



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) **319844**

A 61 K 39/015, 39/29, 39/39, 39/002

(13) **B1**

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19990464	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1997.07.31 PCT/EP97/04326
(22)	Inng.dag	1999.02.01	(85)	Videreføringsdag	1999.02.01
(24)	Løpedag	1997.07.31	(30)	Prioritet	1996.08.02, GB, 9616351
(41)	Alm.tilgj	1999.02.01			
(45)	Meddelt	2005.09.19			
(73)	Innehaver	GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, 1330 RIXENSART, BE			
(72)	Oppfinner	Joseph Cohen, Rue 9 Jean Baptise-Meunier, 1050 BRUSSEL, BE			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vik, 0125 OSLO, NO			

(54)	Betegnelse	Vaksinesammensetning og anvendelse derav
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-9517209
(57)	Sammendrag	

Det er beskrevet en vaksinesammensetning egnet til forebyggingen og behandlingen av malaria omfattende en rekke av malariaderiverte antigener i kombinasjon med en adjuvans, som er en preferansestimulator for TH1 cellerespons.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en ny vaksinesammensetning og dens anvendelse ved fremstilling av et medikament til bruk ved behandling av eller profylakse mot malaria.

5 Malaria er et av verdens store helseproblemer med 2 til 4 millioner mennesker som dør av sykdommen hvert år. En av de mest akutte former av sykdommen er forårsaket av protozoan parasitten, Plasmodium falciparum, som er ansvarlig for flest av de dødelige tilfeller av malaria.

10 Livssyklusen for P. falciparum er kompleks, krevende to verter, menneske og moskito for fullstendiggjøring. Infeksjonen av mennesket utløses ved innpoding av sporogoni i salivaen til en infisert moskito. Sporogoniene vandrer til leveren og der infiserer de hepatocytter hvor de differensierer, via den eksoerytrocytiske intracellulære fase, til merozoittfasen, som infiserer røde blodlegemer (RBC) for å sette igang cyklisk formering i den kjønnsløse blodfase. Syklusen sluttes ved at differensieringen til et
15 antall merozoitter i RBC'en til kjønnsfasen gametocytter, som innføres i moskitoen, hvor de utvikles gjennom en rekke faser i den midterste del av tarmen for å danne sporogonier, som vandrer til salivakjertelen.

P. falciparum's sporogonifase er blitt identifisert som et potensielt mål for en
20 malariavaksine. Det store overflateproteinet av sporogonien er kjent som circumsporogoniprotein (CS protein). Dette proteinet av typen 7G8 er blitt klonet, uttrykt og sekvenssert (Dame et al Science 225 (1984) s. 593). Proteinet av typen 7G8 er karakterisert ved å ha et sentralt immunodominant repiteringsområde omfattende et tetrapeptid Asn-Ala-Asn-Pro repitert 37 ganger, men avbrudt av fire mindre repiteringer
25 av Asn-Val-Asp-Pro. I andre typer varierer antallet av større og mindre repitisjoner så vel som deres relative posisjon. Denne sentrale delen er flankert av en N og C terminal posisjon bestående av ikke-repiterte aminosyresekvenser betegnet, som den ikke-repiterte delen av CS proteinet.

30 Det er blitt vist, at bestrålte sporogonier kan medføre signifikant beskyttelse mot eksperimentell menneskelig malaria (Am. J. Trop. Med. Hyg. 24: 297-402, 1975). Imidlertid gjør produksjonsvanskeligheter anvendelsen av bestrålte sporogonier upraktisk med henblikk på å produsere en vaksine.

35 Flere grupper har foreslått subunitvaksiner basert på circumsporogoniprotein. Flere av disse vaksinene er blitt klinisk testet, et er et syntetisk peptid, det andre er et

rekombinert protein (Ballou et al Lancet: i 1277 (1987) og Herrington et al Nature 328:257 (1987).

Disse vaksiner hadde suksess med å stimulere en anti-sporogonirespons. Likevel, var størrelsen av responsen skuffende, der noen av vaksinene ikke ga respons i det hele tatt. Ytterligere, viser mangelen på "forsterkning" av antistoffnivåer etter injeksjoner og resultater av in vitro lymfocytproliferasjonsanalyser, at T-celler i de fleste av disse frivillige ikke gjenkjente immuno-dominant repetisjonen. Likevel, en vaksiner i hver studie utviklet ikke parasitemi.

Internasjonal patentsøknad WO 93/10152 (SmitKline Beecham Biologicals) beskriver og gjør krav på et hybrid protein omfattende nesten hele C-terminaldelen av CS proteinet, fire eller flere tandemrepetisjoner av immunodominantområdet og overflate-antigen fra Hepatitis B virus (HBsAg). Fortrinnsvis omfatter hybridproteinet en sekvens, som inneholder minst 160 aminosyrer, som er i det vesentlige homolog med C-terminaldelen av CS proteinet. CS proteinet kan være uten de siste 12 aminosyrer fra C-terminalen.

Spesielt beskrives der et protein, som omfatter en porsjon av CS proteinet av *P. falciparum* hovedsakelig som korresponderer med aminosyrer 210-398 av *P. falciparum* 7G8 smeltet på plass via en lineær lenke til N-terminalen av HBsAg. Lenken kan omfatte en del av preS2 fra HBsAg.

En spesiell utførelse som beskrevet i WO 93/10152 er hybridprotein angitt som RTS.

Dette hybridet består av:

- En metioninrest, kodet med nukleotider 1059 til 1061, utvunnet fra Sacchromyces cerevisiae TDH3 genesevens (nukleotider 1-1058 i denne leseramme utgjør TDH3 promoteren selv). (Musti A.M. et al Gene 1983 25 133-143).

- Tre aminosyrer, Met Ala Pro, utvunnet fra en nukleotidsekvens (1062 til 1070) dannet ved kloningsprosedyren brukt til å konstruere hybridgenet.

- En rekke av 189 aminosyrer, kodet ved nukleotider 1071 til 1637 repiterende aminosyrer 210 til 398 av circumsporogoniprotein (CSP) av Plasmodium falciparum type 7G8 (Dame et al supra).

- En aminosyre (Arg) kodet ved nukleotider 1638 til 1640, dannet ved kloningsprosedyren brukt til å skape hybridgenet.
- Fire aminosyrer, Pro Val Thr Asn, kodet ved nukleotider 1641 til 1652, og som representerer fire karboksyterminalrester av hepatitis B virusen (adw serotype) preS2 protein (9).
- En rekke bestående av 226 aminosyrer, kodet av nukleotider 1653 til 2330, og som spesifiserer S-proteinet av hepatitis B virus (adw serotype).

10

WO 93/10152 beskriver ytterligere uttrykket for hybridproteinet i en resipient gjærstamme, som allerede bærer i dets genom flere integrerte kopier av en hepatitis B S ekspresjonskassett. Den oppnådde stamme syntetiserer to polypeptider, S og RTS (eller andre hybridproteiner ifølge oppfinnelsen), som spontant samler seg til blandinger (f.eks. RTS, S) lipoproteinpartikler. Disse partiklene, viser fordelaktig CSP sekvensene av hybridet på deres overflate.

20

En oppgave for foreliggende oppfinnelse er å bibringe immunitet mot *P. falciparum* og/eller *P. vivax* befenghet ved immunisering med en sammensetning inneholdende en rekke forskjellige antigener i kombinasjon med en adjuvans, som er en preferansestimulator av TH1 cellerespons.

25

Den foreliggende oppfinnelse er følgelig en vaksinesammensetning kjennetegnet ved at den inneholder minst to malariaavledede antigener i kombinasjon med en adjuvans, som er en preferansestimulator for en TH1 cellerespons, og hvor minst to malariaantigener er valgt fra gruppen:

30

- a) et hybridprotein omfattende hovedsakelig hele C-terminaldelen av circumsporogoni-proteinet, fire eller flere tandemrepetisjoner av immundominantregionen, og overflateantigen fra hepatitis B virus (HBsAg);
- b) TRAP av et klonet isolat av *P. falciparum* fra Thailand kjent som T/9/96, og proteiner, som er minst 80% homolog dermed;
- c) MSP-1'en av *P. falciparum* eller *P. vivax* og proteiner som er minst 80% homolog hermed, og immunoderivater innbefattende immunofragmenter derav.

35

Fortrinnsvis er minst en av antigenene et hybridprotein som beskrevet ovenfor, slik som
 5 RTS, mere foretrukket er typen av blandede partikler som definert ovenfor slik som RTS,S.

Oppfinnelsen omfatter også en vaksinesammensetning ifølge oppfinnelsen til bruk ved
 terapi.

10 Mengden av antigener tilstede i hver vaksinedose er valgt som en mengde, som inducerer en immunbeskyttelsesrespons uten signifikante uheldige sideeffekter i typiske vaksiner. Slik mengde vil variere avhengig av hvilke spesifikke antigener som anvendes. Det ventes generelt, at hver dose vil omfatte et totalinnhold på 1-1000 µg protein,
 15 fortrinnsvis 1-200 µg mest foretrukket 10-100 µg. En optimal mengde for en spesifikk vaksine kan fastslås ved standardstudier involverende observasjon av immunresponser hos objekter. Etterfølgende en innledende vaksinasjon, vil objekter fortrinnsvis motta en forsterkningsdose etter omkring 4 uker, etterfulgt av gjentakende forsterkningsdoser hver sjette måned så lenge som risikoen for infeksjon eksisterer.

20 Et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse, ligger i anvendelse av en vaksinesammensetning ifølge oppfinnelsen til fremstilling av et medikament til bruk ved behandlingen av eller som profylakse mot malaria.

25 Adjuvaner, som kan preferansestimulere TH1 celleresponsen er beskrevet i internasjonal patentsøknader WO 94/00153 og WO 95/17209.

En spesielt foretrukken adjuvans omfatter QS21, en Hplc rensset ikke-toksisk fraksjon
 30 uttatt fra barken av Quillaja Saponaria Molina, og 3 De-O-acylert monofosforyllipid A (3 D-MPL), eventuelt sammen med en olje-i-vann emulsjon.

3 De-O-acylert monofosforyllipid A er kjent fra GB-patent 2220211 (Ribi). Kjemisk er det en blanding av 3 De-O-acylert monofosforyllipid A med 4, 5 eller 6 acylerte kjeder og det fremstilles hos Ribi Immunochem Montana. En foretrukket form av 3 De-O-
 35 acylert monofosforyllipid A er beskrevet i den internasjonale patentsøknad nr. 92/116556.

QS21 er en Hplc rensset ikke-toksisk fraksjon av en saponin fra barken av det sør-amerikanske tre *Quillaja Saponaria* Molina og metoden til dens fremstilling er beskrevet (som QA21) i US-patent nr. 5.057.540.

- 5 En foretrukket olje-i-vann emulsjon omfatter en for metabolisme akseptabel olje, slik som squalen, alfatokoferol og tween 80. Ytterligere kan olje-i-vann emulsjonen inneholde span 85 og/eller lecitin.

Forholdet mellom QS21 : 3D-MPL vil typisk være i størrelsesorden fra 1 : 10 til 10 : 1; fortrinnsvis 1 : 5 til 5 : 1 og ofte hovedsakelig 1 : 1. Det foretrukne området for optimal synergi er 2,5 : 1 til 1 : 1 3D MPL:QS21. Typisk for menneskelig administrering vil QS21 og 3D MPL være tilstede i en vaksine i området fra 1 µg - 200 µg, slik som 1-100 µg, fortrinnsvis 10 µg - 50 µg pr. dose. Typisk inneholder olje-i-vann emulsjonen fra 2 til 10% squalen, fra 2 til 10% alfatokoferol og fra 0,3 til 3% tween 80. Fortrinnsvis er
15 forholdet mellom squalen: alfatokoferol like og mindre enn 1, da dette gir en mer stabil emulsjon. Span 85 kan også være tilstede på et nivå på 1%. I noen tilfeller kan det være fordelaktig at vaksinene ifølge foreliggende oppfinnelse ytterligere inneholder en stabilisator.

20 Vaksinefremstillingen er generelt beskrevet i *New Trends and Developments in Vaccines*, redigert av Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, USA, 1978. Innkapsling i liposomer er beskrevet, f.eks., av Fullerton, US-patent nr. 4.235.877. Konjugasjon av proteiner til makromolekyler er beskrevet f.eks. av Likhite, US-patent 4.372.945 og av Armor et al., US-patent 4.474.757.

25 Malaria-avledet antigener egnet ifølge foreliggende oppfinnelse kan velges ut fra følgende:

1. Et hybridprotein som definert ovenfor, slik som RTS, mer foretrukket i form av
30 blandede partikler som beskrevet ovenfor, slik som RTS,S.

2. TRAP'en fra et klonet isolat av *P. falciparum* fra Thailand kjent som T/9/96, og proteiner med minst 80% homologe hermed, og antigenderivater innbefattende fragmenter derav (beskrevet i internasjonal patentsøknad WO 90/01496 og WO
35 91/11516 (3i Exploitation Limited) og WO 92/11868 (US Navy)).

3. 16kD proteinet beskrevet i en internasjonal patentsøknad WO 91/18922, og proteiner som er minst 80% homologe hermed, og antigenderivater innbefattende fragmenter derav.

5 4. Det apical membranantigen-1 (AMA-1) av *P. falciparum* eller *P. vivax*, og proteiner, som er minst 80% homologe hermed og antigenderivater innbefattende fragmenter derav.

5. Circumsporogoniprotein (csp) av *P. falciparum* eller *P. vivax*, og proteiner som
10 er minst 80% homologe hermed og antigenderivater innbefattende fragmenter derav.

6. MSP-1'en av *P. falciparum* eller *P. vivax* (US-patent 4.837.016) og proteiner som er minst 80% homolog dermed, og antigenderivater innbefattende fragmenter derav.

15

7. Andre exoerytrocyttfaseproteiner og antigenderivater innbefattende fragmenter derav.

8. Eventuell blodfaseproteiner og antigenderivater innbefattende fragmenter derav.

20

Betegnelsen "antigenderivater" omfatter ethvert molekyl slik som avkortede eller andre derivater av proteinet, som bibeholder dets evne til å medføre immunrespons til proteinet etter invortes administrering til et menneske. Slike andre derivater kan fremstilles ved tilsetning, utelatelse, substitusjon eller omleiring av aminosyrer eller ved
25 kjemisk modifikasjon derav.

Antigenfragmenter av proteinet, som kan være egnet til fremstilling av submitvaksiner, kan fremstilles ved uttrykning av de passende genfragmenter eller ved peptidsynteser, f.eks. ved bruk av Merrifield syntesene (The Peptides, vol. 2., Academic Press, NY, side
30 3).

Antigenderivatet kan være en hybrid, et fusjonspolypeptid inneholdende ytterligere sekvenser, som kan bære en eller flere epitoper for andre plasmodium antigener, eller andre ikke-plasmodium. Alternativt, kan antigenderivatet ifølge foreliggende
35 oppfinnelse smeltes på et bærepolypeptid slik som hepatitis B's overflate eller kjerneantigen eller til andre bærere, som har immunstimulerende egenskaper, som i tilfellet med en adjuvans, eller som på annen måte forbedrer immunresponsen på

proteinet eller derivatet herav, eller som er egnet til fremstilling, rensing eller formulering av proteinet eller derivatet derav.

- Proteinene eller antigenderivatene herav, som er egnede ifølge foreliggende oppfinnelse
- 5 kan være kjemisk konjugert med et makromolekyl ved anvendelse av et konvensjonelt bindemiddel slik som glutaraldehyd (Geerlings et al, (1988) J. Immunol. Methods, 106, 239-244).

Følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen.

Eksempel**Konstruksjon og fremstilling av et rekombinert TRAP.**

5 Dette ble fremstilt som beskrevet i WO 90/01496.

Konstruksjon og fremstilling av RTS,S.

Dette ble fremstilt som beskrevet i WO 93/10152.

10

Adjuvansasjon

To adjuvansformuleringer ble fremstilt hver inneholdende den følgende olje-i-vann emulsjonsforbindelse.

15

SB26: 5% squalen 5% tokoferol 0,4% tween 80; partikkelstørrelsen var 500 nm

SB62: 5% squalen 5% tokoferol 2,0% tween 80; partikkelstørrelsen var 180 nm

Fremstilling av emulsjon SB62 (2 ganger konsentrert)

20

Tween 80 oppløses i fosfatbuffret saltoppløsning (PBS) for å gi en 2% løsning av PBS. For å fremstille 100 ml dobbeltkonsentrert emulsjon roteres 5 g av DL alfatokoferol og 5 ml squalen for å blande grundig. 90 ml PBS/Tween løsning tilsettes og blandes grundig. Den oppnådde emulsjon passerer deretter en sprøyte og tilsist mikrofluidiseres den ved bruk av et M110S mikrofluidiseringsapparat. De oppnådde oljedråper har en størrelse på omkring 180 nm.

25

Fremstilling av emulsjon SB26

30 Denne emulsjonen ble fremstilt på analog måte ved å anvende 0,4% tween 80.

Andre emulsjoner vist i tabellen er fremstilt på analog måte.

Til hver 100 ml av emulsjon ble det tilsatt de to antigener (10 mg av hvert antigen, ekvivalent med 50 µg pr. dose) og blandet. Disse ble kombinert med 100 µg/ml 3D-MPL og 100 µg/ml QS21 for å gi den endelige formuleringen. Buffer ble satt ifølge saltinnholdet og pH.

35

TABELL**Bindemidler to ganger konsentrert**

5

Emulsjoner SB	Tokoferol %	Squalen %	Tween 80%	Span 85%	Lecitin %	Størrelse
26	5	5	0,4	0	0	500 nm 90-100% 800 nm 10-0%
26,1	5	5	0,4	0	0,1	500 nm
63	5	5	0,6	0	0	500 nm
64	5	5	0,8	0	0	500 nm
61	5	5	1	0	0	250-300 nm
62	5	5	2	0	0	180 nm
40	5	5	0,4	1	0	500 nm 80-100% 800 nm 20-0%
40,1	5	5	0,4	1	0,1	500 nm
60	5	5	1	1	0	300 nm
65	5	5	0,4	1,5	0	500 nm
66	5	5	0,4	2	0	500 nm

Referanseeksempel**Forskjellige formuleringer av RTS,S**

RTS,S er beskrevet i internasjonal patentsøknad WO 93/10152 og ble formulert for
 5 vaksinasjon av balb/c mus. Der var fem dyr i hver gruppe. 7 grupper av dyr mottok de
 følgende formuleringer.

Gruppe 1	RTS,S SB62
Gruppe 2	RTS,S QS21 3D-MPL
10 Gruppe 3	RTS,S QS21 3D-MPL SB62
Gruppe 4	RTS,S 3D-MPL A1(OH) ₃
Gruppe 5	RTS,S A1(OH) ₃
Gruppe 6	Ren
Gruppe 7	Negativ kontroll

15

(RTS,S - 5 µg/dose, 3 D-MPL 5 µg/dose QS21 5 µg/dose)

Dyrene ble podet og tatt blodprøve av 15 dager etter første vaksinasjon og dag 7 og 15
 etter annen vaksinasjon og analyser for anti HBSAg antistoff under type ble foretatt.
 20 Emulsjonen SB62, når formulert med QS21 og 3D-MPL økte med preferanse og i en
 synergistisk fassong IgG2a antistoffresponsen i forhold til SB 62 alene.

Øket IgG2a antistoffrespons i mus er et mål for evnen av adjuvanssystemet å stimulere
 en TH1 typerespons.

P a t e n t k r a v

1.

Vaksinesammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
5 inneholder minst to malariaavlede antigener i kombinasjon med en adjuvans, som er
en preferansestimulator for en TH1 cellerespons, og hvor minst to malariaantigener er
valgt fra gruppen:

- 10 a) et hybridprotein omfattende hovedsakelig hele C-terminaldelen av
circumsporogoni-proteinet, fire eller flere tandemrepetisjoner av
immundominantregionen, og overflateantigen fra hepatitis B virus (HBsAg);
- b) TRAP av et klonet isolat av *P. falciparum* fra Thailand kjent som T/9/96, og
15 proteiner, som er minst 80% homolog dermed;
- c) MSP-1'en av *P. falciparum* eller *P. vivax* og proteiner som er minst 80%
homolog dermed, og immunoderivater innbefattende immunofragmenter derav.

2.

20 Vaksinesammensetning ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at adjuvansen omfatter MPL.

3.

25 Vaksinesammensetning ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t
v e d at adjuvansen omfatter QS21.

4.

Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at adjuvansen omfatter en olje-i-vann emulsjon.

5.

30 Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, til bruk ved
terapi.

6.

Anvendelse av en vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 til fremstilling av et medikament til bruk ved behandlingen av eller som profylakse mot malaria.