



REPUBLIKA SLOVENIJA

Urad RS za varstvo industrijske lastnine

(10) **SI 9300271 A**

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: **9300271**

(22) Datum prijave: **21.05.1993**

(51) MPK⁵: **C12P 21/00**, C12P 21/08,
C12N 15/51, A61K 39/42,
A61K 39/295

(45) Datum objave: **31.12.1993**

(30) Prednost: **23.05.1992 GB 9211081.6;**
23.06.1992 GB 9213308.1

(72) Izumitelj: **PETRE JEAN, B-1330 Rixensart, BE;**
HAUSER PIERRE, B-1330 Rixensart, BE

(73) Nosilec: **SmithKline Beecham Biologicals (s.a.), 89 rue de l'Institut, B-1330 Rixensart, BE**

(74) Zastopnik: **PATENTNA PISARNA D.O.O., Čopova 14, p.p. 322, 61000 Ljubljana, SI**

(54) KOMBINIRANE VAKCINSKE FORMULACIJE, KI VKLJUČUJEJO
VAKCINSKO KOMPONENTO HEPATITISA B ZA ZDRAVLJENJE INFEKCIJ S HEPATITISOM B

(57) Opisani so stabilni in učinkoviti multivalentni vakcinski sestavki, ki obsegajo površinski antigen hepatitisa B (HBsAg), pri čemer je HBsAg komponenta stabilna en teden pri 37 stopinjah Celzija in visoko imunogenska, če npr. vakcino damo otrokom. Sestavki značilno obsegajo HBsAg, adsorbiran na

aluminijevem fosfatu, in druge antigene posebno tiste, primerne za uporabo v pediatrični vakcini, adsorbirane na aluminijevem fosfatu ali aluminijevem hidroksidu. Opisani so tudi postopki za pripravo vakcin in uporaba aluminijevega fosfata za stabiliziranje HBsAg v multivalentnem vakcinskem sestavku.

SI 9300271 A

SmithKline Beecham Biologicals (s.a.)

Kombinirane vakcinske formulacije, ki vključujejo vakcinsko komponento hepatitisa B za zdravljenje infekcij s hepatitisom B

Predloženi izum se nanaša na nove vakcinske formulacije, postopke za njihovo pripravo in njihovo uporabo v terapiji. Zlasti se predloženi izum nanaša na nove kombinirane vakcinske formulacije, ki vključujejo vakcinsko komponento hepatitisa B za zdravljenje infekcij s hepatitisom B.

Infekcija z virusom hepatitisa B (HB) je splošen problem, vendar so vaccine, ki jih uporabljajo za množično imunizacijo, sedaj na razpolago, npr. produkt "Engerix-B" (SmithKline Beechman PLC). Engerix B ima kot antigensko komponento hepatitisa B površinski antigen hepatitisa B (HBsAg), ki ga dobijo s tehnikami genetskega inženiringa.

Vendar je pogosto potrebno ali želeno dajati vakcino hepatitisa B istočasno kot druge vaccine in to lahko vključuje mnogoterne injekcije. Problemi, povezani z mnogoternimi injekcijami, vključujejo bolj kompliciran postopek dajanja in velik celotni injekcijski volumen.

Zato obstaja potreba po stabilni kombinirani vakcini, ki obsega antigen hepatitisa B v kombinaciji z drugimi antigeni. Drugi antigeni so zlasti tisti, sposobni v vakcinski formulaciji preprečevanja hepatitisa A (HA), difterije (D), tetanusa (T), pertusisa s popolnimi celicami (Pw), neceličnega pertusisa (Pa), hemofilne influence b (Hib) in polia (P).

Aluminijev hidroksid (AH) se na splošno uporablja kot adjuvant v formulaciji vakcin. Npr. Engerix B uporablja površinski antigen hepatitisa B (HBsAg), adsorbiran na aluminijevem hidroksidu. Tudi mi smo uspešno uporabili AH v formulaciji vakcine hepatitisa A in v kombiniranih vakcinah DT, DTPw in DTPa. Vendar če uporabimo HBsAg, adsorbiran na AH, v kombinaciji z drugimi vakcinami v kombinirani formulaciji, pride do bistvenega padca imunskega odziva na HBsAg, ki ima za posledico nižjo ali nezadostno sero zaščito po vakcinaciji. Poleg tega je stabilnost HBsAg komponente kombinirane vakcine slaba.

HBsAg, adsorbiran na aluminijevem fosfatu (AP), je uporabljen v tržno dosegljivi monovalentni vakcini (HEPPACINE), ki jo izdeluje korejski Cheil Sugar Co Ltd. Ugotovili smo, da ni bistvene razlike v imunogenih lastnostih med monovalentno vakcino HBsAg, adsorbiranega na AH, Engerix B, in monovalentno vakcino HBsAg, adsorbiranega na AP.

Evropska patentna prijava s št. objave 0339 667 prikazuje bivalentno vakcino, ki obsega HBsAg in antigen hepatitisa A, v kateri je uporabljen kot adjuvant bodisi aluminijev hidroksid ali aluminijev fosfat. Iz le-te je razvidno, da ni nobene večje potrebe po tem, da bi se izognili aluminijevemu hidroksidu kot adjuvantu za multivalentno vakcino, ki obsega HBsAg. Nadalje je razvidno, da v tem dokumentu ali kjerkoli drugje ni prikazana bivalentna ali multivalentna vakcina hepatitisa B, v kateri je vsaj en antigen, drugačen kot HBsAg, adsorbiran na aluminijevem hidroksidu, in je HBsAg adsorbiran na aluminijevem fosfatu.

Vsekakor je razvidno, da pri tem sploh ni bilo objave, ki bi omogočala stabilno in učinkovito multivalentno vakcino, ki obsega HBsAg.

Z enega vidika predloženi izum zagotavlja kombiniran vakcinski sestavek, ki obsega površinski antigen hepatitisa B (HBsAg) in številne (n) druge antigene v kombinaciji z adjuvantom, ki obsega eno ali več aluminijevih soli, v kateri je vrednost n 1 ali več in v kateri adjuvant, uporabljen za adsorbiranje HBsAg, ni aluminijev hidroksid, pod pogojem, da kadar je n 1, drugi antigen ni antigen proti hepatitisu A.

Prednostno je n 2, 3, 4, 5 ali 6.

Prednost predloženega izuma je ta, da ne pride do bistvenega padca imunogenosti

HBsAg v kombinirani vakcinski formulaciji. Izogibanje uporabe AH za adsorbiranje HBsAg komponente v vakcinski formulaciji povzroči tudi produkt z znatno boljšo stabilnostjo. Nadaljnja prednost predloženega izuma je ta, da premagamo navedene težave, povezane z mnogoternimi injekcijami, ali jih vsaj ublažimo in zagotovimo visoko imunogeno kombinirano formulacijo. Sestavki v smislu izuma so zlasti primerni za dajanje otrokom.

Prednostno je HBsAg adsorbiran na AP. Zlasti smo ugotovili v humanih kliničnih študijah, da kadar HBsAg adsorbira na AP kombinirano z enim ali več antigenov, adsorbiranih na AH ali AP, v kombinirani vakcini ne pride do bistvenega padca imunogenosti. Stabilnost HBsAg, adsorbiranega na AP v formulaciji, je tudi večja kot HBsAg, adsorbiranega na AH.

Skladno je z nadaljnjim vidikom predloženega izuma zagotovljen vakcinski sestavek v skladu s predloženim izumom, v katerem je vsaj eden od antigenov drugačen kot HBsAg, adsorbiran na aluminijevem fosfatu.

Z nadaljnega prednostnega vidika je vsaj eden od antigenov drugačen kot HBsAg, adsorbiran na AH.

Z nadaljnega vidika predloženi izum zagotavlja kombinirano vakcino, ki obsega površinski antigen hepatitisa B (HBsAg), adsorbiran na AP, in antigen, adsorbiran na AP ali AH, izbran izmed antigena proti enemu ali več od naslednjih patogenov: difterija (D), tetanus (T), pertusis (P), neaktiviran polio (IPV), hemofilna influenza b (Hib), in hepatitis A (HA).

V pediatrično vakcino lahko vključimo tudi druge kompatibilne antigene, npr. antigene, znane, da so učinkoviti proti meningitisu B, meningitisu A in C in otitis medijem.

Kot uporabljamo tukaj, se izraz "bivalenten" nanaša na vakcino, ki obsega kombinacijo dveh antigenov v celoti. Izraz "multivalenten" uporabljamo za vakcinski sestavek, ki obsega več kot dva antigena, npr. 3, 4 ali 5 ali 6 antigenov.

Pomena izrazov "aluminijev fosfat" in "aluminijev hidroksid", kot ju uporabljamo tukaj, vključujeta vse oblike aluminijevega hidroksida ali aluminijevega fosfata, ki so primerne za adjuvantiranje vakcin.

Npr. aluminijev fosfat je lahko oborina netopnega aluminijevega fosfata (amornega, polkristalnega ali kristalnega), ki ga lahko v danem primeru, toda ne izključno, pripravimo z mešanjem topnih aluminijevih soli in soli fosforne kisline. "Aluminijev hidroksid" je lahko oborina netopnega (amornega, polkristalnega ali kristalnega) aluminijevega hidroksida, ki ga lahko v danem primeru, toda ne izključno, pripravimo z nevtraliziranjem raztopine aluminijevih soli. Zlasti primerne so razne oblike aluminijevih hidroksidnih in aluminijevih fosfatnih gelov, ki so dosegljive iz tržnih virov, npr. Alhidrogel (aluminijev hidroksid, 3 % suspenzija v vodi) in Adju-fos (aluminijev fosfat, 2 % suspenzija v slanici), ki ju dobavlja Superfos (Vedbaek, 2950 Danska).

Upoštevati je treba, da smo prvič sposobni zagotoviti stabilen in učinkovit multivalenten vakcinski sestavek, ki obsega HBsAg.

Skladno je z nadaljnjim vidikom predloženega izuma zagotovljen stabilen in učinkovit kombiniran vakcinski sestavek, naravnan za preprečevanje več kot dveh bolezni, ki obsega HBsAg in vsaj dva druga antigena.

Odlične rezultate dobimo, če je HBsAg adsorbiran na AP in je vsaj eden od antigenov drugačen kot HBsAg, adsorbiran na AH.

Prednostne kombinacije vakcin v skladu s predloženim izumom so:

difterija-tetanus-pertusis-hepatitis B (DTP-HB)
 difterija-tetanus-hepatitis B (DT-HB)
 DTP-IPV (neaktivirana polio vakcina)-hepatitis B
 Hib-hepatitis B
 DTP-Hib-hepatitis B
 IPV-DTP-Hib-hepatitis B.

Upoštevati je treba, da za vakcino, ki vsebuje Hib komponento, lahko uporabimo Hib antigen improvizirano s formuliranjem vakcine tik pred dajanjem.

Bolj specifično, posebno vakcine v obsegu izuma so:

difterija-tetanus-pertusis (DTP adsorbiran na AH ali AP)-hepatitis B (HBsAg, adsor-

biran na AP)

difterija-tetanus (DT, adsorbiran na AP ali AH)-hepatitis B (HBsAg, adsorbiran na AP).

Izraz "stabilna" kot ga uporabljamo tukaj, da opišemo vakcino v skladu s predloženim izumom, pomeni vakcino, ki jo lahko vzdržujemo pri 37 °C en teden brez kakršnekoli bistvene izgube imunogenosti HBsAg komponente.

Izraz "učinkovit", kot ga uporabljamo tukaj, pomeni vakcinski sestavek, označen s tem, da je imunogenost HBsAg v kombinirani vakcini takšna, da ugotovimo geometričen povprečni titer vsaj 200 mIU/ml, prednostno 300 mIU/ml ali več, pri otrocih po tretji dozi vakcine, kadar jo dajemo v enomesečnih intervalih po ustreznem vakcinacijskem razporedu.

Z nadaljnega vidika predloženi izum zagotavlja multivalenten vakcinski sestavek, ki obsega HBsAg in stabilizirni adjuvant, ki ga izberemo tako, da vakcino lahko vzdržujemo pri 37 °C en teden brez kakršnekoli izgube imunogenosti HBsAg komponente. Prednostno je multivalentni vakcinski sestavek nadalje označen s tem, da povzroči geometrični srednji titer vsaj 200 mIU/ml (en mesec po tretji dozi), prednostno 300 mIU/ml ali več pri otrocih, kadar poteka dajanje vakcine v enomesečnih intervalih po ustreznem vakcinacijskem razporedu.

Kot uporabljamo tukaj izraz "ustrezen vakcinacijski razpored", to pomeni razpored, znan strokovnjakom na področju dajanja odmerkov doz vakcine, posebno pediatričnih doz. Uporabimo lahko npr. 3, 4 in 5 mesečni razpored. Zlasti je to ustrezno npr. za vakcine, ki vsebujejo DTP-HBsAg v skladu s predloženim izumom.

Z enega vidika je HBsAg lahko adsorbiran na aluminijevi soli, ki je drugačna kot aluminijev hidroksid. Prednostno je adsorbiran na AP. Drugi antigeni v multivalentni vakcinski formulaciji so prednostno adsorbirani na AH, kot je prikazano v primerih tukaj spodaj.

Prednostno obsega vakcinska formulacija v skladu s predloženim izumom pertusisno vakcino.

Pertusisna komponenta je primerno pertusisna vakcina s popolnimi celicami ali

necelična pertusisna vakcina, ki vsebuje delno ali visoko očiščene antigene.

Zgornje kombinacije lahko v danem primeru vključujejo komponento, ki je varovalna proti hepatitisu A, to je HAV antigen.

Prednostno je kombinacijska vakcina hepatitisa B pediatrična vakcina.

Priprava antigenov in adsorpcijski postopek z adjuvanti sta dobro znana v tehniki; glej primer, kot je navedeno spodaj.

Priprava površinskega antigena hepatitisa B (HBsAg) je primerno dokumentirana. Glej npr. Harford et al. (1983) v Develop. Biol. Standard 54, str. 125, Gregg et al. (1987) v Biotechnology 5, str. 479, EP A-0 226 846, EP-A-0 299 108 in reference le tam.

Kot uporabljamo tukaj, izraz "površinski antigen hepatitisa B" ali "HBsAg" vključuje katerikoli HBsAg antigen ali njegov fragment, ki prikazuje antigenost HBV površinskega antigena. Razumljivo je, da lahko poleg 226 aminokislinskih sekvenc HBsAg S antigena (glej Tiollais et al. *Nature*, 317, 489 (1985) in reference le tam) HBsAg, kot je opisan tukaj, če želimo, vsebuje vso ali del pre-S sekvence, kot je opisano v zgornjih referencah in v EP-A-0278940. Zlasti HBsAg lahko obsega polipeptid, ki obsega amino kislinsko sekvenco, ki obsega ostanke 12-52, čemur sledijo ostanki 133-145, čemur sledijo ostanki 175-400 L-proteina HBsAg, glede na odprt bralni okvir virusa hepatitisa B ad serotipa (na ta polipeptid se sklicujemo kot na L*; glej EP 0 414 374). HBsAg v obsegu izuma lahko vključuje tudi pre-S1-pre-S2-S polipeptid, opisan v EP 0 198 474 (Endotronics) ali njegove analoge, kot so opisani v EP 0 304 578 (Mc Cormick and Jones). HBsAg, kot je opisan tukaj, se lahko nanaša tudi na mutante, npr. "pobegli mutant (escape mutant), opisan v WO ali 91/14703 evropski patentni prijavi s številko objave 0 511 855 A1, posebno HBsAg, kjer je v legi 145 aminokislinska substitucija arginina za glicin.

Normalno je HBsAg v obliki delcev. Delci lahko obsegajo, npr. S protein sam ali pa so lahko sestavljeni delci, npr. (L*, S), kjer je L*, kot je definirano zgoraj, in S pomeni S-protein HBsAg. Omenjeni delec je prednostno v obliki, v kateri je izražen v kvasovkah.

Primerni antigeni za uporabo v vakcinah v skladu s predloženim izumom so že tržno

dosegljivi in podrobnosti lahko dobimo pri svetovni zdravstveni organizaciji (WHO). Npr. IPV komponenta je lahko Salkova neaktivirana polio vakcina. Pertusisna vakcina lahko obsega produkt s popolnimi celicami, necelični produkt ali rekombinantno proizveden produkt. Zlasti je pertusisna komponenta lahko PT (pertusis toksini) ali njihove podfrakcije, FHA (filamentni hemaglutininski antigen), aglutinogeni (fimbrijski) in zunanji membranski proteini, vključno 69 kDa protein (pertaktin, nefimbrijski aglutinogen). Reference: Robinson, A., Irons, L. I. & Ashworth, A. E., *Vaccines*, 3, 1985, 11-22; in Brennan, H. J., Li, S. M., Cowell, J. L., Bishen, M. E., Steven, A. C. Novotny, P., Manclarck, C. R., *Infection and Immunity*, 56, 1988, 3189-3195.

Komponenta, ki daje zaščito proti hepatitisu A, je prednostno produkt, znan kot "Havrix" (SmithKline Beecham Biologicals), ki je uničena oslABLJENA vakcina, izvedena iz HM-175 seva HAV [glej "Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A" od F. E. Andre, A. Hepburn and E. D'Hondt (1980), *Prog. Med. Virol.*, Vol., 37, str. 72-95 in monografijo produkta "Havrix", objavljeno od SmithKline Beecham Biologicals (1991).

Flehmg et al (loc cit., str. 56-71) so naredili pregled kliničnih vidikov, virologije, imunologije in epidemiologije hepatitisa A in razpravljali o poskusih razvoja vakcin proti tej običajni virusni infekciji.

Kot uporabljamo tukaj se izraz "HAV antigen" nanaša na katerikoli antigen, ki je sposoben stimuliranja nevtraliziranja protiteles za HAV pri ljudeh. HAV antigen prednostno obsega neaktivirane oslABLJENE virusne delce ali je lahko npr. HAV kapsid ali HAV virusni protein, ki ga lahko običajno dobimo z rekombinantno DNA tehnologijo.

Vakcinski pripravek je na splošno opisan v *New Trends and Developments in Vaccines* (1978), izdano od Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland U.S.A.

Količino antigena v vsaki vakcinski dozi izberemo kot količino, ki inducira imuno zaščitni odziv brez znatnih škodljivih stranskih učinkov v tipičnih vakcinah. Taka količina variira, odvisno od tega, katere specifične imunogene uporabimo. Na splošno pričakujemo, da vsaka doza obsega 1-1000 μg celotnega imunogena, prednostno 2-100 μg , bolj prednostno 1-40 μg , najbolj prednostno 1-5 μg . Optimalno

količino za posebno vakcino lahko določimo s standardnimi študijami, ki vključujejo opazovanja protitelesnih titrov in drugih odzivov v subjektih. Primarni vakcinacijski postopek lahko vključuje dve ali tri doze vakcine, ki jih damo v enem ali dveh mesečnih presledkih po predpisih WHO za DTP imunizacijo.

Z nadaljnjega vidika predloženega izuma je zagotovljen vakcinski sestavek v skladu s predloženim izumom za uporabo v medicini.

Z nadaljnjega vidika predloženega izuma je zagotovljena uporaba HBsAg za izdelavo kombinirane vakcine v skladu s predloženim izumom za profilakso virusnih infekcij hepatitisa B.

Z nadaljnjega vidika predloženega izuma zagotavlja uporabo AP, ki učinkuje kot stabilizator za HBsAg in/ali vzdržuje učinkovitost HBsAg v multivalentni vakcini v skladu s predloženim izumom.

Posebno predloženega izuma zagotavlja uporabo aluminijevega fosfata za pripravo stabilne kombinirane vakcine, ki obsega HBsAg in vsaj en drugačen antigen, pri čemer je stabilnost in/ali imunogenost HBsAg komponente večja kot v kombinirani vakcini, v kateri je HBsAg komponenta absorbirana na AH.

Bolj posebno zagotavlja predloženega izuma uporabo, pri kateri lahko vzdržujemo vakcino pri 37 °C en teden brez bistvene izgube imunogenosti HBsAg.

Zagotovljena je tudi uporaba, pri kateri je geometrični srednji titer, ugotovljen en mesec po tretji dozi vakcinacijskih odmerkov, danih v enomesečnih intervalih po ustreznem vakcinacijskem razporedu pri otrocih, večji kot 200, prednostno večji kot 300 mIU/ml.

Z nadaljnjega vidika predloženega izuma je zagotovljen postopek za izdelavo kombinirane vakcine, učinkovite pri preprečevanju infekcij hepatitisa B, pri čemer postopek obsega mešanje HBsAg, adsorbiranega na AP, kot je definirano tukaj z enim ali več drugimi antigeni, pri čemer je vsaj eden adsorbiran na AP ali AH.

S prednostnega vidika so antigeni, drugačni kot HBsAg, vsi adsorbirani na AH. Na ta način lahko izdelamo zelo učinkovito DTPa - hepatitis B vakcino.

Kombinirane vakcine lahko pripravimo takole. Različne DT, DTPw, DTPa ali HA komponente adsorbiramo na AH ali AP; HBsAg adsorbiramo na AP. Potem ko dopustimo popolno in stabilno adsorpcijo ustreznih komponent, različne komponente kombiniramo. DT, DTPw in DTPa komponente lahko kombiniramo ločeno pred dodajanjem adsorbiranih HBsAg komponent. Multivalentne vakcine, ki obsegajo druge ali dodatne antigene, lahko pripravimo na podoben način. Skladno je zagotovljen postopek za pripravo kombiniranega vakcinskega sestavka po predloženem izumu, pri čemer postopek obsega mešanje HBsAg, adsorbiranega na aluminijevem fosfatu, z enim ali več antigeni, adsorbiranimi na aluminijevem hidroksidu ali aluminijevem fosfatu.

Predloženi izum ponazarjajo sledeči primeri, v katerih pomenita oznaki: Lf-enoto za flokulacijo in OU-enoto za prepustnost.

PRIMERI 1-5

Formulacije

Posebne formulacije skladno s predloženim izumom pripravimo, kot je opisano spodaj.

PRIMER 1 HBsAg adsorpcija na AlPO_4 kot koncentrat za formulacijo kombiniranih vakcin.

Suspenzijo aluminijevega fosfata, ki vsebuje 0,03 do 0,3 g aluminija (kot aluminijev fosfat) v izotonični slanici, zmešamo s HBsAg ali koncentratom, ki vsebuje 10 mg HBsAg proteina v končnem volumnu od 10 do 100 ml. Po naravnanju pH na 5 do 6,5 zmes pustimo 10-24 ur pri sobni temperaturi med mešanjem. Nato po izbiri dodamo antiseptik (t.j. mertiolat, 1:20000 do 1:10000 ali 2-fenoksietanol, 3 do 6 mg/ml).

PRIMER 2 Formulacija kombinirane vakcine difterija-tetanus-hepatitis B

Koncentrat, ki vsebuje 25000 Lf toksoida difterije in 10000 Lf toksoida tetanusa adsorbiranega na 0,35 g Al (kot aluminijev hidroksid ali aluminijev fosfat), pripravimo v končnem volumnu 0,15 l izotonične slane in pH naravnamo med 6 in 7, kot je specificirano od WHO za DT in DTP vakcine. Ta koncentrat kombiniramo z 0,05 l koncentrata hepatitisa B primera 1.

Zmes dopolnimo do končnega volumna 0,5 l z izotonično slanico. Antiseptične medije (mertiolat 1:20000 do 1:10000 ali 2-fenoksietanol, 3 do 6 mg/ml) lahko dodamo po izbiri. Končni pH je med 6 in 7, kot je določeno od WHO za DT in DTP vakcine.

0,5 ml doza te masivne vakcine vsebuje kot učinkovite sestavine:

D toksoid:	25 Lf,
T toksoid:	10 Lf,
HBsAg:	10 μg proteina

Postopek lahko po izbiri dopolnimo za uporabo večjih ali manjših količin učinkovitih sestavin.

PRIMER 3 Formulacija kombinirane vakcine difterija-tetanus-pertusis (vakcina s popolnimi celicami) - hepatitis B

Koncentrat od Behringwerke, ki vsebuje 7500 Lf toksoida difterije, 3250 Lf toksoida tetanusa in 15000 prostorninskih enot antigena B. pertussis, adsorbiranega na 0,45 mg Al (kot aluminijev hidroksid ali aluminijev fosfat), pripravimo v končnem volumnu 0,4 l izotonične slanice in naravnamo pH na 6-7, kot je določeno od WHO za DTP vakcine. Ta koncentrat kombiniramo z 0,05 l koncentrata hepatitisa B primera 1.

To zmes dopolnimo do končnega volumna 0,5 l z izotonično slanico. Antiseptične medije (mertiolat 1:20000 do 0:10000 ali 2-fenoksietanol, 3 do 6 mg/ml) lahko dodamo po izbiri. Končni pH je med 6 in 7, kot je določeno od WHO za DT in DTP vakcino.

0,5 ml doza te masivne vakcine vsebuje kot učinkovite sestavine:

D toksoid:	7,5 Lf,
T toksoid:	3,25 Lf
Pw antigen:	15OU
HBsAg:	10 µg proteina.

Postopek lahko po izbiri dopolnimo za uporabo večjih ali manjših količin učinkovitih sestavin.

PRIMER 4 Formulacija vakcine difterija-tetanus-pertusis (necelična komponenta)

Koncentrat, ki vsebuje 25000 Lf toksoida difterije in 10000 Lf toksoida tetanusa, adsorbiranega na 0,35 g Al (kot aluminijev hidroksid ali fosfatni gel), pripravimo v končnem volumnu 0,15 l izotonične slanice in naravnamo pH med 6 in 7, kot je določeno od WHO za DTP vakcine. Dodamo 25 mg neaktiviranega pertusisnega toksina (DTPa), 25 mg filamentnega hemaglutinina (FHA) in v danem primeru 8 mg 69kDa proteina zunanje membrane (pertaktin), vsakega kombiniranega z 0,05 g Al (kot aluminijev hidroksid ali aluminijev fosfat). B.pertussis antigene PT, FHA in pertaktin lahko pripravimo, kot je opisano, s postopki, znanimi v tehniki, npr. evropska patentna prijava 427 462, PCT prijava WO 91/12020 ali z drugimi postopki, ki dajo

fiziološko sprejemljive in učinkovite antigene *B. pertussis*.

To zmes dopolnimo do končnega volumna 0,5 l z izotonično slanico. Antiseptične medije (mertiolat 1:20000 do 0:10000 ali 2-fenoksietanol, 3 do 6 mg/ml) lahko dodamo po izbiri. Končni pH je med 6 in 7, kot je določeno od WHO za DT in DTP vakcine.

0,5 ml doza te masivne vakcine vsebuje kot učinkovite sestavine:

D toksoid:	25 Lf,
T toksoid:	10 Lf,
PT toksoid:	25 μ g,
FHA (obdelan s formalinom):	25 μ g,
69kDa OMP (obdelan s formalinom):	8 μ g (po izbiri)

Postopek lahko po izbiri dopolnimo za uporabo večjih ali manjših količin učinkovitih sestavin.

PRIMER 5 Formulacija kombinirane vakcine difterija-tetanus-pertusis (necelična komponenta) - hepatitis B

Uporabimo postopek primera 4, razen da dodamo dodatnih 50 ml adsorbiranega koncentrata HBsAg, kot je pripravljen v primeru 1 h končni zmesi.

Nastalo zmes dopolnimo do končnega volumna 0,5 l z izotonično slanico. Antiseptične medije (mertiolat 1:20000 do 0:10000 ali 2-fenoksietanol, 3 do 6 mg/ml) lahko dodamo po izbiri. Končni pH je med 6 in 7, kot je določeno od WHO za DT in DTP vakcine.

0,5 ml doza te masivne vakcine vsebuje kot učinkovite sestavine:

D toksoid:	25 Lf,
T toksoid:	10 Lf,
PTd toksoid:	25 μ g,
FHA toksoid:	25 μ g,
69kDaOMP:	8 μ g (po izbiri)

Postopek lahko po izbiri dopolnimo za uporabo večjih ali manjših količin učinkovitih sestavin.

PRIMERI 6-10

Študije na človeku in živali

PRIMER 6 Formulacija kombiniranih vakcin hepatitis A-hepatitis B

Koncentrat neaktiviranega virusa hepatitisa A (460000 Elisa enot), adsorbiranega na 0,02 do 0,2 g, prednostno 0,04 do 0,1 g, aluminija (kot aluminijev hidroksid) v končnem volumnu približno 125 ml, kombiniramo s 50 ml koncentrata, ki vsebuje 10 mg HBsAg, adsorbiranega na aluminijevem fosfatu, kot je opisano v primeru 1.

Nastalo zmes dopolnimo z izotonično slanico in aminokislinskim koncentratom (Travasol, Baxter-Travenol Inc), da dobimo končni volumen 0,5 l, ki vsebuje 1,5 g aminokislin. Nastali pH je med 6 in 7.

1 ml doza te masivne vakcine vsebuje kot učinkovite sestavine:

antigen virusa hepatitisa A:	800 Elisa enot
HBsAg:	20 µg protein

Postopek lahko po izbiri dopolnimo za uporabo večjih ali manjših količin učinkovitih sestavin.

Rezultati

Klinične študije za primerjanje HBsAg, adsorbiranega na aluminijevem hidroksidu (AH), in HBsAg, adsorbiranega na aluminijevem fosfatu (AP) (monovalentna vakcina)

Na začetku seronegativne zdrave odrasle prostovoljce imuniziramo s 3 dozami po 20 µg HBsAg proteina, ki jih damo v enomesečnem intervalu. Nivoje protiteles določimo v serumih, ki jih dobimo 1 mesec po 2 in 3 dozah z uporabo Ausab (Abbott) testa. Odzive definiramo kot subjekte s titri znatno nad ozadjem. Titre izrazimo v mIU/ml.

Rezultati so izraženi kot geometrični srednji titri (GMT) v mIU/ml.

Serija			po 2, mesec 2		po 3, mesec 3	
HBsAg	adjuvant	št.subj.	GMT	% resp.	GMT	% r e s p .
100	AH	43	32	86	141	100
101	AH	45	26	93	198	98
102	AH	46	30	84	147	93
105/P	AP	7	43	83	380	100

Serija			po 2, mesec 2		po 3, mesec 3	
HBsAg	adjuvant	št.subj.	GMT	% resp.	GMT	% r e s p .
102	AH	51	14	82	126	98
103	AH	50	15	83	110	98
102	AH	54	17	83	133	96
104/P	AP	54	18	96	270	98
105/P	AP	51	14	90	156	96

PRIMER 7

Testi mišje imunogenosti in rezultati testov pospešene stabilnosti za kombinacije vakcin, ki obsegajo HBsAg z aluminijevim hidroksidom (AH) ali aluminijevim fosfatom (AP) kot adjuvantom

Skupine po 10 OF1 miši imuniziramo subkutano z 2 dozama po 2,5 μ g HBsAg (posamezna komponenta ali kombinirana) na dan 0 in 14. Kri odvzamemo 21 dan in titriramo za anti-HBsAg z uporabo Ausab (Abbott) testa. Protitelesne titre izračunamo v mIU/ml. Število respondentnih živali definiramo kot število tistih z nivoji protiteles znatno nad vrednostmi ozadja. Izračunamo tudi geometrične srednje titre (GMT).

Iz rezultatov za DT-HB, DTPw-HB, DTPa-HB je razvidno, da je HBsAg, adsorbiran na AP, boljši kot HBsAg, adsorbiran na AH, tako pri oznaki števila respondentnih živali kot tudi pri GMT. Odziv na HBsAg, adsorbiran na AP, v kombinaciji je primerljiv s tistim, ki ga dobimo z dajanjem monovalentnega HBsAg.

Vakcina	7 dni, 4°C		7 dni, 37 °C		7 dni, 45 °C	
	št.	GMT	št.	GMT	št.	GMT
	resp.		resp.		resp.	
Engerix						
B(HB+AH)	7/10	30	9/10	17	6/10	2,7
Engerix						
B(HB+AH)	9/10	54	8/10	13	5/10	6
HB (AH)	9/10	45	10/10	55	9/10	32
HB(AP)	9/10	54	10/10	50	7/10	6,9
DTPw						
(AH)HB(AH)	4/10	1,4	nd	nd	nd	nd
DTPw						
(AH)HB(AP)	9/10	52	8/10	16	8/10	26
DT(AH)HB(AH)	6/10	1,7	nd	nd	nd	nd
DT(AH)HB(AP)	8/10	44	9/10	21	10/10	36
DTPa(AH)HB(AH)	5/10	1,7	nd	nd	nd	nd
DTPa(AH)HB(AP)	10/10	18	8/10	8	9/10	24

nd: ni testirano

PRIMER 8

Imunogenost HBsAg, kombiniranega na DTPw pri opicah

Rezultati antigena, adsorbiranega na aluminijevem hidroksidu (AH), in antigena, adsorbiranega na aluminijevem fosfatu (AP)

Etiopske opice *Cercopithecus* prejmejo dve injekciji po 10 µg HBsAg (samega ali kombiniranega) na dan 0 in 30. Serume odvezamemo 30. in 57. dan in titriramo (Ausab, Abbott) za anti-HBsAg. Živali z nivoji protiteles znatno nad ozadjem (predvakcinski serum) smatramo za respondente. GMT izračunamo v mIU/ml.

Iz rezultatov je razvidno, da je HBsAg, adsorbiran na AP, boljši kot HBsAg, adsorbiran na AH. Odziv je primerljiv s tistim, ki ga dobimo z dajanjem monovalentnega HBsAg.

Vakcina	po 1, dan 30		po 2, dan 57	
	št.resp.	GMT	št.resp.	GMT
Engerix B(HB)(AH)	4/5	10	5/5	666
DTPw(AH)HB(AH)	4/5	20	5/5	31
DTPw(AH)HB(AP)	5/5	12	5/5	414

PRIMER 9

Klinične študije s kombiniranimi DTPw vakcinami z uporabo HBsAg, adsorbiranega na aluminijevem hidroksidu (AH) ali aluminijevem fosfatu (AP)

Subjekte imuniziramo s 3 dozami po 0,5 ml, ki vsebujejo DTPw in 10 μ g HBsAg proteina, ki jih damo pri starosti 3, 4 in 5 mesecev. Odvzemanje krvi je v 6 mesecu in serume titriramo z Ausab testom. Odstotek respondentov (serokonverzija) se nanaša na subjekte z nivoji protiteles znatno nad ozadjem. Odstotek zaščite se nanaša na subjekte s titri, enakimi ali večjimi kot je 10 mIU/ml. GMT v mIU/ml.

Iz rezultatov za DTPw-HB je razvidno, da HBsAg, adsorbiran na AP, proizvede zadovoljiv odziv nasprotno HBsAg, adsorbiranemu na AH. Vrednosti serokonverzije in GMT so primerljive s podatki, ki so značilni za vakcino z monovalentnim HBsAg (Engerix B).

Vakcina	št.	čas jemanja	%	%	GMT
	subj.	krvi	resp.	zašč.	
DTPw(AH).HB(AH)	32	po 2	nd	nd	nd
		po 3	94	84	38.5
DTPw(AH)HB(AP)	29	po 2	97	97	63
	17	po 3	100	100	469

PRIMER 10

Imunogenost in stabilnost HBsAg, adsorbiranega na aluminijevem hidroksidu (AH) ali aluminijevem fosfatu (AP), v kombinirani vakcini hepatitis A - hepatitis B

Skupino 10 OF1 miši imuniziramo subkutano z dvema dozama po 2,5 μ g HBsAg (posamezna komponenta ali kombinirana) na dan 0 in 14. Kri odvzamemo 21. dan in titriramo za anti-HBsAg kot v primeru 7.

Iz rezultatov za imunogenost in stabilnost kombiniranega produkta HA-HB je razvidno, da HBsAg, adsorbiran na AP, proizvede višje nivoje protiteles in bolj stabilno obliko.

Vakcina	izpostavljenost	št. resp.	GMT
HA(AH).HB(AH)	1 mesec, 4 °C	9/10	41
	1 mesec, 37 °C	6/10	5,6
	1 mesec, 45 °C	5/10	6,4
HA(AH).HB(AP)	1 mesec, 4 °C	10/10	80
	1 mesec, 37 °C	9/10	45
	1 mesec, 45 °C	8/10	18
Engerix B HB(AH)	1 mesec, 4 °C	8/10	58

PRIMER 11: Nadaljnji klinični rezultati pri ljudeh

1. Imunogenost vakcin DTPw-hepatitis B pri otrocih

POSKUS A

Študije na Slovaškem: Razpored: 3-4-5 mesecev. 10 μ g HBsAg: DTPw od Be-hringwerke (DT na AH; Pw na zmesi AH in AP)

Anti-Hbs titri

HBsAg adjuvant	čas	N	GMT	SP(%)
hidroksid	po II (5 mesecev)	44	45	79,5
hidroksid	po III (6 mesecev)	13	34	69,2
fosfat	po II (5 mesecev)	32	80	97,0
fosfat	po III (6 mesecev)	32	396	100

V temu in drugih primerih po II pomeni po drugi dozi, po III pomeni po tretji dozi. GMT vedno izmerimo en mesec po injekcijskem času, prikazanem v razporedu. SP je vrednost sero zaščite.

Anti-difterija, tetanus,B pertusis titri

rezultati po III	N	GMT	% >0,1 IU/ml	GMT po/pred
anti-difterija	38	2,302	100	37,4
anti-tetanus	38	3,281	100	38,4
anti-B pertusis	38	61	-	7,7

Poskus B

Študija v Grčiji: razpored 2-4-6 mesecev (enaka vakcina kot za poskus A)

Anti-HBs titri (vmesni rezultati)

HBsAg adjuvant	čas	N	GMT	SP(%)
hidroksid	mesec 7	22	284	90,5
hidroksid	mesec 7	17	193	94,4
fosfat	mesec 7	23	1794	92,0

Poskus C

Študija na Slovaškem: razpored 3-4-5 (HBsAg = 5 μ g na aluminijevem fosfatu; DTP od Behringwerke kot za poskus A)

Anti-HBs titri

čas	N	GMT	SP(%)
po II	21	94	90,5
po III	18	311	100

Poskus D

Študija na Slovaškem: razpored 3-4-5 mesecev starosti (HBsAg = 10 μ g na aluminijevem fosfatu; DTPw od Behringwerke kot za poskus A)

Anti-HBs titri

čas	N	GMT	SP(%)
pred	24	0	0
po II (mesec 5)	13	259	92,3
po III (mesec 6)	10	592	100,0

Anti-difterija protitelesa

Časovni razpored	N	GMT	SP	GMT po/pred
pred	32	0,054	6,3	1,0
po II	16	1,094	93,8	20,4
po III	11	2,314	100,0	43,1

Anti-tetanus protitelesa

Časovni razpored	N	GMT	SP	GMT po/pred
pred	32	0,083	34,4	1,0
po II	16	3,146	100,0	37,9
po III	11	7,989	100,0	96,4

Anti-B pertusis protitelesa

Časovni razpored	N	GMT	GMT po/pred
pred	32	8	1,0
po II	16	20	2,7
po III	11	50	6,6

2. Imunogenost vakcin DTPa - hepatitis B pri otrocih

Poskus A

Študija v Turčiji: HBsAg 10 μ g na AP; DTP (necelični) na AH. Preliminarni rezultati

Skupina I (DTPa - Engerix B kombinacija)

Časovni razpored	N	S+	%	GMT
pred	19	0	0	0
po I	19	4	21,1	24
po II	19	18	94,7	146
po III	19	19	100,0	345

Skupina 2 (DTPa plus Engerix B; ločene simultane injekcije)

Časovni razpored	N	S+	%	GMT
pred	8	0	0	0
po I	8	2	25,0	37
po II	8	5	62,5	33
po III	7	6	83,7	385

Ključ: N je št. testiranih subjektov; S+ je št. subjektov sero pozitivnih pri določenem času odvzemanja vzorcev krvi; % je vrednost serokonverzije in GMT je geometrični srednji protitelesni titer serokonverterjev.

Za

SmithKline Beecham Biologicals (s.a.):

PATEKINA PIGAZNA

PATENTNI ZAHTEVKI

1. Kombinirani vakcinski sestavek, označen s tem, da obsega površinski antigen hepatitisa B (HBsAg) in številne(n) druge antigene v kombinaciji z adjuvantom, ki obsega eno ali več aluminijevih soli, pri čemer je vrednost za n 1 ali več in pri čemer adjuvant, ki ga uporabimo za adsorpcijo HBsAg, ni aluminijev hidroksid, s pridržkom, da če je n 1, drugi antigen ni antigen proti hepatitisu A.
2. Vakcinski sestavek po zahtevku 1, označen s tem, da je HBsAg adsorbiran na aluminijevem fosfatu.
3. Vakcinski sestavek po zahtevku 2, označen s tem, da je vsaj eden od drugih antigenov adsorbiran na aluminijevem fosfatu.
4. Vakcinski sestavek po zahtevku 2, označen s tem, da je vsaj eden od drugih antigenov adsorbiran na aluminijevem hidroksidu.
5. Vakcinski sestavek po kateremkoli od prejšnjih zahtevkov, označen s tem, da je n 2, 3, 4, 5 ali 6.
6. Kombiniran vakcinski sestavek po zahtevku 5, označen s tem, da antigen, adsorbiran na aluminijevem hidroksidu ali aluminijevem fosfatu, izberemo izmed naslednjih: difterija (D), tetanus (T), pertusis (P), neaktiviran polio (IPV); hemofilna influenza b (Hib) in hepatitis A (HA).
7. Stabilen in učinkovit kombiniran vakcinski sestavek, naravnan za preprečevanje več kot dveh bolezni, označen s tem, da obsega HBsAg in vsaj dva druga antigena.
8. Vakcinski sestavek po zahtevku 7, označen s tem, da je HBsAg adsorbiran na aluminijevem fosfatu.
9. Vakcinski sestavek po zahtevku 8, označen s tem, da je vsaj eden od antigenov, drugačen kot HBsAg, adsorbiran na aluminijevem hidroksidu.
10. Kombiniran vakcinski sestavek po kateremkoli od zahtevkov 7 do 9, označen s tem, da je:
difterija-tetanus-pertusis (DTP)-hepatitis B; ali

difterija-tetanus (DT)-hepatitis B; ali
DTP-IPV (neaktivirana polio vakcina) - hepatitis B.

11. Kombiniran vakcinski sestavek po kateremkoli od prejšnjih zahtevkov, označen s tem, da je stabilnost vakcine takšna, da jo lahko vzdržujemo pri 37 °C en teden brez bistvene izgube imunogenosti HBsAg komponente.

12. Kombiniran vakcinski sestavek po kateremkoli od prejšnjih zahtevkov, označen s tem, da je imunogenost HBsAg v kombinirani vakcini takšna, da geometrični srednji titer 200 mIU/ml (1 mesec po 3 dozi) ali večji ugotovimo pri otrocih, če odmerke vakcine dajemo v enomesečnih intervalih po ustreznem vakcinacijskem razporedu.

13. Kombiniran vakcinski sestavek po kateremkoli od prejšnjih zahtevkov, označen s tem, da obsega antigensko komponento, ki je zaščitna proti hepatitisu A.

14. Kombiniran vakcinski sestavek po kateremkoli od prejšnjih zahtevkov, označen s tem, da obsega pertusisno komponento.

15. Kombinirana vakcina po zahtevku 14, označena s tem, da je pertusisna komponenta pertusisna vakcina s popolnimi celicami ali necelična pertusisna vakcina, ki vsebuje delno ali visoko očiščene antigene.

16. Multivalenten vakcinski sestavek, označen s tem, da obsega HBsAg in stabilizirni adjuvant, pri čemer je adjuvant izbran tako, da lahko vakcino vzdržujemo pri 37 °C en teden brez kakršnekoli bistvene izgube imunogenosti HBsAg komponente.

17. Multivalentni vakcinski sestavek po zahtevku 16, označen s tem, da povzroči geometrični srednji titer vsaj 200 mIU/ml (1 mesec po tretji dozi), če odmerke vakcine damo otrokom v enomesečnih intervalih po ustreznem vakcinacijskem razporedu.

18. Multivalentna vakcina po zahtevku 16 ali 17, označena s tem, da adjuvant izberemo izmed ene ali več aluminijevih soli s pridržkom, da HBsAg komponenta ni adsorbirana na aluminijevem hidroksidu.

19. Multivalentna vakcina po zahtevku 18, označena s tem, da je HBsAg adsorbiran na aluminijevem fosfatu.

20. Multivalentna vakcina po zahtevku 18 ali 19, označena s tem, da so antigeni, prisotni v vakcinskem sestavku, drugačni kot HBsAg, adsorbirani na aluminijevem hidroksidu.
21. Vakcinski sestavek po zahtevku 20, označen s tem, da je difterija-tetanus-pertusis (necelični) - HBsAg.
22. Multivalentni vakcinski sestavek po zahtevku 18 ali 19, označen s tem, da so antigeni prisotni v vakcinskem sestavku, drugačni kot HBsAg, adsorbirani na aluminijevem fosfatu.
23. Vakcinski sestavek po zahtevku 22, označen s tem, da je difterija-tetanus-pertusis (s popolnimi celicami) - HBsAg.
24. Sestavek po kateremkoli od zahtevkov 1 do 23, označen s tem, da je uporaben v medicini.
25. Uporaba HBsAg pri izdelavi kombinirane vakcine po kateremkoli od zahtevkov 1 do 23 za profilakso virusnih infekcij hepatitisa B.
26. Postopek za pripravo kombiniranega vakcinskega sestavka po kateremkoli od zahtevkov 1 do 23, označen s tem, da obsega mešanje HBsAg, adsorbiranega na aluminijevem fosfatu, z enim ali več antigeni, adsorbiranimi na aluminijevem hidroksidu ali aluminijevem fosfatu.
27. Uporaba aluminijevega fosfata kot adjuvanta za adsorbiranje HBsAg, označena s tem, da je namenjena za formuliranje stabilne in učinkovite kombinirane vakcine, ki obsega HBsAg in vsaj en drug antigen, pri čemer je stabilnost in/ali imunogenost HBsAg komponente večja kot v kombinirani vakcini, v kateri je HBsAg komponenta adsorbirana na aluminijevem hidroksidu.
28. Uporaba po zahtevku 27, označena s tem, da je stabilnost vakcine taka, da lahko vakcino vzdržujemo pri 37 °C en teden brez bistvene izgube imunogenosti HBsAg.
29. Uporaba po zahtevku 27, označena s tem, da je imunogenost HBsAg v kombinirani vakcini taka, da ugotovimo geometrični srednji titer 200 mIU/ml (en mesec

po dozi) ali večji pri otrocih po odmerkih treh doz vakcine, ki jih damo v enomesečnih intervalih po ustreznem imunizacijskem razporedu.

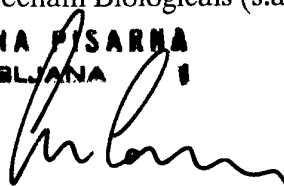
30. Uporaba po kateremkoli od zahtevkov 27 do 29, označena s tem, da sta vsaj dva druga antigena v kombinirani vakcini.

31. Kombinirana vakcina po kateremkoli od zahtevkov od 1 do 24 za uporabo pri profilaksi infekcij s hepatitisom B pri ljudeh.

Za

SmithKline Beecham Biologicals (s.a.):

PATENTNA PISARNA
LJUBLJANA



POVZETEK

Kombinirane vakcinske formulacije, ki vključujejo vakcinsko komponento hepatitisa B za zdravljenje infekcij s hepatitisom B

Opisani so stabilni in učinkoviti multivalentni vakcinski sestavki, ki obsegajo površinski antigen hepatitisa B (HBsAg), pri čemer je HBsAg komponenta stabilna en teden pri 37 °C in visoko imunogenska, če npr. vakcino damo otrokom. Sestavki značilno obsegajo HBsAg, adsorbiran na aluminijevem fosfatu, in druge antigene posebno tiste, primerne za uporabo v pediatrični vakcini, adsorbirane na aluminijevem fosfatu ali aluminijevem hidroksidu. Opisani so tudi postopki za pripravo vakcin in uporaba aluminijevega fosfata za stabiliziranje HBsAg v multivalentnem vakcinskem sestavku.