfeksjon, så som kronisk hepatitt B-virusinfeksjon.

Vaksinen fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse vil inneholde en immunobeskyttende mengde av antigenet.

Vaksinefremstilling er generelt beskrevet i Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach, ed. Powell og Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, ed. Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. Innkapsling i liposomer er for eksempel beskrevet av Fullerton, U.S. patent 4.235.877. Konjugering av proteiner til makromolekyler er beskrevet, for eksempel av Likhite, U.S. patent 4,372,945 og av Armor et al., U.S. patent 4,474,757. Anvendelse av Quil A er beskrevet av Dalsgaard et al., Acta Vet Scand, 18:349 (1977). 3D-MPL er tilgjengelig fra Ribi Immunochem, USA, og er beskrevet i britisk patentsøknad Nr. 2220211 og US-patent 4912094. QS21 er beskrevet i US patent nr. 5057540.

Foreliggende oppfinnelse blir illustrert det følgende eksempler og referanseeksempel, hvor:
Figur 1 illustrerer tiomersal-fri produksjonsprosess for Engerix B™;
Figur 2 illustrerer SDS-PAGE analyse av bulk antigenpartier; og

Figur 3 illustrerer gjenværende gjærproteiner i bulk antigenpartier produsert ved den tiomersal-frie prosess.

Referanseksempel 1:

5 Produksjonsprosess for Hepatitt B-overflateantigen i nærvær av tiomersal

Hepatitt B-overflate-antigen (HBsAg) i SB Biologicals hepatitt B monovalente vaksine (Engerix B™) blir uttrykt som et rekombinant protein i *Saccharomyces cerevisiae* (se Harford *et. al. loc. cit.*). 24 kD proteinet blir produsert intracellulært og akkumulert i de rekombinante gjærceller. Ved slutten av fermenteringen blir gjærcellene høstet og oppbrutt i nærvær av et mildt
10 overflateaktivt middel så som Tween 20 for å frigjøre det ønskede protein. Deretter blir cellehomogenatet, inneholdende de oppløselige overflate-antigenpartikler, for-renset ved en serie av presipitasjoner og deretter konsentrert ved ultrafiltrering.

Ytterligere rensning av det rekombinante antigen blir utført ved påfølgende kromatografiske separeringer. I et første trinn blir det rå antigen-konsentrat underkastet gelpermeasjon-
15 kromatografi på Sepharose 4B medium. Tiomersal er til stede i elueringsbufferen ved 4B gelpermeasjon-kromatografitrinnet. Elueringsbufferen har den følgende sammensetning: 10mM Tris, 5% etylenglykol, pH 7,0, 50 mg/l tiomersal. Tiomersal er inkludert i denne buffer for å kontrollere biobelastningen. Mesteparten av denne tiomersal blir fjernet i løpet av de påfølgende rensningstrinn omfattende ionebytter-kromatografi, ultrasentrifugering og avsalting (gelpermeasjon)
20 slik at rensede bulk antigenpreparater fremstilt ved den opprinnelige prosess inneholder ca. 1,2 µg og mindre enn 2 µg tiomersal pr. 20 µg protein.

Et ionebytter-kromatografitrinn blir utført ved anvendelse av en DEAE-matriks og denne samling blir deretter underkastet en cesium-gradient ultrasentrifugering på 4 preetablerte lag med forskjellige cesiumklorid-konsentrasjoner. Antigenpartiklene blir separert fra forurensende celle-
25 bestanddeler i henhold til deres densitet i gradienten og eluert ved slutten av sentrifugeringsprosessen. Cesium-klorid blir deretter fjernet fra denne samling ved en andre gelpermeasjon på Sepharose-gel.

Når HBsAg blir fremstilt ved fremgangsmåten inneholdende tiomersal i 4B gelpermeasjonsbuffer, blir proteinkonsentrasjoner på over 30 mg/ml gjenvunnet i de samlede
30 HBsAg-inneholdende fraksjoner fra CsCl-gradient, svarende til en ekvivalent konsentrasjon av HBsAg som analysert med AUSZYME-sett fra Abbott Laboratories.

CsCl-ultrasentrifugeringdtrinnet fjerner hensiktsmessig gjenværende lipider, DNA og mindre proteinforurensninger fra HBsAg-preparatet. Det blir utført ved sonesentrifugering i en Ti
15 rotor fra Beckman Instruments, Fullerton, California ved en hastighet på 30.000 rpm i omtrent
35 40 til 60 timer. Prøven som skal renses blir påført lag av CsCl-løsning med endelige konsentrasjoner på 0,75, 1,5, 2,5 og 3,25 M CsCl. Etter sentrifugeringen blir gradienten eluert i fraksjoner. Fraksjoner inneholdende HBsAg kan identifiseres ved UV-absorbans ved 280 nm eller ved testing av fortyndinger av fraksjonene med AUSZYME-settet. HbsAg-båndet har en densitet på 1,17 til 1,23 g/cm³.

Løsningen inneholdende det rensede HBsAg blir steriltfiltrert før den blir anvendt til å fremstille et vaksinepreparat.

Rensning fra gjærcele-lysat er kompleks ettersom antigenet blir produsert intracellulært og en serie av separeringsteknikker utformet for å fjerne forskjellige typer av (gjær) forurensninger er nødvendige for å oppnå rent bulk-antigen. Trinnene med rensning er viktig, ettersom produktet som skal renses er en lipoproteinpartikkel inneholdende multiple kopier av overflate-antigen-polypeptid og denne struktur må holdes gjennom hele rensesprosessen. Det er et særtrekk ved denne prosessen at den gir overflate-antigenpartikler som er fullstendig immunogene uten behov for ytterligere kjemisk behandling for å forbedre immunogenisitet (sammenlign EPO135435).

Detaljer ved produksjonsprosessen er ytterligere beskrevet i europeisk patent 0199698.

Eksempel 2

Produksjon og karakterisering av gjær-avledet HBsAg ved en tiomersal-fri prosess.

1. Produksjon og rensning av gjær-avledet HBsAg

1.1 Oversikt over produksjonsprosessen

Hepatitt B-overflate-antigen kan produseres ved fermentering av en passende stamme av *Saccharomyces cerevisiae*, for eksempel den beskrevet i Harford et. al. (loc. cit.).

Etter stor-skala-fermentering av den rekombinante gjærstamme blir cellene høstet og brutt opp i nærvær av et mildt overflateaktivt middel så som Tween 20. Overflate-antigenet blir deretter isolert ved en flertrinns ekstraksjon- og renseprosedyre nøyaktig som beskrevet ovenfor i Eksempel 1 inntil trinnet med den første gelpermeasjon på Sepharose 4B.

1.2 Tiomersal-fri rensesprosess

I den tiomersal-frie prosess blir de følgende to endringer utført sammenlignet med fremgangsmåten beskrevet i Referanseeksempel 1.

1. Elueringsbuffer for 4B gelpermeasjonskromatografitrinnet inneholder ikke lenger tiomersal.

2. Cystein (2mM endelig konsentrasjon) blir tilsatt til eluatsamlingen fra anionbytter-kromatografitrinnet.

Det ble funnet at utelatelse av tiomersal fra 4B gelpermeasjonsbuffer kan resultere i utfelling av HBsAg-partiklene i løpet av CsCl densitet-gradient-sentrifugeringstrinnet med tap av produkt og aggregering eller klumping av det utvunnede antigen.

Tilsetning av cystein med 2 mM endelig konsentrasjon til eluat-samlingen fra det foregående anionbytter-kromatografitrinn forhindrer utfelling og tap av antigen under CsCl-densitet-sentrifugering.

Cystein er en foretrukket substans for denne behandling ettersom den er en naturlig forekommende aminosyre og kan fjernes ved det påfølgende avsaltingstrinn på en gelpermeasjonskolonne ved anvendelse av Sepharose 4BCLFF som kolonnematriks.

Det er ingen andre endringer i fremstillingsprosessen sammenlignet med fremgangsmåten beskrevet i Referanseeksempel 1.

Den tiomersal-frie prosess gir bulk-antigen med en renhet og med egenskaper sammenlignbare med antigen fra fremgangsmåten ifølge Referanseeksempel 1.

5

1.2a

Tiomersal tilsatt til 4B buffer med 50 µg/ml er antatt å dekomponere og det resulterende etylkvikksølv kan binde kovalent til frie sulfhydrylgrupper på cysteinrester i proteinet. Proteinets inneholder 14 cysteinrester av hvilke 7 er lokalisert mellom posisjoner 101 og 150.

10

Denne region av proteinet er antatt å være lokalisert på overflaten av partikkelen og inneholde den større antigen-region av HBsAg omfattende den immunodominante a region og gjenkjennelsessetet for RF1 monoklonalt antistoff (Waters J et al, Postgrad. Med. J., 1987:63 (Suppl. 2): 51-56 og Ashton-Rickardt og Murray J. Med. Virology, 1989: 29: 196). Antigenet renses med tiomersal til stede i 4B gelpermeasjons-buffer inneholder omtrent 0,5-0,6 µg kvikksølv ved slutten av renseprosessen. Dette kvikksølv blir ikke fullstendig fjernet ved enkel dialyse.

15

I ett forsøk ble 0,56 µg kvikksølv pr. 20 µg protein målt i bulk antigenpreparatet. Dette preparatet ble dialysert i 16 timer ved romtemperatur mot 150mM NaCl, 10mM NaPO₄ buffer pH 6,9. Ved slutten av dialysen ble en konsentrasjon på 0,33 µg Hg pr. 20 µg protein målt.

20

I motsetning resulterer dialyse i nærvær av et reduksjonsmiddel så som L-cystein med 0,1 til 5,0 mg/ml, DTT med 50 mM eller 2-merkaptoetanol med 0,5 M, fulgt av en andre dialyse for å fjerne reduksjonsmidlet, i reduksjon av kvikksølv-innholdet i antigenpreparatet til mindre enn 0,025 µg kvikksølv pr. 20 µg protein. Dette er den laveste grense for deteksjon ved metoden.

25

Kvikksølv-innholdet ble bestemt ved absorpsjons-spektrofotometri. Antigenet blir fortynnet i en løsning inneholdende 0,01% vekt/volum av kalium- bikromat (K₂Cr₂O₇) og 5% volum/volum av salpetersyre. Standard løsninger blir fremstilt med tiomersal som kvikksølvkilde. Atomisk absorpsjon av prøve og standardløsninger blir målt etter fordampning i en dampgenerator, med en kvikksølv-spesifikk katode ved 253,7 nm. Atomisk absorpsjon av fortynningsvæsken er målt som blank. Kvikksølv-innhold av prøven er beregnet ved kalibreringskurver oppnådd fra standard-løsninger. Resultater er uttrykt som µg kvikksølv pr. 20 µg protein.

30

1.3 Produksjon av tiomersal-fritt bulk-antigen

Prosesstrinn for rensning av bulk-antigen er vist i Figur 1.

1.4 Sammensetning av vaksine formulert uten tiomersal.

35

En typisk kvantitativ sammensetning av en hepatitt B-vaksine uten konserveringsmiddel og formulert fra antigen fremstilt ved den tiomersalfrie prosess er gitt i Tabell 1.

Tabell 1:

Bestanddel	Mengde pr. ml
Aktiv bestandel - Protein i hvilket minst 95% er HbsAg	20 µg
Aluminiumhydroksyd (adsorbent) (uttrykt som Al ₂ O ₃)	0,95 mg
Natriumklorid	9,0 mg (maksimum)
Dinatriumfosfat-dihydrat	0,98 mg
Natrium-dihydrogenfosfat-dihydrat	0,71 mg
Vann for injeksjon q.s. til	1,0 ml

Preparatet kan varieres ved tilsetning av 3D-MPL og/eller andre adjuvantia.

2. Karakterisering av bulk-antigen og vaksine produsert ved den tiomersal-frie prosess

5

2.1. Tester og forsøk med renset bulk-antigen

2.1.1 Basis for sammenligning

Tre partier av bulk-antigen ble fremstilt ved den tiomersal-frie prosess i henhold til dette eksempel (Eksempel 1.2) og er identifisert som HEF001, HEF002 og HEF003. Disse ble sammenlignet med et parti av bulk-antigen (HEP2055) fremstilt ved den tidligere prosess (som beskrevet i Eksempel 1) i nærvær av tiomersal.

10

2.1.2 Tester og forsøk med bulk-antigen

15

De tre bulk-antigenpartier produsert ved den tiomersal-frie prosess ble testet og resultatene er oppsummert i Tabell 2.

Protein-innhold ble målt ved metoden ifølge Lowry et al (J. Biol. Chem. 1951:193:265).

Endotoksin-innhold ble målt ved en Limulus gelkoagulasjonsteknikk ved anvendelse av et kommersielt tilgjengelig sett fra Cape Cod Associates, 704 Main St., Falmouth, MA 02540, USA. Reagenset er standardisert mot US Pharm. Endotoxin Reference Standard.

20

Tween 20 ble målt ved metoden ifølge Huddleston og Allred (J. Amer. Oil Chemist Soc., 1965:42:983).

HbsAg-innhold ble målt med det kommersielt tilgjengelige AusZYME-sett fra Abbott Laboratories, One Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, USA. Forsøksprosedyre B fra produsenten ble anvendt. En porsjon av bulk antigen renset ved fremgangsmåten inneholdende tiomersal ble anvendt som standard for å etablere doserespons-kurve.

25

Polysakkarider ble målt ved metoden ifølge Dubois et al (Anal. Chem. 1956:28:350).

Lipider ble målt ved anvendelse av et kommersielt tilgjengelig sett (Merkotest Total Lipids 3321) fra E.Merck, B.P. 4119, Darmstadt D-6100, Tyskland.

30

DNA-innhold ble målt ved terskelmetoden ved anvendelse av apparat og reagenser tilgjengelig fra Molecular Devices Corp., Gutenbergstraße 10, Ismaning, München, Tyskland.

Verdiene funnet i testene og forsøkene er i området sett for bulk antigenpartier fremstilt ved anvendelse av tiomersal i elueringsbufferen i Sepharose 4B gelpermeasjonstrinnet, med unntak av antigen-aktiviteten ved ELISA. Verdiene for denne måling for de tre HEF-preparater er høyere (1,63-2,25) enn den funnet for bulk antigenpartiet HEP2055 som har et ELISA/proteinforhold på 1,13. ELISA/proteinforholdet målt med AUSZYME-settet for tiomersal-inneholdende porsjoner av bulk antigen er generelt omtrent 1,0 og innen området 0,8 - 1,2 og overstiger meget sjelden 1,4.

2.1.3 SDS-PAGE gelanalyse

Bulk-antigenpreparatene ble undersøkt ved SDS-PAGE analyse under reduserende betingelser og Coomassie-blå merking. Alle prøver viste et hoved-bånd ved 24K med spor av et dimer-protein. Prøvene ble bedømt å ha høy renhet (> 99% rene) som bedømt ved fravær av synlige bånd fra forurensende proteiner.

Prøver (1µg) av bulk-antigenpreparatene ble undersøkt ved SDS-PAGE under reduserende og ikke-reduserende betingelser og sølv-merking (Figur 2). Ved reduserende betingelser viste prøvene en intens bånd-migrering ved 24K med spor av dimere og multimere former. Gelmønstrene kan ikke skilles fra det til HEP2055 som komparator. Prøvene ble også kjørt under ikke-reduserende betingelser. Under disse betingelser migrerer mindre av materialet ved 24K og mengden av polypeptid-migrering ved dimere og multimere posisjoner er øket. De tiomersal-frie bulk-antigenpartier synes å ha en noe høyere grad av polymerisering enn komparator-HEP2055-partiet.

Identiteten til 24K polypeptidet avslørt ved Coomassie-blå eller sølv-merking ble bekreftet ved Western blotting med kanin polyklonale antistoffer fremkalt mot plasma HBsAg. Bulk-antigenpreparatene viser et hovedbånd ved 24K sammen med dimere og trimere former. Teknikken avslører mindre spor av nedbrytningsprodukter av overflate-antigenprotein. Det er ingen forskjeller mellom bulk-antigen fremstilt ved den tiomersal-frie prosess og HEP2055-partiet.

Tilstedeværelse av gjenværende gjærproteiner ble undersøkt ved SDS-PAGE-analyse under reduserende betingelser og Western-blotting med kanin polyklonalt antiserum fremkalt mot gjærproteiner (Figur 3). Teknikken er kvalitativ og tillater ikke kvantifisering av urenheter.

Et konstant båndmønster er vist over de tre bulk-antigenpartier fremstilt ved den tiomersal-frie prosess og HEP2055-partiet med ett unntak.

Et sterkt merkende bånd til stede ved $\pm 23K$ for HEP2055-bulk-antigen er praktisk talt fraværende for de 3 HEF-preparater. Western blotting viser at den tiomersal-frie renseprosess resulterer i et renere antigenprodukt.

Tabell 2: Resultater av tester og forsøk med rensset, tiomersal-fritt bulk-antigen

TEST	RESULTAT			
	HEF001	HEF002	HEF003	HEP2055
pH	6,8	6,8	6,8	6,8
Protein-innhold ved	1312 µg/ml	888 µg/ml	913 µg/ml	995 µg/ml

Lowry				
Endotoksin-innhold	< 0,25 EU	< 0,25 EU	< 0,25 EU	< 0,25 EU
Tween 20-innhold	7,1 µg	6,6 µg	7,4 µg	5,8 µg
Antigen-aktivitet ved ELISA	2957 µg/ml	1505 µg/ml	1486 µg/ml	1128 µg/ml
ELISA / protein-forhold	2,25	1,69	1,63	1,13
Polysakkarid- innhold	0,33 µg	0,35 µg	0,33 µg	0,34µg
Lipid-innhold	13,7 µg	12,8 µg	12,9 µg	11,8 µg
DNA innhold ved terskel	< 1 pg	< 1 pg	< 1 pg	< 1 pg

2.1.4 Andre biokjemiske tester og forsøk

2.1.4.1 DNA-innhold

5 DNA-innhold av de 3 bulk-antigenpartier ble målt ved terskelmetoden (Molecular Devices Corp). De målte mengdene var mindre enn 10 pg DNA pr. 20 µg protein (Tabell 2); samme nivå av DNA-innhold sett ved bulk-antigen produsert ved den rådende godkjente prosess.

2.1.4.2 Aminosyresammensetning

10 Aminosyre-sammensetningen av de tre HEF bulk-antigenpartier ble bestemt etter syrehydrolyse med 6N HCl ved kromatografi av aminosyrene på en ionebytter-kolonne med postkolonne ninhydrin-deteksjon. Prolin og tryptofan ble ikke bestemt. Resultatene er gitt i Tabell 3.

Sammensetningen funnet er i god overensstemmelse med den bestemt for HEP2055 og med den forventede sammensetning avledet fra DNA-sekvensen. Selv om antallet glycin-rester målt for HEP2055 er nær den forventede sammensetning, blir en verdi på 16 til 17 rester mer vanlig målt for bulk-antigenpreparater. Det gjennomsnittlige antall cysteinrester funnet er de forventede 14, som viser at ingen ekstra cysteiner er bundet til partikkelen som et resultat av behandlingen i CsCl-gradienttrinnet.

20 2.1.4.3 Kvantifisering av fri cystein

Mengden av fri cystein til stede i bulk-antigenpreparater oppnådd i henhold til metoden beskrevet ble målt etter oksydasjon av partiklene med permaursyre uten tidligere syrehydrolyse. Oksyderte frie cysteinrester ble separert på en ionebytterkolonne med postkolonne-deteksjon med ninhydrin. Grensen for deteksjon av cystein ved denne metoden er 1µg pr. ml.

25 Intet fritt cystein kunne måles i 3 HEF antigenpreparatene når testet ved de innledende protein-konsentrasjoner gitt i Tabell 2.

Teknikken måler både frie cysteinrester til stede i bufferen og cysteinrester som er bundet til HBsAg-protein ved disulfid-binding, men som ikke utgjør del av polypeptid-sekvensen.

2.1.4.4 N-terminal sekvensanalyse

5 Tilstedeværelsen av mulige proteinforurensninger og nedbrytningsprodukter i de tre bulk-antigenpartier produsert ved den modifiserte prosess ble bedømt ved N-terminal sekvensanalyse basert på Edman-nedbrytning. Den N-terminale sekvens MENITS... av HBsAg-proteinet ble detektert uten noen interferens fra andre sekvenser. Det N-terminale metionin ble også bekreftet å være 60-75% blokkert ved acetylering, som observert tidligere for HbsAg-polypeptid produsert ved rutineprosessen.

10 **Tabell 3: Aminosyresammensetning av HBsAg**

Amino-syre	HEF001	HEF002	HEF003	Gjennom-snitt smnsetn.	HEP2055	Forventet smnsetn.
Asp	11,3	11,3	11,3	11,3	11,5	10
Thr	17,5	17,4	17,2	17,4	17,8	17
Ser	21,4	21,6	21,4	21,5	20,9	23
Glu	11	11	11	11,0	10,5	9
Pro	nd	nd	nd		nd	24
Gly	17,1	16,8	16,7	16,9	14,6	14
Ala	7,5	7,4	7,4	7,4	7,2	6
Cys	12,3	14,95	14,9	14,1	13,2	14
Val	10,9	11	10,9	10,9	10,7	11
Met	6,8	6,7	7,1	6,9	7,1	6
Ile	12,3	12,4	12,5	12,4	12,2	16
Leu	26,3	26,6	26,2	26,4	26,7	33
Tyr	6,8	6,8	6,8	6,8	7	6
Phe	13,8	13,9	13,8	13,8	13,9	15
His	3	2,8	3,3	3,0	3,3	1
Lys	4	4	3,9	4,0	4,2	3
Arg	5,7	5,8	5,7	5,7	6,1	5
Trp	nd	nd	nd		nd	13

2.1.4.5 Laserlysspredning-analyse

15 Partikkelstørrelse-sammenligninger ble utført ved laserlysspredning mellom HBsAg-partikler produsert ved anvendelse av den modifiserte prosess og HEP2055 referanse-partiet (Tabell 4).

De gjennomsnittlige molekylvekter bestemt viser god konsistens mellom preparatene.

5

Tabell 4: HBsAg-partikkel-molekylvekter ved laserlysspredning

Antigenparti	MV (dalton)
HEF001	3,07 x 10 ⁶
HEF002	2,76 x 10 ⁶
HEF003	2,76 x 10 ⁶
HEP2055	3,34 x 10 ⁶

10

2.1.4.6 Elektronmikroskopi

Bulk-antigenpreparatene ble undersøkt ved elektronmikroskopi etter fiksering og merking med uranyl-acetat.

De observerte partiklene var lignende i alle prøvene og var i overensstemmelse med ± 20 nm subsfæriske eller brosten-lignende partikler typiske for HBsAg. Partiklene observert i de 3 HEF-partiene kunne ikke skjelles fra HEP2055.

2.1.5 Immunologiske analyser

2.1.5.1 Reaktivitet med RF1 monoklonalt antistoff

De tre bulk-antigenpreparatene ble testet for deres reaktivitet med RF1 monoklonalt antistoff ved ELISA hemningsforsøk. RF1 monoklonalt antistoff er vist å beskytte sjimpanser mot utfordring med HBV og er antatt å gjenkjenne en beskyttende konformasjonell epitop på HBsAg-partikkelen (Iwarson S et al, 1985, J.Med, Virol., 16: 89-96).

RF1 hybridomet kan propageres i peritonealhulen til BalbC-mus eller i vevkultur.

Ascitesvæske fortynnet 1/50000 i metningsbuffer (PBS inneholdende 1% BSA, 0,1% Tween 20) ble blandet 1:1 med forskjellige fortynninger i PBS av HBsAg-prøver som skal testes (endelige konsentrasjoner i området mellom 100 µg og 0,05 µg/ml).

Blandinger ble inkubert i Nunc Immunoplaters (96U) i 1 time ved 37°C før de ble overført i 1 time ved 37°C på plater belagt med et standard preparat av HBsAg. Standard HBsAg-preparatet var et parti bulk-antigen (Hep 286) renses ved den tiomersal-inneholdende prosess. Etter et vasketrinn med PBS inneholdende 0,1% Tween 20, ble biotin-konjugert sau anti-mus IgG fortynnet 1/1000 i metningsbuffer tilsatt og inkubert i 1 time ved 37°C. Etter et vasketrinn ble streptavidin-biotinylert peroksydase-kompleks fortynnet 1/1000 i metningsbuffer tilsatt til samme brønner og inkubert 30 min. ved 37°C. Platene ble vasket og inkubert med en løsning av OPDA 0,04%, H₂O₂

0,03% i 0,1M citratbuffer pH 4,5 i 20 min. ved romtemperatur. Reaksjonen ble stanset med 2N H₂SO₄ og de optiske densiteter (O.D.) ble målt ved 490/630 nm og plottet grafisk.

IC₅₀, definert som den konsentrasjon av antigen (inhibitor-konsentrasjon) som hemmer 50% av antistoff-binding til belagt HBsAg ble beregnet ved anvendelse av en 4 parameter ligning og uttrykt i ng/ml.

En serie av HEP-antigenpartier omfattende HEP2055 ble også testet, sammen med Herpes simplex gD antigen som negativ kontroll. Forsøket måler evnen til hvert test-antigen til å hemme binding av RF1 til et standard antigenpreparat (HEP286) bundet til mikrotiter-plater.

Tabell 5 gir konsentrasjonene av hvert antigen funnet å hemme 50% av RF1-binding til det fikserte antigen.

Tabell 5: Hemning av binding av RF1 monoklonalt antistoff til HBsAg

Bulk-antigen	IC ₅₀ (ng/ml)*
HEP286	3834
HEP673	3437
HEP720	3150
HEP2055	2384
HEF001	468
HEF002	574
HEF003	540

*IC₅₀ = antigenkonsentrasjon (ng/ml) som hemmer 50% av RF1-binding til fiksert antigen

Resultatene viser at 4 til 7 ganger mindre HEF-antigen er nødvendig for å hemme RF1-binding (Tabell 5). Dette viser at antigen fremstilt ved den modifiserte prosess har en øket presentasjon av RF1-epitopen sammenlignet med HEP bulk-antigen.

Samme type hemningsforsøk ble utført ved anvendelse av humane sera fra Engerix B™ vaksiner istedenfor RF1 mAb og viste ikke forskjeller mellom HEP- antigenpartiene og HEF- antigenene.

2.1.5.2. Affinitet av binding til monoklonal RF1

De kinetiske parametere for RF1 monoklonalt antistoff-binding til 3 HEF antigenpartiene og til HEP2055 ble målt ved overflate-plasmon-resonans ved anvendelse av et Biacore 2000 apparat fra Amersham Pharmacia Biotech, Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, UK.

De målte kinetiske parametere var:

ka: assosiasjonshastighet-konstant (M⁻¹S⁻¹)

kd: dissosiasjonshastighet-konstant (S⁻¹)

Ka: likevekts- eller affinitets-konstant (M⁻¹)

$$\text{hvor } K_a = \frac{k_a}{k_d}$$

5 Verdiene funnet er gitt i Tabell 6.

Tabell 6: Affinitetskonstanter for RF1-binding til HBsAg

Bulk antigen	k_a (x 10⁻³)	k_d (x 10⁵)	K_a (x 10⁻⁷)
HEF001	6,81	3,21	21,97
HEF002	6,89	3,73	18,83
HEF003	7,39	4,67	15,80
HEP2055	3,31	6,30	5,31

10 De tre HEF-antigenpartier ga lignende assosiasjons/dissosiasjons-konstanter og bindingsaffinitets-verdier. I motsetning har HEP2055 en svakere affinitet for binding til RF1. Dette er i overensstemmelse med resultatene fra ELISA-hemningsforsøk som viste at antigen fremstilt ved den tiomersal-frie prosess hadde en øket presentasjon av RF1-epitopen.

15 **2. 2. Test og forsøk med vaksine formulert med antigen produsert ved den modifiserte prosess**

De tre HEF-antigenpartier ble adsorbent på aluminiumhydroksyd og formulert som vaksine i henhold til sammensetningen vist i Tabell 1. Presentasjonen er dose for voksne i medisinglass (20 µg antigenprotein i 1ml). Partiene er identifisert som DENS001A4, DENS002A4 og DENS003A4.

20 Vaksinestyrken ble målt ved et in-vitro antigeninnholds-forsøk ved anvendelse av Abbott Laboratories AUSZYME ELISA sett og et klassisk parti av vaksine formulert med 50 µg/ml tiomersal som standard. Vaksinestyrken ble målt ved anvendelse av metode B som beskrevet i PharmaEuropa Special Issue Bio97-2 (Desember1997). De tre HEF-partiene gir høye verdier for antigen-innhold, nesten to ganger det angitte innhold av 20 µg antigenprotein.

25

2.2.1 Reaktivitet til DENS vaksine med RF1 monoklonalt antistoff

Antigenisiteten av den adsorbente vaksine ble videre testet i et hemnings-forsøk med RF1 monoklonalt antistoff. Forsøket måler evnen til vaksineprøven til å hemme RF1-binding til fiksert bulk-antigen (HEP286).

30

Ascitesvæske fortynnet 1/50000 i metningsbuffer (PBS inneholdende 1% BSA, 0,1% Tween 20) ble blandet 1:1 med forskjellige fortynninger i PBS av vaksineprøver som skal testes (konsentrasjon i området mellom 20 µg og 0,05 µg/ml).

Blandinger ble inkubert i Nunc Immunoplater (96U) i 2 timer ved 37°C med agitering før de ble overført på HBsAg-belagte plater. HBsAg-preparatet anvendt for belegg var et parti bulk-antigen (Hep 286) rensed ved den tiomersal-inneholdende prosess. Disse plater blir deretter inkubert i 2 timer ved 37°C med agitering. Etter et vasketrinn med PBS inneholdende 0,1% Tween 20 ble biotin-konjugert sau anti-mus IgG fortynnet 1/1000 i metningsbuffer tilsatt og inkubert i 1 time ved 37°C. Etter et vasketrinn ble streptavidin-biotinylert peroksydase-kompleks fortynnet 1/1000 i metningsbuffer tilsatt til brønnene og inkubert i 30 min. ved 37°C. Platene ble vasket og inkubert i 20 min. ved romtemperatur med en løsning inneholdende OPDA 0,04%, H₂O₂ 0,03% i 0,1M citratbuffer pH 4,5. Reaksjonen ble stanset med 2N H₂SO₄ og optiske densiteter (O.D.) ble målt ved 490/630 nm og plottet grafisk.

IC₅₀, definert som den konsentrasjon av antigen (inhibitor-konsentrasjon) som hemmer 50% av antistoff-bindingen til belagt HBsAg, ble beregnet ved anvendelse av en 4 parameter ligning og uttrykt i ng/ml.

Vaksine fremstilt fra bulk-antigen produsert ved den modifiserte prosess ble sammenlignet med Engerix BTM vaksine formulert fra klassisk HEP bulk-antigen og uten tiomersal som konserveringsmiddel. Forsøkene ble kjørt in triplo.

Resultatene er gitt i Tabell 7 og viser at omtrent halve mengden av DENS vaksine er nødvendig for å oppnå 50% hemning av RF1-binding sammenlignet med den konserveringsmiddel-frie Engerix BTM vaksine. Dette reflekterer en øket presentasjon av RF1-epitop på HEF/DENS-antigen og er konsistent med testene utført med RF1-antistoff på det rensede bulk-antigen.

Tabell 7 Hemning av RF1-binding av formulert vaksine

Vaksine-parti	IC-50 (ng/ml) ⁽¹⁾			
	Forsøk			Gjennomsnitt
	1	2	3	
DENS001A4	913	662	603	726
DENS002A4	888	715	521	708
DENS003A4	817	685	582	695
ENG5100A2	1606	1514	1481	1534
ENG3199B9	1329	1170	1286	1262
ENG3328A9	1417	1194	1334	1315

(1) konsentrasjon av vaksine som hemmer 50% av RF1 antistoff-binding til fiksert antigen

2.2.2 Immunogenisitet av DENS-vaksine i mus

En undersøkelse ble utført på Balb/C-mus for å sammenligne immunogenisiteten av de tre DENS-konsistens partiene med Engerix BTM produsert i henhold til rådende antigen-fremstillingsprosess og formulert med tiomersal.

De følgende partier ble testet:

DENS001A4

DENS002A4

DENS003A4

5 # ENG2953A4/Q som referanse

Grupper på 12 mus ble immunisert intramuskulært to ganger med 2 ukers mellomrom med vaksinedoser svarende til 1/10 (2 µg) eller 1/50 (0,4 µg) av voksen human dose. Antistoff-respons til HBsAg og den isotypiske profil fremkalt ved vaksinasjon ble overvåket fra sera tatt på dag 28.

10

EKSPERIMENTELL DESIGN

Grupper på 12 Balb/C-mus ble immunisert intramuskulært i begge ben (2 x 50 µl) på dager 0 og 15 med de følgende vaksinedoser:

15 **Tabell 8: Grupper og vaksinedose**

Gruppe	Vaksine	Volum	Antigen-dose
1	DENS001A4	100µl	2µg
2	→Fortynnet 5X i PO4/NaCl	100µl	0,4µg
3	DENS002A4	100µl	2µg
4	→Fortynnet 5X i PO4/NaCl	100µl	0,4µg
5	DENS003A4	100µl	2µg
6	→Fortynnet 5X i PO4/NaCl	100µl	0,4µg
7	ENG2953A4/Q	100µl	2µg
8	→Fortynnet 5X i PO4/NaCl	100µl	0,4µg

På dager 15 (2 uker etter I) og 28 (2 uker etter II) ble blod tatt fra retroorbital sinus.

20 For utformingen av dette forsøket (4 preparater x 2 doser med 12 mus pr. gruppe), ble styrken beregnet a priori med PASS statistisk program. PASS (Power and Sample Size) statistisk program ble anskaffet fra NCSS, 329 North 1000 East, Kaysville, Utah 84037. For 2 veis variansanalyse, skulle 2,5 ganger forskjell i GMT mellom preparater med en alfa-feil på 5% detekteres med en styrke > 90%.

RESULTATER

Serologi:

Humorale responser (Total Ig og isotyper) ble målt ved ELISA-forsøk ved anvendelse av HBsAg (Hep286) som belegg-antigen og biotin-konjugert anti-mus antistoffer for å avsløre anti-HBs antistoff-binding. Bare etter II ble sera analysert.

Tabell 9 viser gjennomsnitt og GMT anti-HBs Ig antistoff-responser målt i individuelle sera 2 uker etter II.

Sammenlignbare antistoff-responser blir fremkalt med DENS og klassiske hepatitt B-preparater: GMT i området mellom 2304 og 3976 EU/ml for DENS- partiene sammenlignet med 2882 EU/ml for SB Biologicals hepatitt B monovalente vaksine (Engerix B™) med 2µg dose, og GMT i området mellom 696 og 1182 EU/ml for DENS-partiene sammenlignet med 627 EU/ml for SB Biologicals hepatitt B monovalente vaksine (Engerix B™) med 0,4 µg dose.

- Som forventet er en klar antigen-doseavhengig effekt observert for alle preparater med 2 µg og 0,4 µg doser med en 3 til 6 ganger forskjell i GMT.
- Fire ikke-responderende mus (titere < 50 EU/ml) ble observert uten klare forbindelser til antigen-dosene eller partiene anvendt for injeksjonen (Grupper 1, 2, 3 og 8; én mus pr. gruppe). Basert på statistisk analyse (Grubbs Test) ble disse musene tatt bort fra ytterligere analyse.

Tabell 9 *Antistoffrespons hos mus på dag 28 (2 uker etter II)*

Gruppe	Vaksine	Dose	Antall	ELISA-TITERE (Ig)	
				Gjennomsnitt	GMT
1	DENS001A4	2 µg	11	3466	2971
2	DENS002A4	0,4 µg	11	1283	1182
3		2 µg	11	2436	2304
4		0,4 µg	12	984	786
5	DENS003A4	2 µg	12	4583	3976
6	ENG2953A4/Q	0,4 µg	12	997	696
7		2 µg	12	3999	2882
		0,4 µg	11	737	627

5 **Statistisk analyse:**

En 2 veis variansanalyse ble utført på anti-HBs titere etter log transformasjon av post II data, ved anvendelse av vaksinene (4 partier) og antigendosene (2 µg og 0,4 µg) som faktorer. Denne analyse bekreftet at en statistisk betydelig forskjell ble observert mellom de to antigendoser (p verdi < 0,001) og ikke viste noen betydelig forskjell mellom vaksine-partiene (p verdi = 0,2674).

10 Som tidligere nevnt ble styrken beregnet a priori og utformingen av forsøket var slik at en 2,5 ganger forskjell i GMT med en alfa feil på 5% kunne detekteres mellom preparater med en styrke >90%.

Isotypisk profil:

15 Tabell 10 viser den isotypiske repartisjon (IgG1, IgG2a og IgG2b) beregnet fra en analyse av samlet sera etter II.

- Som forventet blir en klar TH2-respons fremkalt av disse alun-baserte vaksiner ettersom hovedsakelig IgG1-antistoffer er observert.

20 Ingen forskjell er observert mellom DENS-partiene eller SB Biologicals hepatitt B monovalente vaksine når det gjelder isotypisk profil.

Tabell 10 **Repartisjon av IgG isotyper i samlet dag 28 sera**

Gruppe	Vaksine	Dose	Isotype (%)		
			IgG1	IgG2a	IgG2b

1	DENS001A4	2 µg	91	4	5
2		0,4 µg	87	8	5
3	DENS002A4	2 µg	97	2	1
4		0,4 µg	87	6	7
5	DENS003A4	2 µg	98	1	1
6		0,4 µg	93	4	3
7	ENG2953A4/Q	2 µg	88	8	4
		0,4 µg	88	9	3

Eksempel 3

Formulering av kombinerte vaksiner

5 Bulk-antigen ifølge foreliggende oppfinnelse er spesielt egnet for formulering i en kombinert vaksine omfattende IPV.

Stabilitetsundersøkelser utført på opprinnelige partier av en kombinert DTPa-HBV-IPV vaksine viste en nedgang i styrken av IPV-komponent, spesielt av type 1 poliomyelitt-antigen, ved anvendelse av et *in vitro* immunoassay (bestemmelse av D-antigen-innhold ved ELISA) og en *in vivo* styrketest. Intet styrketap ble observert for type 3. For type 2 var styrketapet innenfor det forventede område (ikke mer enn 10% tap pr. år med lagring).

Undersøkelser ble initiert for å bestemme årsaken til dette tap av styrke i den samlede DTPa-HBV-IPV vaksine. Fra observasjonen at stabiliteten til IPV i SB Biologicals DTPa-IPV vaksine er tilfredsstillende (ikke mer enn 10% antigen-innhold-tap pr. år lagring), ble det konkludert at HBV-komponenten sannsynligvis var ansvarlig for ustabiliteten av IPV i DTPa-HBV-IPV-vaksinen.

HBV-komponenten anvendt i den opprinnelige DTPa-HBV-IPV-formuleringen er rensset r-DNA, gjær-avledet HBsAg også anvendt for fremstilling av SB Biologicals hepatitt B monovalent vaksine og fremstilt som beskrevet i Eksempel 1.

Som et første forsøk på å bestemme hvilket element i HBV-komponenten som var skadelig for IPV, ble HBsAg-bulk analysert for tilstedeværelse av tiomersal. Det er tidligere funnet (Davisson et al., 1956, J. Lab. Clin. Med 47: 8-19) at tiomersal anvendt som konserveringsmiddel i DTP-vaksiner "var skadelig for poliomyelitt-virus" i en DTP-IPV-kombinasjon. Denne observasjon ble tatt i betraktning av vaksineprodusenter som har erstattet tiomersal med andre konserveringsmidler for formulering av deres IPV-inneholdende vaksiner. Senere er effekten av tiomersal på IPV-styrke under betingelser med langvarig lagring ved + 4 °C blitt undersøkt påny.

Tap av styrke av type 1 poliovirus-antigen til udetekterbare nivåer etter 4-6 måneder ble rapportert (Sawyer, L.A. et al. 1994, Vaccine 12: 851-856).

Ved anvendelse av atomisk adsorpsjonsspektroskopi ble omtrent 0,5 µg kvikksølv (Hg) pr. 20 µg av HBsAg detektert i antigen renset i henhold til Eksempel 1.

5 Denne mengde av kvikksølv (som tiomersal og etylkvikksølv-klorid, tiomersal-nedbrytningsprodukt) kan reduseres til udetekterbare nivåer ELISA-respons for D-antigen type 1-innhold i et IPV bulk-konsentrat inkubert ved 37°C i 7 dager.

En metode ble etablert for frigjøring av kvikksølv til stede i HBsAg-bulk. Det ble postulert at kvikksølv kunne være bundet til tiolgrupper på HBsAg-partikkelen og derfor kunne bli frigjort i nærvær av reduksjonsmidler. Etter eksperimentering med andre reduksjonsmidler ble L-cystein valgt som midlet for frigjøring av kvikksølv fra HBsAg-partikkelen. Etter dialyse av HBsAg-bulk mot saltvannsløsning inneholdende 5,7 mM L-cystein, ble intet kvikksølv detektert i retentatet (deteksjonsgrense for testingsmetoden: 25 ng Hg/20 µg HBsAg). Det dialyserte antigen ble blandet med IPV-bulk-konsentrat og stabiliteten til type 1 virus ble bedømt ved å måle D-antigen-innholdet etter inkubering ved 37°C i 7 dager. IPV-bulk-konsentrat som var ikke-blandet og blandet med HBsAg ikke behandlet med cystein ble anvendt som kontroller. Referanse ELISA-titere ble oppnådd for prøver lagret ved +2°C til +8°C i 7 dager.

Resultatene er oppsummert i Tabell 11:

20 **TABELL 11**

Prøve	D-antigen-innhold (type 1)⁽¹⁾		Tap
	7 dager/4°C	7 dager/37°C	
IPV (ikke-blandet)	31,6	24,2	23 %
IPV+HBsAg ikke behandlet	31,1	18,1	42 %
IPV + HBsAg-cystein-behandlet	31,4	27,6	12 %
IPV + tiomersal (1 µg/ml)	30,5	11,0	74 %

⁽¹⁾ uttrykt i D-antigen-enheter (DU)

25 Dataene oppnådd for disse laboratorie-preparater demonstrerer klart at stabiliteten til type 1 poliovirus blir betydelig forbedret hvis HBsAg blir behandlet med cystein for å fjerne gjenværende kvikksølv før blanding med IPV.

Dataene presentert ovenfor viser også tap av D-antigen-innhold på 23% for referanse-IPV-preparatet etter inkubering i 7 dager ved 37°C. Dette bekrefter den iboende ustabilitet av type 1 Mahoney poliovirus, som tidligere rapportert (Sawyer, L.A. et al. (1994), Vaccine 12: 851-856).

30 Selv om kommersielle partier av DTPa-HBV-IPV og DTPa-HBV-IPV/Hib vaksiner er fremstilt ved anvendelse av en dialyseprosess med 5,7 mM L-cystein for å fjerne gjenværende

kvikksølv og opprettholde stabiliteten til IPV, er dialyse-prosessen ikke egnet for storskala-produksjon og involverer en serie av supplementære trinn for å fremstille tiomersal- eller kvikksølv-fri HBsAg. I motsetning kan HBsAg fremstilt uten tiomersal, anvendes direkte i preparater av kombinerte vaksiner spesielt de inneholdende IPV.

5

4. Oppsummering

Den tidligere anvendte prosess for rensning av gjær-avledet overflate-antigen omfatter et gelpermeasjonstrinn hvor den kvikksølv-inneholdende anti-mikrobielle forbindelse tiomersal er inkludert i elueringsbufferen for å kontrollere biobelastningen.

10 Tiomersal blir ikke fullstendig utskilt under de påfølgende trinn av fremgangsmåten, slik at ca. 1,2 µg tiomersal pr. 20 µg protein er til stede i det rensede bulk-antigen.

For å produsere et fullstendig tiomersal-(kvikksølv) fritt bulk-antigen blir renseprosessen endret i to trinn.

- Tiomersal blir utelatt fra elueringsbufferen ved 4B gelpermeasjonstrinnet.
 - 15 • Cystein (2 mM endelig konsentrasjon) blir tilsatt til eluatsamlingen fra anionbytter-kromatografitrinnet. Dette forhindrer utfelling av antigen under CsCl densitetsgradient-sentrifugering.
- Det er ingen andre endringer i produksjonsprosessen.

20 Bulk-antigen produsert ved den modifiserte prosess er blitt karakterisert. Fysisk-kjemiske tester og forsøk viser at det tiomersal-frie antigen i egenskaper ikke kan skilles fra antigen produsert ved den tidligere anvendte prosess. Antigenpartiklene har samme bestanddeler.

25 Identitet og integritet av HBsAg-polypeptid er upåvirket av den modifiserte prosess som bedømt ved SDS-PAGE-analyse, Western blotting ved anvendelse av polyklonale anti-HBsAg-antistoffer, N-terminal sekvensanalyse og aminosyre-sammensetning. Elektronmikroskopi og laserlys-sprednings-analyse viser at partiklene har typisk form og størrelse forventet for gjær-avledet HBsAg. Analyse med Western blotting med anti-gjær protein-serum viser at antigenet produsert ved den tiomersal-frie prosess har et lignende mønster av forurensende gjær-proteiner. Imidlertid er mengden av et forurensende bånd som migrerer ved 23K sterkt redusert i de 3 HBsAg-partier produsert ved anvendelse av den modifiserte prosess.

30 Immunologiske analyser viser at de tiomersal-frie partikler har en øket antigenisitet. Partiklene er mer reaktive med Abbott AUSZYME-settet (inneholdende en blanding av monoklonale antistoffer) som gir ELISA/protein-forhold på 1,6 til 2,25. Denne økede antigenisitet er også vist med det beskyttende RF1 monoklonale antistoff. Omtrent 4 til 7 ganger mindre tiomersal-fritt antigen er nødvendig for å hemme RF1-binding til et standard fiksert antigen. Den

35 tiomersal-frie og klassiske antigenhemning av bindings-kurver faller inn i to distinkte familier.

Denne forskjell er også vist ved måling av bindingsaffinitets-konstant for RF1 ved anvendelse av overflate-plasmon-resonans. Bindingsaffiniteter av de tiomersalfrie preparater er 3 til 4 ganger høyere sammenlignet med partiet med klassisk bulk-antigen.

5 Bulk-antigenpreparatene ble formulert som vaksine ved adsorpsjon på aluminium-hydroksyd og uten konserveringsmiddel.

Testing for in vitro styrke ved anvendelse av Abbott AUSZYME ELISA-sett og tiomersal-inneholdende SB Biologicals hepatitt B monovalente vaksine som standard viste at høye in vitro styrkeverdier ble oppnådd. Antigeninnhold målt ved denne test var nesten det dobbelte av den angitte verdi på 20 µg protein pr. ml.

10 En øket reaktivitet av vaksine fremstilt fra tiomersalfritt antigen ble også sett i et hemningsforsøk med RF1 monoklonalt antistoff for binding til fiksert antigen. Omtrent halve mengden av den tiomersalfrie vaksine var nødvendig for å gi 50% hemning av RF1-binding til fiksert antigen sammenlignet med antigen renset ved den tidligere anvendte prosess og formulert uten konserveringsmiddel.

15 Denne økede antigenisitet av den tiomersalfrie vaksine med hensyn til RF1 er overensstemmende med resultatene fra in vitro styrketesten (antigeninnhold) og med RF1-antistoff-tester utført på bulk-antigenpreparatene.

20 En muse-immunogenisitetstest ble utført ved anvendelse av priming og booster vaksinasjoner med to ukers mellomrom og doser på 2 og 0,4 µg antigen. Blod ble tappet fra musene på dag 28, 14 dager etter booster-vaksinen. Sera ble analysert for antistofftiter og isotype-sammensetning. En klar antigen doseeffekt ble observert for de to doser administrert, men det var ingen statistisk betydelig forskjell i respons når det gjelder antistofftiter (GMT) mellom tiomersalfrie og konserveringsmiddelfrie vaksiner.

Ingen vesentlige forskjeller ble observert i isotype-profilene.

25

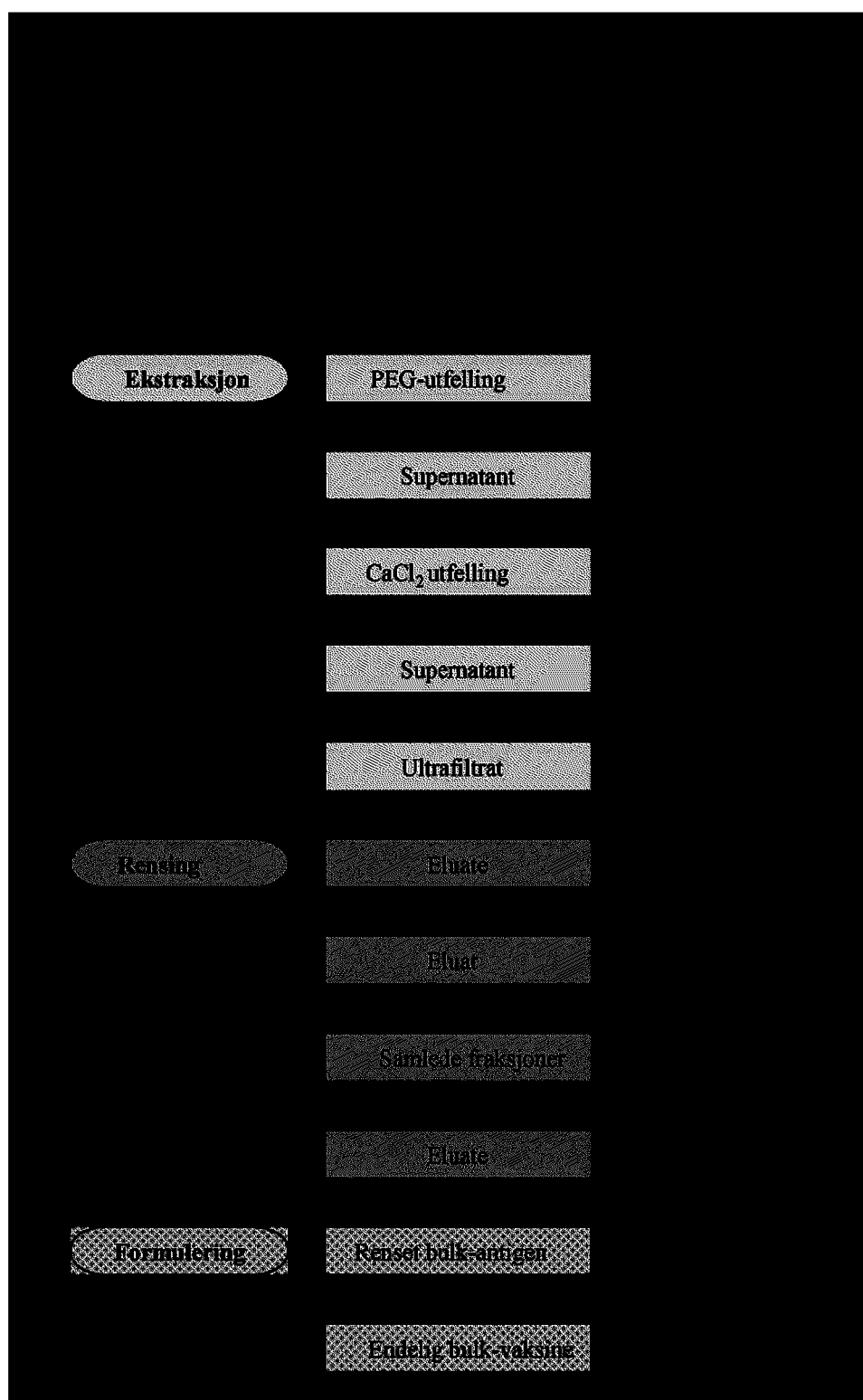
30

Patentkrav

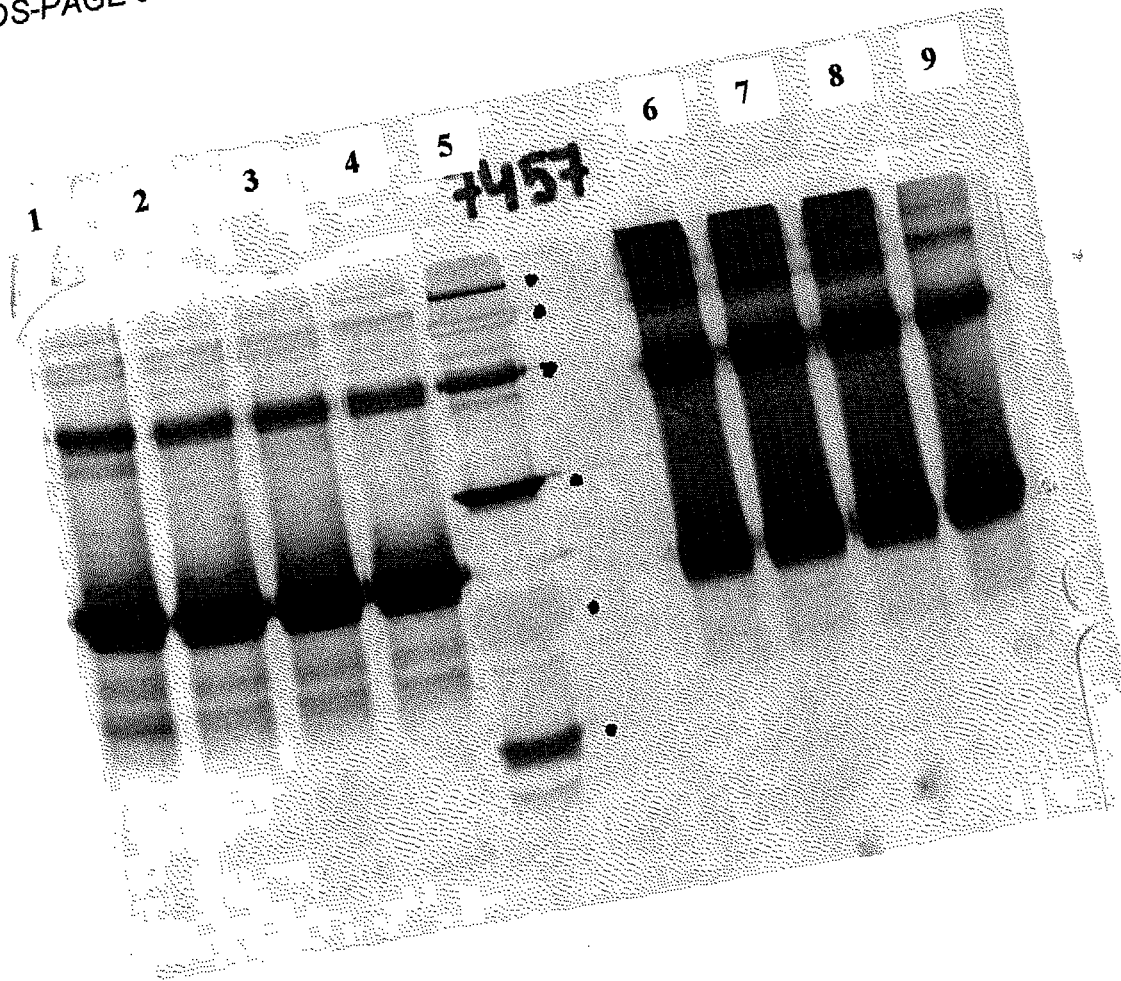
1. Fremgangsmåte for fremstilling av en stabil, immunogen hepatitt B vaksine uten spor av tiomersal, som omfatter:
 - (a) å uttrykke hepatitt B overflateantigen (HBsAg) som et rekombinant protein i *Saccharomyces cerevisiae*;
 - (b) bearbeide gjærcellene for å tilveiebringe et urensset antigenpreparat;
 - (c) underkaste det urensede antigenpreparatet for gelpermasjonskromatografi, hvor elueringsbufferen som anvendes i gelpermasjonskromatografien ikke inneholder tiomersal;
 - (d) underkaste den antigen-inneholdende eluat fra trinn (c) for ionebytterkromatografi;
 - (e) tilsette cystein til den antigen-inneholdende eluat-samling oppnådd etter trinn (d);
 - (f) underkaste preparatet fra trinn (e) for cesiumklorid ultrasentrifugering; og
 - (g) kombinere det rensede HBsAg med en farmasøytisk akseptert eksipiens for å fremstille en stabil, immunogen hepatitt B vaksine; hvor ikke noe tiomersal er tilsatt til den oppnådde vaksinen.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor cysteinets tilsettes til en sluttkonsentrasjon på mellom 1 og 10 mM.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor cysteinets tilsettes til en sluttkonsentrasjon på omtrent 2 mM.
4. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor ionebytterkromatografi er anionbytterkromatografi.
5. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor vaksinen videre kombineres med et adjuvans.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 5, hvor adjuvanset er et aluminumsalt.
7. Fremgangsmåte ifølge krav 6, hvor adjuvanset er aluminumhydroksidgel eller aluminumfosfat.
8. Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvor adjuvanset er et Th-1-induserende adjuvans.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor det Th1-induserende adjuvans er 3D-MPL; QS21; 3D-MPL og QS21; eller et CpG oligonukleotid.
10. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor adjuvanset er 3D-MPL og et aluminumsalt.

Figur 1: Flytdiagram for den tiomersal-frie produksjonsprosess for Engereix B™



Figur 2: SDS-PAGE analyse av bulk-antigen-partier: sølv-merking: 1 µg protein pr. prøve.



Lan 1: HEF 001, reduserende betingelser

Lan 2: HEF002, reduserende betingelser

Lan 3: HEF003, reduserende betingelser

Lan 4: HEP2005, reduserende betingelser

Lan 5: Molekylvekt-markører

Lan 6: HEF001, ikke-redusert

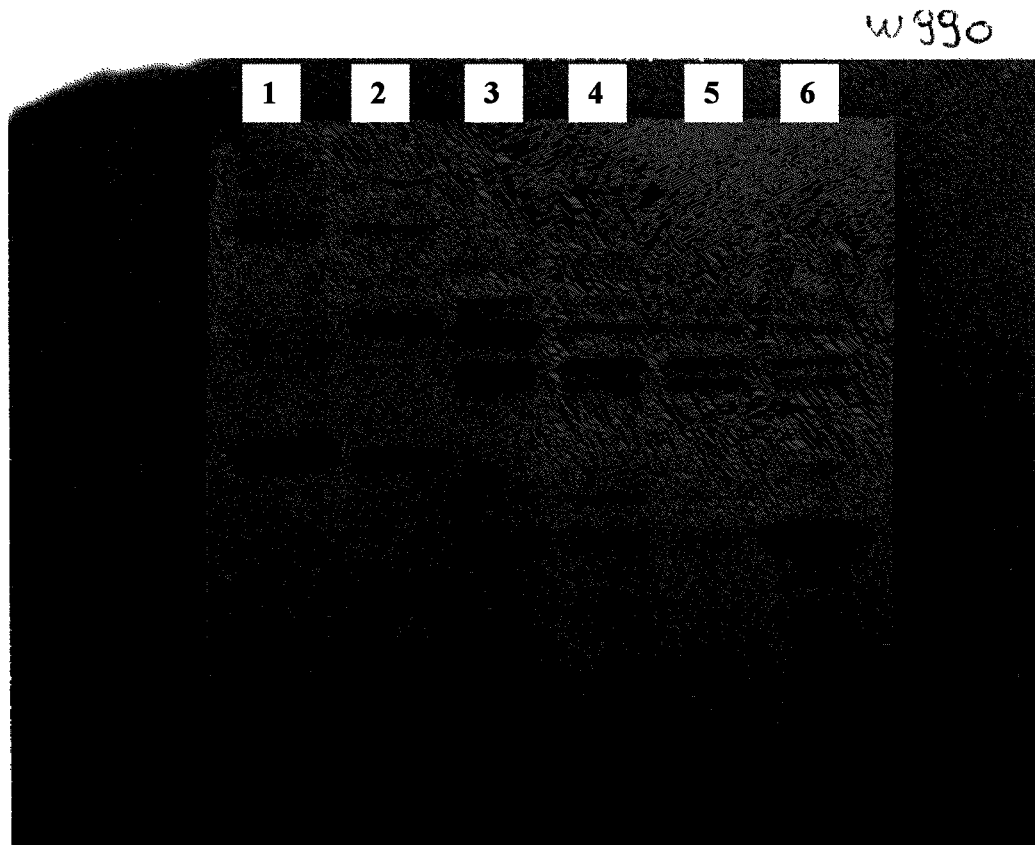
Lan 7: HEF002, ikke-redusert

Lan 8: HEF003, ikke-redusert

Lan 9: HEP2055, ikke-redusert

Stillingene av molekylvekt markører er angitt ved sorte prikker: 92500, 66200, 45000, 31000, 21500, 14400.

Figur 3: Gjenværende gjærproteiner i bulk-antigen-partier produsert av den tiomersal-frie prosess: Western blotting med kanin anti-gjær proteinserum



Lan 1: Molekylvekt-markører (prefarget)

Lan 2: Lav-molekylvekt-markører (biotinylert)

Lan 3: HEF001, 20 μ g protein

Lan 4: HEF002, 20 μ g protein

Lan 5: HEF003, 20 μ g protein

Lan 6: HEP2055, 20 μ g protein

Stillingene av lav-molekylvekt-markører er angitt ved sorte prikker: 92500, 66200, 45000, 31000, 21500, 14400.