PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
2003 - 1093

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
A 61 K 39/00
A 61 P 35/00

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **16.10.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.10.2000 18.10.2000 18.10.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/0025573 2000/0025574 2000/690921**

(33) Země priority: **GB GB US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.08.2003**
(Věstník č. 8/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/EP01/11984**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/032450**

(71) Přihlašovatel:
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S. A., Rixensart, BE;

(72) Původce:
Garcon Nathalie, Rixensart, BE;
Gerard Catherine Marie Ghislaine, Rixensart, BE;
Stephenne Jean, Rixensart, BE;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Imunogenní prostředek

(57) Anotace:

Popisují se nové pomocné prostředky pro použití s antigeny zhoubného bujení. Adjuvans obsahuje saponin a imunostimulační oligonukleotid.

CZ 2003 - 1093 A3

2003-1093
10.06.03

Vakcinační prostředky

Oblast techniky

Popisuje se nový prostředek obsahující kombinaci antigenu zhoubného bujení nebo jeho derivátu a kombinovaný pomocný prostředek obsahující imunostimulační oligonukleotid a saponin. Antigenem je s výhodou derivát Her 2 neu nebo antigen prostaty. Uvedený prostředek se používá při léčbě a prevenci lidí, kteří exprimují takové antigeny. Ve výhodném provedení vynálezu pomocný prostředek navíc obsahuje lipopolysacharid.

Dosavadní stav techniky

Navzdory velkým investicím, jak z finančních tak lidských zdrojů, zhoubné bujení zůstává jedním z hlavních důvodů úmrtí. Zhoubné bujení je například příčinou úmrtí číslo jedna u žen ve věku 35 až 74 let. Karcinom prsu je nejběžnější zhoubné bujení u žen a četnost výskytu karcinomu prsu je na vzestupu. Odhaduje se, že u jedné z devíti žen byl diagnostikován karcinom prsu. Standardní přístupy léčby uvedeného onemocnění je kombinace chirurgického zákroku, ozáření a chemoterapie. Tyto zákroky jsou u jistých typů maligních nádorů velmi úspěšné. Avšak, jestliže se zhoubné bujení prsu diagnostikuje pozdě, je velmi často neléčitelné. Je nezbytné vyvinout jiný přístup umožňující včasnou diagnostiku a léčbu.

Imunostimulační oligonukleotidy obsahující nemetylované dinukleotidy CpG jsou známy jako adjuvans, když se aplikují systémovým a mukozálním způsobem (popisuje se v patentovém dokumentu WO 96/02555, EP 468520 a v publikaci Davis et al., J. Immunol., 1998, 160(2):870-876, McCluskie and Davis, J. Immunol., 1998, 161(9):4463-6). CpG je zkratka dinukleotidových motivů cytosin-guanosin přítomných v DNA.

10.06.03

Pozorovalo se, že frakce DNA BCG mohou mít protinádorový účinek. V dalších studiích se ukázalo, že syntetické oligonukleotidy získané ze sekvencí genu BCG jsou schopné vyvolat imunostimulační účinky (jak in vitro tak in vivo). Ukázalo se, že jisté palindromické sekvence zahrnující centrální motiv CG vykazují uvedenou aktivitu. Hlavní úloha motivu CG při imunostimulaci se popisuje později v publikaci Krieg, Nature 374, p546 1995. Detailní analýza ukázala, že motiv CG musí být v kontextu s jistými sekvencemi a že uvedené sekvence se běžně vyskytují v bakteriální DNA, ale nikoliv v DNA obratlovců. Imunostimulační sekvencí je často purin, purin, C, G, pyrimidin, pyrimidin, kde dinukleotidový motiv CG není metylován, ale jiné nemetylované sekvence CpG jsou známy jako imunostimulanty a mohou se použít podle vynálezu.

Palindromické sekvence jsou přítomny jako určité kombinace šesti nukleotidů. Několik těchto motivů, buď jako repetice jednoho motivu nebo jako kombinace různých motivů, se může vyskytovat v některém oligonukleotidu. Přítomnost jedné nebo více uvedených imunostimulačních sekvencí obsahující oligonukleotidy může aktivovat různé imunitní subsystémy, které zahrnují přirozené smrtící buňky (které produkují interferon γ a mají cytolytickou aktivitu) a makrofágy (popisuje se v publikaci Wooldrige et al., vol. 89 (no.8), 1977). Neprokázalo se, že jiné sekvence, které obsahují jiný nemetylovaný CpG a které nemají tuto konvenční nukleotidovou sekvenci, jsou imunomodulační.

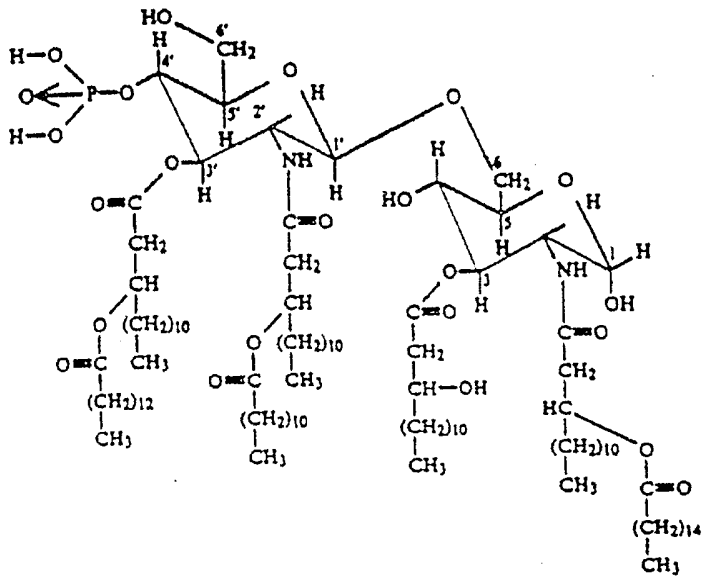
Jestliže se CpG začlení do vakcinačních prostředků, zavádí se v obecném případě jako volný roztok spolu s volným antigenem (popisuje se v patentovém dokumentu WO 96/02555 a v publikaci McCluskie and Davis, J. Immunol., 1998, 161(9):4463-6)) nebo je s antigenem spojen kovalentní vazbou (popisuje se v patentovém dokumentu PCT č. WO 98/16247) nebo

10.06.03

se připraví společně s nosičem, jako je hydroxid hlinitý ((jako v případě hepatitidového povrchového antigenu, což se popisuje v publikaci Davis et al., J. Immunol., 1998, 160(2):870-876), Davis et al., J. Immunol., 1998, 160(2):870-876, Brazolot-Millan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1998, 95(26), 15553-8).

Pomocné prostředky podle vynálezu zahrnují ve výhodných provedeních vynálezu alespoň jedno adjuvans získané z enterobakteriálního lipopolysacharidu.

Je známo, že enterobakteriální lipopolysacharid (LPS) je silný stimulátor imunitního systému, ačkoliv jeho použití jako adjuvans je omezeno jeho toxickými účinky. Netoxický derivát LPS, kterým je monofosforyllipid A (MPL), jenž vznikl odstraněním jaderné sacharidové skupiny a fosfátu z glukozaminu, se popisuje v publikaci Ribi et al., 1986, Immunology and immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419 a vykazuje následující strukturu:



10.06.03

Další detoxifikovaná verze MPL vznikla odstraněním acylového řetězce z polohy 3 hlavního řetězce disacharidu a nazývá se 3-O-deacylmonofosforyllipid A (3D-MPL). Tento derivát se může čistit a připravit způsobem popsaným v dokumentu GB 2122204B. tento dokument také popisuje přípravu difosforyllipidu A a jeho 3-O-deacylovaných variant. Výhodná forma 3D-MPL je emulze, která obsahuje malé částice s průměrem menším než 0,2 μm, přičemž způsob výroby se popisuje v dokumentu WO 94/21 292. Vodné přípravky obsahující monofosforyllipid A a povrchově aktivní činidla se popisují v dokumentu WO 9843670A2.

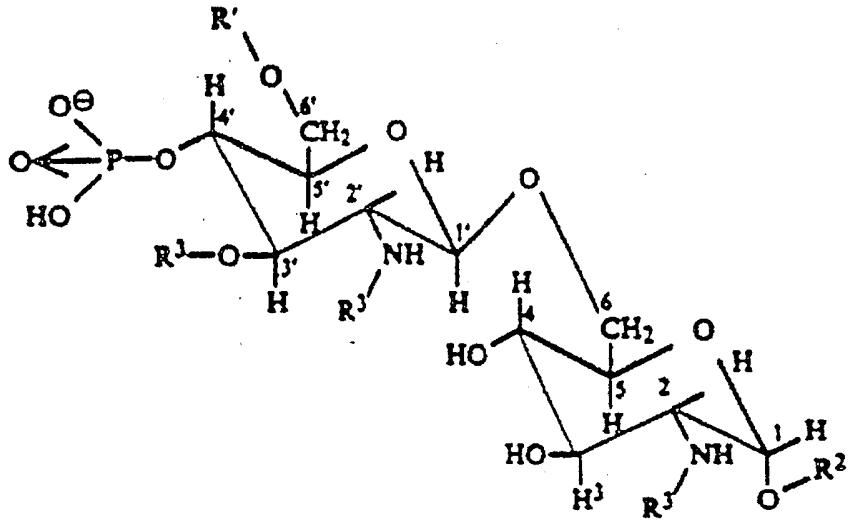
Adjuvans odvozené z bakteriálního lipopolysacharidu za účelem vytvoření kombinace adjuvans podle vynálezu se může čistit a zpracovávat z bakteriálních zdrojů nebo v jiném případě se může syntetizovat. Čištěný monofosforyllipid A se například popisuje v publikaci Ribi et al., 1986, Immunology and immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419 a 3-O-deacylmonofosforyllipid A a 3-O-deacyldifosforyllipid A získaný z mikroorganizmu *Salmonella sp.* se popisuje v patentovém dokumentu GB 2220211 a US4912094. Jiné čištěné a syntetické polysacharidy se popisují v dokumentu WO 98/01 139, US 6 005 099 a EP 0 729 473 B1 a v publikaci Hilgers et al., 1986, Int. Arch. Allergy. Immunol., 79(4): 392-6, Hilgers et al., 1987, Immunology, 60(1):141-6 a EP 0 549 074 B1). Zvláště výhodným bakteriálním lipopolysacharidovým adjuvans jsou 3D-MPL a β(1-6)glukosamindisacharidy popsané v patentovém dokumentu USA č. 6 005 099 a EP 0 729 473 B1.

Deriváty LPS, které se mohou použít podle vynálezu, jsou ty imunostimulanty, které jsou podobné strukturou imunostimulantům LPS nebo MPL nebo 3D-MPL. Deriváty LPS mohou

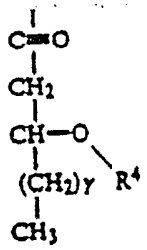
10.06.03

být acylované monosacharidy, které tvoří část shora v textu uvedené struktury MPL.

Výhodné disacharidové adjuvans je čištěný nebo syntetický lipid A obecného vzorce:



kde symbol R2 může být vodík nebo dihydrogenfosforečnan. Symbol R3 může být acylový řetězec nebo β-hydroxymyristoyl nebo zbytek 3-acyloxyacyl obecného vzorce



kde symbol R4 je a symboly X a Y mají hodnotu od 0 do přibližně 20.

Kombinace 3D-MPL a pomocné látky saponin, která se získala z kůry stromu *Quillaja Saponaria molina,* se popisuje v patentovém dokumentu EP 0 761 231 B. WO 95/17 210 popisuje emulzní systém adjuvans založený na skvalenu, α-tokoferolu a polyoxyetylensorbitanmonooleátu (Tween80), který se připravil spolu s imunostimulantem QS21 nebo 3D-MPL.

10.06.03

Saponiny jsou známé jako adjuvans ve vakcinačních prostředcích vhodných pro systémovou aplikaci. Hemolytická aktivita a pomocná aktivita jednotlivých saponinů je středem zájmu oboru (popisuje se například v publikaci Lacaille-Dubois and Wagner). Například přípravek Quil A (získaný z kůry jihoamerického stromu Quillaja Saponaria Molina) a jeho frakce se popisují v patentovém dokumentu USA č. 5 057 540 a v publikaci „Saponins as vaccine adjuvants," Kensil, C.R., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 1996, 12(1-2), 1-55 a EP 0 362 279 B1.

Určité struktury, které se nazývají komplexy stimulující imunitu (ISCOMS) a které obsahují frakce Quil A, jsou hemolytické a mohou se použít při výrobě vakcín (popisuje se v patentovém dokumentu Morein, B., EP 0 109 942 B1). Popisuje se, že tyto struktury vykazují aktivitu pomocného prostředku (EP 0 109 942 B1, WO 96/11 711).

Hemolytické saponiny QS21 a QS17 (frakce Quil A čištěné HPLC) se popisují jako silné systémové adjuvans a způsob jejich produkce se popisuje v patentovém dokumentu USA č. 5 057 540 a EP 0 362 279 B1. V tomto dokumentu se také popisuje použití QS17 (nehemolytické frakce Quil-A), který působí jako silné adjuvans v případě systémových vakcinačních prostředků. Použití QS21 se dále popisuje v publikaci Kensil et al., 1991, J. Immunology vol. 146, 431-437). V patentovém dokumentu WO 99/10008 se popisují kombinace QS21 a polysorbát nebo cyklodextrin. Systémy adjuvans ve formě částic obsahující frakce QuilA, jako je QS21 a QS7, se popisují v dokumentu WO 96/33739 a WO 96/11711.

Další saponiny, které se používají v systémových vakcinačních studiích, se získaly z jiných rostlinných druhů,

10.06.03

jako je Gypsofila a Saponaria (popisuje se v publikaci Bombford et al., Vaccine 10(9):572-577, 1992).

Je také známo, že saponiny se používaly ve studii, kdy se vakcinační prostředek aplikoval mukozálně, což vedlo ke kolísavým úspěchům při vyvolání imunitní odezvy. Ukázalo se, že saponin Quil A nevykazuje žádný účinek při vyvolání imunitní odezvy, když se antigen aplikuje intranasálně (popisuje se v publikaci Gizurarson et al., 1994, Vaccine Research 3, 23-29). Jiní autoři používají uvedené adjuvans úspěšně (Maharaj et al., Can. J. Microbiol, 1986, 32(5):414-20, Chavali and Campbell, Immunibiology, 174(3):347-59). ISCOM obsahující saponin Quil A se použil v intragastrickém a v intranasálním vakcinačním prostředku a vykazuje pomocnou aktivitu (popisuje se v publikaci McI Mowat et al., 1991, Immunology, 72, 317-322, McI Mowar and Donachie, Immunology Today, 12, 383-385).

QS21 a netoxická frakce Quil A se také popisuje jako orální nebo intranasální adjuvans (popisuje se v publikaci Sumino et al., J. Virol., 1998, 72(6): 4931-9 a v dokumentu WO 98/56 415).

Saponiny se také popisují v publikaci Lacaille-Dubois, M. and Wagner H., 1996 A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2 pp 363-386). Saponiny jsou steroidy nebo glykosidy triterpenu, které jsou široce zastoupeny v rostlinné říši a v říši mořských živočichů. Saponiny tvoří ve vodě koloidní roztoky, které při míchání pění, a je možné je použít při srážení cholesterolu. Když se saponiny dostanou do blízkosti buněčných membrán, tvoří se v membráně struktury podobné pórům, které způsobují protržení membrány. Tento jev charakterizuje

10.06.03

například hemolýza erytrocytů, což je vlastnost některých, ale ne všech saponinů.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje překvapivé zjištění, že kombinace imunostimulačních oligonukleotidů (CpG) a saponinů a lipopolysacharidů jsou extrémně silná adjuvans. Popisuje se vakcinační kombinace obsahující kombinaci saponinu a imunostimulačního oligonukleotidu a lipopolysacharidu s antigenem zhoubného bujení nebo jeho derivátu. Ve výhodném provedení vynálezu adjuvantní prostředek obsahuje saponin, přednostně QS21, imunostimulační oligonukleotid a 3D-MPL.

Je výhodné, aby vakcinační prostředek podle vynálezu dále obsahoval nosič. Ve výhodném provedení vynálezu oligonukleotidy v adjuvans a vakcinační prostředky působí s kombinací saponin/lipopolysacharid při vyvolání imunitní odezvy na specifický antigen vedoucí k zesílení regrese nádoru synergicky. Prostředky jsou silné při vyvolání imunitní odezvy, která je běžně spojena s imunitním systémem typu Th1. Kombinace pomocných látek nejsou vhodné pouze pro imunoprofylaxi onemocnění, ale také se používají pro imunoterapii onemocnění, jako je zhoubné bujení.

Prostředky obsahují protinádorový antigen a je možné je použít při imunoterapeutické léčbě zhoubného bujení. Pomocné prostředky se například používají dohromady s antigeny sloužícími k potlačení nádoru, jako jsou antigeny spojené s karcinomem prostaty, prsu, plic, pankreasu, s kolorektálním karcinomem, renálním karcinomem nebo s melanomem. Antigeny zahrnují MAGE 1, 3 a MAGE 4 nebo jiné antigeny MAGE, jak se popisují v dokumentu WO 99/40 188, PRAME, BAGE, Lage (je také znám jako NY Eos 1) SAGE a HAGE (popisuje se v dokumentu WO

10.06.03

99/53 061) nebo GAGE (popisuje se v publikaci Robbins and Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pps 628-636, Van den Eynde et al., International Journal of Clinical and Laboratory research (1997), Correale et al., (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p293. Tyto antigeny se exprimují v mnoha typech nádorů, jako je melanom, karcinom plic, sarkom a karcinom močového měchýře.

Antigeny MAGE vhodné pro použití podle vynálezu se mohou exprimovat jako fúzní protein se zesilovačem exprese nebo imunologickým fúzním partnerem In. Derivát je fúzní protein obsahující antigen pocházející z rodiny proteinů MAGE spojeny s heterogenním partnerem, kterým je přednostně MAGE 3. Proteiny se mohou chemicky konjugovat, ale s výhodou se exprimují jako rekombinantní fúzní proteiny, což umožňuje, že se v imunitním systému vyskytují ve větším množství ve srovnání s proteinem, který netvoří fúzi. Tak fúzní partner může propůjčovat epitopy pro buňky T (imunologický fúzní partner), jde s výhodou o epitopy pomocných buněk T, které jsou rozeznávány člověkem nebo pomáhají při expresi proteinu (zesilovač exprese), která je silnější, než v případě přirozeného rekombinantního proteinu. Je výhodné, aby fúzním partnerem byl imunologický fúzní partner a zesilovač exprese.

Ve výhodném provedení vynálezu se imunologický fúzní partner získal z proteinu D, což je povrchový protein gram-negativní bakterie *Haemophilus influenza B* (popisuje se v dokumentu WO 91/18 926). Derivát proteinu D s výhodou obsahuje přibližně první třetinu proteinu, zvláště pak prvních 100 až 110 aminokyselin N-konce. Derivát proteinu D je s výhodou lipidován. Prvních 109 zbytků fúzního partnera lipoproteinu D je lokalizováno na N-konci, přičemž vzniká antigen vakcinačního prostředku s dalšími exogenními epitopy buněk T a dochází k zesílení exprese v mikroorganizmu *E. coli*

10.06.03

(tak působí také jako zesilovač exprese). Lipidový konec zajišťuje optimální prezentaci antigenu v buňkách prezentující antigen.

Další fúzní partneři zahrnují nestrukturní protein z viru influenzy NS1 (hemaglutinin). V typickém případě se využívá 81 N-terminálních aminokyselin, ačkoliv se mohou využívat různé fragmenty, které zahrnují epitopy pomocných buněk T.

V jiném provedení vynálezu je imunologickým fúzním partnerem protein LYTA. Používá se C-terminální část molekuly. Protein Lyta se získal z z mikroorganizmu *Streptococcus pneumoniae,* který syntetizuje N-acetyl-L-alaninamidázu (amidáza Lyta) (kódovanou genem lytA (popisuje se v publikaci Gene, 43 (1986) p. 265-272). Amidáza Lyta je autolyzin, který specificky štěpí jisté vazby v peptidoglykanové kostře. C-terminální oblast proteinu Lyta je odpovědná za afinitu k cholinu nebo k některým cholinovým analogům, jako je DEAE. Této vlastnosti se využívá při vývoji plasmidů C-LYTA vhodných pro expresi v mikroorganizmu *E. coli*. Popisuje se čištění hybridních proteinů, které obsahují fragment C-LYTA na jeho N-konci (popisuje se v publikaci Biotechnology, 10 (1992) p. 795-798). Výhodné provedení využívá opakovanou část molekuly Lyta zjištěnou na konci C, který začíná zbytkem 178. Zvláště výhodná forma obsahuje zbytky 188 až 305.

Imunologické fúzní partnery uvedené shora v textu jsou také výhodné při napomáhání expresi. Takové fúze se exprimují ve větším výtěžku ve srovnání s přirozenými rekombinatními proteiny MAGE. Takové konstrukce se popisují v patentovém dokumentu WO 99/40 188.

Jiné antigeny specifické pro nádor jsou vhodné pro použití s adjuvans podle vynálezu a zahrnují, ale nejsou omezeny na

10.06.03

gangliosidy specifické pro nádor, jako je GM 2 a GM 3 nebo jejich konjugáty s nosičovými proteiny. Uvedený antigen může být samotný peptid hormonu, jako je celý hormon uvolňující gonadotropin (GnRH, WO 95/20 600), což je peptid obsahující 10 aminokyselin, který se používá při léčbě řady druhů zhoubného bujení nebo při imunokastraci.

Ve výhodném provedení vynálezu se využívají různé antigeny prostaty, jako je antigen specifický pro předstojnou žlázu (PSA), PAP, PSCA (popisuje se v publikaci PNAS 95(4) 1735-1749, 1998), PSMA nebo ve výhodném provedení vynálezu se používá antigen známý jako prostáza.

Prostáza je serinová proteáza specifická pro prostatu (podobná trypsinu), která obsahuje 254 aminokyselin s konzervativní serinovou proteázou katalytické triády H-D-S a aminoterminální prepropeptidové sekvence indikující funkci potencionální sekrece (popisuje se v publikaci P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Gelinas, L. Hood and K. Wand, „Molecular cloning and characterisation of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate restricted expression, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96, 3114-3119). Popisuje se místo putativní glykosylace. Předpokládaná struktura je velmi podobná jiným známým serinovým proteázám, které ukazují, že zralý polypeptid se balí do jediné domény. Zralý protein obsahuje 224 aminokyselin s jedním epitopem A2, který je přirozeně zpracováván.

Nukleotidová sekvence prosteázy a dedukovaná polypeptidová sekvence a homology se popisují v publikaci Ferguson, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 3114-3119) a v mezinárodní patentové přihlášce č. WO 98/12 302 (a také v odpovídajícím patentu USA č. 5 955 306), WO 98/20 117 (a také v odpovídajícicm patentu USA č. 5 840 871 a USA 5 786

10.06.03

148) (kalikrein specifický pro prostatu) a WO 00/04 149 (P703P).

Vynález popisuje prostředky obsahující fúze prostázového proteinu založeného na proteinu prostázy a jeho homologů (derivátů). Takové deriváty jsou vhodné pro použití jako terapeutické vakcinační prostředky, které jsou vhodné pro léčbu nádorů prostaty. V typickém případě fragment bude obsahovat alespoň 20, s výhodou 50, výhodněji 100 nepřerušovaných aminokyselin, jak se popisuje ve shora uvedeném patentovém dokumentu a v patentové přihlášce.

V jiném provedení vynálezu se popisuje mutovaný prostázový antigen, kde se mutace vyskytuje v aktivním místě proteinu. Derivát nebo fragmenty a homology prostázového antigenu nesou mutace v aktivním místě proteinu, přičemž podstatně snižují nebo s výhodou eliminují biologickou aktivitu prostázy. Výhodné mutace zahrnují nahrazení histidinových a aspartátových katalytických zbytků serinové proteázy. Ve výhodném provedení vynálezu prostáza zahrnuje mutaci histidin-alanin v aktivním místě, například ve zbytku 71 sekvence prostázy (popisuje se v publikaci Ferguson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 3114-3119). Odpovídající mutace v homologních proteinech se popisují v dokumentu WO 00/041 949). Tato mutace například odpovídá poloze 43 v P703P. Tato mutace může vést k podstatnému snížení katalytické účinnosti (vyjádřené enzymatickou specifickou aktivitou) proteinu. Snížení katalytické účinnosti je násobeno s výhodou faktorem 10^3, výhodněji alespoň faktorem 10^6. Protein, který obsahuje mutaci histidin-alanin je označen *. V jiném provedení vynálezu mutovaná nebo nemutovaná prostáza je částí fúzního proteinu, který obsahuje prostázu spojenou s nádorem nebo její fragment nebo homolog a heterogenní protein nebo jeho část působící jako fúzní partner. Protein a fúzní partner se může

10.06.03

chemicky spojovat, ale s výhodou se exprimuje jako rekombinantní fúzní proteiny v heterogenním expresním systému.

Ve výhodném provedení vynálezu se popisuje prostázový fúzní protein nebo jeho fragment nebo homolog spojený s imunologickým fúzním partnerem, který může poskytovat epitopy pomocných buněk T. Fúzní partner může působit prostřednictvím náhodného pomocného účinku spojeného s vylučováním aktivačních signálů velkým počtem buněk T specifických pro cizorodý protein nebo peptid, čímž se zesiluje vyvolání imunity vůči složce prostázy ve srovnání s proteinem, který netvoří fúzi. S výhodou se vybral heterogenní partner, aby byl rozeznatelný buňkami T u většiny lidí.

V jiném provedení vynálezu se popisuje prostázový protein nebo jeho fragment nebo homolog spojený s fúzním partnerem, který působí jako zesilovač exprese. Tak může fúzní partner napomáhat při expresi prostázy v heterogenním systému, přičemž v expresních systémech je exprese silnější ve srovnání s přirozeným rekombinantním proteinem.

Fúzní partner může působit jako imunologický fúzní partner a zesilovač exprese. Vynález dále popisuje fúzní proteiny obsahující mutovanou prostázu specifickou pro nádor nebo její fragmenty spojené s fúzním partnerem. Fúzní partner s výhodou může působit jako imunologický fúzní partner a zesilovač exprese. Ve výhodném provedení vynálezu fúzní partner je nestrukturní protein z viru influenzy NS1 (hemaglutinin) nebo jeho fragment. V typickém případě se používá 81 N-terminálních aminokyselin, ačkoliv se mohou použít různé fragmenty, které obsahují epiotopy pomocných buněk T (popisuje se v publikaci C. Hackett, D. Horowitz, M. Wysocka and S. Dillon, 1992, J. Gen. Virology, 73, 1339-1343). V případě, že NS1 je

10.06.03

imunologický fúzní partner dosahuje se silnější exprese. Exprese takových fúzí je silnější ve srovnání s přirozenými rekombinantními prostázovými proteiny.

V nejvýhodnějším provedení vynálezu fúzní protein obsahuje 81 N-terminálních aminokyselin nestrukturního proteinu fúzovaného s aminokyselinami C-konce v poloze 5 až 226. Jiní partneři exprese například zahrnují protein D, jeho fragmenty a C-Lyta, který se využívá v souladu s antigeny MAGE.

Dalším výhodným antigenem prostaty je P501S charakterizovaný sekvencí SEQ. ID. NO: 113, která se popisuje v dokumentu WO 98/37 814. Imunogenní fragmenty a jejich části obsahují alespoň 20, s výhodou 50, výhodněji 100 souvislých aminokyselin, které se popisují ve shora uvedené patentové přihlášce (například PS108, popisuje se v dokumentu WO 98/50 567).

Jiné antigeny specifické pro předstojnou žlázu se popisují v dokumentech WO 98/37 418 a WO 004 149. Dalším antigenem je STEAP, který se popisuje v publikaci PNAS 96, 14 523 14528-7 1999.

Vynález popisuje další antigeny spojené s nádorem, jako je Plu-1 (popisuje se v publikaci J. Biol.Chem. 274 (22) 15 633-15 645, 1999) a HASH-1, HasH-2, cripto (popisuje se v publikaci Salamon, et al., Bioessays 199, 21, 61-70 a v dokumentu USA č. 5 654 140), criptin (popisuje se v dokumentu USA č. 5 981 215). Antigeny zvláště vhodné pro vakcinační prostředky, které se používají při terapii zhoubného bujení také obsahují tyrozinázu a survivin.

Vynález dále zahrnuje peptidy odvozené od mucinu, jako je Muc1, které se například popisují v patentových dokumentech

10.06.03

USA č. 5744 144, č. 5827 666, č. 4 963 484 a WO 8805054. Specificky zvažované jsou peptidy odvozené od Muc1, které obsahují alespoň jednu opakující se jednotku peptidu Muc 1. Výhodné je, když obsahují alespoň dvě takové repetice a jsou rozeznávány protilátkami SM3 (popisuje se v patentovém dokumentu USA č. 6 054 438). Další peptidy odvozené z mucinu zahrnují peptid pocházející z Muc 5.

Předmětnou věc vynálezu je možné také použít v kombinaci s antigeny karcinomu prsu, jako je Her2neu, mamaglobin (popisuje se v patentovém dokumentu USA č. 5668267) nebo se popisují v dokumentech WO/0052165, WO99/33869, WO99/19479, WO 98/45328. Antigeny her2 neu se popisují mimo jiné v patentovém dokumentu USA č. 5 801 005. Antigen her2 neu s výhodou obsahuje celou extrabuněčnou oblast (tvořenou přibližně aminokyselinou 1 až 645) nebo jejími fragmenty a alespoň imunogenní částí vnitrobuněčné domény nebo celou vnitrobuněčnou oblastí tvořenou 580 C-terminálními aminokyselinami. Vnitrobuněčná část by měla zvláště obsahovat fosforylační oblast nebo její fragmenty. Takové konstrukce se popisují v patentovém dokumentu WO 00/44 899. Zvláště výhodná konstrukce je známa jako ECD-PD (popisuje se v patentovém dokumentu WO 00/44 899).

Zde používaný antigen her2 neu se může získat z krysy, myši nebo člověka.

Antigen Her2 neu může být celý antigen Her2 neu zbavený funkční transmembránové oblasti nebo jejích částí. Výhodné části obsahují extrabunečnou doménu. Ve výhodném provedení vynálezu se popisuje fúzní protein obsahující extrabuněčnou oblast spojenou s částí vnitrobuněčné oblasti, jak se popisuje v dokumentu WO 00/44 899.

10.06.03

Vynález popisuje prostředky schopné upravovat imunitní reakci vůči produktu exprese onkogenu Her2 neu (s výhodou vyvolává nebo zesiluje uvedenou imunitu). Tento protein se podílí na mnoha případech maligních nádorů u teplokrevních zvířat, kde není nutné, aby se produkt exprese vyskytoval v nádoru. Například nadměrná exprese genu se může podílet na iniciaci tvorby nádoru nebo jeho časného stádia, ale exprese proteinu se může v podstatě snížit nebo zcela vymizet. Vynález se může použít k vyvolání nebo zesílení účinné imunitní odezvy, aby došlo k přeměně nádoru, kde se vyskytuje Her 2 neu, na nádor, kde se Her2 neu nevyskytuje. Navíc je možné předejít tvorbě nádorů, kde se vyskytuje Her2 neu a vyvolat regresi existujících nádorů, které obsahují Her2 neu.

Zkratka „ECD" znamená extrabuněčnou oblast, „ICD" znamená vnitrobuněčnou oblast, „PD" znamená fosforylační oblast (to znamená, že je fosforylována), která je vnitrobuněčnou oblastí, „ΔPD" znamená fragment fosforylační oblasti, který leží ve fosforylační oblasti a „KD" znamená oblast kinázy, která leží ve vnitrobuněčné oblasti. Produkt exprese genu Her2 neu se nazývá protein Her2 neu a je také znám jako p185 nebo c-erbB2.

„Fúzní protein Her2 neu ECD-ICD", který je znám také jako „fúzní protein ECD-ICD" nebo „ECD-ICD" znamená fúzní protein (nebo jeho fragmenty), který obsahuje extrabuněčnou oblast (nebo její fragmenty) a vnitrobuněčnou oblast (nebo její fragmenty) proteinu Her2 neu. Fúzní protein ECD-ICD nezahrnuje podstatnou část transmembránové oblasti Her2 neu a s výhodou nezahrnuje žádnou transmembránovou oblast Her 2 neu.

Termín „fúzní protein Her2 neu ECD-ICD" a „fúzní protein Her2 neu ECD-PD" a jejich příbuzné termíny znamená jejich fragmenty, homology a funkční ekvivalenty (společně se

10.06.03

nazývají „varianty"), stejně jako ty, ve kterých jedna nebo více aminokyselin podle vynálezu buď (i) vyvolávají nebo zesilují imunitní odezvu ve srovnání s proteinem Her2 neu nebo (ii) podstatně neovlivňují vyvolání nebo zesílení imunitní odezvy ve srovnání s proteinem Her 2 neu (varianta například stimuluje odezvu pomocí pomocných buněk T nebo pomocí cytotoxických buněk T nebo stimuluje produkci protilátek). Popisují se specifické nelimitující příklady variant zahrnují fragmenty, homology a funkční ekvivalenty fúzního proteinu Her2 neu ECD-ICD a fúzního proteinu Her2 neu ECD-PD. Varianty mohou být „podstatně shodné" nebo „podstatně podobné" s fúzním proteinem, který obsahuje složky přirozeného polypeptidu a uchovávají si schopnost stimulovat imunitní odezvu.

Her2 neu PD obsahuje 268 aminokyselin, vyskytuje se uvnitř buňky a může být fosforylován proteinovými tyrozinovými kinázami. Tato oblast není shodná s žádnou odpovídající částí receptorů tyrozinové kinázy. Tak specifita a jedinečnost této oblasti ji dělá zvláště výhodnou pro použití jako vakcinačního prostředku vhodného pro zhoubné bujení. Exprese samotné této domény v bakteriálních a savčích buňkách je problematická. Výsledný protein PD je velmi labilní a není vhodný pro produkci ve velkém měřítku. V jednom provedení vynálezu se s výhodou používá fúze obsahující celou nebo část vnitrobuněčné oblasti nebo fosforylační oblast celé extrabuněčné oblasti Her2 neu nebo její části. Fúzní proteiny ECD-ICD a ECD-PD podle vynálezu jsou rozpustné, vylučují se do kultivačního média a jsou v něm stabilní.

Vakcinační prostředky podle vynálezu je možné použít proti libovolnému zhoubnému bujení, které je charakterizováno nádorem spojeným s expresí antigenu, jako je exprese Her 2 neu. Vedle zesílené exprese vnitrobuněčné oblasti nebo fosforylační oblasti nebo jejich variant, jako je fúzní

10.06.03

protein s extrabuněčnou oblastí nebo jeho varianty, fúzní proteiny ECD-ICD a ECD-PD se používají pro zdokonalené vakcinační prostředky.

Vynález dále popisuje vakcinační prostředek obsahující pomocný prostředek. Uvedené adjuvans obsahující saponin a imunostimulační oligonukleotid a antigen Her 2 neu, který ztratil svou transmembránovou oblast. Molekula Her2 neu může být z krys, myší, člověka nebo může jít o hybrid. Molekula her 2 s výhodou obsahuje v podstatě celou extrabuněčnou oblast. „v podstatě celou" znamená, že z extrabuněčné oblasti není deletováno více než 100 aminokyselin, s výhodou méně než 75 aminokyselin, výhodněji více než 50 aminokyselin. Je výhodné, když je přítomna celá extrabuněčná oblast. Extrabuněčná oblast v lidské konstrukci Her2 neu podle vynálezu s výhodou obsahuje v podstatě všech 600 N-terminálních aminokyselin, s výhodou všech 630 N-terminálních aminokyselin, výhodněji všech 650 aminokyselin. Lidský ICD začíná aminokyselinou v poloze 676 a končí aminokyselinou Val 1255. Fosforylační oblast se nachází v N-terminální oblasti ICD. Je výhodné, když se konstrukce využívané podle vynálezu obsahují fosforylační oblast, ale nezahrnují funkční transmembránovou oblast. Je výhodné, aby transmembránová oblast byla celá deletovaná.

Konstrukce, které jsou zvláště vhodné pro použití podle vynálezu se popisují v dokumentu WO/0044899.

Ve výhodném provedení vynálezu se antigen Her2 neu připravuje dohromady s 3D-MPC, QS21 a oligonukleotidem CpG spolu s lipozomem nebo v emulzi olej ve vodě. Takové prostředky tvoří humorální odezvu nebo odezvu zprostředkovanou buňkami. V porovnání s pomocným prostředkem, který obsahuje QS21 a 3D-MPL, prostředek podle vynálezu vyvolává u myší s výhodou silnější odezvu TH1. Prostředky, které obsahují

10.06.03

pouze CpG nevyvolávají podstatnou imunitní odezvu zprostředkovanou buňkou.

Prostředky mohou obsahovat antigeny spojené s mechanismy podporující nádor (například angiogeneze, invaze nádoru), jako jsou například tie 2, VEGF.

Výhodné oligonukleotidy vhodné pro použití jako adjuvans nebo vakcinační prostředky podle vynálezu s výhodou obsahují dva nebo více dinukleotidových motivů CpG oddělených alespoň třemi, výhodněji alespoň šesti nebo více nukleotidy. Oligonukleotidy podle vynálezu jsou v typickém případě deoxynukleotidy. Ve výhodném provedení vynálezu internukleotid v oligonukleotidu je fosforodithioát nebo s výhodou fosforothioátová vazba, ačkoliv vynález popisuje fosfodiesterové a jiné internukleotidové vazby, které zahrnují oligonukleotidy se smíchanými internukleotidovými vazbami. Způsoby přípravy fosforothioátových oligonukleotidů nebo fosforodithioátu se popisují v dokumentu USA č. 5 666 153, č. 5 278 302 a WO 95/26 204.

Příklady výhodných oligonukleotidů vykazují následující sekvence. Sekvence s výhodou obsahují fosforothioátové upravené internukleotidové vazby.

OLIGO 1(SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
OLIGO 2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
OLIGO 3(SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
OLIGO 4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
OLIGO 5 (SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

10.06.03

Jiné oligonukleotidy CpG mohou obsahovat výhodné shora uvedené sekvence, které vykazují delece nebo adice.

Oligonukleotidy CpG využívané podle vynálezu se mohou syntetizovat libovolným způsobem, který je znám v oboru (popisuje se například v dokumentu EP 468 520). Obyčejně se takové oligonukleotidy mohou syntetizovat použitím automatického syntetizéru. Obsahují v typickém případě 10 až 50 bazí.

Oligonukleotidy využívané podle vynálezu jsou v typickém případě deoxynukleotidy. Ve výhodném provedení internukleotidová vazba v oligonukleotidu je fosforodithioát nebo výhodněji fosforothioátová vazba, ačkoliv vynález také popisuje fosfodiestery. Také se zvažuje oligonukleotid obsahující různé internukleotidové vazby, jsou to například smíšené fosforothioátové fosfodiestery. Mohou se také použít jiné internukleotidové vazby, které stabilizují oligonukleotid.

Saponiny, které se mohou použít jako kombinace adjuvans podle vynálezu, zahrnují ty saponiny získané z kůry stromu Quillaja Saponaria Molina, jenž se nazývají Quil A a jejich frakce popsané v dokumentu USA č. 5 057 540 a v publikaci „Saponins as vaccine adjuvants," Kensil, C. R., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 1996, 12(1-2):1-55 a v dokumentu EP 0 362 279 B1. Zvláště výhodné frakce QuilA jsou QS212, QS7 a QS17.

β-escin je další výhodný hemolytický saponin vhodný pro použití jako pomocný prostředek podle vynálezu. Escin se popisuje v v publikaci Merck index (12^{th}ed., entry 3737) jako směs saponinů, které se vyskytují v semenech stromu koňského kaštanu (lat. *Asculus hippocastanum)*. Jeho izolace se provádí

10.06.03

chromatograficky a čištěním (popisuje se v publikaci Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953)) a pomocí pryskyřic vhodných pro výměnu iontů (popisuje se v dokumentu Erbring et al., USA č. 3 238 190). Čištěné frakce escinu vykazují biologickou aktivitu (popisuje se v publikaci Yoshikawa M., et al. (Chem. Pharm. Bull (Tokyo)1996 Aug., 44(8): 1454-1464)). β-escin je také znám jako aescin.

Dalším výhodným hemolytickým saponinem vhodným pro použití podle vynálezu je digitonin. Digitonin se popisuje v publikaci Merck index (12thed., entry 3204), jako saponin, který se získal ze semen stromu *Digitalis purpurea* a čistil postupem popsaného v publikaci Gisvold et al., J. Ant. Pharm. Assoc., 1934, 23, 664 a Ruhenstroth-Bauer, Physiol. Chem., 1955, 301, 621. Popisuje se jako klinické reakční činidlo pro stanovení cholesterolu.

Kombinace adjuvans podle vynálezu mohou dále obsahovat další nosič, tak že saponin nebo CpG nebo polysacharid se může spojovat s nosičem ve formě částic, přičemž se v kombinaci zesiluje účinek adjuvans. Zvláště výhodné systémové vakcinační prostředky obsahují například molekulu nosiče.

CpG užívaný v kombinacích adjuvans podle vynálezu může být ve volném roztoku nebo může tvořit komplexy s nosiči ve formě částic, jako jsou minerální sole (například sole hliníku nebo vápníku), lipozomy, ISCOM, polymery (polymery tvořené molekulami kyseliny mléčné, polyglykolické polymery, polyfosfazin, polyaminokyseliny, alginát, chitosan) nebo mikročástice. Uvedené nosiče jsou s výhodou kationické. Vakcinační prostředky podle vynálezu dále obsahují antigen, který může a nemusí být spojen s komplexem CpG-nosič. V tomto případě antigen může být volná suspenze nebo může být spojen s odděleným nosičem.

10.06.03

Saponiny tvořící část vynálezu se mohou oddělit ve formě micel nebo mohou být ve formě velkých uspořádaných struktur, jako je ISCOM (popisuje se v dokumentu č. EP 0 109 942 B1) nebo ve formě lipozomů (popisuje se v dokumentu WO 96/33 739), když se připravují spolu s cholesterolem a lipidem nebo ve formě emulze olej ve vodě (popisuje se v dokumentu WO 95/17 210). Saponiny se mohou s výhodou spojovat se solí kovu, jako je hydroxid hlinitý nebo fosforečnan hlinitý (popisuje se v dokumentu WO 98/15 287). V jiném případě se saponin může spojovat s určitým adjuvans, jako je chitosan. Saponin se může vyskytovat v suché formě, jako je prášek. Konečná forma vakcinačního prostředku, ve které se aplikují na povrch sliznice, je ve své podstatě hemolytická. Saponin může být nebo nemusí být fyzicky spojen s antigenem buď pomocí přímé vazby nebo společnou interakcí se stejnou molekulou nosiče (popisuje se v dokumentu Velké Británie č. 9822712.7, WO 98/16247).

CpG, saponin a lipopolysacharid v adjuvans nebo ve vakcinačním prostředku podle vynálezu se mohou samy separovat nebo naopak spojovat. CpG a saponin může být ve volné suspenzi nebo se může spojovat prostřednictvím nosiče. Výhodný je nosič ve formě částic, jako je hydroxid hlinitý nebo kationický liposom nebo ISCOM.

Výhodná kombinace adjuvans podle vynálezu se skládá z jednoho nebo více oligonukleotidů CpG, které obsahují alespoň 3 s výhodou alespoň 6 nukleotidů mezi dvěma sousedníma motivy CG spolu s QS21 a určitým nosičem se vybraly ze skupiny obsahující emulzi olej ve vodě nebo DQ. Je výhodné, když lipopolysacharid je derivát difosforyllipidu nebo monofosforyllipidu. Výhodný je 3-O-deacylmonofosforyllipid A. Pomocný prostředek s výhodou obsahuje CpG 2006 (SEQ ID NO: 4)

10.06.03

nebo CpG 1758 (SEQ ID NO: 2) nebo CpG 1826 (SEQ ID NO: 1) smíchaný s QS21 a s nosičem ve formě částic vybraným ze skupiny obsahující emulzi olej ve vodě nebo DQ. Zvláště výhodné vakcinační prostředky například obsahují uvedené pomocné prostředky a antigen. Výhodný vakcinační prostředek podle vynálezu se používá při vyvolání systémové imunitní odezvy po aplikaci jedinci systémovým způsobem.

Pomocné prostředky podle vynálezu mohou obsahovat emulzi založenou na oleji. Pomocné prostředky založené na olejové emulzi jsou známy po mnoho let. Spadají sem práce spojené s Freundovým úplným nebo neúplným adjuvans, která obsahují emulzi s minerálním olejem. V této době se věnovalo hodně času k vytvoření stabilních a dobře tolerovatelných alternativ uvedených silných, reaktogenních pomocných prostředků.

Popisuje se řada emulzních systémů, které jsou tvořeny jednou nebo více fázemi. Adjuvans obsahující emulzi olej ve vodě je možné použít jako adjuvantní prostředek (popisuje se v dokumentu EP O 399 843 B). Popisují se také prostředky obsahující emulze olej ve vodě a jiná aktivní činidla, které je možné použít jako adjuvans v případě vakcinačních prostředků (popisuje se v dokumentu WO 95/17 210, WO 98/56 414, WO 99/12 565, WO 99/11 241). Popisují se další pomocné prostředky obsahující olejovou emulzi, jako je voda v oleji (dokument USA č. 5 422 109, EP 0 480 982 B2) a emulze voda v oleji ve vodě (popisuje se v dokumentu USA č. 5 424 067, EP 0 480 981 B).

Pomocný prostředek obsahující olejovou emulzi vhodný pro použití podle vynálezu může být přirozený nebo syntetický a může být minerální nebo organický. Příklady minerálních a organických olejů jsou pro odborníka zřejmé.

10.06.03

Aby prostředek obsahující olej ve vodě byl pro člověka vhodný, olejová fáze emulzního systému zahrnuje metabolizovatelný olej. Význam termínu metabolizovatelný olej je dobře znám v oboru. Termín „metabolizovatelný" znamená, že je možné ho změnit působením metabolizmu (popisuje se v publikaci Dorland´s illustrated medical dictionary, W.B. Sanders company, 25th edition (1974)). Vhodným olejem je libovolný rostlinný olej, rybí olej, zvířecí nebo syntetický olej, který není toxický pro příjemce a je schopen být přeměněn metabolizmem. Běžnými zdroji rostlinného oleje jsou ořechy (jako je arašídový olej), semena a zrní. Vynález dále popisuje syntetické oleje, které mohou zahrnovat běžně dostupné oleje, jako je NEOBEE® a jiné. Skvalen (2,6, 10, 15, 19, 23-hexametyl-2,6,10, 14, 18, 22-tetrakosahexaen) je nesaturovaný olej, který se nachází ve velkém množství v oleji z jater žraloka a v malém množství v olivovém oleji, v oleji z moučných červů, v oleji z rýžových otrub a v kvasinkách. Tento olej je zvláště vhodný při použití podle vynálezu. Skvalen je metabolizovatelný olej, protože je meziproduktem biosyntézy cholesterolu (Merck index, 10. vydání, č. 8619).

Zvláště výhodnými olejovými emulzemi jsou emulze olej ve vodě a zvláště pak skvalen ve vodních emulzích.

Příklady výhodných systémů emulzí se popisují v patentových dokumentech WO 95/17 210 a WO 99/11 241, které popisují adjuvans ve formě emulze založené na skvalenu, α-tokoferolu a přípravku Tween 80. Mohou se také připravit s imunostimulanty QS21 a/nebo 3D-MPL. V dokumentu WO 99/12 565 se popisuje zlepšení uvedených skvalenových emulzí s přidáním sterolu do olejové fáze. Za účelem stabilizace emulze (popisuje se v dokumentu WO 98/56 414) se do olejové fáze může přidat triglycerid, jako je trikaprylin (C27H5006).

10.06.03

Velikost olejových kapiček, které se vyskytují ve stabilní emulzi olej ve vodě je s výhodou menší než 1 μm. Uvedená velikost může být v rozmezí 30 až 600 nm, s výhodou přibližně 30 až 500 nm. Nejvýhodnější je, když průměr je 150 až 500 nm a zvláště výhodné jsou kapénky s průměrem 150 nm měřeno fotonovou korelační spektrofotometrií. 80 % olejových kapének je ve výhodném rozmezí velikostí, výhodněji více než 90 % a nejvýhodněji více než 95 % olejových kapének se pohybuje v definovaném rozmezí velikosti. Množství složek přítomných v olejových emulzích podle vynálezu tvoří běžně 2 až 10 %, skvalen, 2 až 10 % alfa-tokoferol a 0,3 až 3 % povrchochově aktivní činidlo, jako je polyoxyetylen-sorbitanmonooleát. Je výhodné, aby poměr olej (s výhodou skvalen) ku tokolu (s výhodou α-tokoferol) se rovnal nebo byl menší než 1, přičemž vzniká více stabilní emulze. Emulgační činidlo, jako je přípravek Tween 80 a Span 85, se mohou také vyskytovat v množství přibližně 1 %. V některých případech může být výhodné, že vakcinační prostředky podle vynálezu mohou dále obsahovat stabilizační činidlo.

Způsob přípravy emulzí olej ve vodě je dobře znám v oboru. Způsob běžně zahrnuje míšení olejové fáze obsahující tokol s povrchově aktivním činidlem, jako je PBS/TWEEN80(tm). Pak následuje homogenizace za použití homogenizéru. Odborníkovi je zřejmé, že způsob, který zahrnuje krok dvojnásobný průchodu směsi injekční jehlou, je vhodný pro homogenizaci malých objemů kapaliny. Stejně je možné přizpůsobit emulgační postup v mikrofluidizéru (zařízení mukrofluidika M110S, maximálně 50 průchodů, v čase 2 minuty maximální tlak na vstupu je 6 barů (tlak na výstupu je přibližně 850 barů) pro produkci menších nebo větších objemů emulze. Této adaptace je možné dosáhnout běžným experimentem, který zahrnuje sledování výsledné emulze dokud se nedosáhne přípravku, kde olejové kapénky mají požadovaný průměr.

10.06.03

Kombinace adjuvans podle vynálezu se může použít jako systémové nebo mukozální adjuvans. Vynález popisuje systémové vakcinační prostředky, které se aplikují systémovým nebo parenterálním způsobem. To znamená intramuskulárně, intradermálně, transdermálně, subkutánně, intraperitoneálně nebo intravenózně. Výhodný způsob aplikace je transdermálním způsobem například pomocí kožních náplastí.

Systémové vakcinační prostředky podle vynálezu se mohou použít při ochraně nebo léčbě savců náchylných nebo trpících onemocněním intramuskulárním, intraperitoneálním, intradermálním, transdermálním, intravenózním nebo subkutánním způsobem. Způsoby systémové aplikace vakcinačních prostředků mohou zahrnovat běžné injekční stříkačky a jehly nebo zařízení navržené pro balistické zavedení pevných vakcín (popisuje se v publikaci WO 99/27 961) nebo tlakové vstřikovače kapalin, které nemají jehly (popisuje se v patentovém dokumentu USA č. 4 596 556, č. 5 993 412) nebo transdermální náplasti (popisuje se v patentovém dokumentu WO 97/48 440, WO 98/28 037). Vynález je možné také použít k zesílení imunogennosti antigenů aplikovaných na kůži (transdermální nebo transkutánní zavedení, popisuje se v patentových dokumentech WO 98/20 734, WO 98/28 037). Vynález dále popisuje aplikátory pro systémovou aplikaci, které jsou předem naplněny vakcinačním prostředkem nebo adjuvans podle vynálezu. Vynález dále popisuje aplikátor pro systémovou aplikaci, který je předem naplněn vakcinačním prostředkem nebo adjuvans podle vynálezu. V souladu s tím se dále popisuje způsob vyvolání imunitní odezvy jedince. Tento způsob zahrnuje aplikaci vakcinačního prostředku podle vynálezu jedinci, přičemž vakcinační prostředek se aplikuje parenterálním nebo systémovým způsobem. Výhodné způsoby vyvolání imunitní odezvy zahrnují aplikaci vakcinačního prostředku proti derivátu Her 2 neu spolu se saponinem

10.06.03

odvozeným z Quil A, jako je QS21, a nosičem, jako je emulze olej ve vodě, lipozom obsahující cholesterol nebo alum.

Systémové vakcinační prostředky podle vynálezu se mohou použít při ochraně nebo léčbě savců náchylných nebo trpících onemocněním aplikací mukozálním způsobem, jako je orální způsob/zažívacím traktem nebo nasálním způsobem. Alternativní mukozální způsob je intravaginální a intrarektální způsob. Výhodný mukozální způsob je aplikace nasálním způsobem, který se nazývá intranasální vakcinace. Způsoby intranasální vakcinace jsou dobře známy v oboru a zahrnují aplikaci kapének, spreje a suchého prášku do nasofaryngu imunizovaného jedince. Vynález popisuje vakcinační prostředky ve zmlžované formě a ve formě aerosolu. Vynález dále popisuje střevní prostředky, jako jsou kapsule a granule rezistentní vůči podmínkám v zažívacím traktu vhodné pro orální aplikaci, čípky vhodné pro rektální nebo vaginální aplikaci.

Pomocné prostředky podle vynálezu reprezentují třídu mukozálních pomocných prostředků vhodných pro aplikaci člověku, přičemž je možné, že systémová vakcinace se nahradí mukozální vakcinací. Ve výhodném provedení vynálezu čisté saponiny, jako je Quil A nebo jeho deriváty zahrnující QS21, escin, digitonin nebo saponiny *Gosophila* nebo *Chenopodium quinoa* v kombinaci s imunostimulačním oligonukleotidem se mohou použít jako adjuvans v případě mukozální aplikace antigenů, aby se dosáhlo systémové imunitní odezvy.

Pomocné prostředky podle vynálezu se používají při přípravě vakcinačních prostředků, které se mohou aplikovat systémovým nebo mukozálním způsobem. V případě, že se vakcinační prostředky aplikují mukozální aplikací, pomocné prostředky obsahují hemolytický saponin.

10.06.03

V případě mukozální aplikace prostředek podle vynálezu s výhodou obsahuje hemolytický saponin. Hemolytický saponin nebo saponinové přípravky podle vynálezu se stanovují následujícím testem.

1. Čerstvá krev, která pochází z morčat, se promyla třikrát fyziologickým roztokem pufrovaným fosforečnanem (PBS) za použití stolní centrifugy. Po resuspendování do počátečního objemu se krev dále 10 krát zředila v PBS.
2. Objem 50 µl této suspenze krve se přidal do 800 µl PBS, které obsahuje dvojnásobné ředění povrchově aktivního činidla nebo saponinu.
3. Po osmi hodinách je možné hemolýzu hodnotit vizuálně nebo měřením optické hustoty supernatantu. Přítomnost červeného supernatantu, který absorbuje světlo při vlnové délce 570 nm, indikuje přítomnost hemolýzy.
4. Výsledky jsou vyjádřené jako koncentrace prvního ředění saponinu, při kterém nedochází k hemolýze.

Pro účely vynálezu je saponinový pomocný prostředek hemolytický v případě, že lyzuje erytrocyty v koncentraci nižší než 0,1%. V podstatě čisté vzorky QuilA, QS21, QS7, digitonin a β-escin jsou hemolytické saponiny, jak se definovalo v tomto textu. Saponiny podle vynálezu vykazují hemolytickou aktivitu přibližně v koncentraci 0,5 až 0,00001 %, výhodněji při koncentraci 0,05 až 0,00001 %, dokonce ještě výhodněji v koncentraci 0,005 až 0,00001 % a nejvýhodnější je koncentrace 0,001 až 0,0004 %. V ideálním případě uvedené saponiny vykazují hemolytickou aktivitu podobnou (to znamená desetinásobný rozdíl), jako vykazuje QS21.

Vakcinační prostředky podle vynálezu se mohou také aplikovat orálním způsobem. V takových případech farmaceuticky přijatelný ekcipient může zahrnovat alkalické pufry nebo střevní kapsule nebo mikrogranule. Vakcinační prostředky podle

10.06.03

vynálezu se mohou také aplikovat vaginálním způsobem. V takových případech farmaceuticky přijatelné pomocné látky mohou také zahrnovat emulgační činidla, polymery, jako je přípravek CARBOPOL® a další známé stabilizátory vaginálních krémů a čípků. Vakcinační prostředky podle vynálezu se mohou aplikovat rektálním způsobem. V takových případech pomocné látky mohou také zahrnovat vosky a polymery, které jsou známy v oboru a využívají se při přípravě rektálních čípků.

Vynález dále popisuje přípravu pomocných prostředků, které obsahují více jak jeden saponin. Kombinace alespoň dvou následujících skupin, které obsahují QS21, QS7, Quil A, β-escin nebo digitonin. Prostředky podle vynálezu mohou zahrnovat kombinace více než jednoho imunostimulačního oligonukleotidu.

V jiném případě se prostředky mohou kombinovat s vakcinačními nosiči, které obsahují chitosan nebo jiný polykationické polymery, polymery tvořené molekulami kyseliny mléčné a polylaktid-ko-glykolidové částice, polymerové matrice založené na poly-N-acetylglukozaminu, částice složené s polysacharidů nebo chemicky upravených polysacharidů, liposomy a částice založené na lipidech, částice tvořené monoesterem glycerolu atd.. Saponiny se mohou také připravovat společně s cholesterolem za vzniku částic, jako jsou liposomy nebo ISCOM. Dále se saponiny mohou připravovat spolu s polyoxyetyleneterem nebo polyoxyetylenesterem za vzniku roztoku, který neobsahuje částice nebo za vzniku suspenze nebo za vzniku určitých struktur, jako je paucilamelární liposom nebo ISCOM. Saponiny se mohou také připravovat spolu s pomocnými látkami, jako je Carbopol®, aby vzrostla viskozita, nebo spolu se suchým práškem, jako je pomocná látka laktóza.

10.06.03

Zvláště výhodné pomocné prostředky jsou kombinace 3D-MPL a QS21 (popisuje se v dokumentu EP 0 671 948 B1), emulze olej ve vodě obsahující 3D-MPL a QS21 (popisuje se v dokumentu WO 95/17 210, WO 98/56 414) nebo 3D-MPL připravený spolu s jinými nosiči (popisuje se v dokumentu EP 0 689 454 B1) v kombinaci s oligonukleotidy CpG. Množství CpG nebo imunostimulačních oligonukleotidů v adjuvans nebo ve vakcinačních prostředcích podle vynálezu je v obecném případě malé, ale závisí na vakcinačním prostředku. Pohybuje se v rozmezí 1 až 1 000 µg v jedné dávce, s výhodou 1 až 500 µg v jedné dávce a nejvýhodněji 1 až 100 µg v jedné dávce.

Množství saponinu vhodné pro použití v pomocném prostředku podle vynálezu může být 1 až 1000 µg, s výhodou 1 až 500 µg, výhodněji 1 až 250 µg v jedné dávce a nejvýhodnější je 1 až 100 µg v jedné dávce. Poměr CpG:saponinu (hmotnost/hmotnost) je proto v rozmezí 1:1 000 až 1 000:1 a bude v typickém případě v rozmezí 1:100 až 100:1 a s výhodou v rozmezí 1:10 až 1:1 nebo 1:1 až 10:1 a nejvýhodněji 1:1, 4:1 nebo 10:1.

Prostředky podle vynálezu se mohou použít pro účely profylaxe a terapie. Vynález popisuje použití kombinace saponinu a molekuly CpG při výrobě vakcinačního prostředku vhodného pro profylaxi a léčbu virové, bakteriální a parazitické infekce, alergie, zhoubného bujení a jiných poruch, které nejsou chronické. Vynález dále popisuje způsob léčby savce náchylného nebo trpícího infekčním onemocněním nebo zhoubným bujením nebo alergií nebo autoimunitním onemocněním. Vynález dále popisuje kombinaci vakcinačního prostředku a adjuvans, která obsahuje saponin a CpG, jak se popisuje v případě použití pro přípravu léčebného prostředku. Vakcinační prostředek se v obecném případě popisuje

10.06.03

v publikaci New Trends and Development in Vaccines, Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978.

Vynález dále popisuje způsob prevence onemocnění u jedince, jako je to v případě karcinomu prostaty, prsu, kolorektálního karcinomu, karcinomu plic, karcinomu pankreasu, renálního karcinomu a melanomu. Tento způsob zahrnuje aplikaci prostředku systémovým způsobem.

V jiném případě vynález popisuje mukozální vakcinační prostředek, který zahrnuje antigen a hemolytický saponin. Popisuje se způsob léčby jedince náchylného nebo trpícího onemocněním, který zahrnuje aplikaci prostředku na povrch sliznice jedince.

Dále se popisuje způsob vyvolání specifické imunitní odezvy na systémový antigen u savců, který zahrnuje aplikaci prostředku na povrch sliznice uvedeného savce. Vakcinační prostředek obsahuje antigen a hemolytický saponin. Dále se popisuje způsob výroby vakcinačního prostředku nebo adjuvans, který obsahuje saponin a molekulu CpG a antigen.

Příklady vhodných farmaceuticky přijatelných pomocných látek vhodných pro použití v kombinacích podle vynálezu zahrnují vodu, fyziologický roztok pufrovaný fosforečnanem, izotonické pufrované roztoky.

Přehled obrázků na výkrese

Obrázek č. 3 zobrazuje výsledky růstu nádoru myší ze skupiny 1, 2, 4, 5 a 6. Na obrázku č. 4 jsou zobrazeny výsledky růstu nádoru u myší ve skupinách 1, 5, 6, 7 a 11. Na obrázku č. 5 jsou výsledky získaných u myší ve skupinách 1, 5, 6, 8, 9 a 10. Vakcinační prostředky, které vyvolaly úplnou

10.06.03

regresi nádoru byly ty, které obsahují jak imunostimulační oligonukleotid tak saponin.

Na obrázku č. 6 a 7 je zobrazena lymfoproliferace splenocytů in vitro po inkubaci s imunogenem v koncentraci 5 µg/ml (ECD-PD) nebo s extrabuněčnou (ECD) nebo intrabuněčnou oblastí (ICD) nebo Her 2 neu.

Obrázky č. 8 a 9 zobrazují humorální imunitní odezvu na imunogen (ECD-PD) vyjádřenou jako Ig. Hodnoty se získaly měřením testem ELISA (obrázek č. 8) nebo rozšířením izotypu IgG při těchto odezvách (obrázek č. 9).

Na obrázku č. 10 a 11 je zobrazena lymfoproliferace splenocytů po druhé vakcinaci a 14 dní po čtvrté vakcinaci po inkubaci in vitro s imunogenem v koncentraci 3 µg/ml (NS1-P703P) nebo s P703P exprimovaném v mikroorganizmu pichia (15 µg/ml) s nespecifickým fúzním proteinem NS1-OspA.

Obrázky č. 12 a 13 zobrazují humorální imunitní odezvu na imunogen (NS1-P703P) vyjádřenou jako celkové Ig. Hodnoty se získaly měřením testem ELISA a vyjádřily se jako střední hodnoty titrů (obrázek č. 10) nebo rozptylem izotypu IgG při těchto odezvách (obrázek č. 11.).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1:

- ECD-PD se připravil v buňkách CHO způsobem popsaným v dokumentu WO 00/44 899. Přípravky se testovaly na myších a králících.
- Přípravky se porovnávaly s řadou kontrol.

10.06.03

SBAS1+SBA7:

ECD-PD se připravil s oligonukleotidem CpG 2006 a 3D-MPL, QS21 ve formě liposomů.

Přípravek SBAS1

Přípravek SBAS1 obsahuje QS21 v liposomech a 3D-MPL spojený s liposomy a připravil se způsobem popsaným v dokumentu EP 0822831.

Přípravek SBAS1 a SBAS7

Ke shora v textu popsanému přípravku se přidal oligonukleotid CpG 2006. Antigen se před použitím smíchal s pomocným prostředkem.

Přípravky založené na SBAS7 a SBAS2 (myš)

V případě jedné dávky 50 µl vakcinačního prostředku se protein ECD-PD (25 µg) ředil 10x koncentrovaným PBS s hodnotou pH 6,8 a vodou. Pak se přidala emulze olej ve vodě, která obsahuje SB62. Tato emulze obsahuje 5% skvalen, 5% tokoferol, 2% Tween 80. Velikost částice je 180 nm.

Příprava emulze SB62 (2x koncentrované)

Tween 80 se rozpustil ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosforečnanem (PBS) za vzniku 2% roztoku v PBS. Aby vzniklo 100 ml dvakrát koncentrované emulze, smíchalo se na vortexu 5 g alfa-tokoferolu LD a 5 ml skvalenu. Za stálého míchání se přidalo 90 ml roztoku PBS/Tween. Výsledná emulze se nechala projít stříkačkou a nakonec se mikrofluidizovala za použití mikrofluidizéru M110S. Výsledné kapénky oleje mají velikost

10.06.03

přibližně 180 nm. Pak se přidalo 10 µg 3D-MPL, 10 µg QS21. Pak se přidalo 50 µg CpG ODN 2006 a o 30 minut později se přidal thiomersal jako konzervační činidlo v koncentraci 50 µg/ml. Všechny inkubace proběhly při teplotě místnosti za stálého míchání.

Přípravky SBAS se připravily způsobem popsaným shora v textu, s výjimkou, že se nepřidal oligonukleotid CpG.

SBAB7 je oligonukleotid CpG 2006.

Přípravky založené na SBAB2 a SBAB 7 (králík)

V případě jedné dávky 500 µl vakcinačního prostředku se protein ECD-PD (100 µg) ředil 10x koncentrovaným PBS s hodnotou pH 6,8 a vodou. Pak se přidala emulze 250 µl SB62, 100 µg 3D-MPL, 100 µg QS21 a 500 µg CpG ODN 2006. Po 30 minát se přidal thiomersal v koncentraci 50 µg/ml jako konzervační činidlo. Všechny inkubace se provedly při teplotě místnosti za stálého míchání.

Příklad 2: Experimenty zavedení nádoru.

Skupině myší F1 (C57 x Balb) (8 myší ve skupině) se injekcí zavedla 1/10 dávky lidského antigenu (25 µg) v den 0, 14 a 42 a v den 56 se zavedly podkožně buňky TC1 exprimující Her2 ($2x10^6$ buněk TC1 Her2 na jedno zvíře).

Buňky TC1 z jedné poloviny sleziny zvířete se shromáždily v den 56 a zvířata se nechala vykrvácet.

Jak je zobrazeno na obrázku č. 1 přidání oligonukleotidu CpG k přípravku 3D-MPL/QS21 synergicky zesiluje regresi nádoru

10.06.03

a pouze aplikací těchto přípravků dochází k úplné regresi nádoru u myší.

Příklad 3: Imunogennost ECD-PD v různých adjuvans u králíků.

Šest skupin, kdy každá obsahuje 4 králíky, se imunizovaly v den 0, 21 a 42 se 100 µg ECD-PD v AS02, AS01, AS05, AS06 (CpG 2006 absorbované na alum), AS07 a AS02B a AS07.

Serologie se analyzovala 14 dní post III a v tabulce č. 1 je zobrazeno, že prostředky podle vynálezu byly lepší ve srovnání s testovanými prostředky při vyvolání vysokého titru protilátkové odezvy.

Tabulka č. 1

	pre	14 postIII
AS02B	50	96 923
AS01B	173	196 637
AS5	144	76 221
AS6	142	74 180
AS07A	480	3 904
AS02B+AS07A	94	362 713

Příklad 4: Imunogennost Her2 neu, ECD-PD u dospělých opic Rhesus

Dospělé opice Rhesus se imunizovaly ECD-PD za použití různých pomocných prostředků.

AS02B	QS21, 3D-MPL, v emulzi olej ve vodě
AS01	QS21, 3D-MPL v liposomech
AS05	QS21 v liposomech
AS06	CpG 2006 v alum

AS07 CpG 2006

AS02B+AS07 detaily se popisují v příkladu 1.

Vakcinace vyvolává vyšší protilátkovou odezvu u přípravků podle vynálezu (AS)2+AS07. Zobrazeno na obrázku č. 1.

Další analýza ukazuje protilátkovou odezvu, která je polyklonální, a demonstruje inhibiční aktivitu růstu in vitro lidské buněčné linie karcinomu prsu (SKBR3), které nadměrně exprimují molekulu Her2 neu. Herceptin, což je monoklonální protilátka vhodná pro léčbu nádorů, které exprimují Her2 neu, je schopna inhibovat růst uvedené buněčné linie.

U protilátek vytvořených po aktivní vakcinaci vakcinačním prostředkem se testovala jejich funkce.

Příklad 5: Imunizace myší antigenem ECD-PD

Tento experiment se navrhl za účelem zkoumání rozmezí pomocných prostředků s antigenem, který je fúzí extrabuněčné oblasti Her2 neu spojenou s fosorylační oblastí (ECD-PD), která se produkovala v buňkách CHO podle způsobu popsaného v dokumentu WO 00/44 899.

skupina	antigen (25 µg)	adjuvans
1	ECD-PD	žádné (fyziologický roztok pufrovaný fosforečnanem (PBS))
2	ECD-PD	liposomy s QS21 a 3D-MPL v membráně
3	ECD-PD	emulze olej ve vodě obsahující tokol s QS21 a 3D-MPL
4	ECD-PD	CpG
5	ECD-PD	liposomy s QS21 a 3D-MPL v membráně + CpG

10.06.03

6	ECD-PD	emulze olej ve vodě obsahující tokol s QS21 a 3D-MPL + CpG
7	ECD-PD	3D-MPL + CpG
8	ECD-PD	QS21 + CpG
9	ECD-PD	emulze olej ve vodě obsahující tokol + CpG
10	ECD-PD	liposomy s QS21 v membráně + CpG
11	ECD-PD	liposomy s 3D-MPL v membráně + CpG

V emulzích olej ve vodě, které obsahují tokol a použily se ve shora uvedených skupinách, se používá D,L-tokoferol (CAS č. 10191-41-0, chemický název (2RS, 4´RS, 8´RS)-2,5,7,8-tetrametyl-2-(4´,8´, 12-trimetyltridecyl)-6-chromanol), který je běžně dostupný u firmy ROCHE(tm). Jestliže je v emulzi olej ve vodě přítomen tokol, je v koncentraci 2,5 % (objem) a je v kombinaci se skvalenem, který je v koncentraci 2,5 % (objem). Oba oleje se smíchaly a přidal se polyoxyetylensorbitanmonooleát (Tween80(tm)) pak došlo k mikrofluidizaci (za použití mikrofluidizačního stroje M110S, dochází maximálně k 50 průchodům po dobu 2 minuty při maximálním tlaku na vstupu 6 barů (tlak na výstupu je přibližně 850 barů) (popisuje se v dokumentu WO 95/17 210). Skupiny 3, 6 a 9 jsou založené na shora uvedené emulzi s tokolem, přičemž se přidá vodný roztok QS21, 3D-MPL nebo CpG.

QS21 a 3D-MPL, jestliže je přítomen v libovolných vakcinačních skupinách, je zahrnut v množství 5 µg/dávku. CpG (OLIGO4 (SEQ ID NO: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT) se přidal v dávce 50 µg.

Adjuvans používané pro skupiny 2, 5, 10 se připravily postupy popsanými v dokumentu EP 0 822 831 B1. Skupina 11 obsahovala 3D-MPL v membráně liposomu. 3D-MPL,

10.06.03

dioleoylfosfatydylcholin a cholesterol se smíchaly a mikrofluidizovaly za vzniku unilamelárního lipozomu (jak se popisuje v publikaci EP 0 822 831 B1, nepoužívá se QS21).

Adjuvans používané ve skupině 4, 7 a 8 byly vodné suspenze nebo roztok.

Postup vakcinace

Skupiny myší B6F1 se vakcinovaly čtyřikrát intramuskulárně v rozmezí 14 dní (objem dávky je 50 µl). 14 dní po 4. vakcinaci se myším aplikovalo podkožně $2x10^6$ nádorových buněk TC1, které exprimují Her2 neu.

Nádorové buněčné linie Her 2neu-TC1 se produkovaly transdukcí buněk TC1 retrovirovým genem, který kóduje Her2 neu. Po selekci blastocydinem se izolovaly rezistentní klony a testovala se jejich schopnost exprimovat Her2 neu testem FACS. Vybral se klon s nejvyšší expresí Her2 neu. Zjistilo se, že dávka $2x10^6$ vykazuje podobnou kinetiku růstu, jako buňky TC1 a u kontrolních zvířat ve 100 % dochází ke vzniku nádoru. Velikost jednotlivých nádorů se měřila dvakrát a exprimovala se jako průměr ve skupině.

Výsledky

Obrázek č. 3 zobrazuje výsledky růstu nádoru myší ze skupiny 1, 2, 4, 5 a 6. Na obrázku č. 4 jsou zobrazeny výsledky růstu nádoru u myší ve skupinách 1, 5, 6, 7 a 11. Na obrázku č. 5 jsou výsledky získaných u myší ve skupinách 1, 5, 6, 8, 9 a 10. Vakcinační prostředky, které vyvolaly úplnou regresi nádoru byly ty, které obsahují jak imunostimulační oligonukleotid tak saponin.

10.06.03

Na obrázku č. 6 a 7 je zobrazena lymfoproliferace splenocytů in vitro po inkubaci s imunogenem v koncentraci 5 µg/ml (ECD-PD) nebo s extrabuněčnou (ECD) nebo intrabuněčnou oblastí (ICD) nebo Her 2 neu.

Obrázky č. 8 a 9 zobrazují humorální imunitní odezvu na imunogen (ECD-PD) vyjádřenou jako Ig. Hodnoty se získaly měřením testem ELISA (obrázek č. 8) nebo distribucí izotypu IgG při těchto odezvách (obrázek č. 9).

Závěr

Po 3 injekcích vyvolání protilátek odpovídá AS02B+AS07A>AS01B>AS02B=AS06=AS05>AS07A.

Obecný závěr

Testované adjuvans (AS1, AS2, AS7) vykazuje podobný účinek. Avšak kombinace AS1 a AS7 nebo AS2 a AS7 jsou účinější adjuvans. CMI je jasně prokázal po čtvrté vakcinaci u zvířat, kterým se aplikovalo kombinované adjuvans, které obsahuje celé molekuly ECD-PD nebo zvlášť ECD a ICD. Přípravky podle vynálezu jsou velmi účinné při vyvolání regrese nádoru.

Příklad 6: Imunizace myší antigenem P703P

Tento experiment se navrhl tak, aby se zkoumalo rozmezí pomocných prostředků s antigenem, které jsou fúzí antigenu prostázy (popisuje se v publikaci Ferguson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 3114-3119)) a N-terminálního fragmentu aminokyselin 1 až 81 NS1.

skupina	antigen (25 µg)	adjuvans
1	P703P-NS1	žádný (fyziologický roztok pufrovaný fosforečnanenm (PBS))

10.06.03

2	P703P-NS1	CpG
3	P703P-NS1	liposomy s QS21 v membráně + CpG
4	P703P-NS1	liposomy s QS21 a 3D-MPL v membráně + CpG
5	P703P-NS1	emulze olej ve vodě obsahující tokol s QS21 a 3D-MPL + CpG
6	P703P-NS1	emulze olej ve vodě obsahující tokol + CpG

V emulzích olej ve vodě, které obsahují tokol a použily se ve shora uvedených skupinách, se používá D,L-tokoferol (CAS č. 10191-41-0, chemický název (2RS, 4´RS, 8´RS)-2,5,7,8-tetrametyl-2-(4´,8´, 12-trimetyltridecyl)-6-chromanol), který je běžně dostupný u formy ROCHE(tm). Jestliže je v emulzi olej ve vodě přítomen tokol, je v koncentraci 2,5 % (objem) je v kombinaci se skvalenem, který je v koncentraci 2,5 % (objem). Oba oleje se smíchaly a přidal se polyoxyetylensorbitanmonooleát (Tween80(tm)) pak došlo k mikrofluidizaci (za použití mikrofluidizačního stroje M110S, dochází maximálně k 50 průchodům po dobu 2 minuty při maximálním tlaku na vstupu 6 barů (tlak na výstupu je přibližně 850 barů) (popisuje se v dokumentu WO 95/17 210). Skupiny 5 a 6 jsou založené na shora uvedené emulzi s tokolem, přičemž se přidá vodný roztok QS21, 3D-MPL nebo CpG.

QS21 a 3D-MPL, jestliže je přítomen v libovolných vakcinačních skupinách, je zahrnut v množství 5 µg/dávku. CpG (OLIGO4 (SEQ ID NO: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT) se přidal v dávce 50 µg.

Adjuvans používané pro skupiny 3 a 4 se připravily postupy popsanými v dokumentu EP 0 822 831 B1.

10.06.03

Postup vakcinace

Skupiny myší B6F1 se vakcinovaly čtyřikrát intramuskulárně v rozmezí 14 dní (objem dávky je 50 µl).

Výsledky

Na obrázku č. 10 a 11 je zobrazena lymfoproliferace splenocytů po druhé vakcinaci a 14 dní po čtvrté vakcinaci po in vitro inkubaci s imunogenem v koncentraci 3 µg/ml (NS1-P703P) nebo s P703P exprimovaném v mikroorganizmu pichia (15 µg/ml) s nespecifickým fúzním proteinem NS1-OspA.

Obrázky č. 12 a 13 zobrazují humorální imunitní odezvu na imunogen (NS1-P703P) vyjádřenou jako celkové Ig. Hodnoty se získaly měřením testem ELISA a vyjádřily se jako střední hodnoty titrů (obrázek č. 10) nebo distribucí izotypu IgG při těchto odezvách (obrázek č. 11.).

10.06.03 2003-1093

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Imunogenní prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje antigen zhoubného bujení vybraný ze skupiny zahrnující:

i) antigen z rodiny proteinů MAGE spojený s heterogenním fúzním partnerem

ii) antigen prostázy spojený s heterogenním fúzním partnerem,

iii) fragmenty prostázy obsahující alespoň 20 souvislých aminokyselin prostázy, které mohou být spojené s heterogenním fúzním partnerem,

iv) P501S,

v) Cripto,

vi) derivát antigenu Her-2/neu, kterému chybí podstatná část transmembránové oblasti Her-2/neu

a pomocný prostředek obsahující saponin spolu s imunostimulačním oligonukleotidem.

2. Prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje lipopolysacharid.

3. Prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e saponinem je QS21.

4. Prostředek podle libovolného z nároků 2 nebo 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e lipopolysacharid se vybral ze skupiny zahrnující

i) monofosforyllipid A

ii) 3-0-deacylmonofosforyllipid A

iii) difosforyllipid A.

10.06.03

5. Imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e imunostimulační oligonukleotid obsahuje alespoň dva motivy CpG.

6. Imunogenní prostředek podle libovolného z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e imunostimulační oligonukleotid se vybral ze skupiny zahrnující:

SEQ ID No 1 - TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
SEQ ID No 2 - TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
SEQ ID No 3 - ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
SEQ ID No 4 - TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
SEQ ID No 5 - TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

7. Prostředek podle libvolného z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e saponin se připravil za vzniku formy ISCOM nebo liposomy.

8. Prostředek podle libovolného z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e saponin je přítomen v emulzi olej ve vodě.

9. Prostředek podle libovolného z nároků 1 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje v podstatě všechny extrabuněčné oblasti Her 2 neu.

10. Prostředek podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e molekula Her 2 neu je zbavena funkční transmembránové oblasti.

11. Prostředek podle libovolného z nároků 1 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e navíc obsahuje fosforylační oblast Her 2 neu.

12. Způsob léčby pacienta trpícího karcinomem nebo náchylného ke zhoubnému bujení, které exprimuje Her 2 neu nebo

10.06.03

antigen specifický pro prostatu/nádorový antigen, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci bezpečného a účinného množství prostředku podle libovolného z nároků 1 až 11.

13. Způsob léčby pacienta trpícího karcinomem nebo náchylného ke zhoubnému bujení, které exprimuje libovolný z antigenů MAGE, prostáza, P501S nebo Cripto, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci bezpečného a účinného množství prostředku podle libovolného z nároků 1 až 11.

14. Použití kombinace saponinu, imunostimulačního oligonukleotidu a antigenu karcinomu vybraného ze skupiny zahrnující:

i) antigen z rodiny proteinů MAGE spojený s heterogenním fúzním partnerem,

ii) antigen prostázy spojený s heterogenním fúzním partnerem,

iii) fragmenty prostázy obsahující alespoň 20 souvislých aminokyselin prostázy, které mohou být spojené s heterogenním fúzním partnerem,

iv) P501S,

v) Cripto,

vi) derivát antigenu Her-2/neu, kterému chybí podstatná část transmembránové oblasti Her-2/neu,

při výrobě léčebného prostředku pro léčbu nebo profylaxi nádorů.

15. Způsob výroby prostředku podle libovolného z nároků 1 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje smíchání antigenu karcinomu vybraného ze skupiny zahrnující:

i) antigen z rodiny proteinů MAGE spojený s heterogenním fúzním partnerem,

ii) antigen prostázy spojený s heterogenním fúzním partnerem,

10.06.03

iii) fragmenty prostázy obsahující alespoň 20 souvislých aminokyselin prostázy, které mohou být spojené s heterogenním fúzním partnerem,

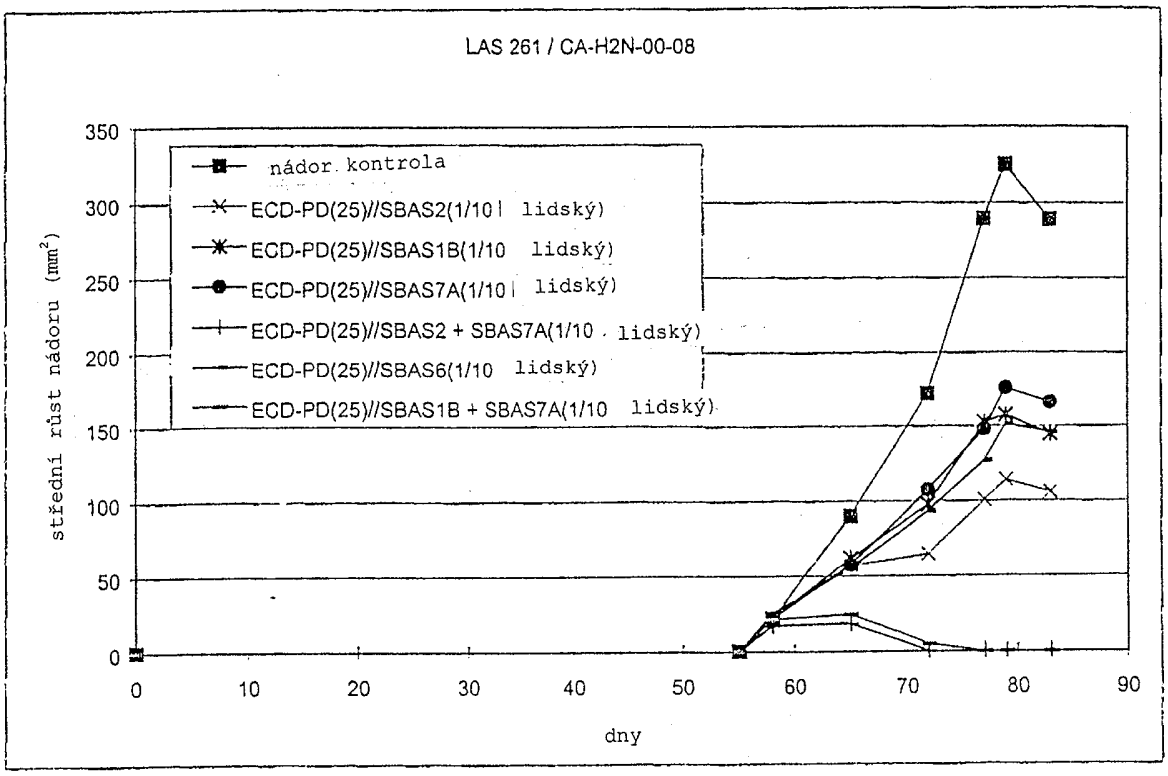
iv) P501S,

v) Cripto,

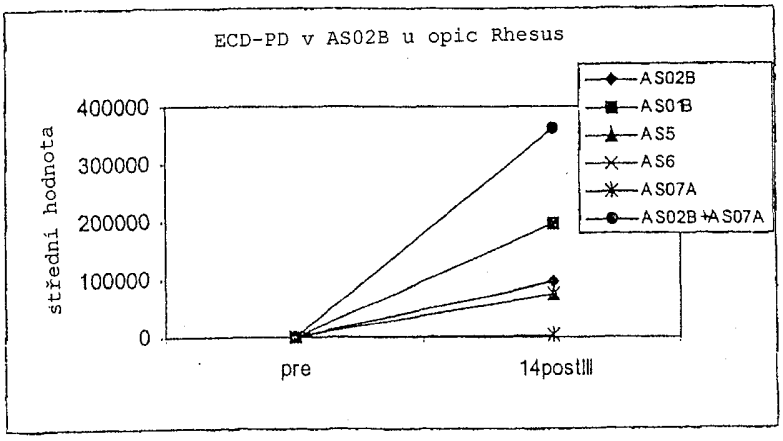
vi) derivát antigenu Her-2/neu, kterému chybí podstatná část transmembránové oblasti Her-2/neu ,

se saponinem a molekulou CpG.

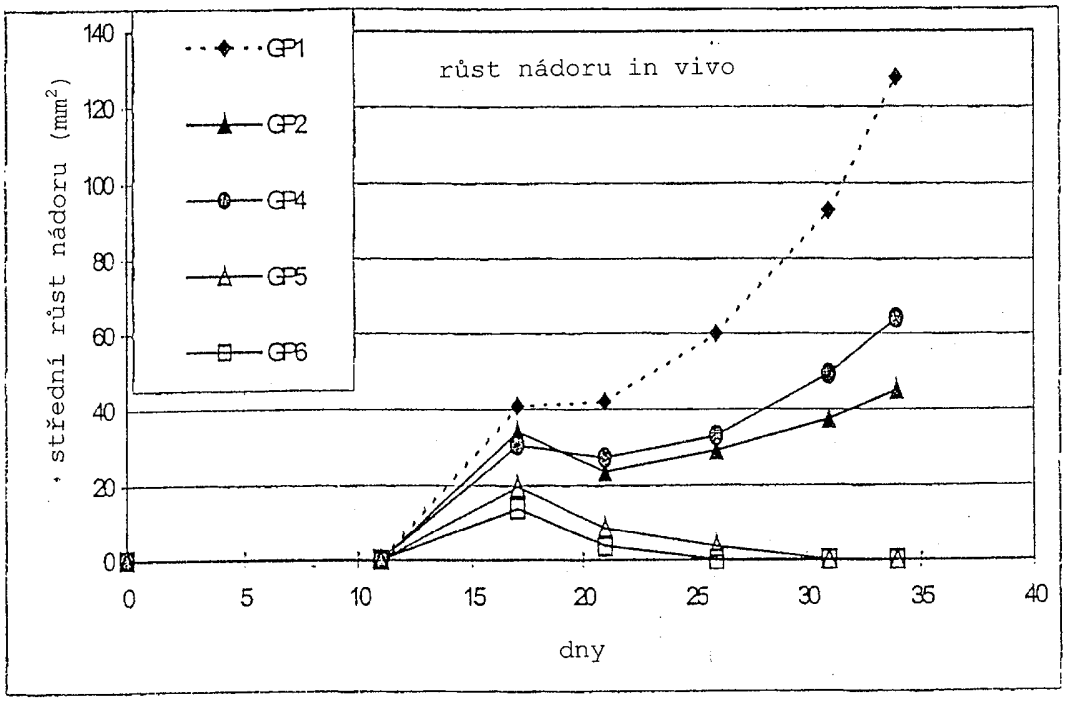
Obr. č. 1


LAS 261 / CA-H2N-00-08
střední růst nádoru (mm²)
dny
nádor kontrola
ECD-PD(25)//SBAS2(1/10 lidský)
ECD-PD(25)//SBAS1B(1/10 lidský)
ECD-PD(25)//SBAS7A(1/10 lidský)
ECD-PD(25)//SBAS2 + SBAS7A(1/10 lidský)
ECD-PD(25)//SBAS6(1/10 lidský)
ECD-PD(25)//SBAS1B + SBAS7A(1/10 lidský)
0
50
100
150
200
250
300
350
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90

Obr. č. 2

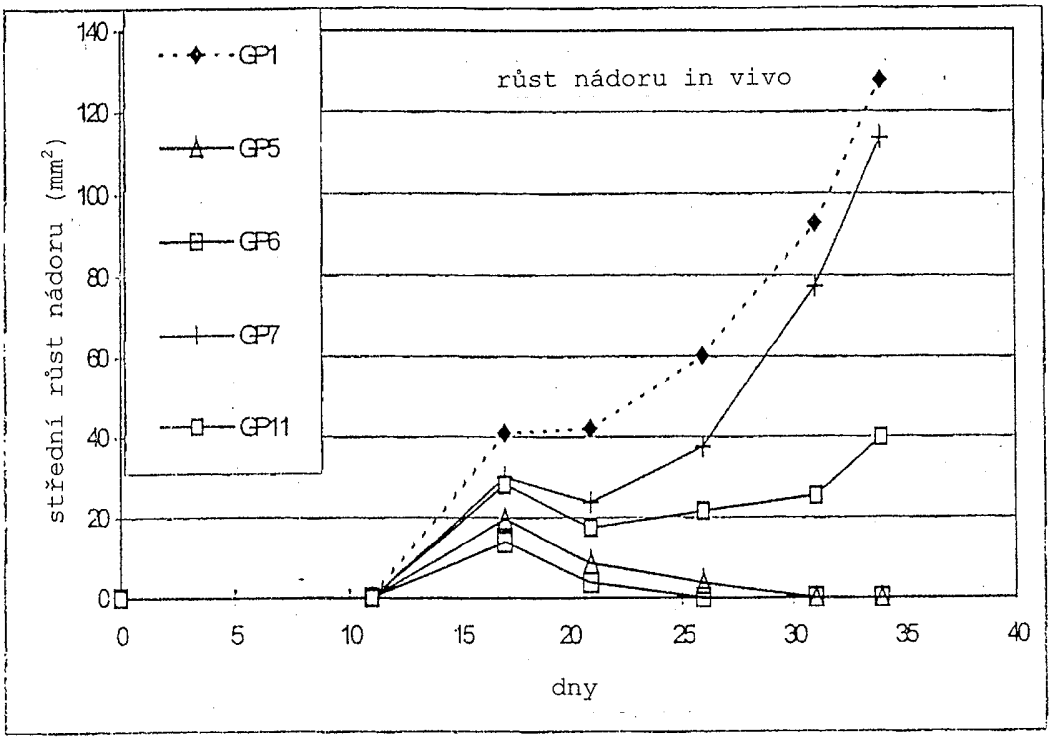

ECD-PD v AS02B u opic Rhesus
střední hodnota
400000
300000
200000
100000
0
pre
14postIII
AS02B
AS01B
AS5
AS6
AS07A
AS02B+AS07A

Obr. č. 3: Růst nádoru in vivo po vakcinaci

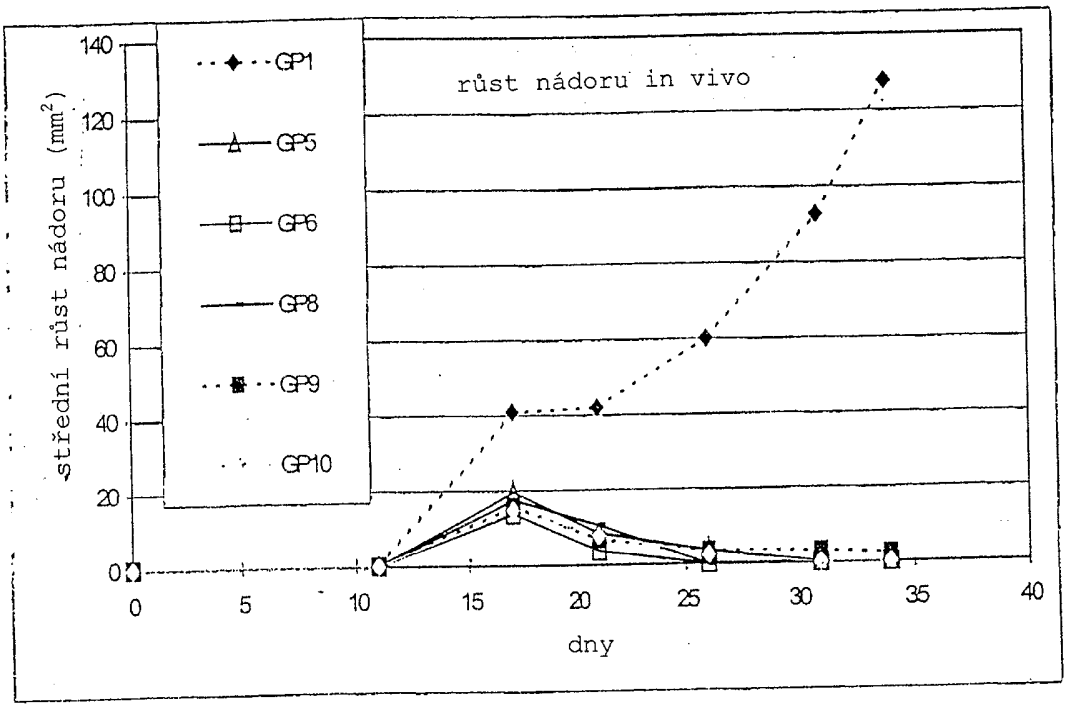


10.06.03 2003-1093

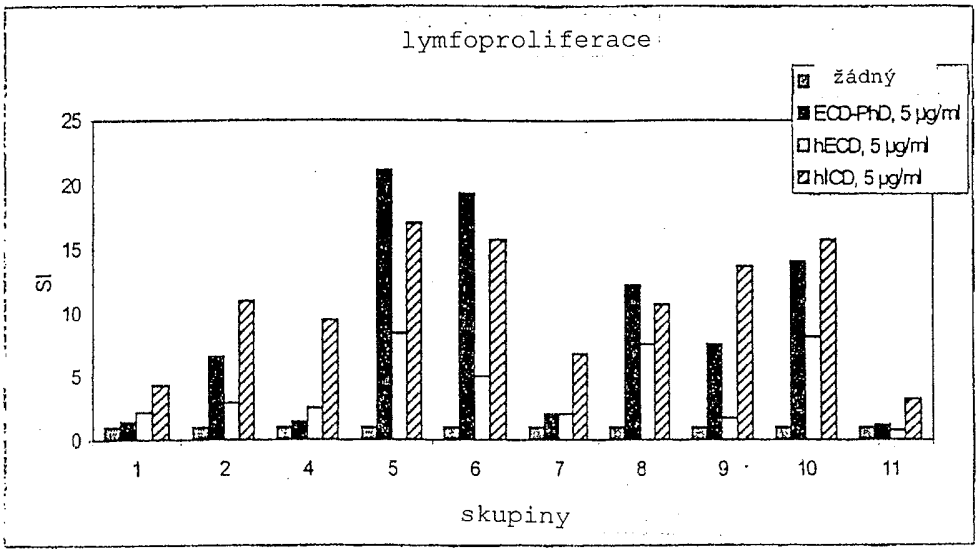
Obr. č. 4



Obr. č. 5

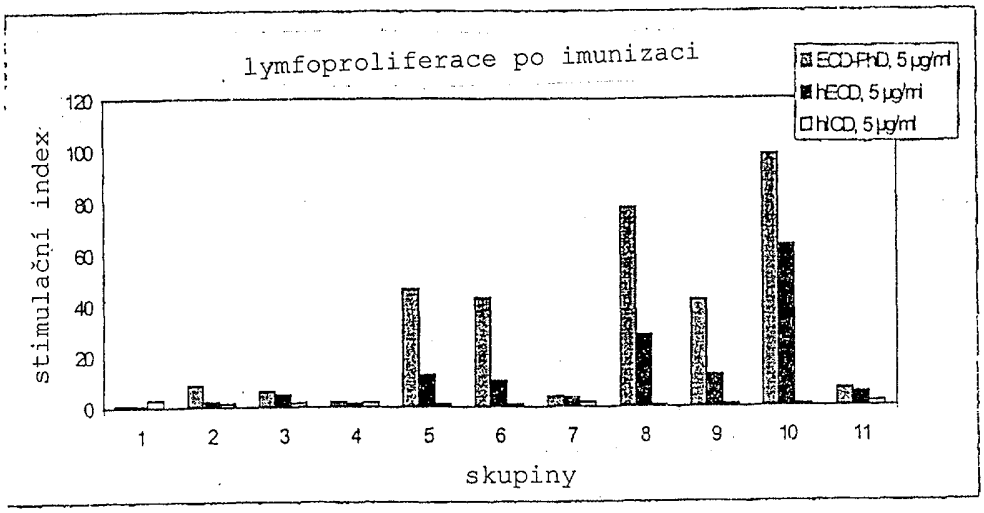

růst nádoru in vivo
střední růst nádoru (mm²)
GP1
GP5
GP6
GP8
GP9
GP10
0
20
40
60
80
100
120
140
0
5
10
15
20
25
30
35
40
dny

Obr. č. 6: Lymfoproliferace (po vakcinaci, pre-nádorová vakcinace)

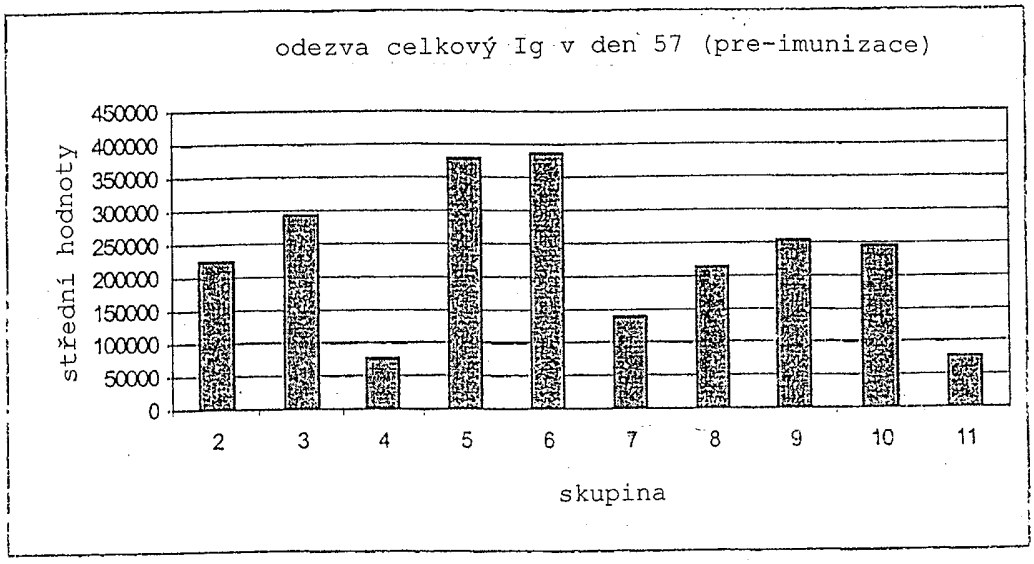


10.06.03 2003-1093

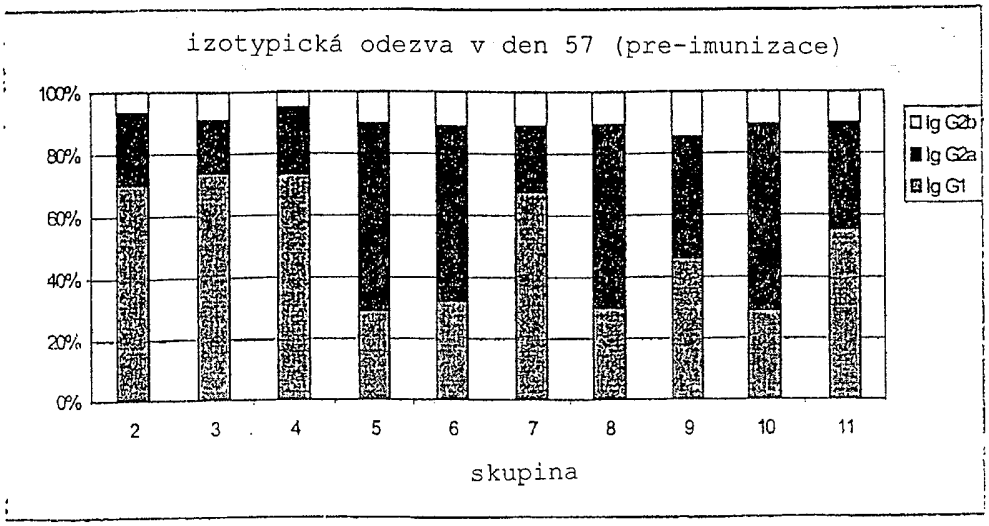
Obr. č. 7: Lymfoproliferace (post-nádorová vakcinace)



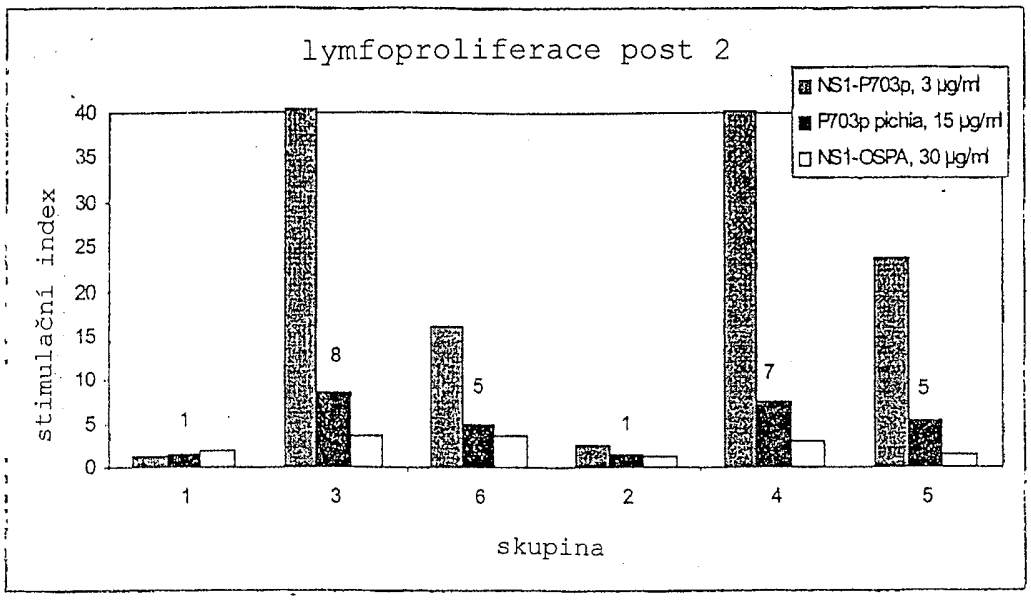
Obr. č. 8: Odezva celkového Ig proti ECD po vakcinaci



Obr. č. 9: Distribuce izotypu vyvolaná vakcínou

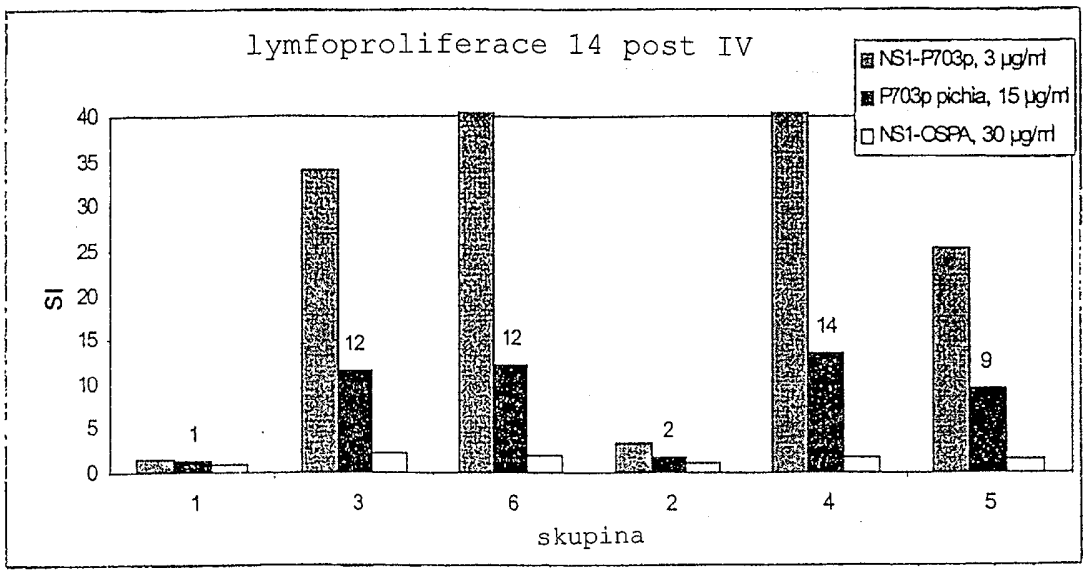


Obr. č. 10: Lymfoproliferace po druhé vakcinaci P703

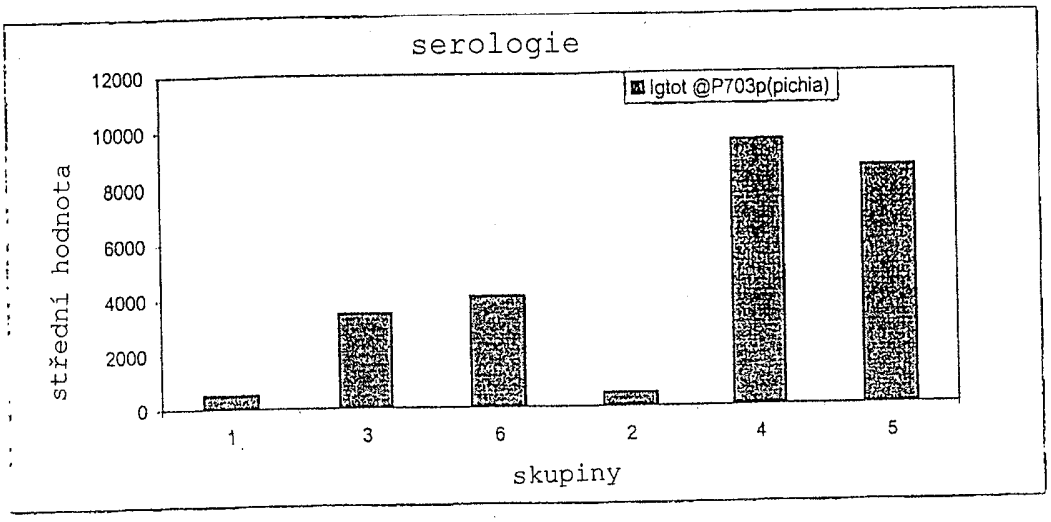


10.06.03 2003-1093

Obr. č. 11: Lymfoproliferace po čtvrté vakcinaci P703

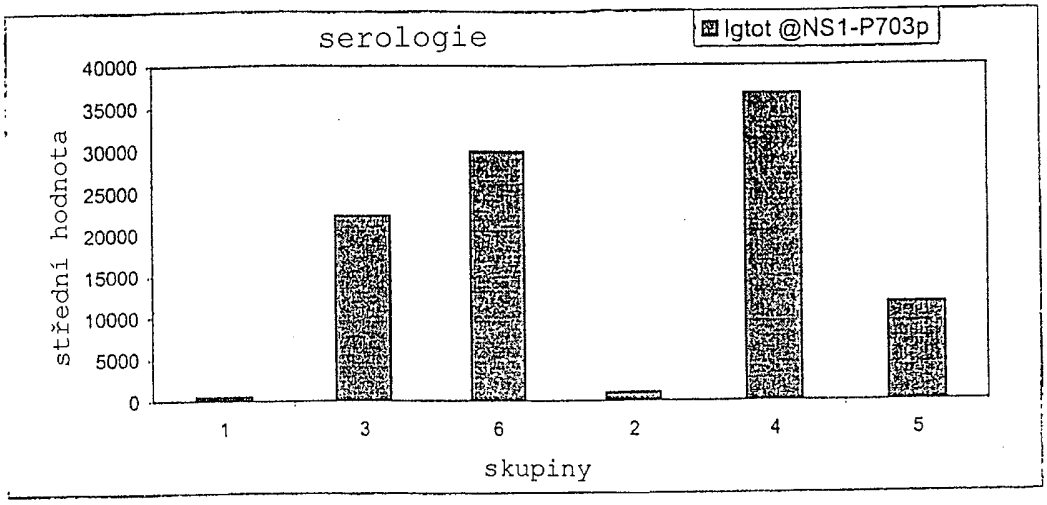


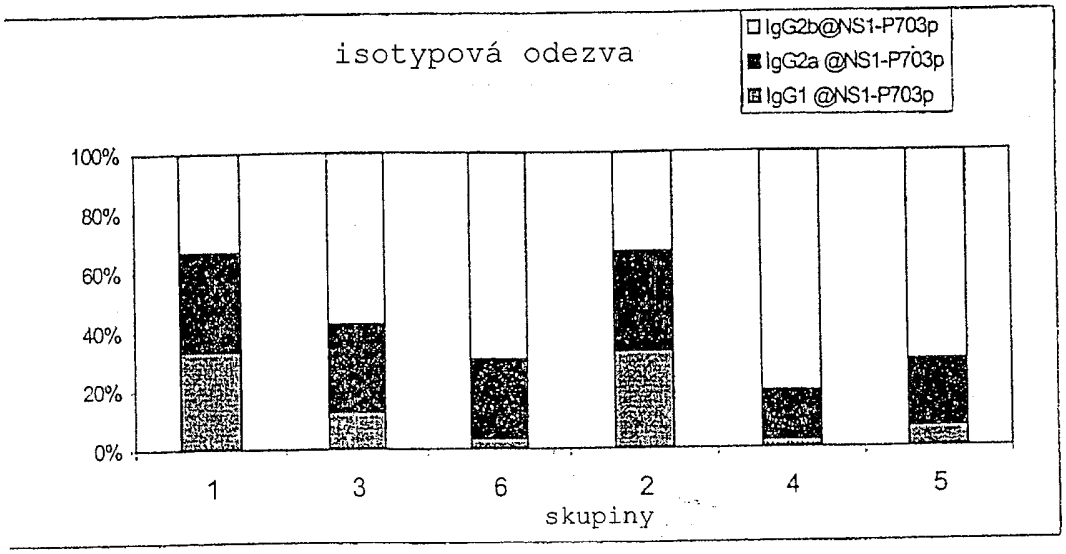
Obr. č. 12


serologie
střední hodnota
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Igtot @P703p(pichia)
1
3
6
2
4
5
skupiny

10.06.03
2003-1093

Obr. č. 13: Titry protilátek proti NS1-P703 vyvolané vakcinací



10.06.03 2003-1093

Obr. č. 14: Distribuce isotypu proti NS1-P703P vyvolané vakcinací