



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2440242 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 39/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.11.10
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.06.25
(86)	Europeisk søknadsnr	10721036.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2010.06.08
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.04.18
(30)	Prioritet	2009.06.10, GB, 0910046
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	BA ME RS
(73)	Innehaver	GlaxoSmithKline Biologicals S.A., rue de l'Institut, 89, 1330 Rixensart, BE-Belgia
(72)	Oppfinner	HENDERICKX, Veronique, GlaxoSmithKline Biologicals s.a.rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, BE-Belgia LEMOINE, Dominique Ingrid, GlaxoSmithKline Biologicals s.a.rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, BE-Belgia
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Adjuvanssammensetning omfattende et ikke-ionisk isotonisitetsmiddel
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2008/142133 WO-A1-96/33739 WO-A2-99/56776 US-B1- 6 869 607

Område for oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse vedrører vandige adjuvanssammensetninger omfattende et ikke-ionisk isotonisk middel, og som har lave konsentrasjoner av salt, spesielt med natriumkloridkonsentrasjoner ved eller under 100 mM. Foreliggende oppfinnelse

5 vedrører også immunogene sammensetninger som omfatter et antigen eller antigenpreparat, og nevnte vandige adjuvanssammensetninger.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Adjuvanter blir noen ganger anvendt for å forbedre immunresponsen dannet mot et

10 gitt antigen. Derimot øker innlemming av adjuvanter inn i en vaksine eller immunogen sammensetning kompleksiteten av preparering av komponentene, samt kompleksiteten av fordelingen og formuleringen av vaksinesammensetningen. Preparering av hver av adjuvanssammensetningene, samt den antigene komponenten må bli betraktet av fremstillere. Spesielt bør kompatibiliteten av den antigene

15 komponenten med adjuvanskomponenten bli betraktet. Dette er spesielt tilfelle hvor lyofiliserte antigener eller antigenpreparater skal bli rekonstituert med en adjuvanspreparering. I et slikt tilfelle er det viktig at bufferen av adjuvansprepareringen er egnet for antigenet eller antigenprepareringen, og at immunogenisiteten eller oppløseligheten av antigenet ikke blir påvirket av adjuvansen.

20 US 6 868 607 beskriver vaksiner omfattende peptider, en polykationisk adjuvant, og én eller flere vannoppløselige eller vannemulgerbare substanser som har evne til å gjøre vaksinen isotonisk.

Oppsummering av oppfinnelsen

25 Foreliggende oppfinnere har funnet ut at noen antigener er spesielt følsomme overfor fenomenet kjent som "utsalting", og kan bli definert som preparering av et protein fra dets løsning ved metning med et salt så som natriumklorid. Foreliggende oppfinnere har funnet at sensitive antigener kan aggregere og presipitere ved en konsentrasjon av natriumklorid på så lavt som 150 mM.

30

Derfor tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en vandig isotonisk adjuvanssammensetning, omfattende en tolliknende reseptor (TLR) 4 agonist, og en saponin i en liposomal formulering, og et ikke-ionisk isotonisetsmiddel, hvor konsentrasjonen av natriumklorid i nevnte sammensetning er mindre enn 100 mM.

35

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en vandig isotonisk adjuvanssammensetning, omfattende en TLR-4-agonist, og en saponin i en liposomal

formulering, og et ikke-ionisk isotonisitetsmiddel hvor ionestyrken i nevnte sammensetning er mindre enn 100 mM.

I tillegg tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en vandig isotonisk adjuvanssammensetning som kan bli anvendt for et bredere område av proteinantigener, inkludert de som er mottakelige for "utsalting" og de som ikke er det.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en immunogen sammensetning omfattende et antigen eller antigenisk preparering, og en vandig adjuvanssammensetning omfattende en TLR-4-agonist, og en saponin i en liposomal formulering, og et ikke-ionisk isotonisk middel, hvor konsentrasjonen av natriumklorid i nevnte adjuvanssammensetning er mindre enn 100 mM, og fremgangsmåter for fremstilling av nevnte immunogene sammensetninger.

Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1. QS21 lytisk aktivitetskurve.

Figur 2. Prosentandel av hver 3D-MPL-kongener i forskjellige ASA-formuleringer.

Figur 3. Frysetørkesyklus anvendt for lyofilisering av PRAME/CpG.

Figur 4. En billedlig sammenlikning mellom PRAME og NYESO-1 gjenopprettet i ASA (150 mM NaCl) og ASA (sorbitol).

Figur 5. Humoral respons i mus immunisert med PRAME/CpG formulert med forskjellige adjuvanssammensetninger i eksperiment 1.

Figur 6. Tumorbeskyttelse i mus immunisert med PRAME/CpG formulert med forskjellige adjuvanssammensetninger i eksperiment 1.

Figur 7. Humoral respons i mus immunisert med PRAME/CpG formulert med ASA (150 mM NaCl), ASA (sorbitol), eller flytende formulering ASA (70 mM NaCl) i eksperiment 2.

Figur 8. CD4+ respons til mus immunisert med PRAME/CpG formulert med ASA (150 mM NaCl), ASA (sorbitol), eller flytende formulering ASA i eksperiment 2.

Figur 9. Tumorbeskyttelse i mus immunisert med PRAME/CpG formulert med ASA (150 mM NaCl), ASA (sorbitol, eller flytende formulering ASA i eksperiment 2.

5 **Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen**

Foreliggende oppfinnelse beskriver erstatning eller delvis erstatning av et isotonisk middel, som er et salt så som natriumklorid i en vandig adjuvanssammensetning med et ikke-ionisk isotonisitetsmiddel.

10 Det er velkjent at for parenteral administrering bør løsningene være fysiologisk isotone (dvs. ha en farmasøytisk akseptabel osmolalitet) for å unngå celleødeleggelse eller lysering. Et "isotonisitetsmiddel" er en forbindelse som blir fysiologisk tolerert, og tilveiebringer en egnet tonisitet til en formulering (f.eks. immunogene sammensetninger ifølge oppfinnelsen) for å forebygge netto strømming av vann over
15 cellemembraner som er i kontakt med formuleringen.

Vandige adjuvanssammensetninger er kjente, og som inneholder 100 mM natriumklorid eller mer, f.eks. adjuvanssystem A (ASA) i WO 2005/112991 og WO 2008/142133 eller de liposomale adjuvansene beskrevet i WO 2007/068907. Som
20 angitt i WO 2008/142133, kan slike adjuvanssammensetninger bli anvendt som fortynningsmiddel for å rekonstituere en lyofiliserte sammensetninger omfattende antigener eller antigene prepareringer før vaksinerings. Det er viktig at slike gjenopprettede sammensetninger er isotoniske, dvs. inneholder en saltkonsentrasjon vesentlig den samme som finnes i cellene i kroppen og blodet, slik at ingen
25 cellekrymping eller ekspansjon blir dannet ved injeksjon. Generelt blir natriumklorid anvendt som et isotonisitetsmiddel. Foreliggende oppfinnere har funnet at visse antigener er spesielt sensitive for "utsalting", en prosess hvor proteinene i løsning aggregerer eller koagulerer når løsningene inneholder høye konsentrasjoner av salt.

30 Konsentrasjonene av salt hvor proteinantigener aggregerer, varierer fra protein til protein. Foreliggende oppfinnere har identifisert en gruppe antigener som vil aggregere ved relativt lave konsentrasjoner av salt, f.eks. ved omtrent 100 mM eller mindre natriumklorid. Dette betyr at visse kjente adjuvanssammensetninger ikke er egnet for rekonstitusjon av, eller anvendelse med, sammensetninger omfattende disse
35 antigenene, hvor aggregasjon oppstår.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer vandige adjuvanssammensetninger som kan bli anvendt ved slike antigener, dvs. de antigenene som aggregerer ved saltkonsentrasjoner på under 100 mM natriumklorid. Vandige adjuvanssammensetninger ifølge oppfinnelsen omfatter en TLR-4-agonist, og et saponin i en liposomal formulering, og et ikke-ionisk isotonisitetsmiddel hvor konsentrasjonen av natriumklorid i adjuvanssammensetninger er under omtrent 100 mM, f.eks. under 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM eller 15 mM. I en bestemt utførelsesform er konsentrasjonen av natriumklorid i adjuvanssammensetningen under 10 mM, eller ved eller under 5 mM. I en ytterligere spesifikk utførelsesform er adjuvanssammensetningen vesentlig fri for natriumklorid. Med vesentlig fri menes at konsentrasjonen av natriumklorid er ved eller veldig nær null mM (dvs. 1 mM, 2 mM eller 3 mM).

Fagpersonen kan lett teste for konsentrasjonen av både natrium (Na^+) og klorid (Cl^-) ioner ved anvendelse av kjente teknikker og sett. For eksempel kan natrium bli bestemt ved anvendelse av et sett så som natriumenzymatisk analysesett (katalog nummer: BQ011EAEL) fra Biosupply. Klorid kan bli bestemt ved anvendelse av et sett så som klorid enzymatisk analysesett (katalog nummer BQ006EAEL) fra Biosupply.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en vandig isotonisk adjuvanssammensetning omfattende en TLR-4-agonist, og et saponin i en liposomal formulering, og et ikke-ionisk isotonisitetsmiddel hvor ionestyrken er mindre enn 100 mM, f.eks. under 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM eller 15 mM. I en spesiell utførelsesform er ionestyrken i adjuvanssammensetningen under 10 mM, eller er ved eller under 5 mM. I en ytterligere spesifikk utførelsesform har adjuvanssammensetningen en ionestyrke som er ved eller veldig nær null mM.

Ionestyrken til en adjuvans eller immunogen sammensetning ifølge oppfinnelsen kan bli målt ved anvendelse av teknikker kjent for fagfolk, f.eks. ved anvendelse av et konduktivitetsmeter.

Et egnet ikke-ionisk isotonisitetsmiddel for anvendelse i en vandig adjuvanssammensetning ifølge oppfinnelsen, som skal bli kombinert med en antigensammensetning, må være egnet for anvendelse i mennesker, og også være kompatibel med antigenene innenfor den antigene sammensetningen, og videre kompatibel med andre komponenter av adjuvanssammensetningen.

Spesielt må den vandige adjuvanssammensetningen være slik at antigenene innenfor den antigene sammensetningen, når kombinert med adjuvanssammensetningen, har evne til å både forbli i løsning, og beholde deres immunogenisitet.

5 I én utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er egnede ikke-ioniske isotoniseringsmidler polyoler, sukre (spesielt sukrose, fruktose, dekstrose eller glukose) eller aminosyrer så som glysin. I én utførelsesform er polyolen en sukkeralkohol, spesielt en C3-6 sukkeralkohol. Eksempler på sukkeralkoholer inkluderer glyserol, erytritol, treitol, arabitol, xylitol, ribitol, sorbitol, mannitol, dulsitol og iditol. I et
10 spesifikt eksempel på denne utførelsesformen er et egnet ikke-ionisk isotoniseringsmiddel sorbitol. I en bestemt utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det ikke-ioniske isotoniseringsmidlet i sammensetningen ifølge oppfinnelsen sukrose og/eller sorbitol.

15 I én utførelsesform er en egnet konsentrasjon av polyol innenfor den vandige adjuvanssammensetningen mellom omtrent 3 og omtrent 15 % (v/v), spesielt mellom omtrent 3 og omtrent 10 % (v/v), f.eks. mellom omtrent 3 og omtrent 7 % (v/v), f.eks. mellom omtrent 4 og omtrent 6 % (v/v). I et spesifikt eksempel av denne utførelsesformen er polyol sorbitol.

20

Den vandige adjuvanssammensetningen omfatter en tolliknende reseptoragonist (TLR) 4-agonist, og en saponin i en liposomal formulering. Med dette menes det at saponinet og TLR-4-agonisten er formulert med liposomer.

25 Betegnelsen "liposomer" refererer generelt til uni- eller multilamellære (spesielt 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 lamellære avhengig av antall lipidmembraner som blir dannet) lipidstrukturer innesluttende et vandig indre. Liposomer og liposomformuleringer er velkjente innenfor fagområdet. Lipider, som har evne til å danne liposomer, inkluderer alle forbindelser som har fett eller fettliknende egenskaper. Lipider som kan utgjøre
30 lipidene i liposomene kan bli valgt fra gruppen omfattende glyserider, glyserofosfolipider, glyserofosfofinollipider, sulfolipider, sfingolipider, fosfolipider, isoprenolider, steroider, steariner, steroler, arkeolipider, syntetiske kationiske lipider, og karbohydratinneholdende lipider.

35 I én utførelsesform omfatter liposomene et fosfolipid. Egnede fosfolipider inkluderer (men er ikke begrenset til), fosfocholin (PC) som er et mellomprodukt ved syntese av fosfatidylcholin; naturlige fosfolipidderivater: eggfosfocholin, egg fosfocholin,

soyafosfocholin, hydrogenert soyafosfocholin, sfingomyelin som naturlige fosfolipider; og syntetiske fosfolipidderivater: fosfocholin (didekanoyl-L- α -fosfatidylcholin [DDPC], dilauroylfosfatidylcholin [DLPC], dimyristoylfosfatidylcholin [DMPC], dipalmitoylfosfatidylcholin [DPPC], distearoylfosfatidylcholin [DSPC],

5 dioleoylfosfatidylcholin [DOPC], 1-palmitoyl, 2-oleoylfosfatidylcholin [POPC], dielaidoylfosfatidylcholin [DEPC]), fosfoglyserol (1,2-dimyristoyl-sn-glysero-3-fosfoglyserol [DMPG], 1,2-dipalmitoyl-sn-glysero-3-fosfoglyserol [DPPG], 1,2-distearoyl-sn-glysero-3-fosfoglyserol [DSPG], 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glysero-3-fosfoglyserol [POPG]), fosfatidinsyre (1,2-dimyristoyl-sn-glysero-3-fosfatidinsyre

10 [DMPA], dipalmitoylfosfatidinsyre [DPPA], distearoyl-fosfatidinsyre [DSPA]), fosfoetanolamin (1,2-dimyristoyl-sn-glysero-3-fosfoetanolamin [DMPE], 1,2-dipalmitoyl-sn-glysero-3-fosfoetanolamin [DPPE], 1,2-distearoyl-sn-glysero-3-fosfoetanolamin DSPE 1,2-dioleoyl-sn-glysero-3-fosfoetanolamin [DOPE]), fosfoserin, polyetylglyserol [PEG] fosfolipid (mPEG-fosfolipid, polyglyserin-fosfolipid,

15 funksjonalisert-fosfolipid, terminalaktivert-fosfolipid). I én utførelsesform omfatter liposomene 1-palmitoyl-2-oleoyl-glysero-3-fosfoetanolamin. I én utførelsesform blir høyt rensset fosfatidylcholin anvendt, og kan bli valgt fra gruppen omfattende fosfatidylcholin (EGG), fosfatidylcholinhydrogenert (EGG) fosfatidylcholin (SOYA) fosfatidylcholinhydrogenert (SOYA). I en ytterligere utførelsesform omfatter

20 liposomene posfatidyletanolamin [POPE] eller et derivat derav.

Liposomstørrelsen kan variere fra 30 nm til flere μm , avhengig av fosfolipidsammensetningen og metoden anvendt for fremstilling derav. I bestemte utførelsesformer ifølge oppfinnelsen vil liposomstørrelsen være i området på 50 nm til

25 500 nm, og i ytterligere utførelsesformer 50 nm til 200 nm. Dynamisk laserlysspredning er en metode anvendt for å måle størrelsen på liposomene som er velkjente for fagfolk innenfor dette området.

Liposomene inneholder fortrinnsvis et nøytralt lipid, f.eks. fosfatidylcholin, som er

30 fortrinnsvis ikke-krystallinsk ved romtemperatur, f.eks. eggeplommefosfatidylcholin, dioleoylfosfatidylcholin (DOPC) eller dilaurylfosfatidylcholin. I en bestemt utførelsesform inneholder liposomene ifølge foreliggende oppfinnelsen DOPC. Liposomene kan også inneholde et ladet lipid, som øker stabiliteten til liposom-saponinstrukturen for liposomer bestående av mettede lipider. I disse tilfellene er

35 mengden av ladet lipid fortrinnsvis 1 til 20 % v/v, fortrinnsvis 5 til 10 %. Forholdet mellom sterol og fosfolipid er 1 til 50 % (mol/mol), fortrinnsvis 20 til 25 %.

En spesielt egnet saponin for anvendelse i foreliggende oppfinnelse er Quil A og derivater derav. Quil A er en saponinpreparering isolert fra Sør Amerika treet *Quillaja Saponiara Molina* og ble først beskrevet av Dalsgaard et al. i 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, bind 44, Springer Verlag, Berlin, s. 243-254) for å ha adjuvansaktivitet. Rensede fragmenter av Quil A er blitt isolert ved HPLC som beholder adjuvansaktivitet uten toksisiteten assosiert med Quil A (EP 0 362 278), f.eks. QS7 og QS21 (også kjent som QA7 og QA21). QS-21 er et naturlig saponin avledet fra barken til *Quillaja saponaria Molina*, som induserer CD8+ cytotoksiske T-celler (CTLs), Th1-celler, og en predominant IgG2a-antistoffrespons. QS21 er et foretrukket saponin i sammenheng med foreliggende oppfinnelse.

I en egnet form ifølge foreliggende oppfinnelse er saponinadjuvans innenfor den immunogene sammensetningen et derivat av *saponaria molina* quil A, fortrinnsvis en immunologisk aktiv fraksjon av Quil A, så som QS-17 eller QS-21, fortrinnsvis QS-21.

I en spesifikk utførelsesform er QS21 tilveiebrakt i dets mindre reaktogene sammensetning, hvor det blir quenched med en eksogen sterol, så som kolesterol for eksempel. Flere bestemte former av mindre reaktogene sammensetninger hvori QS21 blir quenched med en eksogen kolesterol eksisterer. Saponinet/sterolen er i en liposomal formuleringsstruktur (WO 96/33739, eksempel 1).

Egnede steroler inkluderer β -sitosterol, stigmasterol, ergosterol, ergokalsiferol og kolesterol. I én bestemt utførelsesform omfatter adjuvanssammensetningen kolesterol som sterol. Disse sterolene er velkjente innenfor fagområdet, f.eks. der kolesterol beskrevet i Merck Index, 11. utgave, side 341, som en naturlig forekommende sterol funnet i dyrefett.

Hvor den aktive saponinfraksjonen er QS21, vil forholdet mellom QS21:sterol typisk være i størrelsesorden 1:100 til 1:1 (v/v), fortrinnsvis mellom 1:10 til 1:1 (v/v), og fortrinnsvis 1:5 til 1:1 (v/v). Overskudd av sterol er fortrinnsvis tilstede, idet forholdet mellom QS21:sterol er minst 1:2 (v/v). I én utførelsesform er forholdet mellom QS21:sterol 1:5 (v/v). Sterolen er fortrinnsvis kolesterol.

Den vandige adjuvanssammensetningen omfatter en tolliknende reseptor 4 (TLR-4) agonist. Med "TLR-agonist" menes en komponent som har evnen til å forårsake en signaliseringsrespons gjennom en TLR-signaliseringsvei, enten som en direkte ligand, eller indirekte gjennom dannelsen av endogen eller eksogen ligand (Sabroe et al., JI

2003 p1630-5). En TLR4-agonist har evnen til å forårsake en signaliseringsrespons gjennom en TLR-4-signaliseringsvei. Et egnet eksempel på en TLR-4-agonist er et lipopolysakkarid, fortrinnsvis et ikke-toksisk derivat av lipid A, fortrinnsvis monofosforyllipid A, eller mer spesielt 3-deacylert monofosforyllipid A (3D-MPL).

5

3D-MPL blir solgt under navnet MPL av GlaxoSmithKline Biologicals N.A., og blir referert til gjennom dokumentet som MPL eller 3D-MPL, se f.eks. US patentene nr. 4 436 727, 4 877 611, 4 866 034 og 4 912 094. 3D-MPL fremmer primært CD4+ T-celleresponser med en IFN- γ (Th1) fenotype. 3D-MPL kan bli produsert ifølge fremgangsmåtene beskrevet i GB 2 220 211 A. Kjemisk er det en blanding av 3-deacylert monofosforyllipid A med 4, 5 eller 6 acylerte kjeder. I sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse kan små partikkel 3D-MPL bli anvendt for å danne den vandige adjuvanssammensetningen. Små partikkel 3D-MPL har en partikkelstørrelse slik at det kan bli sterilfiltrert gjennom et 0,22 μ m filter. Slike prepareringer er beskrevet i WO 94/21292. Det er foretrukket at pulverformet 3D-MPL blir anvendt for å danne de vandige adjuvanssammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse.

10

Andre TLR-4-agonister som kan bli anvendt er alkylglukosaminidfosfater (AGPs), så som de beskrevet i WO 98/50399 eller US patent nr. 6 303 347 (fremgangsmåte for fremstilling av AGPs er også beskrevet), fortrinnsvis RC527 eller RC529, eller farmasøytisk akseptable salter av AGPs som beskrevet i US patent nr. 6 764 840.

20

Andre egnede TLR-4-agonister er beskrevet i WO 2003/011223 og i WO 2003/099195, så som forbindelse I, forbindelse II og forbindelse III beskrevet på sidene 4-5 i WO 2003/011223 eller på sidene 3 til 4 i WO 2003/099195, og spesielt de forbindelsene som er beskrevet i WO 2003/011223, som ER80322, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 og ER804764. For eksempel er en egnet TLR-4-agonist ER804057.

25

Vandige adjuvanssammensetninger ifølge oppfinnelsen omfatter både et saponin og en TLR-4-agonist. I en bestemt utførelsesform omfatter den vandige adjuvanssammensetningen QS21 og 3D-MPL.

30

En TLR-4-agonist så som lipopolysakkarid, så som 3D-MPL, kan bli anvendt i mengder på mellom 1 og 100 μ g pr. human dose av adjuvanssammensetning. 3D-MPL kan bli anvendt i et nivå på omtrent 50 μ g, f.eks. mellom 40 til 60 μ g, fortrinnsvis mellom 45 til 55 μ g, eller mellom 49 til 51 μ g eller 50 μ g. I en ytterligere utførelsesform omfatter

35

den humane dosen av adjuvanssammensetning 3D-MPL i et nivå på omtrent 25 µg, for eksempel mellom 20 til 30 µg, fortrinnsvis mellom 21 til 29 µg, eller mellom 22 til 28 µg, eller mellom 28 til 27 µg, eller mellom 24 til 26 µg, eller 25 µg.

5 Et saponin, så som QS21, kan bli anvendt i mengder på mellom 1 og 100 µg pr. human dose av adjuvanssammensetningen. QS21 kan bli anvendt i et nivå på omtrent 50 µg, f.eks. mellom 40 til 60 µg, fortrinnsvis mellom 45 til 55 µg, eller mellom 49 og 51 µg, eller 50 µg. I en ytterligere utførelsesform omfatter den humane dosen av adjuvanssammensetning QS21 i et nivå på omtrent 25 µg, f.eks. mellom 20 til 30 µg,
10 fortrinnsvis mellom 21 til 29 µg, eller mellom 22 til 28 µg, eller mellom 28 og 27 µg, eller mellom 24 og 26 µg, eller 25 µg.

Både TLR4-agonist og saponin er tilstede i den vandige adjuvanssammensetningen, idet vektforholdet mellom TLR4-agonist og saponin er fortrinnsvis mellom 1:5 til 5:1,
15 fortrinnsvis 1:1. For eksempel, hvor 3D-MPL er tilstede i en mengde på 50 µg eller 25 µg, kan egnet QS21 også være tilstede i en mengde på 50 µg eller 25 µg, henholdsvis, pr. human dose av den vandige adjuvanssammensetningen.

Når adjuvansen skal bli kombinert med en flytende form av en
20 antigensammensetning, vil adjuvanssammensetningen være i en human dose egnet volum, som er omtrent halvparten av det antatte endelige volum av den humane dosen. F.eks. et 500 µl volum av adjuvans for en ment endelig human dose på 1 ml, eller en 250 µl volum for en antatt slutthuman dose på 0,5 ml.

Adjuvanssammensetningen blir fortynnet når kombinert med
25 antigensammensetningen, for å tilveiebringe den endelige humane dosen av vaksinen. Det endelige volumet av en slik dose vil selvfølgelig variere avhengig av det opprinnelige volumet av adjuvanssammensetningen og volumet av antigensammensetning tilsatt til adjuvanssammensetningen. I en alternativ utførelsesform blir det vandige adjuvans anvendt for å gjenopprette en lyofilisert
30 antigensammensetning. I denne utførelsesformen er human dose egnet volum av adjuvanssammensetningen omtrent lik det endelige volumet av den humane dosen. Den flytende adjuvanssammensetningen blir tilsatt til beholderen inneholdende den lyofiliserte antigensammensetningen, og anvendt for å gjenopprette den lyofiliserte antigensammensetningen.

35

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer derfor en fremgangsmåte for fremstilling av en immunogen sammensetning omfattende trinnene av å gjenopprette en lyofilisert

sammensetning omfattende minst ett antigen eller antigenpreparering som beskrevet heri, med en vandig adjuvanssammensetning som definert heri.

5 I en ytterligere utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det tilveiebrakt et sett omfattende (i) en lyofilisert sammensetning omfattende et antigen eller antigenpreparering, og (ii) en vandig adjuvanssammensetning som beskrevet heri.

10 I en spesiell utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det tilveiebrakt et sett omfattende (i) en lyofilisert sammensetning omfattende et antigen eller antigenpreparering som beskrevet heri, og (ii) en vandig adjuvanssammensetning som beskrevet heri.

I én utførelsesform omfatter den lyofiliserte sammensetningen videre en TLR-9-agonist, f.eks. som angitt i WO 2008/142133.

15 I en alternativ utførelsesform er det tilveiebrakt et sett hvor CpG ikke er ko-lyofilisert med antigenet. CpG kan bli enten blandet med den vandige adjuvanssammensetningen, eller være i en separat beholder i vandig eller lyofilisert form. Følgelig, i en alternativ utførelsesform, er det tilveiebrakt et sett omfattende (i) en lyofilisert sammensetning omfattende et antigen som beskrevet heri; (ii) en vandig adjuvanssammensetning; og (iii) en TLR9-agonist (f.eks. et immunostimulatorisk CpG oligonukleotid).

20

TLR-9-agonisten for anvendelse i settene ifølge oppfinnelsen er et immunostimulatorisk oligonukleotid, spesielt et oligonukleotid inneholdende et umetylert CpG-motiv. Slike oligonukleotider er velkjente, og er beskrevet f.eks. i WO 96/02555, WO 99/33488 og US 5 865 462. Egnede TLR9-agonister for anvendelse i de immunogene sammensetningene beskrevet heri er CpG-inneholdende oligonukleotider, eventuelt inneholdende to eller flere dinukleotid CpG-motiver separert av minst tre, fortrinnsvis minst seks eller flere nukleotider. Et CpG-motiv er et cytosinnukleotid etterfulgt av et guaninnukleotid.

25

30

I én utførelsesform er internukleotidbindingen i oligonukleotidet fosforditioat-, eller muligens en fosforotioatbinding, til tross for at fosfodiester- og andre internukleotidbindinger også kan bli anvendt, inkludert oligonukleotider med blandede internukleotidbindinger. Metoder for produsering av fosforotioatoligonukleotider eller fosforditioat er beskrevet i US 5 666 153, US 5 278 302 og WO 95/26204. Oligonukleotid omfattende forskjellige internukleotidbindinger er betraktet, f.eks.

35

blandede fosforotioatfosfodiesterer. Andre internukleotidbindinger som stabiliserer oligonukleotider kan bli anvendt.

Eksempler på CpG oligonukleotider egnet for innlemming i de immunogene sammensetningene beskrevet heri, har følgende sekvenser. I én utførelsesform inneholder disse sekvensene fosforotioatmodifiserte internukleotidbindinger.

OLIGO 1 (SEKV. ID nr. 1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
 OLIGO 2 (SEKV. ID nr. 2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
 OLIGO 3 (SEKV. ID nr. 3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
 OLIGO 4 (SEKV. ID nr. 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
 OLIGO 5 (SEKV. ID nr. 5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

Alternative CpG oligonukleotider kan omfatte sekvensene ovenfor, idet de har inkonsekvensielle delesjoner eller addisjoner dertil.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en immunogen sammensetning omfattende et antigen eller antigenpreparering, og en vandig adjuvanssammensetning som beskrevet heri, hvor den nevnte immunogene sammensetning har en konsentrasjon av natriumklorid under omtrent 100 mM, f.eks. under 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM eller 15 mM. I en bestemt utførelsesform er konsentrasjonen av natriumklorid i den immunogene sammensetningen under 10 mM, eller ved eller under omtrent 5 mM. I en ytterligere spesifikk utførelsesform er den immunogene sammensetningen vesentlig fri for natriumklorid. Med vesentlig fri menes det at konsentrasjonen av natriumklorid er ved eller veldig nær null mM.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en immunogen sammensetning omfattende et antigen eller antigenpreparering, og en vandig adjuvanssammensetning som beskrevet heri, hvori ionestyrken til den immunogene sammensetningen er mindre enn 100 mM, f.eks. under 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM eller 15 mM. I en spesiell utførelsesform er ionestyrken i den immunogene sammensetningen under 10 mM, eller er ved eller under 5 mM. I en ytterligere spesifikk utførelsesform har den immunogene sammensetningen en ionestyrke som er ved eller veldig nær null mM.

Det vil være innlysende at dersom den immunogene sammensetningen er blitt dannet ved anvendelse av en lyofilisert antigen sammensetning omfattende en TLR-9-agonist, så vil den immunogene sammensetningen også omfatte en TLR-9-agonist. Derfor er det i én utførelsesform tilveiebrakt en immunogen sammensetning omfattende et antigen eller antigenpreparering, en TLR-9-agonist, og en TLR-4-agonist, og ved en saponin i en liposomal formulering, hvor den immunogene sammensetningen har en saltkonsentrasjon under omtrent 100 mM, f.eks. under 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM eller 15 mM. I et spesifikt eksempel på denne utførelsesformen er konsentrasjonen av natriumklorid i den immunogene sammensetningen under 10 mM, eller er ved eller under omtrent 5 mM.

I en ytterligere utførelsesform er det tilveiebrakt en immunogen sammensetning omfattende et antigen eller antigenpreparering, en TLR-9-agonist, og en TLR-4-agonist og en saponin i en liposomal formulering, hvor ionestyrken er mindre enn 100 mM, f.eks. under 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM eller 15 mM. I en spesiell utførelsesform er ionestyrken i den immunogene sammensetningen under 10 mM, eller er ved eller under 5 mM. I en ytterligere spesifikk utførelsesform har den immunogene sammensetningen en ionestyrke som er ved eller veldig nær null mM.

20

I en ytterligere utførelsesform er det tilveiebrakt en immunogen sammensetning omfattende et antigen eller antigenpreparering, en TLR-9-agonist og en 3D-MPL og QS21 i en liposomal formulering, hvor den immunogene sammensetningen har en saltkonsentrasjon under omtrent 100 mM, f.eks. under 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM eller 15 mM. I et spesifikt eksempel for denne utførelsesformen er konsentrasjonen av natriumklorid i den immunogene sammensetningen under 10 mM, eller på eller under omtrent 5 mM.

I en ytterligere utførelsesform er det tilveiebrakt en immunogen sammensetning omfattende et antigen eller antigenpreparering, en TLR9-agonist, og en 3D-MPL og QS21, i en liposomal formulering, hvor ionestyrken er mindre enn 100 mM, f.eks. under 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM eller 15 mM. I en spesiell utførelsesform er ionestyrken i den immunogene sammensetningen under 10 mM, eller er på eller under 5 mM. I en ytterligere spesifikk utførelsesform har den immunogene sammensetningen en ionestyrke som er på eller meget nær null mM.

35

I en ytterligere utførelsesform er det tilveiebrakt en immunogen sammensetning omfattende ert antigen eller antigenpreparering og 3D-MPL og QS21, i en liposomal formulering, og et CpG oligonukleotid, hvor den immunogene sammensetningen har en saltkonsentrasjon under omtrent 50 mM, f.eks. under omtrent 40 mM, 30 mM, 20 mM eller 15 mM. I et spesifikt eksempel ifølge denne utførelsesformen er konsentrasjonen av natriumklorid i den immunogene sammensetningen under 10 mM, eller er på eller under 5 mM.

I én utførelsesform er antigenet eller den antigene prepareringen anvendt i de immunogene sammensetningene i et hvilket som helst antigen som presipiterer, koagulerer eller aggregerer etter å ha blitt blandet og/eller oppløst med en løsning omfattende en konsentrasjon av natriumklorid, som er høyere enn 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM eller 100 mM.

I én utførelsesform er antigenet eller antigenprepareringen anvendt i de immunogene sammensetningene ifølge oppfinnelsen et hvilket som helst antigen som presipiterer, koagulerer eller aggregerer etter å ha blitt blandet og/eller oppløst en løsning hvor ionestyrken er mindre enn 100 mM, f.eks. under 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 15 mM eller 10 mM. I en bestemt utførelsesform presipiterer, koagulerer eller aggregerer antigenet ifølge oppfinnelsen i løsninger med en ionestyrke på eller under 5 mM.

Fagpersonen innenfor området kan bestemme om et antigen oppfyller denne definisjonen ved blanding av antigenet i en slik løsning. Et antigen som ikke oppfyller denne definisjonen vil fortsatt være i løsning, dvs. væsken vil fortsatt være klar uten noen presipitering, 24 timer etter å ha blitt oppløst. Et antigen som presipiterer, koagulerer eller aggregerer etter å ha blitt blandet og/eller oppløst i en løsning, kan ses ved visuell inspisering å bli presipitert ved slørethet av løsningen. I tillegg kan aggregasjon som ikke er visuelt detekterbart bli observert ved anvendelse av metodene kjent for fagfolk innenfor dette området, som inkluderer, men som ikke er begrenset til SEC-HPLC.

I en ytterligere utførelsesform blir antigenet eller antigenprepareringen avledet fra HIV, *Neisseria meningitidis*, eller et tumorassosiert antigen. I en bestemt utførelsesform er det tumorassosierte antigenet valgt fra enten PRAME eller NYESO-1, eller et fragment eller derivat derav.

PRAME (også kjent som DAGE) er et antigen som kan bli anvendt som tumorassosiert antigen ifølge foreliggende oppfinnelse. Antigenet og dets preparering er beskrevet i US patent nr. 5 830 753. PRAME finnes i Annotated Human Gene Database H-Inv DB under aksesjonsnumrene: U65011.1, BC022008.1, AK129783.1, BC014974.2,
 5 CR608334.1, AF025440.1, CR591755.1, BC039731.1, CR623010.1, CR611321.1, CR618501.1, CR604772.1, CR456549.1 og CR620272.1.

Fusjonsproteiner som omfatter PRAME-antigenet kan også bli anvendt. PRAME eller et fragment eller derivat derav kan bli anvendt, eventuelt i form av et fusjonsprotein
 10 med en heterolog fusjonspartner. Spesielt kan PRAME-antigenet fortrinnsvis bli anvendt i form av et fusjonsprotein med *Haemophilus influenzae B* protein D, eller en del derav, eller derivat derav. Delen av protein D som kan bli anvendt fortrinnsvis inkluderer ikke sekresjonssekvensen eller signalsekvensen.

15 Fusjonspartnerproteinet omfatter fortrinnsvis aminosyrene Met-Asp-Pro på eller innenfor den N-terminale enden av fusjonsproteinsekvensen, og hvor fusjonspartnerproteinet ikke inkluderer sekresjonssekvensen eller signalsekvensen til protein D. For eksempel kan fusjonspartnerproteinet omfatte eller bestå av omtrent eller nøyaktig aminosyrene 17 til 127, 18 til 127, 19 til 127 eller 20 til 127 av protein
 20 D. Egnede PRAME-antigener basert på fusjonsproteiner med protein D er beskrevet i WO 2008/087102.

NY-ESO-1 er et annet antigen som kan bli anvendt som tumorassosiert antigen ifølge foreliggende oppfinnelse. NY-ESO-1 eller et fragment eller derivat derav kan bli
 25 anvendt, eventuelt i form av et fusjonsprotein med en heterolog fusjonspartner. NY-ESO-1 er beskrevet i US 5 804 381. Proteinet NY-ESO-1 er omtrent 180 aminosyrer i lengde, og kan bli beskrevet å bestå av tre regioner: (a) en N-terminal region ble omtrent aminosyrene 1-70, (b) en sentral region med omtrent aminosyrene 71-134, og (c) en C-terminal region med omtrent aminosyrene 135-180. NY-ESO-1 kan bli
 30 anvendt som et fusjonsprotein f.eks. som en fusjon med LAGE-1, som er et ytterligere CT-antigen, eller et fragment derav, se WO 2008/089074. Hvor fragmentene av NY-ESO-1 blir anvendt, innbefatter disse fortrinnsvis én eller flere MHC klasse 1 eller klasse 2 epitoper, f.eks. de som er kjent som A31, DR1, DR2, DR4, DR7, OP4, B35, B51, Cw3, Cw6 og A1 (se WO 2008/089074).

35

Til tross for at de ikke er sensitive overfor NaCl i seg selv, er et ytterligere antigen som kan bli anvendt i henhold til foreliggende oppfinnelse et MAGE-antigen eller et

fragment eller derivat derav, f.eks. av MAGE-3-familien, så som MAGE-A3. MAGE-3-antigener er f.eks. blitt beskrevet som egnede for å bli formulert i kombinasjon med NY-ESO-1 – se WO 2005/105139.

5 MAGE-antigener så som MAGE-A3 kan bli anvendt som det er, eller i form av et derivat, f.eks. et kjemisk modifisert derivat og/eller i form av et fusjonsprotein med en heterolog fusjonspartner. F.eks. kan MAGE-antigenet inneholde reduserte disulfidbroer for å danne frie tioler som er blitt derivatisert, f.eks. med karboksamid eller karboksymetylgrupper, se WO 99/40188. Spesielt kan MAGE-antigener fortrinnsvis bli
10 anvendt i form av et fusjonsprotein med *Haemophilus influenzae B* protein D eller en del derav, eller et derivat derav. For eksempel kan omtrent første tredjedel av protein D eller N-terminale 100 til 110 aminosyrer av protein D bli anvendt som fusjonspartneren, se WO 99/40188.

15 I en ytterligere utførelsesform kan antigenet eller antigensammensetningen være et derivat av et hvilket som helst antigen beskrevet heri. Som anvendt heri, refererer betegnelsen "derivat" til et antigen som er modifisert i forhold til dets naturlig forekommende form. Derivater ifølge foreliggende oppfinnelse er tilstrekkelig lik de native antigenene til å beholde de antigene egenskapene, og beholde evnen til å
20 muliggjøre en immunrespons bli øket overfor det native antigenet. Om et gitt derivat øker en slik immunrespons kan bli målt med en egnet immunologisk analyse så som ELISA eller flow cytometri.

Betegnelsen "fragment" som anvendt heri, refererer til fragmenter av et
25 tumorassosiert antigen eller derivat av antigenet, som inneholder minst én epitope, f.eks. en CTL-epitope, typisk et peptid med minst 8 aminosyrer. Fragmenter av minst 8, f.eks. 8-10 aminosyrer eller opp til 20, 50, 60, 70, 100, 150 eller 200 aminosyrer i lengde, blir betraktet å falle innenfor omfanget av oppfinnelsen dersom fragmentet demonstrerer antigenisitet, dvs. at hovedepitopene (f.eks. CTL-epitopene) blir
30 tilbakeholdt av fragmentet, og fragmentet har evne til å indusere en immunrespons som kryssreagerer med det naturlig forekommende tumorassosierte antigenet. Eksempler å fragmenter kan være 8-10, 10-20, 20-50, 50-60, 60-70, 70-100, 100-150, 150-200 aminosyreresidier i lengde (inkludert en hvilken som helst verdi innenfor disse områdene).

35 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en immunogen sammensetning som beskrevet heri, for anvendelse i medisin, spesielt for behandling og/eller forebygging av sykdom.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en immunogen sammensetning som beskrevet heri for anvendelse ved immunoterapeutisk behandling av cancer.

I spesifikke eksempler på denne utførelsesformen tilveiebringer oppfinnelsen en immunogen sammensetning som beskrevet heri, for anvendelse ved immunoterapeutisk behandling ved én eller flere cancerformer valgt fra gruppen bestående av prostata-, bryst-, kolorektal-, lunge-, bukspyttkjertel-, nyre-, ovarie- eller melanomcancer.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en metode for terapi eller profylakse av cancer i et individ som trenger det, omfattende trinnet av å tilveiebringe til individet en effektiv mengde av en immunogen sammensetning som beskrevet her.

I spesifikke eksempler på denne utførelsesformen tilveiebringer oppfinnelsen en metode for terapi eller profylakse av en cancerform valgt fra gruppen bestående av prostata-, bryst-, kolorektal-, lunge-, bukspyttkjertel-, nyre-, ovarie- eller melanomcancerformer.

Foreliggende oppfinnelse vil nå bli ytterligere beskrevet ved hjelp av følgende ikke-begrensede eksempler.

Eksempler

Eksempel 1: Fremstilling av adjuvanssammensetning ASA (sorbitol)

En adjuvanssammensetning ble dannet som omfatter 3-deacylert MPL og QS21 i en liposomal formulering. Dette ble fremstilt som følger:

A. Metode for fremstilling av liposomer:

En blanding av lipid (så som syntetisk fosfatidylcholin), kolesterol og 3-O-dacylert MPL i organisk løsningsmiddel ble tørket ned under vakuum. En vandig løsning (så som fosfatbufret saltvann [100 mM NaCl, 20 mM fosfat pH 6,1]) ble deretter tilsatt, og beholderen agitert helt til all lipid var i suspensjon. Denne suspensjonen ble deretter prehomogenisert med høy skjærblander, og deretter høytrykkhomogenisert helt til størrelsen på liposomene var redusert til rundt 90 nm+/-10 nm målt ved DLS. Liposomer ble deretter sterilt filtrert.

B. ASA-formulering:

Trinn 1: Fortynning av konsentrerte liposomer

Na₂/K-fosfatbuffer 100 mM pH 6,1 når fortynnet ti ganger, ble satt til vann for injeksjon for å nå en 10 mM fosfatbufferkonsentrasjon i den endelige formuleringen. En 30 % (v/v) sorbitolløsning i vann for injeksjon (WFI) ble deretter tilsatt, for å oppnå en konsentrasjon på 4,7 % i den endelige formuleringen – dette ble omrørt i 15 til 45 minutter ved romtemperatur.

Konsentrerte liposomer (dannet av DOPC, kolesterol og MPL ved henholdsvis 40 mg/ml, 10 mg/ml og 2 mg/ml), ble deretter tilsatt til blandingen for å oppnå en konsentrasjon på 100 µg/ml av MPL i den endelige formuleringen.

10

Blandingen ble deretter omrørt i 15 til 45 minutter ved romtemperatur.

Trinn 2: QS21-tilsetning

Ved anvendelse av en peristaltisk pumpe ble QS21 bulkmasse (tint 24 t ved RT, eller 2 dager ved 4°C i 200 ml) ble tilsatt med en peristaltisk pumpe i en rate på 200 ml/min. til de fortynnede liposomene under magnetisk røring for å oppnå en 100 µg/ml konsentrasjon i den endelige formuleringen. Blandingen ble omrørt i 15 til 45 minutter.

Endelig ASA-formulering inneholdt 100 µg MPL/ml og 100 µg QS21/ml.

Trinn 3: pH ble undersøkt å være 6,1 +/- 0,3.

Trinn 4: Sterilfiltrering

Sterilfiltrering ble realisert ved en konstant rate på 400 ml/min. på et polyetersulfon (PES) filter fra PALL Corporation.

Trinn 5: Lagring ved +2°C til +8°C

Adjuvanssammensetningen ble oppnådd, som omfatter 3-O-deacylert MPL og QS21 i en liposomal formulering, og inneholdende sorbitol (angitt ASA (sorbitol)), ble deretter lagret ved 4°C.

Eksempel 2: Fremstilling av adjuvanssammensetning ASA (150 mM NaCl)

A. Metode for fremstilling av liposomer:

En blanding av lipid (så som syntetisk fosfatidylcholin), kolesterol og 3-deacylert MPL (3D-MPL) i organisk løsningsmiddel ble tørket ned under vakuum. Fosfatbufret saltvann ble deretter tilsatt, og beholderen agitert helt til alt lipid var i suspensjon.

Denne suspensjon WAs ble deretter prehomogenisert med høy skjærblanding, og deretter høytrykkshomogenisert til liposomstørrelsen ble redusert til rundt 90 nm +/- 10 nm målt ved DLS. Liposomene ble deretter sterilfiltrert på 0,22 µm PES-membran.

5 **B. ASA-formulering:**

Trinn 1: Fortynning av konsentrerte liposomer

Na₂/K-fosfatbuffer 100 mM pH 6,45 ble fortynnet ti ganger, og NaCl 1,5 M ble tilsatt til vann for injeksjon for å oppnå henholdsvis 10 mM fosfat og NaCl 150 mM konsentrasjoner i sluttformuleringen. Denne blandingen ble omrørt i 5 minutter ved romtemperatur. Konsentrerte liposomer (dannet av DOPC, kolesterol og MPL ved henholdsvis 40 mg/ml, 10 mg/ml, og 2 mg/ml) ble deretter tilsatt til blandingen for å nå en konsentrasjon på 100 µg/ml MPL i den endelige formuleringen. Blandingene ble deretter omrørt i 5 til 15 minutter ved romtemperatur.

15 **Trinn 2: QS21-tilsetning**

QS21 bulkmateriale (tint 24 t ved RT eller 2 dager ved 4°C i 200 ml) ble tilsatt til de fortynnede liposomene under magnetisk omrøring for å nå en 100 µg/ml konsentrasjon i den endelige formuleringen. Blandingene ble omrørt ved RT.

20 **Trinn 3:** pH ble undersøkt å være 6,1 +/- 0,1.

Trinn 4: Sterilfiltrering

Sterilfiltrering ble realisert på et polyetersulfon (PES) filter fra PALL Corporation.

25 **Trinn 5: Lagring ved +2°C til +8°C**

Endelig konsentrasjon av ASA var 2 mg DOPC, 500 µg kolesterol, 100 µg 3-O-deacylert MPL, 100 µg QS21 pr. 1 ml.

Eksempel 3. QS21 lytisk aktivitet

30 QS21 er kjent for å lysere røde blodceller (RBC). ASA (sorbitol) adjuvanssammensetning dannet som i eksempel 1, ble testet for å forsikre at QS21 lytisk aktivitet ble quenched på samme måte som sett med ekvivalent adjuvanssammensetning omfattende 150 mM NaCl (ASA (150 mM NaCl)).

35 QS21 lytisk aktivitet ble målt i en hemolyseanalyse ved anvendelse av kylling røde blodceller (RBC). RBC ble sentrifugert ved 550 g ved 4°C. Supernatanten ble kastet. Pelleten ble forsiktig resuspendert i PBS-buffer for å nå det endelige volumet, og den

samme operasjon ble gjentatt helt til supernatanten ikke lenger var rød (generelt 3 ganger). Pelleten ble lagret ved 4°C i 3 til 4 dager maksimalt, dersom den ikke ble anvendt direkte (og vasket på ny den dagen den ble brukt), eller ble fortynnet rundt 10 ganger i buffer, dersom den ble brukt samme dag.

5

En QS21-doseområdekurve ble dannet i ASA-buffer (i salt eller i sorbitolbuffer ved å følge ASA-prøven testet) ektemporært, og adjuvansprøvene (inneholdende en 50 µg eller 90 µg ekvivalent av QS21 som betyr ekvivalent av 500 µl eller 900 µl ASA) ble dannet. Sluttvolumet ble justert til 900 µl i standarder, og prøvene med adekvat buffer (inneholdende eller ikke sorbitol som en funksjon av bufferen av prøven testet). Grunnets det opalescens interfererer ASA i optisk tetthet (OD). ASA "blank" ble dermed dannet, og deres OD ble subtrahert fra OD til ASA-testede prøver. Disse blankprøvene korresponderer med samme ASA-volum som volumet testet i prøver, men justert til 1 ml med buffer. Ingen RBC ble tilsatt til disse blankprøvene.

10

15

Standarder og prøver ble deretter inkubert med RBC (100 µl av fortynnet RBC tilsatt til 900 µl standarder og prøver) i 30 minutter ved romtemperatur (RT). Prøvene ble deretter sentrifugert i 5 minutter ved 900 g. Den optiske tettheten ved 540 nm ble målt etter sentrifugeringen.

20

Bestemmelse av den lytiske aktiviteten ble utført ved en grensetest.

1. Grense for deteksjon (LOD) ble definert som den laveste konsentrasjon av QS21 som fører til en OD:

25

- Høyere enn basenivået ($OD > 0,1$)
- Rundt tre ganger høyere enn ODs buffer ("0 µg QS21)
- Stigende delen av kurven
- Bestemt for hver test.
-

2. QS21 lytisk aktivitet ble angitt å være positiv i adjuvansprøver dersom OD for adjuvansprøven var høyere enn OD_{LOD} .

30

Eksempel på QS21-kurve:

µg QS21	OD	QS21 quenched
0	0,029	NA
0,5	0,052	< LOD
0,6	0,073	< LOD
0,7	0,091	< LOD

0,8	0,096	< LOD
0,9	0,12	> 98,2 %
1	0,195	> 98 %
1,1	0,212	> 97,8 %
1,2	0,348	> 97,6 %
1,3	0,479	> 97,4 %
1,4	0,612	> 97,2 %
1,5	0,669	> 97 %
2	1,139	> 96 %
2,5	1,294	> 95 %
3	1,391	> 94 %
5	1,416	> 90 %
Adjuvans*	0,03	> 98,2 %

*50 µg QS21 ekvivalent testet. 150 mM natriumkloridbuffer.

Grensen for deteksjon i denne analysen er ved 0,9 µg QS21, og OD på 0,12.

5

QS21-quenching i en adjuvanssammensetning omfattende 150 mM natriumklorid ble beregnet å være mer enn 98,2 % for ekvivalent av 50 µg QS21 testet. I tilfelle av en ekvivalent på 90 µg testet, er konklusjonen mer enn 99 %.

10

QS21-quenching ble deretter sammenliknet med en ekvivalent adjuvanssammensetning omfattende sorbitol og kun 5 mM natriumklorid. Data ble dannet etter lagring av ASA ved 4°C og etter akselerert stabilitet (7 dager ved 37°C). For ASA i sorbitol ble QS21 standardkurven realisert i en sorbitolinneholdende buffer.

Prøve	Tidspunkt	LOD	QS21 quenched
Adjuvanssammensetning (ASA) 150 mM NaCl	T0	< 1,4	> 97,2 %
	7 d 37°C	< 0,9	> 98,2 %
Adjuvanssammensetning (ASA) sorbitol, 5 mM NaCl	T0	< 2	> 97,8 %
	7 d 37°C	< 1	> 96 %
	11 m 4°C	< 2	> 97,8 %

15

Ekvivalent av 50 µg QS21 testet unntatt * ekvivalent av 90 µg QS21 testet.

Det ble konkludert med at QS21 ble tilstrekkelig quenched i en lav natriumkloridbuffer.

5 **Eksempel 4: MPL-kongener**

Kjemisk er 3D-MPL en blanding av 3-deacylert monofosforyllipid A med 4, 5 eller 6 acylerte kjeder. Hvert separate 3D-MPL-molekyl blir kalt en kongener. Det er viktig at kongenersammensetningen forblir konstant, uten skift mellom proporsjonen av kongenene. Det er også viktig at en hvilken som helst buffer som blir anvendt
10 muliggjør at kongenersammensetningen er den samme som i de konsentrerte liposomene anvendt for å danne adjuvanssammensetningen.

Som vist i figur 2 ble kongenersammensetningen undersøkt i 3D-MPL-konsentrerte liposomer (Kons. Liposomene LIP07-217, første kolonne i figur 2), en
15 adjuvanssammensetning omfattende 3D-MPL-liposomer og QS21 i en 150 mM NaCl-buffer (adjuvans 150 mM NaCl eller ASA (150 mM NaCl), andre kolonne), og en adjuvanssammensetning omfattende 3D-MPL-liposomer og QS21 i en sorbitol og 5 mM NaCl-buffer (adjuvans sorbitol, eller ASA (sorbitol), kolonner 3-7).

20 Kongenersammensetningen ble også undersøkt i to mengder av ASA (sorbitol) adjuvans på dag 0 og 7 dager etter preparering og opprettholdelse ved 37°C for å forsikre at det ikke var noen utvikling over tid (se siste fire kolonner i figur 2).

Relativ distribusjon av tetra-, penta- og hekso-acylerte kongener av MPL i
25 konsentrerte liposomer eller ASA (sorbitol) prøver ble bestemt ved IP-HPLC-Fluo-deteksjon (ARD). Både standarder og prøver ble derivatisert med dansylhydrazin, som introduserer en fluo-aktiv kromofor på disakkaridskjelettet. De derivatiserte prøvene ble analysert på en C18 revers fase kolonne ved anvendelse av tetrabutylammoniumhydroksid (TBAOH) som et ioneparreagens. Kongener
30 inneholdende det samme antallet av fettacylgrupper ble fortynnet i bestemte grupper (tetraacyl, pentaacyl og heksoacyl). Fordeling av kongener blir utledet ved sammenlikning av toppområdet til hver gruppe med det totale toppområdet for alle MPL-kongener.

35 Figur 2 viser prosent av hver kongener. Ingen signifikant forskjell i kongensammensetning ble funnet mellom adjuvansbufferne, og kongensammensetningen var jevn over tid i sorbitolbufferen.

Eksempel 5: Fremstilling av sammensetninger og anvendt i eksemplene 6 og 7

5.1 Fremstilling av PRAME med CpG (CpG 2006 blir anvendt i alle eksemplene

5.1.1 Fremstilling av PRAME med CpG med ASA (150 mM NaCl) anvendt i eksempel 6 og eksempel 7, eksperiment 1 og eksperiment 2

30 % (v/v) sukrosløsning (dannet i vann for injeksjon) ble tilsatt til vann for injeksjon for å nå en sukrosekonsentrasjon på 5 %. Tris-HCl-buffer 100 mM pH 9,5 ble deretter tilsatt for å oppnå en 75 mM Tris-bufferkonsentrasjon. Boratbuffer 100 mM pH 9,8 ble deretter tilsatt for å nå en 5 mM boratbufferkonsentrasjon. 10 % (v/v) Poloxamer 188 løsning (dannet i vann for injeksjon) ble deretter tilsatt for å nå en konsentrasjon på 0,313 %. Blandingen omrørt magnetisk (150 rpm) i 5 minutter ved RT. CpG-løsningen ble i konsentrasjon på omtrent 20 mg/ml (i vann for injeksjon) ble deretter tilsatt for å nå en konsentrasjon på 1050 µg/ml i den endelige formuleringen. Blandingen ble magnetisk omrørt (150 rpm) i 5 minutter ved RT. PRAME-antigenet ble deretter tilsatt for å nå en proteinkonsentrasjon på 1250 µg/ml. Blandingen ble magnetisk omrørt (150 rpm) i 15 minutter ved RT. pH ble undersøkt (9,51). Den oppnådde blandingen ble fylt med 0,5 ml i 3 ml glassbeholdere, og deretter frysetørket.

20

Figur 3 illustrerer fryse-tørkesyklusen anvendt for PRAME (varighet = 40 t).

Den resulterende lyofiliseringskaken ble gjenopprettet med 625 µl vandig adjuvanssammensetning dannet som i eksempel 2, omfattende 150 mM NaCl. Lyofiliseringskaken inneholdt et 1,25 ganger overskudd av antigendose for å oppnå det rette antigen/adjuvansforholdet etter gjenoppretning med en endelig sammensetning av 16 mM Tris, 4 mM borat, 4 % sukrose, 0,24 % Poloxamer 188, 840 µg/ml CpG og 1000 µg/ml PRAME.

5.1.2 Fremstilling av PRAME med CpG for "væskeformulering" (70 mM NaCl) i eksperiment 1 i eksempel 7

Konsentrert adjuvansfremstilling

PBS mod 10 ganger konsentrert pH 6,1 når fortynnet 10 ganger ble tilsatt til vann for injeksjon for å nå en 1 ganger konsentrert buffer i den endelige formuleringen. En forblandet løsning dannet av liposomer og QS21 fortynnet ved 400 µg/ml ble dannet separat. Forblandingen ble magnetisk blandet i 15 min. ved romtemperatur. De konsentrerte liposomene anvendt i forblandingen ble dannet av 40 mg/ml DOPC, 10

35

mg/ml kolesterol og 2 mg/ml 3-deacylert MPL. Forblandingen ble tilsatt til PBS for å oppnå en MPL-konsentrasjon på 200 µg/ml, og en QS21-konsentrasjon på 200 µg/ml i den endelige formulering. Blandingen ble magnetisk omrørt i 15 til 30 minutter ved RT. CpG ved rundt 23 mg/ml ble deretter tilsatt for å nå en sluttkonsentrasjon på 1680 µg/ml. Blandingen ble magnetisk omrørt i 15 til 30 minutter ved RT. pH ble undersøkt å være 6,1 +/- 0,1. AS ble filtrert på 0,22 µm PES-filter, og lagret ved 4°C frem til bruk.

Sluttformulering

Sukrose 25 %, borat 25 mM pH 9,8 tilsatt til WFI for å nå henholdsvis 9,25 %, 5 mM og 0,24 % i den endelige formuleringen. To ganger konsentrert AS + CpG-fremstilling ble tilsatt, som resulterte i 1 ganger konsentrert i den endelige formuleringen. Blandingen ble omrørt i 5 minutter ved RT. PRAME-antigen i sukrose 3,15 %, borat 5 mM ble deretter tilsatt, og blandingen ble omrørt i 5 minutter ved RT.

5.1.3 Preparering av PRAME med CpG for "væskeformulering" i eksperiment 2 i eksempel 7

Konsentrert adjuvanspreparering

ASA for flytende formulering ble dannet som følger. Fosfatbuffer 1M (pH 6,1 ble deretter fortynnet 100 ganger) og ble tilsatt under magnetisk omrøring til WFI for å nå til slutt 45 mM, med i beregning 50 mM fosfatkonsentrasjon i de konsentrerte liposomene. Sorbitol 35 % ble deretter tilsatt for å nå en 21,15 % konsentrasjonsslutt. De konsentrerte liposomene dannet av 40 mg/ml DOPC, 10 mg/ml kolesterol og 2 mg/ml 3-deacylert MPL ble tilsatt til blandingen for å nå en endelig MPL-konsentrasjon på 450 µg/ml. QS21-masse (ved rundt 5000 µg/ml) ble tilsatt for å nå en endelig QS21-konsentrasjon på 450 µg/ml. Blandingen ble omrørt i 15 minutter ved RT. pH ble undersøkt og justert til pH 6,1 +/- 0,1. Den endelige konsentrasjonen i denne ASA var henholdsvis 450 µg/ml for MPL, 450 µg/ml for QS21, 45 mM fosfat, 22,5 mM NaCl, 21,15 % sorbitol.

Sluttformulering

30 % (v/v) sukrosløsning (dannet i vann for injeksjon) ble tilsatt til vann for injeksjon for å nå en sukrosekonsentrasjon på 4 % i sluttformuleringen. Tris-HCl-buffer 1M pH 9,0 ble deretter tilsatt for å nå en 16 mM Tris bufferkonsentrasjon i den endelige formuleringen. Boratbuffer 100 mM pH 9,8 ble deretter tilsatt for å nå en 4 mM boratbufferkonsentrasjon i den endelige formuleringen. 10 % (v/v) Poloxamer 188 løsning (dannet i vann for injeksjon) ble deretter tilsatt for å oppnå en konsentrasjon

på 0,24 % i den endelige formuleringen. Blandingen ble magnetisk omrørt (150 rpm) i 5 minutter ved RT. CpG-løsningen i en konsentrasjon på omtrent 20 mg/ml (i vann for injeksjon) ble deretter tilsatt for å oppnå en konsentrasjon på 840 µg/ml i den endelige formuleringen. Blandingen ble magnetisk omrørt (150 rpm) i 5 minutter ved RT. PRAME-antigenbuffer (borat 5 mM – sukrose 3,15 % pH 9,8) ble deretter tilsatt for å justere PRAME-antigenkonsentrasjonen til 1000 µg/ml . PRAME-antigenet ble deretter tillatt for å oppnå en proteinkonsentrasjon på 8 µg/ml i den endelige formuleringen. Blandingen ble magnetisk omrørt (150 rpm) i 15 minutter ved RT. En 4,5 ganger konsentrert AS i sorbitol ble tilsatt for å oppnå de endelige konsentrasjonene på 100 µg/ml MPL og QS21. pH ble undersøkt (+/- 8,0).

5.1.4 Preparering av PRAME med CpG for ASA (sorbitol) og ASA (sukrose) i eksperiment 1 i eksempel 7

30 % (v/v) sukrosløsning (dannet i vann for injeksjon) ble tilsatt til vann for injeksjon for å oppnå en sukrosekonsentrasjon på 5 % i formuleringen, boratbuffer 100 mM pH 9,8 ble deretter tilsatt for å oppnå en 5 mM boratbufferkonsentrasjon i denne formuleringen, Tris-HCl-buffer 100 mM pH 9,0 når fortynnet 20 ganger, ble deretter tilsatt for å oppnå en 5 mM Tris-bufferkonsentrasjon i denne formuleringen. 10 % (v/v) Poloxamer 188 løsning (dannet i vann for injeksjon) ble deretter tilsatt for å oppnå en konsentrasjon på 0,3 % i formuleringen. Blandingen ble omrørt magnetisk (150 rpm) i 5 minutter ved RT. CpG-løsningen ved en konsentrasjon på omtrent 20 mg/ml (i vann for injeksjon) ble deretter tilsatt for å oppnå en konsentrasjon på 1050 µg/ml i formuleringen. Blandingen ble omrørt magnetisk (150 rpm) i 5 minutter ved RT. PRAME-antigenet blir deretter tilsatt for å oppnå en proteinkonsentrasjon på 1250 µg/ml i den endelige formuleringen. Blandingen ble omrørt magnetisk (150 rpm) i 15 minutter ved RT. pH ble målt til 9,4. Blandingen oppnådd ble fylt med 0,5 ml i 3 ml glassbeholdere, og deretter frysetørket.

ASA (sorbitol) ble dannet som nevnt i eksempel 1, med visse forskjeller: sorbitolkonsentrasjonen var 4,6 % og QS21 ble fortynnet ved 400 µg/ml før tilsetning til de fortynnede konsentrerte liposomene.

ASA (sukrose) ble dannet som nevnt i eksempel 1, med følgende forskjeller: sorbitol blir erstattet med sukrose (en beholdningsløsning på 30 % v/v sukrosløsning blir anvendt, og den endelige sukrosekonsentrasjon er 8,3 %) og QS21 ble fortynnet ved 400 µg/ml før tilsetning til de fortynnede konsentrerte liposomene.

Den resulterende lyofiliseringskaken ble gjenopprettet med 625 µl vandig adjuvanssammensetning, og den endelige sammensetningen omfattet 4 mM Tris, 4 mM borat, 4 % sukrose, 0,24 % Poloxamer 188 840 µg/ml CpG og 1000 µg/ml PRAME.

5

5.1.5 Fremstilling av PRAME med CpG for ASA (sorbitol) i eksperiment 2 i eksempel 7

30 % (v/v) sukrosløsning (dannet i vann for injeksjon) ble tilsatt til vann for injeksjon for å oppnå en sukrosekonsentrasjon på 5 % i formuleringen, Tris-HCl-buffer 1M pH 9,0 når 50 ganger fortynnet ble deretter tilsatt for å oppnå en 20 mM Tris-
10 bufferkonsentrasjon i denne formuleringen, boratbuffer 100 mM pH 9,8 når 20 ganger fortynnet, ble deretter tilsatt for å oppnå en 5 mM boratbufferkonsentrasjon i denne formuleringen. 10 % (v/v) Poloxamer 188 løsning (dannet i vann for injeksjon) ble deretter tilsatt for å nå en konsentrasjon på 0,3 % i formuleringen. Blandingen ble omrørt magnetisk (150 rpm) i 5 minutter ved RT. CpG-løsningen ved en konsentrasjon
15 på omtrent 20 mg/ml (i vann for injeksjon) ble deretter tilsatt for å oppnå en konsentrasjon på 1050 µg/ml i formuleringen. Blandingen ble omrørt magnetisk (150 rpm) i 5 minutter ved RT. PRAME-antigenet ble deretter tilsatt for å oppnå en proteinkonsentrasjon på 1250 µg/ml i sluttformuleringen. Blandingen ble omrørt magnetisk (150 rpm) i 15 minutter ved RT. pH ble målt til 9,1. Blandingen oppnådd
20 ble fylt med 0,5 ml i 3 ml glassbeholdere, og deretter frysetørket.

ASA sorbitol ble dannet som beskrevet i eksempel 1. Den resulterende lyofiliseringskaken ble gjenopprettet med 625 µl vandig adjuvanssammensetning, og den endelige sammensetningen omfattet 16 mM Tris, 4 mM borat, 4 % sukrose, 0,24
25 % Poloxamer 188, 840 µg/ml CpG og 1000 µg/ml PRAME.

5.2 Preparering av NY-ESO1 med CpG

5.2.1 Preparering av NY-ESO1 med CpG i eksempel 6

Na/K₂ fosfatbuffer 200 mM pH 6,3 når fortynnet 20 ganger ble tilsatt under magnetisk omrøring til vann for injeksjon, for å oppnå 12,5 mM i den endelige formuleringen. De
30 følgende eksipientene ble deretter tilsatt til blandingen i følgende rekkefølge: monotioglyserol ved 10 % v/v for å oppnå 0,3125 % til slutt, Poloxamer 188 ved 5 % v/v for å oppnå 0,0625 %, sukrose 25 % for å oppnå 5 % til slutt, og L-argininbase 287 mM for å oppnå 6,25 mM. CpG-massen ved rundt 20 mg/ml ble deretter tilsatt til
35 en blanding for å oppnå en konsentrasjon på 1050 µg/ml i sluttformuleringen. Blandingen ble opprettholdt under magnetisk omrøring (rundt 150 rpm) ved romtemperatur i 10 minutter. pH ble undersøkt og var 7,1 +/- 0,3. Den magnetiske

omrøringen ble øket for å danne en vorteks. NY-ESO1 ble deretter tilsatt for å oppnå en sluttkonsentrasjon på 750 µg/ml. Den magnetiske omrøringen ble deretter redusert til 150 rpm, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 5 minutter. En aliquot ble deretter tatt ut for å undersøke den endelige pH-verdien (som må være 7,02). Den

5 endelige massen ble deretter frysetørket.

Den resulterende lyofiliseringskaken ble gjenopprettet med 625 µl ASA-buffere (150 mM NaCl og sorbitol).

10 **Eksempel 6. Forebygging av "utsalting" i adjuvanssammensetningen omfattende sorbitol som buffer**

Figur 4 demonstrerer at reduisering av saltkonsentrasjonen til 5 mM og inkludering av sorbitol i adjuvanssammensetningen forebygger "utsalting" av både PRAME og NY-ESO-1 i de immunogene sammensetningene (som dannet i henholdsvis eksempel

15 5.1.1 og 5.2.1). I figur 4:

1. PRAME-antigen gjenopprettet i ASA 150 mM NaCl-buffer.
2. PRAME-antigen gjenopprettet i ASA sorbitolbuffer.
3. NYESO-1-antigen gjenopprettet i ASA 150 mM NaCl-buffer.
- 20 4. NYESO-1-antigen gjenopprettet i ASA sorbitolbuffer.

Figur 4 er en fotografisk sammenlikning mellom PRAME og NYESO-1 gjenopprettet i ASA (150 mM NaCl) og ASA (sorbitol). Som det fremgår fremstår PRAME gjenopprettet i ASA (150 mM NaCl) sløret sammenliknet med PRAME gjenopprettet i

25 ASA (sorbitol). Likeledes fremstår NY-ESO gjenopprettet i ASA (150 mM NaCl) sløret sammenliknet med NY-ESO-antigenet gjenopprettet i ASA (sorbitol).

Eksempel 7. In vivo musemodell

Eksperiment 1:

30 Syv grupper av 20 hunn CB6F1-mus (hybrid av C57BL/6 og Balb/C-mus) 6 til 8 uker gamle ble immunisert to ganger intramuskulært (hver gang etter to uker, i alternative injeksjoner i venstre og høyre gastronemiusmuskel), med PRAME-proteinformuleringen er i en bestemt dose av ASA +CpG som tilsvarer 1/10 av en human dose (50 µl inneholdende 5 µg MPL, 5 µg QS21 og 42 µg CpG7909). 14 dager

35 etter siste immunisering ble fire grupper av mus (n=8 hver gruppe) utsatt subkutant med 10e5 CT26-PRAME tumorceller, som beskrevet nedenfor. De syv gruppene av mus var:

- grp1: buffer
- grp2: kolyofilisert PRAME + CpG resuspendert i "klassisk" ASA (150 mM NaCl) hvori PRAME-proteinet presipiterer
- 5 - grp3: kolyo PRAME + CpG resuspendert i ASA (sukrose)
- grp4: kolyo PRAME + CpG resuspendert i ASA (sukrose-inkubasjon 48 t ved 25°C)
- grp5: kolyo PRAME + CpG resuspendert i ASA (sorbitol)
- grp6 PRAME + ASA – "flytende" formulering inneholdende 70 mM NaCl +
10 CpG
- grp7: PRAME + ASA – "flytende" formulering inneholdende 70 mM NaCl + CpG (+ poloxamer)

15 7 dager etter siste immunisering ble den cellulære responsen ved evnen som T-celler har til å utskille cytokiner (n=4 grupper av 3 mus) analysert.

Alle musene mottok 0,4 µg PRAME i 1/10 av human dose av ASA + CpG adjuvanssystem (5 µg MPL, 5 µg QS21 og 42 µg CpG).

20 **Resultater:**

Tumorvekst

Gjennomsnittlig tumorvekst over tid, som målt ved overflate (mm²), (+SD), pr. gruppe er representert i figur 6. PRAME-formulert ASA (150 mM NaCl) + CpG og PRAME i ASA væskeformulering indusert en lavere tumorbeskyttelse (høyere
25 tumorvekst) enn PRAME ASA (sorbitol) + CpG.

Cellulær respons (7 dager etter 2 immuniseringer – n=4 grupper av 3 mus pr. gruppe behandling):

30 Frekvensen av CD4 og CD8 T-celler med evne til å produsere cytokiner som IFN γ og TNF α etter immunisering av mus med PRAME ASA-CpG-tumorantigen blir anvendt for å reflektere kapasiteten til de forskjellige formuleringene for indusering av en funksjonell cellulær respons. 7 dager etter andre immunisering ble prosentandeler av CD4 og CD8 T-celleproduserende cytokiner (IFN γ og TNF α) målt ved intracellulær
35 cytokinfarging (ICS) på miltceller til immuniserte mus.

Prosent av CD4 som produserer IFN γ og TNF α (gjennomsnitt +/- standardavvik) er vist i figur 5.

Ingen målbar CD8-respons ble funnet i dette eksperimentet.

5

PRAME-proteinet formulert i ASA (150 mM NaCl) + CpG ble vist å presipitere og indusere en lavere spesifikk T-cellerrespons sammenliknet med PRAME formulert i ASA (sorbitol) + CpG. En like god PRAME-spesifikk CD4-respons ble oppnådd når PRAME-proteinet ble formulert i ASA (sorbitol) + CpG og i ASA "flytende" formulering (70 mM NaCl) + CpG (ingen statistisk forskjell). Den humorale immunresponsen ble også testet, men data etter 2 injeksjoner kunne ikke tolkes.

10

Eksperiment 2:

Fire grupper av 24 hunn CB6F1-mus (hybrid av C57BL/6 og Balb/C-mus) 6 til 8 uker gamle, ble immunisert fire ganger intramuskulært (hver etter to uker, i alternative injeksjoner i venstre og høyre gastronemiusmuskel) med PRAME-proteinet formulert i en bestemt dose av ASA + CpG, som korresponderer med 1/10 av en human dose (50 μ l inneholdende 5 μ g MPL, 5 μ g QA21 og 42 μ g CpG7909). 14 dager etter siste immunisering av fire grupper av mus (n=12 i hver gruppe) ble utfordret subkutant med 10e5 CT26-PRAME tumorceller, som beskrevet nedenfor. De fire gruppene av mus var:

15

20

- grp1: buffer
- grp2: kolyofilisert PRAME + CpG resuspendert i "klassisk" ASA (150 mM NaCl) hvori PRAME-proteinet presipiterer
- grp3: kolyo PRAME + CpG resuspendert i ASA (sorbitol)
- grp4: PRAME + ASA "flytende" formulering + CpG (+ poloxamer)

25

14 dager etter siste immunisering ble immunresponsen analysert ved anvendelse av forskjellige resultater fra ("read outs") som følger:

30

- Humoral respons (n=12)
- Cellulær respons for evnen som T-celler har til å utskille cytokiner (n=4 grupper av 3 mus)
- Beskyttende effekt overfor en tumoreksponering (n=12)

35

Alle musene mottok 0,4 μ g PRAME i 1/10 Hu-dose av ASA + CpG adjuvanssystem (5 μ g av MPL, 5 μ g av QS21 og 42 μ g av CpG).

Resultater:

Tumorvekst

Gjennomsnittlig tumorvekst over tid, som målt ved overflate (mm^2) (+SD), pr. gruppe er representert i figur 9. PRAME-formulert ASA (150 mM NaCl) + CpG induserer en lavere tumorbeskyttelse (høyere tumorvekst) enn PRAME ASA (sorbitol) + CpG. Liknende beskyttelse ble observert for PRAME ASA (sorbitol) + CpG og PRAME i ASA flytende formulering + CpG).

Prøveanalyse: Humoral respons:

Musesera ($n=12$) ble testet ved ELISA for tilstedeværelse av PRAME-spesifikke antistoffer 14 dager etter den siste av de fire immuniseringene, som beskrevet nedenfor. Antistoffresponsen (total Ig) ble vurdert ved ELISA ved anvendelse av rensset rekombinant PRAME-protein som beleggantigen. Sera fra immuniserte dyr ble analysert for tilstedeværelse av PRAME-spesifikke antistoffer. Geometrisk gjennomsnitt av standardtitere ($n=12$ mus) $\pm$ 95 % konfidensintervaller oppnådd etter de fire immuniseringene, er vist i figur 7. PRAME/ASA + CpG inneholdende klassisk ASA (150 mM NaCl) induserer en veldig liten antistoffrespons, mens PRAME/ASA + CpG-inneholdende ASA (sorbitol) induserer meget høye antistofftitere. Denne responsen er lik den som blir induert av flytende formulering ASA.

Cellulær respons (14 dager etter fjerde immuniseringer – $n=4$ grupper av 3 mus pr. gruppebehandling):

Frekvensen av CD4 og CD8 T-celler med evne til å produsere cytokiner som $\text{IFN}\gamma$ og $\text{TNF}\alpha$ etter immunisering med mus med PRAME ASA-CpG-tumorantigen, blir anvendt for å reflektere kapasiteten av de forskjellige formuleringene for induering av en funksjonell cellulær respons. 14 dager etter fjerde immunisering ble prosentandelene av CD4 og CD8 T-celler som produserer cytokiner ($\text{IFN}\gamma$ og $\text{TNF}\alpha$) målt ved intracellulær cytokinfarging (ICS) på miltceller til immuniserte mus.

Prosent av CD4-produserende $\text{IFN}\gamma$ og $\text{TNF}\alpha$ (gjennomsnitt $\pm$ standardavvik) er vist i figur 8. p-verdiene er stort sett underordnet med 0,05 som demonstrerer en betydelig forskjell mellom gruppe 2 og gruppene 3 og 4.

Ingen målbar CD8-respons ble funnet i dette eksperimentet.

PRAME-proteinet formulert i ASA (150 mM NaCl) + CpG ble vist å presipitere og indukere en statistisk lavere spesifikk T-cellerespons sammenliknet med PRAME formulert i ASA (sorbitol) + CpG. I kontrast til liknende god PRAME-spesifikk CD4-respons ble oppnådd når PRAME-proteinet ble formulert i ASA (sorbitol) + CpG, og i
 5 ASA "flytende" formulering + CpG.

Metode

CT26-PRAME-tumormodell og gumorvekst

CT26-PRAME-cellelinjen ble dannet ved transfektering av CT26
 10 kolonkarsinomcellelinjen med pattedyrekspresjonsplasmid, pCDNA3, kodende for cDNA for PRAME (Invitrogen, Carlsbad, CA). Seleksjon med G418 (200 µg/ml) og begrenset fortynningskloning ga en klon som uttrykker PRAME (CT26-PRAME) som bestemt ved kvantitativ real-time PCR (10e-3 PRAME mRNA-kopier/kopi av mus βaktin som er i området for nivået av PRAME-ekspressjon til humane tumorer).

15 CT26 PRAME-celler ble dyrket in vitro ved 37°C med 5 % CO₂ i RPMI-medium med 10 % føtalt kalveserum, 1 % L-glutamin, 1 % penicillin-streptomycin, 1 % ikke-essensielle aminosyrer, 1 % natriumpyruvat og 0,1 % β-merkaptotanol. Cellene ble trypsinert, vasket to ganger i serumfritt medium, og injisert i 200 µl RPMI-medium
 20 subkutan i høyre flanke til fire grupper av CB6F1-mus 14 dager etter den siste immuniseringen med PRAME som beskrevet ovenfor. Individuell tumorvekst ble målt to ganger i uken. Produktet av to hoveddiametere av hver tumor ble registrert overtid, og data er vist som gjennomsnittlig tumoroverflate (mm²) i hver dyregruppe.

25 Prøveanalyse: Humoral respons:

Før tilsetning av sera ble immunoplaten belagt med PRAME-antigen over natt ved 4°C. Etter reaksjon med sera i 90 minutter ved 37°C, ble en biotinylert kanin helt antistoff mot museimmunoglobuliner tilsatt i 90 minutter ved 37°C. Antigen-antistoffkomplekset ble vist ved inkubasjon med et streptavidin-biotinylert
 30 peroksydasekompleks i 30 minutter ved 37°C. Dette komplekset ble deretter oppdaget ved tilsetning av tetrametylbenzidin (TMB) i 10 minutter ved romtemperatur, og reaksjonen ble stoppet med 0,2 M H₂SO₄. Optiske tettheter ble registrert ved 450 nm.

Prøveanalysemetode: Cellulær respons (IFNγ/TNFα-produksjon)

35 IFNγ- og TNFα-produksjon til CD4 og CD8 T-celler ble målt ved flow cytometri (LSR2 fra Becton Dickinson) ved anvendelse av intracellulær cytokinfarging (ICS) på miltceller av immuniserte mus (4 grupper med 3 mus pr. gruppe), etter 2 timer

simulering med en blanding av overlappende 15mer peptider som dekker hele PRAME-proteinsekvensen.

Stimulering av T-celler:

- 5 - Miltceller til immuniserte dyr ble restimulert med en blanding av 123 15mer peptider som overlapper med 11 aminosyrer, og som dekker hele PRAME-sekvensen. Peptidene (1 µg/ml/peptid) blir blandet med 10e6 T-celler (miltceller) 2 timer ved 37°C i en 96-brønn plate (U) i et sluttvolum på 200 µl RPMI 5 % FCS inneholdende 2 µg/ml anti-CD49d og anti-CD28 med 2
- 10 µg/ml
- etter inkubasjon ble 50 µl brefeldin (1/1000) tilsatt i RPMI 5 % FCS.

Intracellulær farging:

• CD4/CD8-farging:

- 15 - Cellene ble overført til en 96-brønn plate (koniske brønner)
- Sentrifugering 1000 rpm 5' ved 4°C
- Vask med 250 µl FACS-buffer (PBS 1 % FCS)
- Pellets av celler ble inkubert med 50 µl 2,4G2 1/50 i FACS-buffer i løpet av 10' ved 4°C
- 20 - 50 µl Master mix CD4-PE (fortynning Mab: 1/200) og CD8PerCP (fortynning Mab: 1/200) i FACS-buffer ble tilsatt i løpet av 30' ved 4°C
- Vask i FACS-buffer (1200 RPM-10')

• Permeabilisering av celler:

- 25 - Pellets ble inkubert med 200 µl cytoFix-cytoPerm-løsning i løpet av 20' ved 4°C
- Vasket med permWASH 1x (1200 RPM-10')- permWASH-løsning er 10x konsentrert, fortynning i sterilt vann

• I IFN γ og TNF α intracellulær farging:

- 30 - Pellets ble inkubert i 2 timer ved 4°C med 50 µl Mix IFN γ APC (fortynning Mab: 1/50) og TNF α FITC (fortynning Mab: 1/50) i permWASH 1x løsning
- Vasket med permWASH 1x (1200 RPM-10')
- Pellets ble resuspendert i FACS-buffer
- 35 - FACS-analyse

Brefeldin (Gologi Plug): BD kat. 555029

- Cytofix/cytoperm: Pharmingen (BD) kat. nr. 554722
Perm/vaskebuffer: Pharmingen (BD) kat. nr. 554723
Rotte anti mus CD49d rensset NA LE: BD kat. nr. 553154
Rotte anti mus CD28 rensset NA LE: BD kat. nr. 553295
5 Rotte anti mus CD8a perCp: BD kat. Nr. 553036
Rotte anti mus CD4 PE: BD kat. nr. 556616
Rotte anti mus IFN γ APC: BD kat. nr. 554413
Rotte anti mus TNF α FITC: BD kat. nr. 554418
Anti-mus CD 16/CD32 (2.4G2) Becton Dickinson kat. Nr. 553142 (0,5 mg/ml).

PATENTKRAV

1. En vandig adjuvansløsning omfattende: (a) en TLR-4-agonist og en saponin I en liposomal formulering; og (b) et ikke-ionisk isotonisitetsmiddel, hvor konsentrasjonen av natriumklorid eller ionestyrken I adjuvanssammensetningen er mindre enn 100 mM.
2. En vandig adjuvanssammensetning ifølge hvilket som helst foregående krav, hvor det ikke-ioniske isotonisitetsmidlet er en polyol.
3. En vandig adjuvanssammensetning ifølge krav 2, hvor polyolen er sorbitol.
4. En vandig adjuvanssammensetning ifølge krav 3, hvor konsentrasjonen av sorbitol er mellom omtrent 4 % og omtrent 10 % (v/v).
5. En vandig adjuvanssammensetning ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvor nevnte TLR-4-agonist er 3D-MPL.
6. En vandig adjuvanssammensetning ifølge et hvilket som helst foregående krav, hvor nevnte saponin er QuilA eller et derivat derav.
7. En vandig adjuvanssammensetning ifølge krav 6, hvor derivatet av QuilA er QS21.
8. En vandig adjuvanssammensetning ifølge et hvilket som helst foregående krav, omfattende omtrent 5 mM natriumklorid og mellom 5 % og 6 % v/v sorbitol.
9. En immunogen sammensetning omfattende et antigen eller antigenpreparering, og en vandig adjuvanssammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8.
10. En immunogen sammensetning ifølge krav 9, hvor nevnte antigen eller antigenpreparering ikke er oppløselig i saltkonsentrasjoner eller i løsninger hvor ionestyrken er høyere enn 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM eller 100 mM.
11. En fremgangsmåte for fremstilling av en immunogen sammensetning ifølge enten krav 9 eller 10, omfattende trinnet av å rkonstituere en lyofilisert

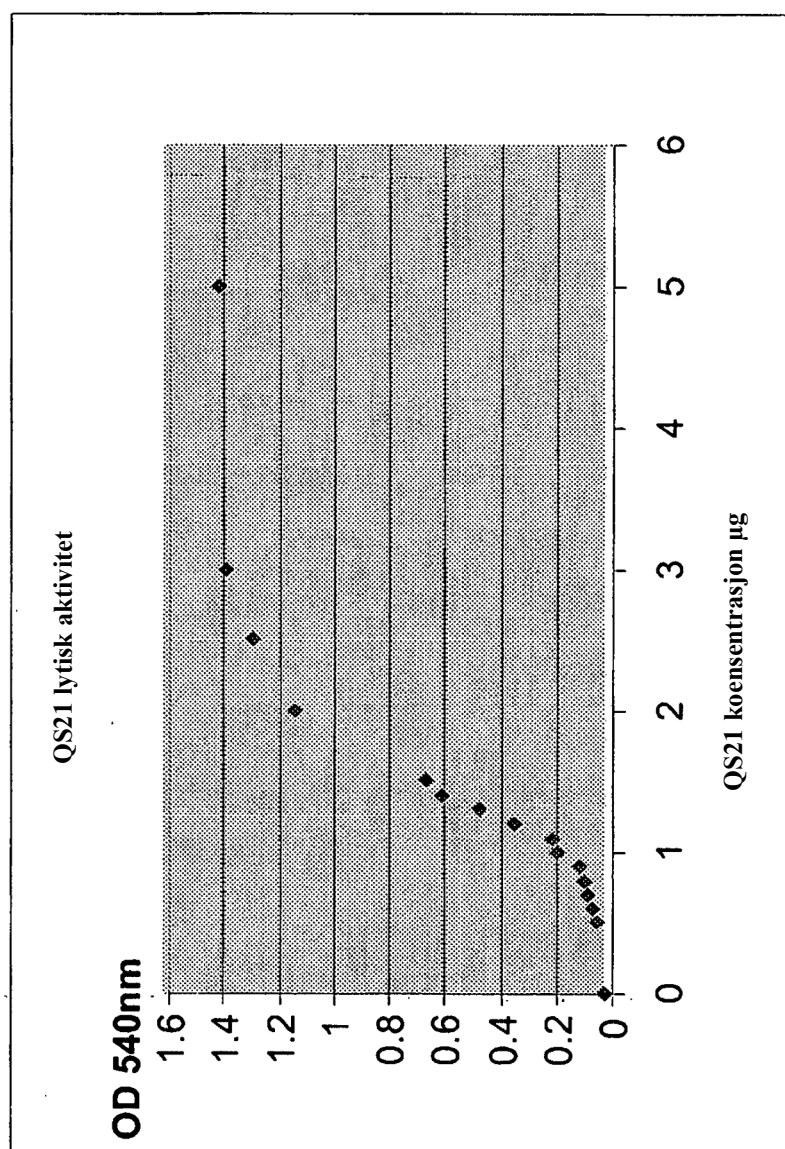
sammensetning omfattende minst ett antigen eller antigenpreparering, med en vandig adjuvanssammensetning som definert i hvilke som helst av kravene 1 til 8.

5 12. Et sett omfattende (i) en lyofilisert sammensetning omfattende et antigen eller antigenpreparering, og (ii) en vandig adjuvanssammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8.

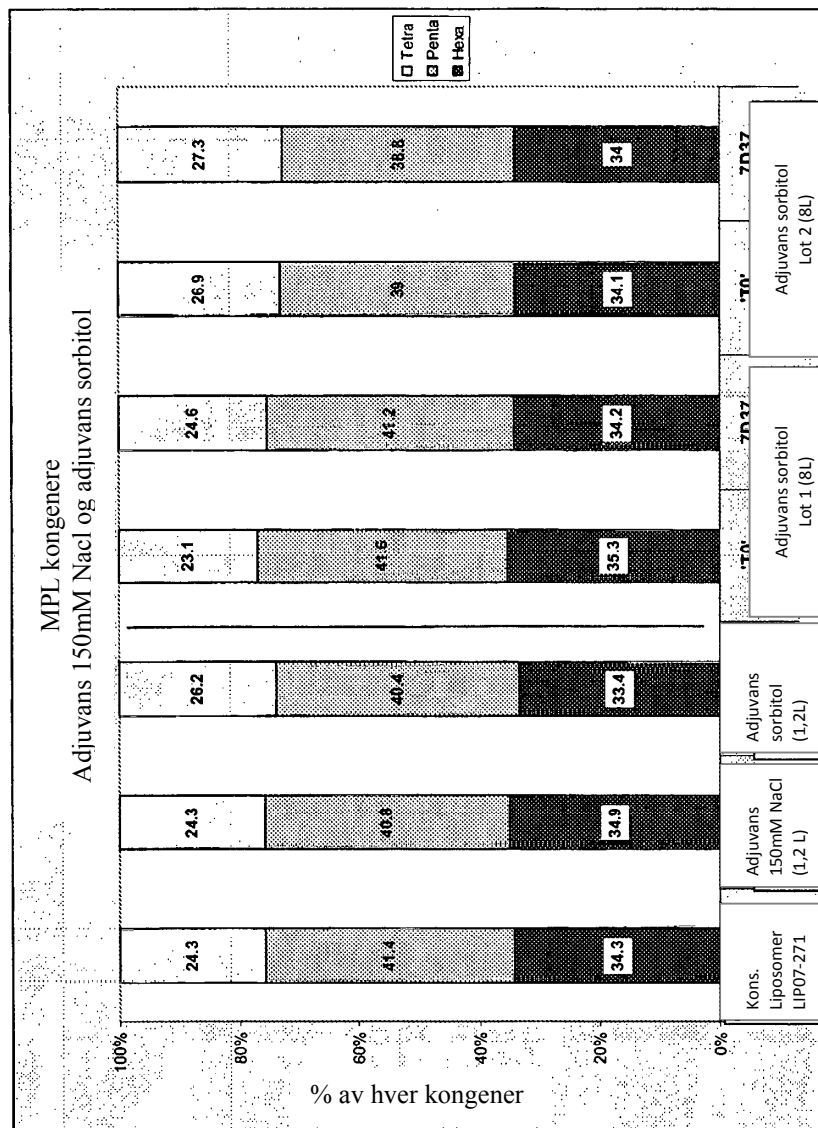
10 13. Fremgangsmåten eller settet ifølge kravene 11 eller 12, hvor antigenet eller den antigene sammensetningen ikke er oppløselig i saltkonsentrasjoner, eller i løsninger hvor ionestyrken er høyere enn 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM eller 100 mM.

14. En immunogen sammensetning ifølge kravene 9 eller 10, for anvendelse i medisin.

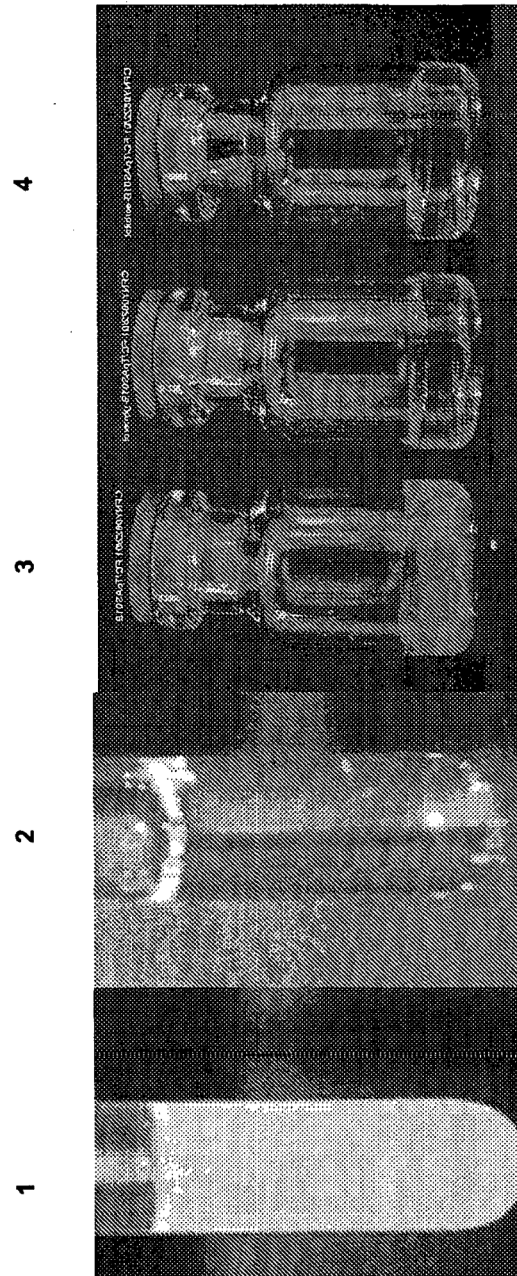
Figur 1



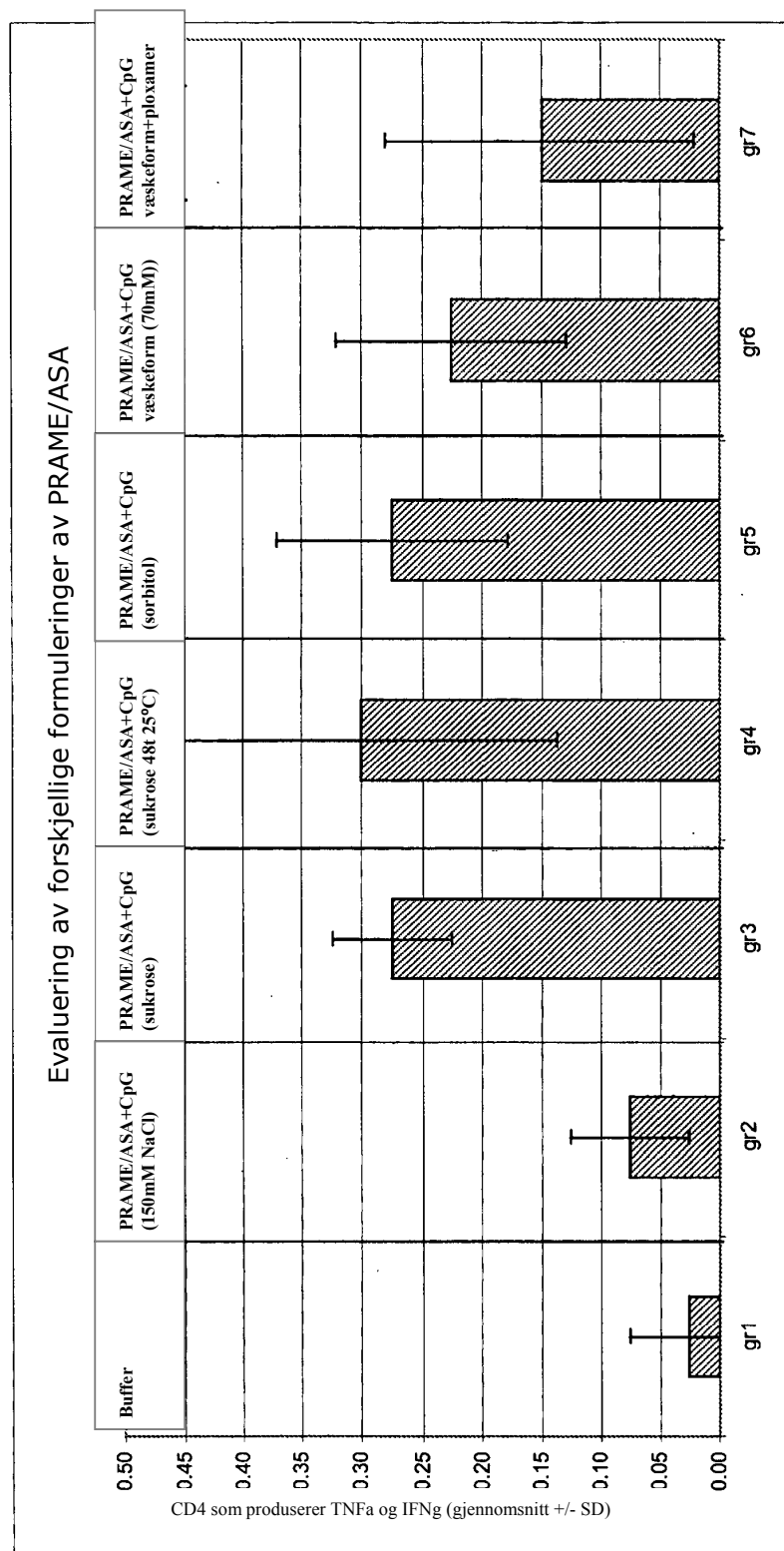
Figur 2



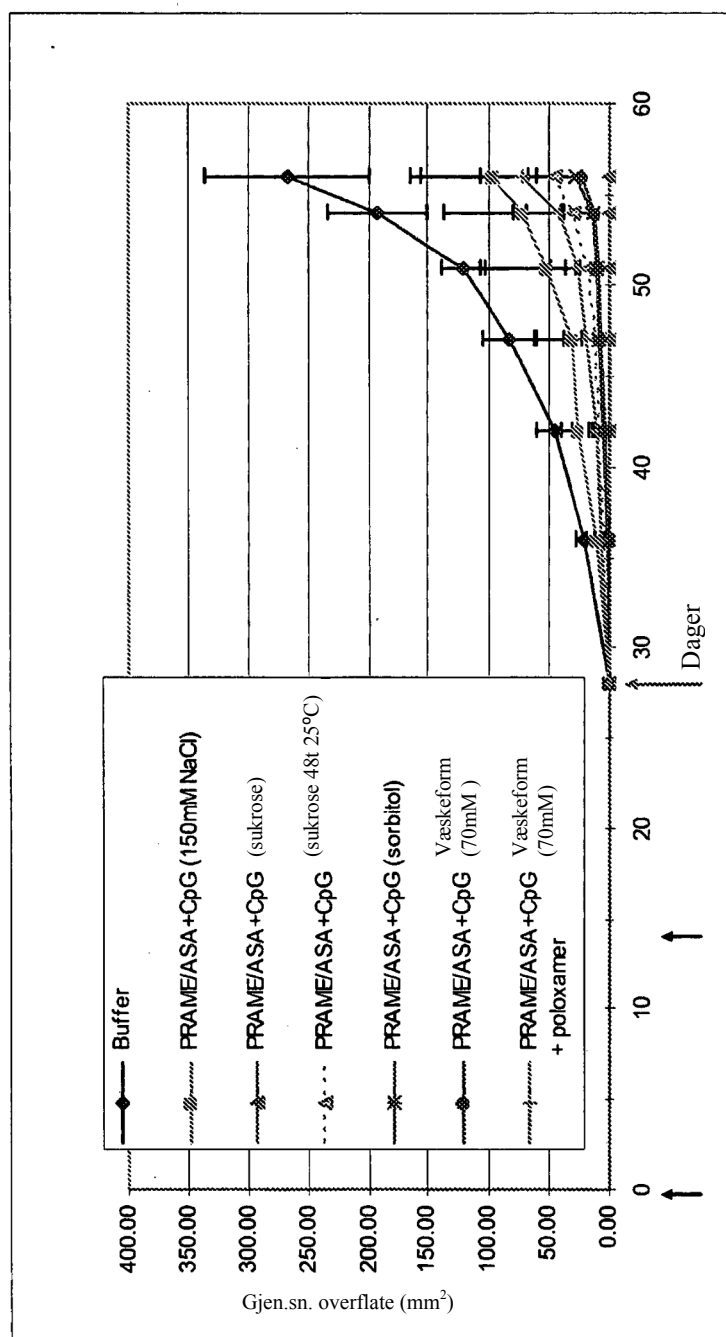
Figur 4



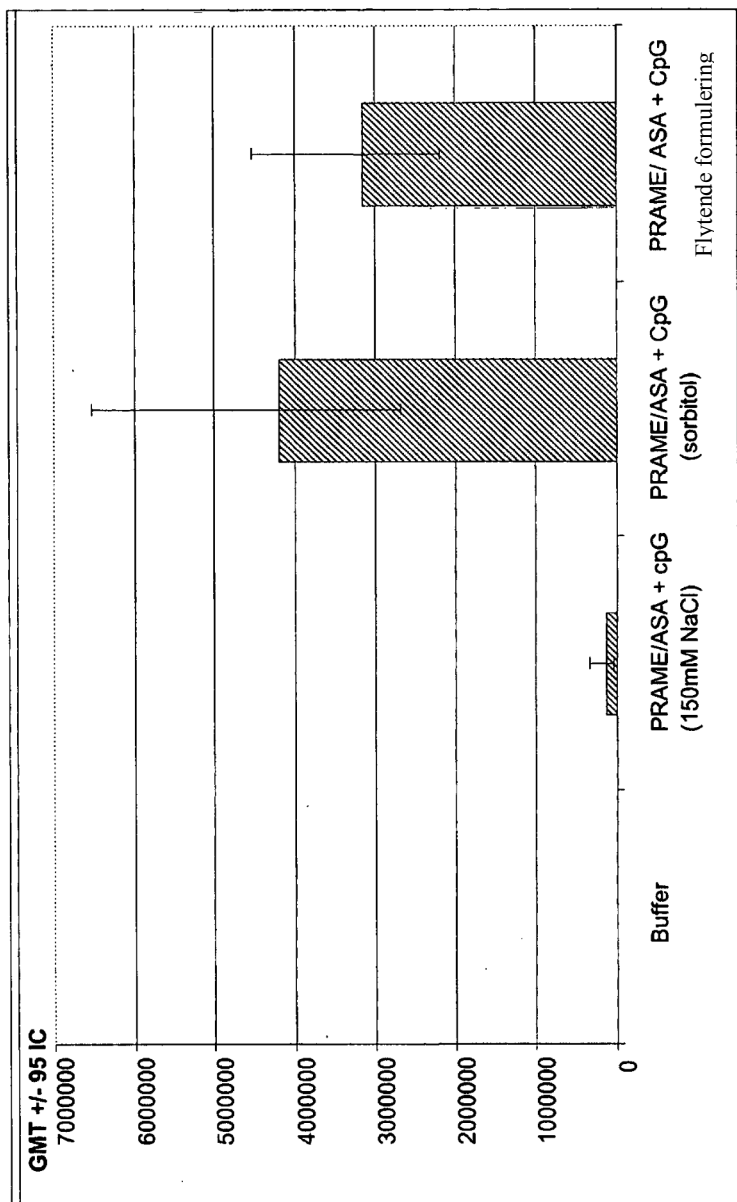
Figur 5



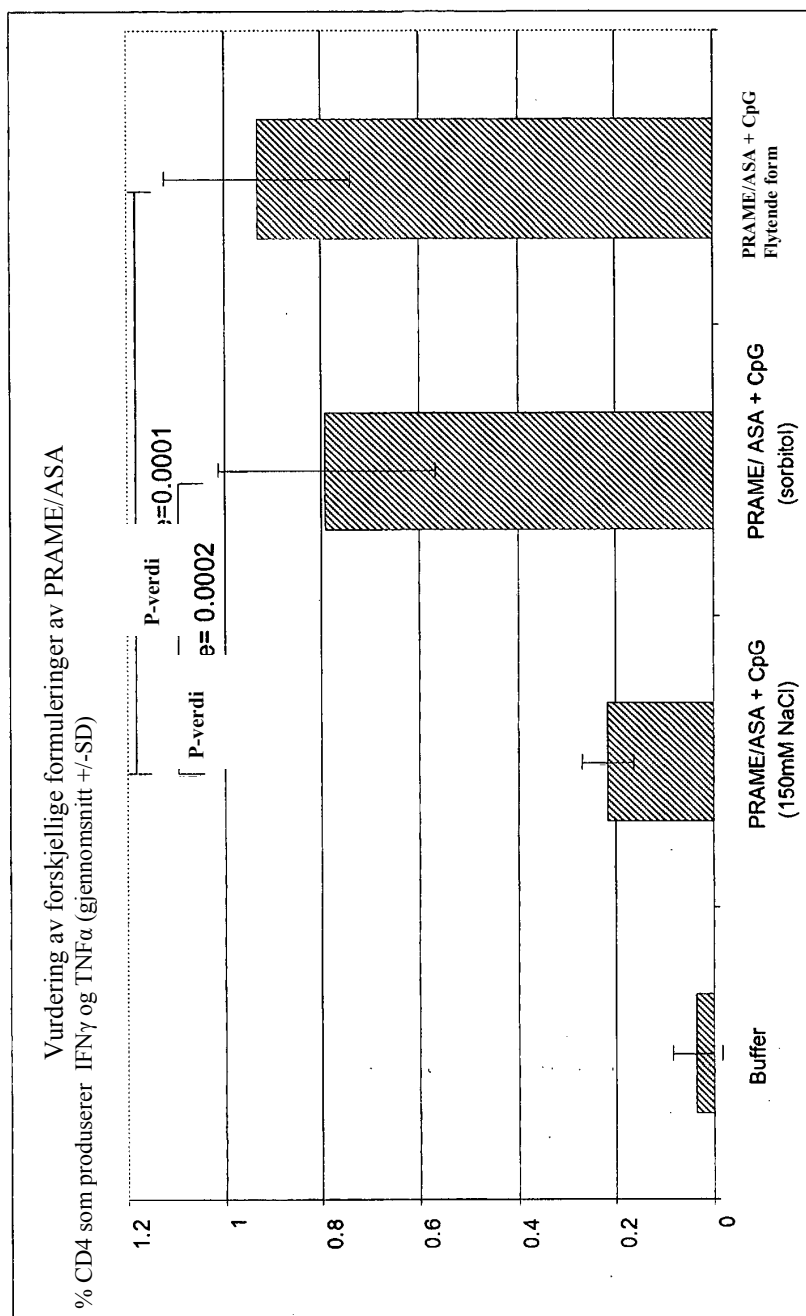
Figur 6



Figur 7



Figur 8



Figur 9

