



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **309675**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ A 61 K 39/29

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19944475	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1993.05.15, PCT/EP93/01276
(22) Inng. dag	1994.11.22	(85) Videreføringsdag	1994.11.22
(24) Løpcedag	1993.05.15	(30) Prioritet	1992.05.23, GB, 9211081
(41) Alm. tilgj.	1995.01.18		1992.06.23, GB, 9213308
(45) Meddelt dato	2001.03.12		

(71) Patenthaver	SmithKline Beecham Biologicals SA, 89, rue de l'Institut, B-1330 Rixensart, BE
(72) Oppfinner	Jean Petre, Rixensart, BE Pierre Hauser, Rixensart, BE
(74) Fullmektig	Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) **Benevnelse** **Kombinert vaksine omfattende hepatitt B-overflateantigen (HBsAg) og andre antigener, fremgangsmåte for fremstilling av et kombinasjonsvaksinepreparat, samt anvendelse av HBsAg og av aluminiumfosfat som adjuvans**

(56) **Anførte publikasjoner** Coursaget et al. (1986), Infect.Immun., 51(3), 784-787
Research Disclosure (1991), 329:688, 32975
EP B1 399667

(57) **Sammendrag**

Det er beskrevet stabile og effektive, flerverdige vaksinepreparater omfattende Hepatit B overflateantigen (HBsAg), hvori HBsAg-komponenten er stabil i 1 uke ved 37°C og er høyst immunogen, f.eks. når vaksinen administreres til barn. Preparatene omfatter typisk HBsAg adsorbent til aluminiumfosfat og andre antigener, særlig de som er egnet for anvendelse i en pediatrik vaksine, adsorbent til aluminiumfosfat eller aluminiumhydroksyd. Fremgangsmåter for fremstilling av vaksiner og anvendelse av aluminiumfosfat til stabilisering av HBsAg i en flerverdig vaksineformulering er også beskrevet.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører kombinerte vaksiner omfattende hepatitt B-overflateantigen (HBsAg) og andre antigener, fremgangsmåte for fremstilling av et kombinasjonsvaksinepreparat, samt anvendelse av HBsAg og av aluminiumfosfat som adjuvans. Den foreliggende oppfinnelse angår særlig nye kombinasjonsvaksineformuleringer omfattende en hepatitt B-vaksinekomponent for behandling av hepatitt B-infeksjoner.

Infeksjon med Hepatitis B (HB) virus er et utbredt problem, men vaksiner som er anvendt for masseimmunisering er nå tilgjengelige, f.eks. produktet "Engerix-B" (SmithKline Beecham plc). Engerix B har som hepatitt B-antigenkomponenten hepatitt B-overflateantigen (HBsAg) som oppnås ved genteknologi.

Det er imidlertid ofte nødvendig eller ønskelig å administrere hepatitt B-vaksine samtidig med andre vaksiner, og dette kan medføre multiple injeksjoner. Problemer i forbindelse med multiple injeksjoner omfatter en mer komplisert administreringsmetode og et større totalt injeksjonsvolum.

Det er derfor et behov for en kombinert vaksine omfattende et hepatitt B-antigen i kombinasjon med andre antigener. De andre antigener er særlig de som i en vaksineformulering er i stand til å forebygge hepatitt A (HA), difteri (D), tetanus (T), helcellepertussis (Pw), acellulær pertussis (Pa), haemofilus influenza b (Hib) og poliomyelitt (P).

Aluminiumhydroksyd (AH) har bred anvendelse som adjuvans ved formulering av vaksiner. For eksempel vil Engerix B anvende hepatitt B-overflateantigen (HBsAg) adsorbent til aluminiumhydroksyd. Vi har også med hell anvendt AH ved formuleringen av hepatitt A-vaksine og i de kombinerte vaksiner DT, DTPw og DTPa. Når AH-adsorbent HBsAg anvendes i kombinasjon med andre vaksiner i en kombinert formulering, er det imidlertid en betydelig reduksjon av immunresponsen på HBsAg, hvilket fører til lavere eller utilstrekkelig serobeskyttelse etter vaksinasjonen. I tillegg vil stabiliteten av HBsAg-komponenten i den kombinerte vaksine være dårlig.

Aluminiumfosfat (AP) adsorbent HBsAg er blitt anvendt i en kommersielt tilgjengelig énverdig vaksine (HEPPACINE) laget av Korean Cheil Sugar Co Ltd.

Vi har funnet at det ikke er noen signifikant forskjell i immunogene egenskaper mellom den AH-adsorbte HBsAg énverdige vaksine (Engerix B) og en AP-adsorbte HBsAg énverdige vaksine.

5 Europeisk patentsøknad, publikasjon nr. 0 339 667 beskriver en toverdige vaksine omfattende HBsAg og et hepatitt A-antigen hvori enten aluminiumhydroksyd eller aluminiumfosfat anvendes som adjuvans. Det synes imidlertid ikke å være noen forståelse av behovet for å unngå aluminiumhydroksyd som adjuvans for en flerverdige vaksine omfattende HBsAg. Videre synes det ikke å være noen beskrivelse i dette dokument eller andre steder av en toverdige eller flerverdige hepatitt 10 B-vaksine hvori minst ett antigen forskjellig fra HBsAg er adsorbte på aluminiumhydroksyd og HBsAg er adsorbte på aluminiumfosfat.

I virkeligheten synes det overhodet ikke å være noen tidligere beskrivelse som muliggjør en stabil og effektiv flerverdige vaksine omfattende HBsAg.

15 Ifølge et trekk tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse et kombinert vaksinepreparat kjennetegnet ved hepatitt B-overflateantigen (HBsAg) og et antall (n) av andre antigener i kombinasjon med et adjuvans omfattende ett eller flere aluminiumsalter, hvori verdien av n er 1 eller høyere, og hvori det adjuvans som anvendes til å adsorbte HBsAg er aluminiumfosfat, under den forutsetning at når n er 1, skal det andre antigen ikke være et antigen mot hepatitt A.

20 Fortrinnsvis vil n være 2, 3, 4, 5 eller 6.

Fordelen ved denne oppfinnelse er at det ikke forekommer noen betydelig reduksjon i immunogenisiteten av HBsAg i den kombinerte vaksineformulering. Ved å unngå anvendelsen av AH til å adsorbte HBsAg-komponenten i vaksineformuleringen, vil man også oppnå et produkt med markert overlegen 25 stabilitet. En ytterligere fordel ifølge denne oppfinnelse er at de foran-nevnte problemer i forbindelse med multiple injeksjoner blir overvunnet eller iallfall avdempet, og at det tilveiebringes en stabil, svært immunogen kombinert formulering. Preparatene ifølge denne oppfinnelse er særlig egnet for administrering til barn.

30 HBsAg blir adsorbte på AP. Særlig har vi funnet i humane, kliniske studier at når AP-adsorbte HBsAg blir kombinert med ett eller flere AH-adsorbte eller AP-adsorbte antigener i en kombinert vaksine, vil det ikke forekomme noen betydelig

reduksjon av immunogenisitet. Stabiliteten av det AP-adsorberte HBsAg i formuleringen er også høyere enn av AH-adsorbent HBsAg.

Følgelig tilveiebringes i et ytterligere aspekt et vaksinepreparat ifølge denne oppfinnelse, hvori minst ett av antigenene forskjellig fra HBsAg er adsorbent på aluminiumfosfat.

I et ytterligere foretrukket aspekt er minst ett av antigenene forskjellig fra HBsAg adsorbent på AH.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en kombinert vaksine omfattende hepatitt B-overflateantigen (HBsAg) adsorbent på AP og et antigen adsorbent på AP eller på AH valgt fra et antigen som tilveiebringer immunitet mot ett eller flere av følgende virus: difteri (D); tetanus (T); pertussis (P); inaktivert Polio (IPV); haemofilus influenza b (Hib); og hepatitt A (HA).

I en pediatrik vaksine kan andre forlikelige antigener også være inkludert, f.eks. antigener kjent for å være effektive mot meningitt B, meningitt A og C, og otitis media.

Som anvendt heri skal betegnelsen "toverdig" anvendes til å referere til en vaksine omfattende en kombinasjon av to antigener tilsammen (innbefattet HBsAg).

Betegnelsen "flerverdig" anvendes på en vaksineblanding omfattende mer enn to antigener, f.eks. tre, fire eller fem eller seks antigener.

Betydningen av betegnelsene "aluminiumfosfat" og "aluminiumhydroksyd" som anvendt heri, omfatter alle former av aluminiumhydroksyd eller aluminiumfosfat som er egnet som vaksinehjelpemidler.

For eksempel kan aluminiumfosfat være et bunnfall av uløselig aluminiumfosfat (amorft, semikrystallinsk eller krystallinsk), som eventuelt men ikke utelukkende kan fremstilles ved å blande løselige aluminiumsalter og fosforsyresalter. "Aluminiumhydroksyd" kan være et bunnfall av uløselig (amorft, semikrystallinsk eller krystallinsk) aluminiumhydroksyd, som eventuelt men ikke utelukkende, kan fremstilles ved å nøytralisere en løsning av aluminiumsalter. Særlig egnet er de forskjellige former av aluminiumhydroksyd- og aluminiumfosfat-geler som er tilgjengelige fra kommersielle kilder, f.eks. Alhydrogel (aluminiumhydroksyd, 3% suspensjon i vann) og Adjufos (aluminiumfosfat, 2% suspensjon i saltløsning) levert av Superfos (Vedbæk, 2950 Danmark).

Det vil bli forstått at vi for første gang er i stand til å tilveiebringe en stabil og effektiv, flerverdig vaksineblanding omfattende HBsAg.

5 Det tilveiebringes følgelig en stabil og effektiv, kombinert vaksineblanding vedrørende forebygging av mer enn to sykdommer, omfattende HBsAg og minst to andre antigener.

Med hensyn til valg av adjuvans, er det oppnådd utmerkede resultater når HBsAg blir adsorbert på AP og minst ett av antigenene forskjellig fra HBsAg blir adsorbert på AH. Andre egnede adjuvanser kan imidlertid anvendes. For eksempel kan ett eller alle antigenene forskjellige fra HBsAg være adsorbert på AP.

10 Foretrukne, stabile kombinasjonsvaksiner ifølge denne oppfinnelse er:

Difteri - tetanus - pertussis - hepatitt B (DTP-HB)

Difteri - tetanus - hepatitt B (DT-HB)

DTP - IPV (inaktivert polio vaksine) - hepatitt B

15 Det vil bli forstått at for en vaksine som inneholder en Hib komponent, kan Hib-antigenet anvendes improvisert ved å formulere vaksinen rett før administreringen. På denne måte kan det fremstilles følgende kombinerte vaksinepreparater innenfor rammen av denne oppfinnelse, f.eks.:

Hib - hepatitt B

DTP - Hib - hepatitt B

20 IPV - DTP - Hib - hepatitt B.

Nærmere bestemt vil særlige vaksiner innenfor rammen av denne oppfinnelse være:

Difteri - tetanus (DT adsorbert på AP eller AH) - hepatitt B (HBsAg adsorbert på AP)

25 Difteri - tetanus (DT adsorbert på AP eller AH) - hepatitt B (HBsAg adsorbert på AP).

Med "stabil" som anvendt heri for å beskrive en vaksine ifølge denne oppfinnelse, menes en vaksine som kan holdes ved 37°C i 1 uke uten betydelige tap av immunogenisitet av HBsAg-komponenten.

30 Med "effektiv" som anvendt heri, menes en vaksineblanding, karakterisert ved at immunogenisiteten av HBsAg i den kombinerte vaksine er slik at et geometrisk middeltiter på minst 200 mIU/ml, fortrinnsvis 300 mIU/ml eller høyere, blir funnet i

humane barn 1 måned etter den 3dje dose av vaksinen når vaksinen blir administrert med 1 måneds mellomrom i et hensiktsmessig vaksinasjonsprogram.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer denne oppfinnelse en flerverdige vaksineblanding omfattende HBsAg og et stabiliserende adjuvans valgt slik at vaksinen kan holdes ved 37°C i 1 uke uten noe betydelig tap i immunogenisitet av HBsAg-komponenten. Fortrinnsvis karakteriseres den flerverdige vaksineblanding ved å gi opphav til en geometrisk middeltiter på minst 200 mIU/ml (en måned etter tredje dose), fortrinnsvis 300 mIU/ml eller høyere, hos humane barn når vaksinen administreres med 1 måneds mellomrom i et hensiktsmessig vaksinasjonsprogram.

Som anvendt heri, skal betegnelsen "hensiktsmessig vaksinasjonsprogram" bety et program kjent for fagfolk på dette området for å administrere et doseringsforløp av en vaksine, særlig for pediatriske doser. Et program med 3, 4 eller 5 måneder kan f.eks. anvendes. Dette er særlig hensiktsmessig f.eks. for DTP - HBsAg-holdige vaksiner ifølge denne oppfinnelse.

HBsAg adsorberes på aluminiumfosfat. De andre antigener i den flerverdige vaksine-formulering kan adsorberes på AP eller AH (eller begge) og blir fordelaktig adsorbent på AH som vist i eksemplene heri nedenfor.

Fordelaktig vil vaksineformuleringen ifølge denne oppfinnelsen omfatte en kikhostevaksine.

Kikhostekomponenten er hensiktsmessig en helcelle pertussisvaksine eller en acellulær pertussisvaksine inneholdende delvis eller høyt rensede antigener.

Kombinasjonene ovenfor kan eventuelt omfatte en komponent som er beskyttende mot hepatitt A, dvs. et HAV-antigen.

Fordelaktigvis vil hepatitt B-kombinasjonsvaksinen være enn pediatrisk vaksine.

Fremstillingen av antigenene og adsorbsjonsfremgangsmåten med adjuvansene er vel kjent i teknologien. Se eksemplene som er gitt nedenfor.

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

Som anvendt heri, skal uttrykket "hepatitt B-overflateantigen" eller "HBsAg"

omfatte et hvilket som helst HBsAg antigen eller fragment derav som har antigenisiteten til HBV overflateantigen. Det skal forstås at i tillegg til den 226 aminosyresekvens i HBsAg S antigenet (se Tiollais et al, Nature, 317 489 (1985) og referanser deri) kan HBsAg som beskrevet heri, om ønsket, inneholde hele eller en
5 del av en pre S-sekvens som beskrevet i referansene ovenfor og i EP-A-0 278 940. Spesielt kan HBsAg omfatte et polypeptid omfattende en aminosyresekvens omfattende restene 12-52 etterfulgt av restene 133-145, etterfulgt av restene 175-400 av L-proteinet i HBsAg relativt til den åpne leseramme på et hepatitt B-virus av ad-serotype (dette polypeptid refereres til som L*; se EP 0 414 374). HBsAg
10 innenfor rammen av denne oppfinnelse kan også innbefatte preS1-preS2 polypeptidet beskrevet i EP 0 198 474. (Endotronics) eller analoger derav, slik som dem beskrevet i EP 0 304 578 (Mc Cormick og Jones). HBsAg som beskrevet heri kan også referere til mutanter, f.eks. "flyktningsmutanten" beskrevet i WO 91/14703 eller europeisk patentsøknad publikasjon nr. 0 511 855 A1, særlig HBsAg hvor
15 aminosyresubstitusjonen i posisjon 145 er til arginin fra glysin.

Normalt vil HBsAg være i partikkelform. Partiklene kan omfatte f.eks. S-protein alene eller kan være komposittpartikler, f.eks. (L*, S) hvor L* er som definert ovenfor og S betegner S-proteinet i HBsAg. Den nevnte partikkel er fordelaktig i den form hvori den blir uttrykt i gjær.

20 Egnede antigener for anvendelse i vaksiner ifølge denne oppfinnelse er allerede kommersielt tilgjengelige, og detaljer kan oppnås fra The World Health Organization. For eksempel kan IPV komponenten være Salk inaktivert poliovaksine. Kikhostevaksinen kan omfatte et helcelleprodukt, et acellulært produkt eller et rekombinant fremstilt produkt. Særlig kik-hostekomponenten kan være PT
25 (pertussis toksiner) eller subfraksjoner derav, FHA (filament Haemagglutinin-antigen), agglutinogener (fimbriale) og ytre membranproteiner, innbefattet 69kDa protein (pertactin, ikke-fimbrialt agglutinogen). Referanser: Robinson, A., Irons, L.L. & Ashworth, A.E., Vaccines, 3, 1985, 11-22; og Brennan, H.J., Li, S.M., Cowell, J.L., Bishen M.E., Steven, A.C. Novotny., P, Manclarck, C.R., Infection and Immunity, 56,
30 1988, 3189-3195.

Den komponent som gir beskyttelse mot hepatitt A er fortrinnsvis produktet kjent som "Havrix" (SmithKline Beecham Biologicals), som er en drept, svekket

vaksine avledet fra HM-175 stammen av HAV [se "Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A" av F.E. Andre, A. Hepburn og E.D. Hondt (1980), Prog. Med. Virol, Vol 37, sidene 72-95 og produktmonografien "Havrix" publisert av SmithKline Beecham Biologicals (1991).

5 Flehmg et al (loc.cit, sidene 56-71) har gitt en oversikt over de kliniske aspekter, virologi, immunologi og epidemiologi av hepatitt A og diskutert muligheter for utvikling av vaksiner mot denne vanlige virusinfeksjon.

 Som anvendt heri, skal uttrykket "HAV-antigen" referere til et hvilket som helst antigen som er i stand til å stimulere nøytraliserende antistoff mot HAV hos
10 mennesker. HAV-antigenet omfatter fortrinnsvis inaktiverede, svekkede viruspartikler eller kan være f.eks. et HAV-kapsid eller HAV-virusprotein, som beleilig kan oppnås ved rekombinant DNA-teknologi.

 Vaksinefremstilling er generelt beskrevet i New Trends and Developments in Vaccines (1978), utgitt av Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland,
15 USA.

 Mengden av antigen i hver vaksinedose er valgt som en mengde som inducerer en immunobeskyttende respons, uten signifikante skadelige bivirkninger, i typiske vaksiner. En slik mengde vil variere avhengig av hvilke spesifikke immunogener som anvendes. Generelt er det ventet at hver dose vil omfatte 1 til
20 1.000 µg av totalt immunogen, fortrinnsvis 2-100 µg, mer fortrinnsvis 1-40 µg, mest fortrinnsvis 1-5 µg. En optimal mengde for en bestemt vaksine kan fastlegges ved standard-studier omfattende observasjon av antistoff-titer og andre responser hos individer. Et primært vaksinasjonsforløp kan omfatte 2 eller 3 doser av vaksine, gitt med én til to måneders mellomrom, ifølge WHO anbefalingene for DTP-
25 immunisering.

 Det beskrives en fremgangsmåte til å forebygge hepatitt B og andre infeksjoner hos mennesker, særlig barn, hvilken fremgangsmåte omfatter behandling av et menneskelig individ i behov derav med en immunologisk effektiv dose av en vaksine ifølge hvilket som helst aspekt av denne oppfinnelse som
30 beskrevet heri ovenfor.

 I et ytterligere trekk ifølge denne oppfinnelse tilveiebringes anvendelse av HBsAg for fremstilling av en kombinasjonsvaksine ifølge denne oppfinnelse for å

forebygge hepatitt B-virusinfeksjoner.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer denne oppfinnelse anvendelse av AP som adjuvans for adsorpsjon av HBsAg for det formål å virke som en stabilisator for, og/eller opprettholde effektiviteten av, HBsAg i en flerverdig vaksine ifølge denne oppfinnelse.

Spesifikt tilveiebringer denne oppfinnelse anvendelse av aluminiumfosfat for det formål å fremstille en stabil kombinert vaksine omfattende HBsAg og minst ett annet antigen (fortrinnsvis minst to andre antigener) hvorved stabiliteten og/eller immunogenisiteten av HbsAg-komponenten er høyere enn i den tilsvarende kombinerte vaksine hvori HbsAg-komponenten er adsorbert på AH.

Nærmere bestemt tilveiebringer oppfinnelsen den anvendelse hvorved vaksinen kan holdes ved 37°C i 1 uke (dvs. 7 dager) uten betydelige tap av immunogenisitet av HBsAg.

Det tilveiebringes også den anvendelse hvorved den geometriske middeltiter (GMT) funnet 1 måned etter den 3dje dose av et vaksinasjonsforløp gitt med 1 måneds mellomrom i et hensiktsmessig vaksinasjonsprogram til menneskebarn, er høyere enn 200, fortrinnsvis høyere enn 300, mIU/ml.

I et ytterligere aspekt ifølge den foreliggende oppfinnelse, tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av en kombinasjonsvaksine som er effektiv til å forebygge hepatitt B-infeksjon som illustrert i eksemplene heri nedenfor.

I et foretrukket aspekt blir antigenene forskjellige fra HBsAg alle adsorbert på AH. En svært effektiv DTPa - hepatitt B-vaksine kan f.eks. lages på denne måte.

Vanligvis kan de kombinerte vaksinepreparater ifølge hvilket som helst trekk av denne oppfinnelse fremstilles som følger.

De nødvendige DT, DTPw, DTPa, HA eller andre komponenter blir adsorbert på en egnet adjuvans, spesielt AH eller AP; HBsAg blir adsorbert på et egnet stabiliserende adjuvans, valgt som beskrevet heri ovenfor, særlig et aluminiumsalt fo-skjellig fra AH. Fortrinnsvis blir det adsorbert på AP. Etter å ha tillatt tid for fullstendig og stabil adsorpsjon av de respektive komponenter, blir de forskjellige komponenter kombinert under hensiktsmessige betingelser.

Det vil bli forstått at visse komponenter, f.eks. DT-, DTPw- og DTPa-komponentene kan kombineres separat før tilsetning av den adsorberte HBsAg

komponent. Flerverdige vaksiner omfattende HBsAg og andre eller ytterligere antigener til dem nevnt heri ovenfor, kan fremstilles på lignende måte.

I et foretrukket aspekt tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av en kombinert vaksineblanding ifølge denne oppfinnelse, hvori fremgangsmåten
5 omfatter å blande aluminium-fosfat-adsorbent HBsAg med ett eller flere aluminiumhydroksyd- eller aluminiumfosfat-adsorbente antigener.

Følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen.

EKSEMPLENE 1 - 5

10 **Formuleringer**

Særlige formuleringer ifølge den foreliggende oppfinnelse ble fremstilt som beskrevet nedenfor.

15 **Eksempel 1 HBsAg adsorpsjon på $AlPO_4$ som konsentrat for formulering av kombinerte vaksiner.**

En suspensjon av aluminiumfosfat inneholdende 0,03 til 0,3 g aluminium (som aluminiumfosfat) i isotonisk saltløsning blir blandet med et HbsAg-konsentrat inneholdende 10 mg HBsAg protein, i et sluttvolum på 10-100 ml. Etter justering av pH til 5-6,5, etterlates blandingen i 10-24 timer ved romtemperatur under omrøring.
20 Antiseptikum blir deretter eventuelt tilsatt (dvs. mertiolat, 1:20.000 til 1:10.000 eller 2-fenoksy-etanol, 3 til 6 mg/ml) og volumet bringes opp til 50 ml med isotonisk saltløsning.

25 **Eksempel 2 Formulering av kombinert difteri - tetanus - hepatitt B-vaksine.**

Et konsentrat inneholdende 25.000 Lf av difteritoksoid og 10.000 Lf av tetanus toksoid adsorbent til 0,35 g Al (som aluminiumhydroksyd eller aluminiumfosfat) blir fremstilt i et sluttvolum på 0,15 l av isotonisk saltløsning og justert til mellom pH 6 og 7 som angitt av WHO for DT- og DTP-vaksiner. Dette
30 konsentrat kombineres med 0,05 l av hepatitt B-konsentratet fra eksempel 1.

Denne blanding bringes til et sluttvolum på 0,5 l med isotonisk saltløsning. Antiseptiske media (cc. mertiolat 1:20.000 til 0:10.000 eller 2-fenoksyetanol, 3 til 6

mg/ml) kan eventuelt tilsettes. Den endelige pH er mellom 6 og 7, som angitt av WHO for DT- og DTP-vaksiner.

En 0,5 ml dose av denne bulkvaksine inneholder som aktive bestanddeler:

D-toksoid: 25 Lf,

T-Toksoid: 10 Lf,

HBsAg 10 µg protein

Denne fremgangsmåte kan eventuelt modifiseres til å anvende høyere eller lavere mengder av de aktive bestanddeler.

Eksempel 3 Formulering av kombinert difteri - tetanus - pertussis (helcellevaksine) - hepatitt B-vaksine

Et konsentrat fra Behringwerke inneholdende 7.500 Lf av difteri toksoid, 3.250 Lf av tetanus toksoid og 15.000 kapasitetsenheter av B. Pertussis-antigen adsorbent til 0,45 mg Al (som aluminiumhydroksyd og aluminiumfosfat) fremstilles i et sluttvolum på 0,4 l isotonisk saltløsning og justeres til pH 6-7, som angitt av WHO for DTP-vaksiner. Dette konsentrat kombineres med 0,05 l av hepatitt B-konsentrat fra eksempel 1.

Denne blanding bringes til et sluttvolum på 0,5 l med isotonisk saltløsning. Antiseptiske media (cc. mertiolat 1:20.000 til 0:10.000 eller 2-fenoksyetanol, 3 til 6 mg/ml) kan eventuelt tilsettes. Slutt-pH er mellom 6 og 7, som angitt av WHO for DT- og DTP-vaksiner.

En 0,5 ml dose av denne bulkvaksine inneholder som aktive bestanddeler:

D-toksoid 7,5 Lf,

T-toksoid 3,25 Lf,

Pw-antigen 15OU

HBsAg 10 µg protein.

Denne fremgangsmåten kan eventuelt modifiseres til å anvende høyere eller lavere mengder av de aktive bestanddeler.

**Eksempel 4 Formulering av difteri - tetanus - pertussis
(acellulær komponent)-vaksine.**

Et konsentrat inneholdende 25.000 Lf av difteritoksoid og
10.000 Lf av tetanustoksoid adsorbent til 0,35 g Al (som aluminiumhydroksyd eller -
5 fosfatgel) fremstilles i et sluttvolum på 0,15 l isotonisk saltløsning og justeres til —
mellom pH 6 og 7, som angitt av WHO for DTP-vaksiner. 25 mg av inaktivert
pertussis toksin (DTPa), 25 mg av filament hemagglutinin (FHA) og eventuelt 8 mg
av 69kDa yttermembran-protein (pertactin), hver kombinert med 0,05 g Al (som alu-
miniumhydroksyd eller aluminiumfosfat) blir tilsatt. B.pertussis antigenene PT, FHA
10 og pertactin kan fremstilles som beskrevet ved fremgangsmåten kjent i teknologien,
f.eks. europeisk patentsøknad 427 462, PCT-søknad WP 91/12020 eller ved andre
fremgangsmåter som gir fysiologisk akseptable og potente B.pertussis antigener.

Denne blandingen bringes til et sluttvolum på 0,5 l med isotonisk saltløsning.
Antiseptiske media (c.c. mertiolat 1:20.000 til 0:10.000 eller 2-fenoksyetanol, 3 til 6
15 mg/ml) kan eventuelt tilsettes. Slutt-pH er mellom 6 og 7, som angitt av WHO for
DT- og DTP-vaksiner.

En 0,5 ml dose av denne bulkvaksine inneholder som aktive bestanddeler:

D-toksoid	25 Lf,
T-toksoid	10 Lf,
20 DTd-toksoid	25 µg,
FHA-toksoid	25 µg,
69kDa OMP	8 µg (valgfri)

Denne fremgangsmåten kan eventuelt modifiseres til å anvende høyere eller
lavere mengder av de aktive bestanddeler.

25

**Eksempel 5 Formulering av kombinert difteri - tetanus -
pertussis (acellulær komponent) – hepatitt B- vaksine**

Fremgangsmåten i Eksempel 4 blir anvendt, med det unntak at ytterligere 50
ml av HBsAg adsorbent konsentrat som fremstilt i eksempel 1 blir tilsatt til den
30 endelige blanding.

Den resulterende blanding bringes til et sluttvolum på 0,5 l med isotonisk
saltløsning. Antiseptiske media (c.c. mertiolat 1:20.000 til 0:10.000 eller 2-

fenoksyetanol, 3 til 6 mg/ml) kan eventuelt tilsettes. Slutt-pH er mellom 6 og 7, som angitt av WHO for DT- og DTP-vaksiner.

En 0,5 ml dose av denne bulkvaksine inneholder som aktive bestanddeler:

	D-toksoid	25 Lf,	
5	T-toksoid	10 Lf,	—
	PTd-toksoid	25 µg,	
	FHA-toksoid	25 µg,	
	69kDaOMP:	8 µg (valgfri)	

10 Denne fremgangsmåten kan eventuelt modifiseres til å anvende høyere eller lavere mengder av de aktive bestanddeler.

EKSEMPLENE 6 - 10

Dyre- og menneskestudier

Eksempel 6 Formulering av kombinert hepatitt A - hepatitt B-vaksiner

15 Et inaktivert hepatitt A-viruskonsentrat (460.000 Elisa enheter), adsorbent til 0,02 til 0,2 g, fortrinnsvis 0,04 til 0,1 g aluminium (som aluminiumhydroksyd) i et sluttvolum på ca. 125 ml ble slått sammen med 50 ml konsentrat inneholdende 10 mg HBsAg adsorbent til aluminiumfosfat som beskrevet i eksempel 1.

20 Den resulterende blanding ble supplert med isotonisk saltløsning og et aminosyrekonsentrat (Travasol, Baxter-Travenol Inc.) for å oppnå et sluttvolum på 0,5 l inneholdende 1,5 g aminosyrer. Den resulterende pH var mellom 6 og 7.

Vår 1 ml dose av denne bulkvaksine inneholder som aktive bestanddeler:

	Hepatitt A virus-antigen:	800 Elisa enheter
	HBsAg:	20 µg protein.

25 Denne fremgangsmåten kan eventuelt modifiseres til å anvende høyere eller lavere mengder av de aktive bestanddeler.

Resultater:

Kliniske studier for sammenligning av aluminiumhydroksyd (AH) og aluminiumfosfat (AP) adsorbent HBsAg (enverdig vaksine)

30 Til å begynne med ble seronegative, friske, voksne frivillige immunisert med 3 doser av 20 µg HbsAg-protein gitt med 1 måneds mellomrom. Antistoffnivået ble bestemt i sera oppnådd 1 måned etter 2 og 3 doser ved anvendelse av Ausab-

testen (Abbott). Responser ble definert som individer med titer signifikant over bakgrunnen. Titeret ble uttrykt i mIU/ml.

Resultatene er uttrykt som geometrisk middeltiter (GMT) i mIU/ml).

5	HBsAg Lot	Adjuvans	Antall individer	Post 2. mnd 2		Post 3. mnd 3	
				GMT	% respons	GMT	% respons
10	100	AH	43	32	86	141	100
	101	AH	45	26	93	198	98
	102	AH	46	30	84	147	93
15	105/P	AP	7	43	83	380	100

20	HBsAg Lot	Adjuvans	Antall individer	Post 2. mnd 2		Post 3. mnd 3	
				GMT	% respons	GMT	% respons
25	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
30	105/P	AP	51	14	90	156	96

Eksempel 7

35 **Museimmunogenisitetstester og resultater av aksellererte stabilitetstester for kombinasjonsvaksiner omfattende HBsAg med aluminiumhydroksyd (AH) eller aluminiumfosfat (AP) som adjuvans**

40 Grupper av 10 OF1 mus ble immunisert subkutan med 2 doser av 2,5 µg HBsAg (enkeltkomponent eller kombinert) på dagene 0 og 14. Blod ble trukket av på dag 21 og titrert for anti-HBsAg ved anvendelse av Ausab-testen (Abbott). Antistofftiteren ble beregnet i mIU/ml. Antallet responderende dyr ble definert som

antallet av dem med antistoffnivå signifikant over bakgrunnsverdiene. Den geometriske middeltiter ble også beregnet (GMT).

Resultatene av DT-HB, DTPw-HB, DTPa-HB viser at AP-adsorbent HBsAg virket bedre enn AH-adsorbent HBsAg både med hensyn til antallet responderende dyr og GMT. Responsen på AP-adsorbent HBsAg i kombinasjonen var sammenlignbar med den som ble oppnådd ved enverdig HBsAg-administrasjon.

Vaksine	4°C		7 dager, 37°C		7 dager, 45°C	
	Ant. resp.	GMT	Ant. resp.	GMT	Ant. resp.	GMT
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
DTAa(AH)HB(AP)	10/10	18	8/10	8	9/10	24

nd: ikke testet

Eksempel 8

Immunogenisitet av HBsAg kombinert til DTPw i aper.

Resultater av aluminiumhydroksyd (AH) og aluminiumfosfat (AP) adsorbent antigen.

Cercopithecus aethiops apekatter fikk 2 injeksjoner av 10 µg HBsAg (alene eller kombinert) på dagene 0 og 30. Sera ble trukket av på dagene 30 og 57 og titrert (Ausab, Abbott) for anti-HBsAg. Dyr med antistoffnivå signifikant over bakgrunnen (prevaksinasjonssera) ble ansett som respondere. GMT ble beregnet i mIU/ml.

Resultatene viser at AP-adsorbent HBsAg virket bedre enn AH-adsorbent HBsAg. Responsen var sammenlignbar med den som ble oppnådd ved enverdig HBsAg-administrering.

5	Vaksine	Post 1,	dag 30	Post 2,	dag 57
		Antall responser	GMT	Antall responser	GMT
10	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

15 Eksempel 9

Kliniske studier med kombinerte DTPw-vaksiner ved anvendelse av HBsAg adsorbent til aluminiumhydroksyd (AH) eller aluminiumfosfat (AP)

Individer ble immunisert med 3 doser à 0,5 ml inneholdende DTPw og 10 µg HBsAg-protein gitt ved en alder på 3, 4 og 5 måneder. Avblødning var ved 6 måneder, og sera ble titrert med Ausab-testen. Prosentvise respondere (serokonversjon) relaterer til individer med antistoffnivå signifikant over bakgrunnen. Prosentvis beskyttelse relaterer til individer med en titer like eller høyere enn 10 mIU/ml. GMT i mIU/ml.

Resultater for DTPw-HB viser at AP-adsorbent HBsAg ga en tilfredsstillende respons i motsetning til AH-adsorbent HBsAg.

Serokonversjonsrater og GMT var sammenlignbare med data som typisk kan observeres med enverdig HBsAg-vaksine (Engerix B).

30	Vaksine	Antall individer	Avblødn. tidspunkt	% resp.	% prot.	GMT
35	DTPw (AH). HB(AH)	32	post 2 post 3	nd 94	nd 84	nd 38,5
	DTPw(AH).HB(AP)	29 17	post 2 post 3	97 100	97 100	36 469

Eksempel 10**Immunogenisitet og stabilitet av HBsAg adsorbert til aluminiumhydroksyd (AH) eller aluminiumfosfat (AP) i en hepatitt A - hepatitt B-kombinert vaksine.**

Grupper av 10 OF1 mus ble immunisert subkutant med 2 doser av 2,5 µg HBsAg (enkeltkomponent eller kombinert) på dagene 0 og 14. Blod ble trukket av på dag 21 og titrert for anti-HBsAg som i eksempel 7.

Resultater for immunogenisitet og stabilitet av HA-HB kombinert produkt viste at AP-adsorbert HBsAg ga høyere anti-stoffnivå og en mer stabil form.

Vaksine	Eksponering	Ant. resp.	GMT
HA(AH).HB(AH)	4°C	9/10	41
	1 mnd, 37°C	6/10	5,6
	1 mnd, 45°C	5/10	6,4
HA(AH),HB(AP)	4°C	10/10	80
	1 mnd, 37°C	9/10	45
	1 mnd, 45°C	8/10	18
Engerix B HB (AH)	4°C	8/10	58

Eksempel 11: Ytterligere kliniske resultater på mennesker**1. Immunogenisitet av DTPw - hepatitt B-vaksiner hos barn.**

5

Eksperiment A

**Studier i Slovakia: Program: 3-4-5 måneder, 10 μ g HBsAg;
DTPw fra Behringwerke (DT på AH; Pw på en blanding av AH
og AP.**

10

Anti-Hbs titere

15

HBsAg adjuvans	Tid	N	GMT	SP(%)
Hydroksyd	Post II (5 mnd)	44	45	79,5
Hydroksyd	Post III (6 mnd)	13	34	69,2
Fosfat	Post II (5 mnd)	32	80	97,0
Fosfat	Post III (6 mnd)	32	396	100

25

I dette og andre eksempler skal Post II bety etter den andre dose, Post III etter den tredje dose. GMT blir alltid målt 1 måned etter injeksjonstidspunktet vist i programmet. SP er serobeskyttelsesgrad.

30

Anti-difteri, tetanus, B. pertussis titere

35

Post III resultater	N	GMT	% < 0,1 IU/ml	GMT Post/Pre
Anti-difteri	38	2,302	100	37,4
Anti-tetanus	38	3,281	100	38,4
Anti-B. pertussis	38	61	-	7,7

Eksperiment B

Studie i Grekenland: Program 2-4-6 måneder (samme vaksine som i Eksperiment A)

5 **Anti-HBs titere (interim-resultater)**

HBsAg adjuvans	Tid	N	GMT	SP(%)
Hydroksyd	Mnd 7	22	284	90,5
Hydroksyd	Mnd 7	17	193	94,4
Fosfat	Mnd 7	23	1794	92,0

15 **Eksperiment C**

Studie i Slovakia: Program 3-4-5 (HBsAg = 5 μ g på aluminium-fosfat; DTP fra Behringwerke som for Eksperiment A). Anti-HBs titere.

Tid	N	GMT	SP(%)
Post II	21	94	90.5
Post III	18	311	100

30

35

Eksperiment D

Studie i Slovakia: Program 3-4-5 måneder gamle (HBsAg = 10 μ g på aluminiumfosfat; DTPw fra Behringwerke som for Eksperiment A).

Anti-HBs-titere

Tid	N	GMT	SP(%)
Pre	24	0	0
Post II (mnd 5)	13	259	92,3
Post III (mnd 6)	10	592	100,0

Anti-difteri-antistoffer

Tid	N	GMT	SP(%)	GMT Post/Pre
Pre	32	0,054	6,3	1,0
Post II	16	1,094	93,8	20,4
Post III	11	2,314	100	43,1

Anti-tetanus antistoffer

Tid	N	GMT	SP(%)	GMT Post/Pre
Pre	32	0,083	34,4	1,0
Post II	16	3,146	100,0	37,9
Post III	11	7,989	100,0	96,4

Anti-B pertussis antistoffer

	Tid	N	GMT	GMT Post/Pre
5	Pre	32	8	1,0
10	Post II	16	20	2,7
15	Post III	11	50	6,6

2. Immunogenisitet av DTPa - hepatitt B-vaksiner i barn**20 Eksperiment A**

**Studie i Tyrkia. HBsAg 10 μ g på AP; DTP (acellulær) på AH.
Foreløpige resultater.**

25 Gruppe 1 (DTPa - Engerix B kombinasjon)

	Tid	N	S+	%	GMT
30	Pre	19	0	0	0
	Post I	19	4	21,1	24
35	Post II	19	18	94,7	146
	Post III	19	19	100,0	345

Gruppe 2 (DTPa pluss Engerix B; separate simultaninjeksjoner)

	Tid	N	S+	%	GMT
5	Pre	8	0	0	0
	Post I	8	2	25,0	37
10	Post II	8	5	62,5	33
	Post III	7	6	83,7	385

15 **Nøkkel:** N = antall individer testet;

S+ = antall individer seropositive på et gitt blodprøvetidspunkt;

% = serokonversjonsrate, og

GMT = geometrisk middel antistofftiter av serokonverterere.

P a t e n t k r a v

1. Kombinert vaksinepreparat,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d h e p a t i t t B o v e r f l a t e a n t i g e n (H B s A g) o g e t a n t a l l (n) a v
a n d r e a n t i g e n e r i k o m b i n a s j o n m e d e t a d j u v a n s o m f a t t e n d e e t t e l l e r f l e r e
a l u m i n i u m s a l t e r , h v o r i v e r d i e n a v n e r 1 e l l e r h ø y e r e , o g h v o r i d e t a d j u v a n s s o m
a n v e n d e s t i l å a d s o r b e r e H B s A g e r a l u m i n i u m f o s f a t , u n d e r d e n f o r u t s e t n i n g a t n å r n
e r 1 , s k a l d e t a n d r e a n t i g e n i k k e v æ r e e t a n t i g e n m o t h e p a t i t t A .
- 10
2. Vaksinepreparat ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t m i n s t e t t a v d e a n d r e a n t i g e n e r e r a d s o r b e r t t i l
a l u m i n i u m f o s f a t .
- 15
3. Vaksinepreparat ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t m i n s t e t t a v d e a n d r e a n t i g e n e r e r a d s o r b e r t t i l
a l u m i n i u m h y d r o k s y d .
4. Vaksinepreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d a t n e r 2 , 3 , 4 , 5 e l l e r 6 .
5. Kombinert vaksinepreparat ifølge krav 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t a n t i g e n e t a d s o r b e r t t i l a l u m i n i u m h y d r o k s y d e l l e r
a l u m i n i u m f o s f a t e r v a l g t f r a e t a n t i g e n s o m g i r i m m u n i t e t m o t d i f t e r i (D) ; t e t a n u s (T) ;
25 p e r t u s s i s (P) ; i n a k t i v e r t p o l i o (I P V) ; h a e m o f i l u s i n f l u e n s a b (H i b) o g h e p a t i t t A (H A) .
6. Kombinert vaksinepreparat ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t s t a b i l i t e t e n a v v a k s i n e n e r s l i k a t v a k s i n e n k a n h o l d e s
v e d 3 7 ° C i 1 u k e u t e n b e t y d e l i g t a p a v i m m u n o g e n i s i t e t f o r H B s A g - k o m p o n e n t e n .

7. Kombinert vaksinepreparat ifølge hvilket som helst av de tidligere krav, karakterisert ved at immunogenisiteten av HBsAg i den kombinerte vaksine er slik at en geometrisk middel-titer på 200 mIU/ml (1 måned post 3. dose) eller høyere, blir funnet i menneskebarn når en vaksinebehandling blir gitt med 1 måned mellomrom i et hensiktsmessig vaksinasjonsprogram.
8. Kombinert vaksinepreparat ifølge hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at det omfatter en pertussiskomponent.
9. Kombinert vaksine ifølge krav 8, karakterisert ved at pertussiskomponenten er helcelle-pertussis-vaksinen eller den acellulære pertussis-vaksinen inneholdende delvis eller sterkt rensede antigener.
10. Fremgangsmåte for fremstilling av et kombinasjonsvaksinepreparat ifølge kravene 1-9, hvori HBsAg er adsorbent til AP, karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter blanding av aluminiumfosfatadsorbent HBsAg med ett eller flere aluminiumhydroksyd- eller aluminiumfosfat-adsorbente antigener.
11. Anvendelse av HBsAg ved fremstilling av en kombinasjons-vaksine ifølge hvilket som helst av kravene 1-9 for profylakse av hepatitt B-virusinfeksjoner.
12. Anvendelse av aluminiumfosfat som adjuvans for adsorpsjon av HBsAg, for det formål å formulere en stabil og effektiv kombinert vaksine omfattende HBsAg og minst ett annet antigen, hvorved stabiliteten og/eller immunogenisiteten av HBsAg-komponenten er høyere enn i den kombinerte vaksine hvori HBsAg-komponenten er adsorbent på aluminiumhydroksyd.
13. Anvendelse ifølge krav 12, hvori stabiliteten av vaksinen er slik at vaksinen kan holdes ved 37°C i 1 uke uten betydelig tap av immunogenisitet for HBsAg.

14. Anvendelse ifølge krav 12, hvori immunogenisiteten av HBsAg i den kombinerte vaksinen er slik at et geometrisk middeltiter på 200 mIU/ml (1 måned post dose) eller høyere, blir funnet hos menneskebarn etter en behandling på 3 doser av vaksinen gitt med 1 måneds mellomrom i et hensiktsmessig immuniseringsprogram.

15. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 12-14, hvori det er minst to andre antigener i den kombinerte vaksine.