



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **97-01969**

(22) Data de depozit: **01.04.1996**

(30) Prioritate: **25.04.1995 GB 9508326.7;**
28.06.1995 GB 9513107.4

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.03.2004 BOPI nr. **3/2004**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **EP 96/01464 01.04.1996**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 96/33739 31.10.1996**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
EP 0415794; WO 9206710; 9003184

(71) Solicitant: **SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A., RIXENSART, BE**

(73) Titular: **SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A., RIXENSART, BE**

(72) Inventatori: **GARCON NATHALIE MARIE-JOSEPHE CLAUDE, RIXENSART, BE; FRIEDE MARTIN, RIXENSART, BE**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A., BUCUREȘTI**

(54) **COMPOZIȚIE DE VACCIN CONȚINÂND O SAPONINĂ ȘI UN STEROL**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la o compoziție de vaccin conținând un antigen, o fracție de saponină imunologic activă derivată din coaja de *Quillaja Saponaria Molina* și un sterol, ce constă în aceea că raportul în greutate de saponină:sterol este cuprins între 1:1 și 1:100, la utilizarea compoziției ca medicament și la procedeul de obținere a compoziției de vaccin, ce cuprinde următoarele

etape: a) obținerea unei suspensii lipidice conținând un sterol; b) microfluidizarea suspensiei lipidice, până ce dimensiunea lipozomilor se reduce la 100 nm; c) adăugarea de QS21 în esență pur; d) amestecarea QS21 și a colesterolului cu un antigen sau o compoziție antigenică.

Revendicări: 17

RO 119068 B1



RO 119068 B1

Invenția se referă la o compoziție de vaccin, cuprinzând un antigen, o fracție de saponină, imunologic activă, derivată din coajă de *Quillaja Saponaria Molina* și un sterol, la utilizarea compoziției ca medicament și la procedeul de obținere a compoziției de vaccin.

5 Invenția cuprinde vaccinuri care conțin un antigen, o fracție imunologic activă, derivată din coaja de *Quillaja Saponaria Molina*, cum ar fi QS21 și un sterol.

10 Frațiile de saponină, activă imunologic, care au activitate adjuvantă, derivate din coaja arborelui din America de Sud *Quillaja Saponaria Molina* sunt cunoscute în domeniu. De exemplu, QS21, cunoscută, de asemenea, ca QA21, o fracție purificată Hplc din arborele *Quillaja Saponaria Molina* și metoda pentru producerea sa sunt descrise (ca QA21) în brevetul **US 5.057.540**. De asemenea, saponina *Quillaja* a fost descrisă drept adjuvant de către Scott et al, Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 77, 409. Cu toate acestea, utilizarea QS21 ca un adjuvant se asociază cu anumite dezavantaje. De exemplu, când QS21 este injectată la un mamifer ca o moleculă liberă, se observă necroză, altfel spus, țesut mort localizat, la locul injectării.

15 Acum, s-a dovedit, în mod surprinzător, că necroza la locul injectării se poate evita prin utilizarea formulărilor care conțin o combinație de QS21 și un sterol. Sterolii preferați includ β -sitosterol, stigmasterol, ergosterol, ergocalciferol și colesterol. Acești steroli sunt bine cunoscuți în domeniu, de exemplu, colesterolul este descris în Merck Index, Ediția a 11-a, pagina 341, ca un sterol întâlnit în mod natural ce se găsește în grăsimea animală.

20 Compoziția de vaccin cuprinzând un antigen, o fracție de saponină imunologic activă derivată din coajă de *Quillaja Saponaria Molina* și un sterol, conform invenției, constă în aceea că, raportul în greutate de saponină: sterol este cuprins între 1:1 și 1:100, utilizarea compoziției este ca medicament, iar procedeul de obținere a compoziției de vaccin cuprinde următoarele etape:

25 a) obținerea unei suspensii lipidice conținând un sterol;
b) microfluidizarea suspensiei lipidice, până ce dimensiunea lipozomilor se reduce la 100 nm;

c) adăugarea de QS21 în esență pur;
d) amestecarea QS21 și a colesterolului cu un antigen sau o compoziție antigenică.

30 Compoziția de vaccin, conform invenției, are următoarele avantaje:

- compoziția de vaccin, care cuprinde QS21 și colesterol prezintă reactogenitate scăzută, comparativ cu compoziția în care colesterolul este absent;
- stabilitatea QS21 la hidroliză este sporită în formulările care conțin colesterol;
- microfluidizarea suspensiei lipidice, în timpul procedeului de obținere până la dimensiuni ale lipozomilor de 100 nm asigură compoziției de vaccin o mai bună biodisponibilitate.

35 Prin urmare, într-un prim aspect, invenția asigură o compoziție de vaccin care cuprinde un antigen, o fracție saponină activă imunologic și un sterol. De preferință, compozițiile invenției conțin fracția saponină imunologic activă în formă substanțial pură. De preferință, compozițiile invenției conțin QS21 în formă substanțial pură, altfel spus, QS21 este cel puțin 90% pură, de preferință, cel puțin 95% pură și cel mai preferat cel puțin 98% pură. Alte fracții saponină active imunologic, utile în compozițiile invenției includ QA17/QS17. Compozițiile invenției care cuprind QS21 și colesterol prezintă reactogenitate scăzută comparat cu compozițiile în care colesterolul este absent, în timp ce efectul adjuvantului este menținut. Suplimentar se știe că QS21 se degradează în condiții bazice unde pH-ul este în jur de 7 sau mai mare. Un avantaj suplimentar al compozițiilor prezente este că stabilitatea QS21 la hidroliza mediată bază este sporită în formulările care conțin colesterol.

45 Compozițiile preferate ale invenției sunt acelea care formează o structură de lipozom. Compozițiile în care sterolul/fracție saponină imunologic activă formează o structură ISCOM formează de asemenea un aspect al invenției.

RO 119068 B1

Raportul QS21:sterol va fi de obicei de ordinul 1:100 la 1:1 greutate la greutate. De preferință este prezent un exces de sterol, raportul QS21:sterol fiind cel puțin 1:2 g/g. În mod obișnuit, pentru administrare umană QS21 și sterolul vor fi prezente în vaccin în domeniul de 1 μg la 100 μg, de preferință 10 μg la 50 μg per doză.

50

Lipozomii conțin de preferință o lipidă neutră, de exemplu, fosfatidilcolină care este de preferință necristalină la temperatura camerei, de exemplu, fosfatidilcolina albușului de ou, dioleoil fosfatidilcolină sau dilauril fosfatidilcolină. De asemenea, lipozomii pot să conțină o lipidă încărcată care crește stabilitatea structurii lipozom-QS21 pentru lipozomii compuși ai lipidelor saturate. În aceste cazuri cantitatea lipidei încărcate este de preferință 1-20% g/g, cel mai preferat 5-10% g/g. Raportul sterolului la fosfolipid este 1-50% (mol/mol), cel mai preferat 20-25%.

55

De preferință, compozițiile invenției conțin MPL (monofosforil lipidă A 3-deacilată, cunoscută de asemenea ca 3D-MPL). 3D-MPL este cunoscută din GB 2.220.211 (Ribi) ca un amestec a trei tipuri de monofosforil lipidă A De-O-acilate cu 4, 5, sau 6 catene acilate și este fabricată de Ribi Immunochem, Montana. O formă preferată este descrisă în cererea internațională de brevet WO 92/116556.

60

Compozițiile adecvate ale invenției sunt cele în care, inițial, sunt preparați lipozomi fără MPL și apoi se adaugă MPL, de preferință, ca particule de 100 nm. Prin urmare, MPL nu este conținută în membrana veziculei (cunoscute ca MPL afară). Compoziții în care MPL este conținută în membrana veziculei (cunoscute ca MPL) formează, de asemenea, un aspect al invenției. Antigenul poate fi conținut în membrana veziculei, sau conținut în exteriorul membranei veziculei. De preferință, antigenii solubili sunt în exterior și antigenii hidrofobi sau lipidici sunt conținuți fie în interiorul, fie în exteriorul membranei.

65

70

Vaccinurile descrise în invenție nu necesită vreun purtător și sunt formulate într-un tampon apos sau alt tampon acceptabil farmaceutic. În unele cazuri, poate fi avantajos ca vaccinurile din prezenta invenție să conțină în plus alaun, sau să fie prezentate într-o emulsie ulei-în-apă, sau alt vehicul corespunzător, cum ar fi, de exemplu, lipozomi, microsfele sau particule de antigen încapsulate.

75

De preferință, formulările de vaccin vor conține un antigen sau o compoziție antigenică capabile să provoace un răspuns imun împotriva unui patogen uman sau animal. Antigenul sau compozițiile antigenice cunoscute în domeniu pot fi folosite în compozițiile invenției, inclusiv antigeni polizaharidici, antigen sau compoziții antigenice derivate de la HIV-1 (cum ar fi, gp 120, sau gp 160), orice virus al imunodeficienței feline, virusuri herpes umane sau animale, ca, gD sau derivați ai lor, sau proteina timpurie imediată, ca ICP 27 de la HSV1, sau HSV2, citomegalovirus (în special, uman) (cum ar fi gB sau derivați ai ei), virus *Varicella Zoster* (cum ar fi gp I, II, sau III), sau de la un virus al hepatitei, cum ar fi virusul hepatitei B, de exemplu, antigenul de suprafață al hepatitei B, sau un derivat al lui, virusul hepatitei A, virusul hepatitei C și virusul hepatitei E, sau de la alți patogeni virali, cum ar fi, virusul respirator sincițial (de exemplu, proteine HSRV F și G, sau fragmente imunogenice ale acestora descrise în brevetul UD 5.149.650, sau polipeptide himerice care conțin fragmente imunogenice de la proteine HSRV F și G, de exemplu, glicoproteina FG descrisă în brevetul US 5.194.595), antigeni derivați de la tulpini de meningită, cum ar fi, meningita A, B și C, *Streptococcus Pneumonia*, virusul papilloma uman, virus *Influenza, Haemophilus Influenza B* (Hib), virus *Epstein Barr* (EBV), sau derivați de la patogeni bacterieni, cum ar fi, *Salmonella, Neisseria, Borrelia* (de exemplu, OspA sau OspB, sau derivați ai lor), sau *Chlamydia*, sau *Bordetella*, de exemplu, P.69, PT și FHA, sau derivați de la paraziți, cum ar fi plasmodium sau toxoplasma.

80

85

90

95

Glicoproteina D HSV (gD) sau derivații ai ei sunt un vaccin antigen preferat. Ea este localizată pe membrana virală și de asemenea, este găsită în citoplasma celulelor infectate (Eisenberg R. J., et al., *J of Virol*, 1980, 35 428-435). Ea cuprinde 393 aminoacizi, incluzând o peptidă semnal și are o greutate moleculară de aproximativ 60 kD. Din toate glicoproteinele învelișului HSV, aceasta este probabil cel mai bine caracterizată (Cohen et al *J. Virology* 60 157-166). *In vivo* ea este cunoscută a juca un rol central în atașarea virală la membranele celulei. Mai mult, glicoproteina D s-a dovedit a fi capabilă să provoace anticorpi de neutralizare *in vivo* și să protejeze animalele de provocarea letală. O formă scurtată a moleculei gD este lipsită de regiunea ancoră C-terminală și poate fi produsă în celulele mamifere ca o proteină solubilă care se exportă în supernatantul culturii de celule. Astfel de forme solubile ale gD sunt preferate. Producerea formelor scurtate ale gD este descrisă în EP 0 139 417. De preferință, gD este derivată de la HSV-2. O realizare preferată a invenției este o glicoproteina D HSV-2 scurtată de 308 aminoacizi, care cuprinde aminoacizii 1 la 306 ai glicoproteinei întâlnită în mod natural cu adăugarea Asparaginei și Glutaminei la capătul C-terminal al proteinei scurtate, lipsite de regiunea sa ancoră la membrană. Această formă a proteinei include peptida semnal, care este clivată pentru a permite ca proteina matură solubilă de 283 aminoacizi să fie secretată dintr-o celulă gazdă.

În alt aspect al invenției, antigenul de suprafață Hepatită B este un antigen de vaccinare preferat.

Așa cum s-a folosit aici, expresia "antigen de suprafață Hepatită B" sau "HBsAg" include orice antigen HBsAg, sau fragment al acestuia, care prezintă antigenicitatea antigenului de suprafață HBV. Se va înțelege că suplimentar la secvența de 226 aminoacizi a antigenului HBsAg (vezi, Tiollais et al., *Nature*, 317, 489 (1985) și referințele de aici), HBsAg așa cum s-a descris aici, poate, dacă se dorește, să conțină în totalitate sau parțial, o secvență pre-S așa cum s-a descris în referințele de mai sus și în **EP-A-0 278 940**. În special, HBsAg poate să cuprindă o polipeptidă care conține o secvență aminoacidă ce cuprinde resturile 12-52, urmate de resturile 133-145, urmate de resturile 175-400 ale proteinei L a HBsAg relative la cadrul deschis de citire, pe un virus Hepatită B de serotip ad (această polipeptidă este cunoscută ca L*; vezi, EP 0 417 374). De asemenea, HBsAg din cuprinsul invenției, poate să includă polipeptidă pre-S1-preS2-S, descrisă în **EP 0 198 474** (Endotronics), sau analogi apropiați ai acesteia, cum ar fi cei descriși în **EP 0 304 578** (Mc Cormick și Jones). BHsAg așa cum s-a descris aici, se poate referi la mutante, de exemplu, "mutanta de ieșire" descrisă în **WO 91/14703** sau cererea de brevet european **0 511 855 A1**, în special, HBsAg în care substituția aminoacidă la poziția 145 este la arginină de la glicină.

În mod normal, HBsAg va fi sub formă de particulă. Particulele pot să conțină, de exemplu, numai proteină S, sau pot fi particule compozite, de exemplu, (L*,S), unde L* este așa cum s-a definit mai sus și S denumește proteina S a HBsAg. Numita particulă este în mod avantajos în forma în care ea este exprimată în drojdie.

Prepararea proteinei S antigen de suprafață hepatită B este bine documentată. Vezi, de exemplu, Harford et al., (1983) în *Develop. Biol. Standard* 54, pag. 125, Gregg et al., (1987) în *Biotechnology*, 5, pag. 479, **EP 0 226 846**, **EP 0 299 108** și referințele de aici.

Formulările din cuprinsul invenției pot să conțină, de asemenea, un antigen antitumoral și să fie utile pentru tratamentul imunoterapeutic al cancerelor.

Prepararea vaccinului este descrisă, în general, în *New Trends and Developments in Vaccines*, editată de către Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, SUA, 1978. Încapsularea în lipozomi este descrisă, de exemplu, de către Fullerton, brevet US **4.235.877**. Conjugarea proteinelor la macromolecule este descrisă de exemplu, de către Likhite, brevet US **4.372.945** și de către Armor et al., brevet US **4.474.757**.

RO 119068 B1

Cantitatea proteinei din fiecare doză de vaccin este aleasă ca o cantitate care induce un răspuns imunoprotector fără efecte secundare adverse semnificative în vaccinuri tipice. O astfel de cantitate poate varia în funcție de care imunogen specific este folosit și cum este el prezentat. În general, este de așteptat ca fiecare doză să cuprindă 1-1000 mcg de proteină, de preferință, 2-100 mcg, cel mai preferat, 4-40 mcg. O cantitate optimă pentru un vaccin particular poate fi stabilită prin studii standard care implică observarea răspunsurilor imune corespunzătoare la subiecți. După o vaccinare inițială, subiecții pot primi una sau mai multe imunizări de rapel distanțate în mod adecvat.

Formulările prezentei invenții pot fi folosite atât pentru scopuri profilactice, cât și terapeutice.

În conformitate cu un aspect suplimentar, se asigură prin urmare, utilizarea unui vaccin al invenției pentru tratamentul pacienților umani. Invenția asigură o metodă de tratament care cuprinde administrarea unei cantități eficiente a unui vaccin al prezentei invenții la un pacient. În special, invenția asigură o metodă de tratare a infecțiilor virale, bacteriene, parazitare, sau cancerului, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente dintr-un vaccin al prezentei invenții la un pacient.

Exemplele și datele care urmează ilustrează invenția.

Se dau, în continuare, exemple de realizare a invenției.

1.1 Metodă de preparare a lipozomilor

Un amestec de lipidă (cum ar fi fosfatidilcolina, oricare dintre gălbenuș de ou sau sintetic) și colesterol în solvent organic, s-a uscat sub vid (sau alternativ sub un curent de gaz inert). O soluție apoasă (cum ar fi fosfat salin tamponat) s-a adăugat apoi și vasul s-a agitat până toată lipida este în suspensie. Această suspensie este apoi microfluidizată până când mărimea lipozomului este redusă la 100 nm și apoi s-a filtrat steril printr-un filtru de 0,2 μm. Extrudarea sau sonicarea poate înlocui această etapă. În mod tipic, raportul colesterol: fosfatidilcolina este 1:4 (g/g) și soluția apoasă este adăugată pentru a da o concentrație finală de colesterol de la 5 până la 50 mg/ml. Dacă MPL în soluție organică este adăugată la lipida în soluția organică, lipozomii finali conțin MPL în membrană (referiți ca, MPL în).

Lipozomii au o mărime definită de 100 nm și sunt referiți ca, SUV (pentru vezicule unilamelare mici). Dacă această soluție este înghețată și dezghețată în mod repetat, veziculele se contopesc pentru a forma structuri multilamelare largi (MLV) ale mărimii în domeniul de la 500 nm la 15 μm. Lipozomii prin ei înșiși sunt stabili în timp și nu au capacitate fusogenică.

1.2 Procedura de formulare

QS21 în soluție apoasă se adaugă la lipozomi. Acest amestec se adaugă apoi la soluția antigen care poate, dacă se dorește, conține MPL în forma particulelor de 100 nm.

1.3 Activitatea litică a QS21 este inhibată prin lipozomi care conțin colesterol

Când QS21 se adaugă la eritrocite, ele se lizează rezultând hemoglobina. Această activitate litică poate de asemenea, să fie măsurată folosind lipozomi care conțin colesterol în membrana lor și un colorant fluorescent captat, carboxifluoresceina - pe măsură ce lipozomii sunt lizați, colorantul este eliberat, ceea ce poate fi urmărit prin spectroscopie fluorescentă. Dacă lipozomii fluorescenți nu conțin colesterol în membrana lor nu este observată nici o liză.

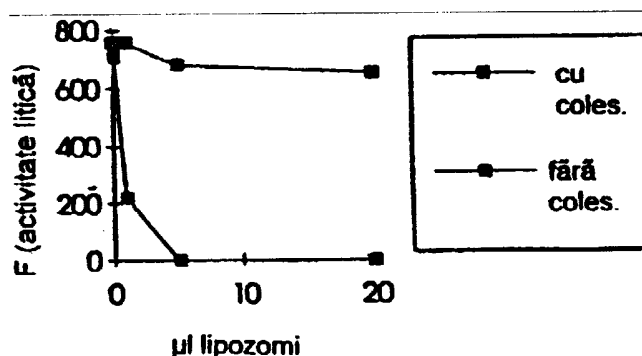
Dacă QS21 este incubată cu lipozomi care conțin colesterol înainte de adăugare la eritrocite, liza eritrocitelor este diminuată în funcție de raportul colesterolului față de QS21. Dacă se folosește un raport 1:1 nu se detectează nici o activitate litică. Dacă lipozomii nu conțin colesterol, inhibarea lizei necesită un exces de 1000 de ori al fosfolipidei față de QS21.

Cele de mai înainte sunt adevărate când se folosesc lipozomi fluorescenți pentru a măsura activitatea litică. În graficul de mai jos, se prezintă activitatea litică a 4 μg de QS21 tratată cu lipozomi cărora le lipsește colesterolul (1 mg lecitină din gălbenuș de ou per ml) sau care conțin colesterol (1 mg lecitină, 500 μg colesterol per ml) s-a măsurat prin fluorescență.

195

200

205



Datele arată că QS21 se asociază într-un mod specific cu colesterolul într-o membrană, aceasta producând liza (celulelor sau lipozomilor fluorescenți). Dacă QS21 se asociază mai întâi cu colesterolul în lipozomi, nu mai este litică față de celule sau alți lipozomi. Aceasta necesită un raport minim de 0,5:1 colesterol:QS21 (g/g).

210

Colesterolul este insolubil în soluții apoase și nu formează o suspensie stabilă, în prezența fosfolipidelor, colesterolul precipită în bistratul fosfolipidic care poate forma o suspensie stabilă de vezicule numite lipozomi. Pentru a evita necesitatea adăugării fosfolipidelor s-a ales un derivat solubil. Polioxietanilcolesterol sebacat este solubil în apă la 60 mg/ml chiar la un exces de 2000 de ori (g/g) față de QS21 nefiind detectată nici o reducere în activitatea litică a QS21.

215

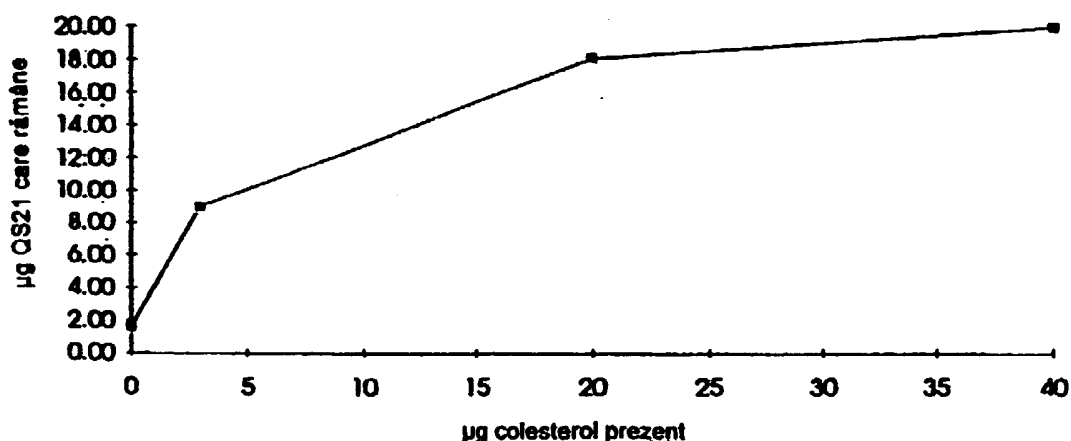
1.4 Stabilitatea crescută a QS21 prin lipozomi care conțin colesterol.

QS21 este foarte sensibil la hidroliză la un pH peste 7. Această hidroliză poate fi urmărită prin măsurarea descreșterii în maximul care corespunde la QS21 pe HPLC în fază inversă. De exemplu, graficul de mai jos arată că la pH 9 și la o temperatură de 37°C, 90% din QS21 este hidrolizată în 16 ore. Dacă lipozomii care conțin colesterol sunt adăugați la QS21 la un raport de 2:1 (colesterol:QS21 g/g) nici o hidroliză a QS21 nu se detectează în aceleași condiții. Dacă raportul este 1:1 10% din QS21 este degradată.

220

225

230



235

S-a ajuns la concluzia că atunci când QS21 se asociază cu lipozomi care conțin colesterol devin mult mai puțin susceptibili la hidroliză mediata bază. Produsul hidrolizei este descris ca neavând activitate adjuvantă când s-a administrat parenteral; de aici vaccinurile care conțin QS21 trebuind să fie formulate la pH acid și păstrate la 4°C pentru menținerea compoziției adjuvante. Folosirea lipozomilor poate depăși această cerință.

240

RO 119068 B1

1.5 Studii de reactogenicitate

S-au injectat șoareci în mușchiul tibial cu 5 μg QS21 (sau digitonină) adăugate la cantități crescute de lipozomi (exprimate în termenii μg colesterol). Activitatea litică este exprimată ca μg echivalent QS21, care înseamnă acea cantitate de QS21 necesară pentru a obține aceeași hemoliză ca probă.

Roșeața, necroza și toxicitatea din mușchi la locul injectării s-au marcat vizual după sacrificarea șoarecilor.

Formulare	Activitate litică μg	Roșeață	Necroză	Toxicitate
QS21 + PBS	5	+++	±	+++
QS21 + 1 μg coles. (SUV)	4	+++	+	++++
QS21 + 5 μg coles. (SUV)	0	-	-	±
QS21 + 25 μg coles. (SUV)	0	±	-	+
doar SUV	0	-	-	-
digitonină	5	-	-	±
PBS	0	-	-	-

Datele arată că atunci când activitatea litică este îndepărtată prin adăugarea lipozomilor care conțin colesterol, toxicitatea datorată QS21 este de asemenea, îndepărtată.

1.6 Reactogenicitatea intramusculară, la iepuri

Valori în U.I./L

Experiment	Formulare	Ziua 0	hemo- liza	Ziua 1	hemo- liza	Ziua 3	hemo- liza
lepure nr 1	QS21 50 μg	1078	±	8650		1523	
lepure nr 2		1116		4648		1435	
lepure nr 3		660		4819		684	
lepure nr 4		592		5662		684	
lepure nr 5		3400		7528		1736	
Medie		1369		6261		1212	
SD		1160		1757		495	

Experiment	Formulare	Ziua 0	hemo- liza	Ziua 1	hemo- liza	Ziua 3	hemo- liza
lepure nr 6	QS21 50 μg Chol în SUV 50 μg (1:1)	596		1670		460	
lepure nr 7		540		602		594	
lepure nr 8		611		1873		803	
lepure nr 9		521		507		616	
lepure nr 10		1092	±	787		555	
Medie		672		1088		606	
SD		238		636		125	

RO 119068 B1

Experiment	Formulare	Ziua 0	hemo-liza	Ziua 1	hemo-liza	Ziua 3	hemo-liza
lepure nr 11	QS21 50 µg Chol în SUV 150 µg (1:3)	332		344		387	
lepure nr 12		831		662		694	
lepure nr 13		464		356		519	
lepure nr 14		528		720		614	
lepure nr 15		1027		568		549	
Medie		637		530		613	
SD		285		173		175	

Experiment	Formulare	Ziua 0	hemo-liza	Ziua 1	hemo-liza	Ziua 3	hemo-liza
lepure nr 16	QS21 50 µg Chol în SUV 250 µg (1:5)	540		769		745	
lepure nr 17		498		404		471	
lepure nr 18		442		717		(4535)	
lepure nr 19		922		801		925	
lepure nr 20		3192	±	2410		960	
Medie		1097		1020		775	(1527)
SD		1175		793		224	(1692)

Experiment	Formulare	Ziua 0	hemo-liza	Ziua 1	hemo-liza	Ziua 3	hemo-liza
lepure nr 21	PBS	321		290		378	
lepure nr 22		660		535		755	
lepure nr 23		650		603		473	
lepure nr 24		1395		(3545)		(5749)	
lepure nr 25		429	±	323		263	
Medie		691		438	(1059)	467	(1527)
SD		419		155	(1396)	210	(2369)

Datele arată că adăugarea lipozomilor care conțin colesterol la formulare reduce semnificativ creșterea în CPK (creatin fosfo kinază) produsă de QS21. Deoarece creșterea CPK este o măsură a distrugerii musculare, aceasta indică descreșterea distrugerii mușchiului și este confirmată prin histopatologie.

1.7 Legarea complexului lipozom-QS21 la alaun

S-a incubat QS21 cu lipozomi neutri care conțin colesterol în exces precum și colesterol radioactiv și apoi s-a incubat cu alaun (A1(OH)₃) în PBS. Singuri, nici lipozomii neutri nici QS21 nu se leagă la alaun în PBS, dar lipozomii încărcăți negativ o fac. Cu toate acestea când sunt împreună, QS21 și lipozomii neutri se leagă la alaun. Supernatantul nu a conținut nici QS21 (analizat prin testul orcinol) nici colesterol radioactiv.

Aceasta arată că QS21 s-a legat la lipozomi și permite combinației lipozom-QS21 să se lege la alaun. Aceasta poate să apară de la o sarcină negativă fiind impusă lipozomilor de către QS21, sau la o expunere a regiunilor hidrofobe pe lipozomi. De asemenea, rezultatele implică faptul că QS21 nu extrage colesterolul din membrană. Deci compozițiile invenției se pot folosi în vaccinuri pe bază de alaun.

RO 119068 B1

1.8 Comparație a QS21/MPL lipozomale și QS21+MPL liberă pentru inducere de anticorp și CMI

S-au preparat SUV prin extrudare (EYPC:colesterol:MPL 20:5:1).

Pentru MPL afară, s-au preparat lipozomi fără MPL și s-a adăugat MPL ca particule de 100 nm.

QS21 s-a adăugat înaintea antigenului. Colesterol:QS21 = 5:1(g/g). S-au obținut MLV prin înghețare-dezghețare SUV 3x înaintea adăugării antigenului.

Pentru a avea antigenul captat, antigenul s-a adăugat la SUV înainte de înghețare-dezghețare și QS21 s-a adăugat după înghețare dezghețare, încapsularea antigenului = 5% în, 95% afară.

Șoarecii (balb/c pentru gD, B10BR pentru RTSs) s-au injectat de două ori în talpa piciorului.

GD este glicoproteina D de la virusul *Herpes Simplex*. RTSs este antigen de suprafață Hepatită B (HbsAg) modificat genetic pentru a conține un epitop de sporozoitul *Plasmodium falciparum*.

ag = 10 μg RTSs	Titru anti HbsAg la 15 zile post rapel		
formulare	IgG1	IgG2a	IgG2b
SUV/QS + MPL _(afară) + Ag	1175	10114	71753
SUV/QS + MPL _(afară) + Ag	2247	11170	41755
SUV/QS/MPL _(în) + Ag	969	7073	18827
SUV/QS/MPL _(în) /Ag _(în) + Ag	1812	2853	9393
QS + MPL + Ag	372	9294	44457
+ Ag	<100	<100	<100
SUV/QS + MPL _(afară)	<100	<100	<100
SUV/QS/MPL _(în)	<100	<100	<100

ag = 20 μg gD	anti-gD	CMI	
formulare	IgG	IFN-γ 96 ore (pg/ml)	IL2 48 ore (pg/ml)
SUV/QS + MPL _(afară) + Ag	2347	1572	960
SUV/QS/MPL _(în) + Ag	2036	1113	15
SUV/QS + MPL _(afară) + Ag	1578	863	15
SUV/QS/MPL _(în) + Ag	676	373	15
SUV/QS/MPL _(în) /Ag _(în) + Ag	1064	715	15
QS + MPL + Ag	1177	764	15
Ag	<100	567	44
SUV/QS + MPL _(afară)	<100	181	15
SUV/QS/MPL _(în)	<100	814	105

RO 119068 B1

365 Datele arată că SUV/QS21 + MPL_(afară) induce titruri ridicate de anticorp cel puțin la fel de bine ca QS21 + MPL, precum și inducerea unui marker IL2 al imunității mediate celular, stopând în același timp reactogenicitatea QS21.

370 Rezultate suplimentare de la un al doilea experiment care compară QS21 și QS21 în prezență de colesterol (SUV) la șoareci balb/c cu HSV gD ca antigen sunt prezentate mai jos:

Formulare	antigen	IgG7 post II (GMT)	IgG14 post II (GMT)	Izotipuri 7 zile post II					
				IgG1 μg/ml	%	IgG2a μg/ml	%	IgG2b μg/ml	%
375 SUV/QS21 + MPL _(afară)	gD(5μg)	20290	16343	331	26	716	56	222	17
SUV/QS21/ MPL _(în)	gD(5μg)	12566	10731	418	44	412	44	111	12
380 QS21+MPL	gD(5μg)	10504	10168	200	34	285	48	107	18
SUV/QS21 + MPL _(afară)	nimic	0	0	0	0	0	0	0	0
QS21	gD(5μg)	3468	4132	156	66	67	28	14	6
385 SUV7QS21	gD(5μg)	11253	11589	484	57	304	36	65	8

1.9 Compararea gp120 plus MPL/QS21 lipozomal cu MPL/QS21 liber

Lipozomi=SUV care conțin MPL în membrană

Coles:QS21=6:1

Răspunsul s-a testat la 2 săptămâni după o imunizare

390 formulare	prolif	IFN-g ng/ml	IL2 pg/ml	IL5 pg/ml
SUV/MPL/QS21 + Ag	12606	16,6	59	476
MPL + QS21 + Ag	16726	15,8	60	404

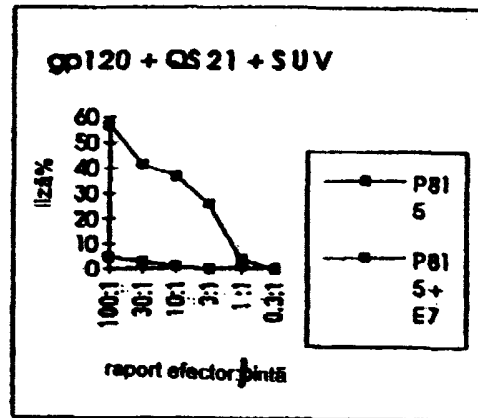
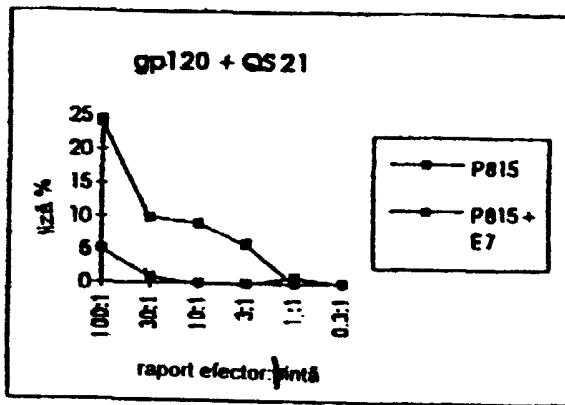
395 După a doua imunizare

formulare	prolif	IFN-g ng/ml	IL4 pg/ml	IL5 pg/ml
SUV/MPL/QS21 + Ag	12606	135	0	250
MPL + QS21 + Ag	16726	60	0	500

400 Datele arată că QS21 asociată cu lipozomi care conțin colesterol și MPL induce răspuns Th1/Th0 egal la MPL+QS21.

La acest raport al colesterolului la QS21, QS21 nu este toxic la iepuri (prin CPK).

405 Într-un al doilea experiment, șoareci balb/c s-au imunizat în laba piciorului cu gp120 în prezența QS21 sau QS21+SUV care conține colesterol. S-a măsurat activitatea citotoxică a limfocitelor T în celule de splină.



410

415

Aceasta demonstrează că QS21 singură induce activitate CTL și că QS21 în prezența lipozomilor care conțin colesterol induc activitate CTL cel puțin la fel de bună, sau mai bună decât, QS21 singură.

420

2. Vaccinuri

2.1 Formularea particulelor HbsAg L*,S.

Particule HBsAg L*,S pot fi formulate după cum urmează: 10 μg de particule HBsAg L*, S per doză sunt incubate 1 oră la temperatura camerei sub agitare. Volumul este ajustat folosind apă pentru injectare și o soluție PBS și s-a completat la un volum final de 70 μl/doză cu o soluție apoasă de QS21 (10 μg/doză). PH-ul este menținut la 7 ± 0,5.

425

Formulări similare se pot prepara folosind 1 și 50 μg de HBsAg L*,S și de asemenea folosind antigenul HbsAg.

Aceste formulări pot fi testate în modelul terapeutic surogat Woodchuck folosind antigeni Woodchuck HBV ca model.

430

Model Woodchuck

DQ QS21 (adică QS21/colesterol sau QS21 stopat) se pot testa în modelul terapeutic Woodchuck unde animalele sunt infectate cronic cu virusul. Vaccinul virus hepatită specific Woodchuck poate fi adăugat amestecat cu QS21 ca atare sau DQ și cu sau fără MPL și administrat la animale în fiecare lună timp de 6 luni. Eficacitatea vaccinului poate fi analizată prin epuizarea ADN-ului viral.

435

2.2 Model cobai (HSV)

2.2.1 Model profilactic

Grupuri de 12 cobai Hartley femele au fost injectate intramuscular în ziua 0 și ziua 28 cu următoarele formulări:

440

Primul experiment

- gd 5 μg + QS21 50 μg + SUV conținând 50 μg colesterol
- gd 5 μg + QS21 100 μg + SUV conținând 100 μg colesterol
- gd 5 μg + QS21 50 μg + SUV conținând 250 μg colesterol
- gd 5 μg + QS21 50 μg

445

Al doilea experiment

- gd 5 μg + MPL 12,5 μg + SUV conținând 62,5 μg colesterol, sau lăsat netratat

Animalelor li s-a prelevat sânge la ziua 14 și 28 după a doua imunizare și serurile s-au testat ELISA pentru titrurile lor specifice gd.

RO 119068 B1

450 Apoi animalele au fost injectate intravaginal cu 10^5 pfu tulpină HSV-2 MS. S-a acordat un scor zilnic din ziua 4 la ziua 12 pentru evaluarea leziunilor herpetice primare. Scorurile au fost după cum urmează:

Leziuni vaginale:

- sângerare = 0,5

455 - roșeață pentru una sau 2 zile fără sângerare = 0,5

- roșeață și sângerare timp de 1 zi = 1

- roșeață fără sângerare care cel puțin 3 zile = 1

Veziicule herpetice externe:

- <4 vezicule mici = 2

460 - ≥ 4 vezicule mici sau o veziculă ≥ 4 = 4 leziuni mari = 8 leziuni mari care fuzionează
= 16

- leziuni mari care fuzionează pe toată suprafața genitală externă = 32.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

RO 119068 B1

Model profilactic

465

Experiment 1 (col. se referă la SUV conținând colesterol)

n	Formulare	Boală primară						Severitate leziune*
		Animal fără leziune %	Incidență leziuni vaginale %	Incidență leziuni externe %	PI		n	
					Index**	reducere vs control		
12	gD/QS21 50 µg	50	33	17	73	93%	1,50	6
11	gD/QS21 50 µg	64	18	17	67	93%	2,50	4
12	col.1/5	100	0	0	0	100%	-	-
12	gD/QS21 50 µg	50	33	17	54	95%	0,75	6
12	col.1/1	25	0	75	996	-	55,00	9
	gD/QS21 50 µg							
	col.1/1							
	NETRATAT							

475

480

Experiment 2

n	Formulare	Titurii Ab (GMT)			Boala primară					
		ELISA		NEUTRA	Incidență leziuni vaginale %	Incidență leziuni externe %	PI		Severitate leziune*	
		ziua 14 post II	ziua 28 post II	ziua 28 post II			Index**	Reducere control	Medie	n
12	gD/QS21/SU V/MPL	47006	31574	449	58,33	8,33	37,50	94%	1,00	5
12	NETRATAT	<400	<400	<50	16,67	75,00	587,50	-	11,50	10

* Suma scorurilor pentru zilele 4 la 12 post-infecție (animalele fără leziuni nu sunt luate în considerare).

Scoruri leziuni: fără leziune (0), leziuni vaginale (0, 5 sau 1), vezicule externe ale pielii (2, 4, 8 sau 16)

** Index infecție primară = SUM (Scor l max.) X (Incidență %); cu i=0, 0,5, 1, 2, 4, 8, sau 16

RO 119068 B1

Tabelul și graficul arată că în modelul profilactic, s-a indus un nivel foarte ridicat al protecției împotriva bolii primare la imunizare cu gD/MPL/QS21/SUV. Atât incidența leziunilor externe cât și severitatea leziunii apar puternic reduse în grupul de animale imunizate cu gD/MPL/QS21/SUV.

2.2.2 Model terapeutic

500

În modelul terapeutic, cobaii Hartley femele au fost injectați inițial cu 10^5 pfu tulpină HSV-2 MS. Animalele cu leziuni terapeutice au fost alocate randomic la grupuri de 16.

În ziua 21 și ziua 42 ele s-au imunizat cu una dintre următoarele formulări:

- gD + MPL 50 μ g + QS21 50 μ g + SUV conținând 250 μ g colesterol,

- gD + Al(OH)₃ + MPL 50 μ g + QS21 50 μ g + SUV conținând 250 μ g colesterol sau

505

lăsate netratate.

Ele s-au urmărit zilnic din ziua 22 până în ziua 75 pentru evaluarea recurenței bolii.

Atribuirea de scoruri s-a făcut cum s-a descris pentru modelul profilactic.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul și graficul de mai jos:

Model terapeutic

n	FORMULĂRI	SEVERITATE*		DURATĂ**		EPISOD NBER***	
		Medie	Reducere% vs control	Medie	Reducere% vs control	Medie	Reducere% vs control
16	gD + MPL + QS21 + SUV	9,00	43%	7,00	18%	3,00	14%
15	gD + Al(OH) ₃ + MPL + QS21 + SUV	8,50	46%	7,00	18%	3,00	14%
16	Netratat	15,75	-	8,50	-	3,50	-

* Suma scorurilor leziunii pentru zilele 22 la 75 post-infecție.

** Total zile leziuni recurente la animale de experiment pentru zilele 22 la 75 post-infecție.

*** Număr episod recurență pentru zilele 22 la 75 post-infecție. Un episod este precedat și urmat de o zi fără leziune și caracterizat prin cel puțin 2 zile cu eritem (scor = 0,5), sau o zi cu vezicule externe (scor >=2).

Tratament imunoterapeutic realizat în zilele 21 și 42.

RO 119068 B1

Rezultate arată că niveluri bune ale protecției au fost induse de asemenea în modelul terapeutic al infecției HSV-2. Imunizarea cu gD/MPL/QS21/SUV cu sau fără alaua a avut un efect marcat asupra mediei severității bolii recurente. De asemenea, sunt reduse ușor numărul episoadelor și durata (vezi, Tabel). 525

Revendicări

1. Compoziție de vaccin, cuprinzând un antigen, o fracție de saponină, imunologic activă, derivată din coajă de *Quillaja Saponaria Molina* și un sterol, **caracterizată prin aceea că raportul în greutate de saponină:sterol este cuprins între 1:1 și 1:100.** 530
2. Compoziție de vaccin, în conformitate cu revendicarea 1, **caracterizată prin aceea că raportul în greutate de saponină:sterol este cuprins între 1:1 și 1:5.**
3. Compoziție de vaccin, în conformitate cu revendicarea 1, **caracterizată prin aceea că raportul în greutate de saponină:sterol este 1:2.** 535
4. Compoziție de vaccin, conform revendicărilor 1...3, **caracterizată prin aceea că fracția de saponină imunologic activă este QS21.**
5. Compoziție de vaccin, în conformitate cu revendicarea 1, **caracterizată prin aceea că sterolul este reprezentat de colesterol.** 540
6. Compoziție de vaccin, în conformitate cu oricare din revendicările 1...5, **caracterizată prin aceea că mai conține 3D-MPL.**
7. Compoziție de vaccin, în conformitate cu oricare din revendicările 1...6, **caracterizată prin aceea că mai conține și un purtător.**
8. Compoziție de vaccin, în conformitate cu revendicarea 7, **caracterizată prin aceea că purtătorul este selectat din grupul format din: ulei în emulsii apoase, alaua, microsfere și particule de antigen încapsulate.** 545
9. Compoziție de vaccin, în conformitate cu oricare din revendicările 1...3, **caracterizată prin aceea că aceasta cuprinde un sterol, o saponină QS21, în esență pură, într-o structură de tip lipozom.** 550
10. Compoziție de vaccin, în conformitate cu revendicarea 9, **caracterizată prin aceea că QS21 are o puritate de cel puțin 95%.**
11. Compoziție de vaccin, în conformitate cu revendicarea 9, **caracterizată prin aceea că QS21 are o puritate de cel puțin 98%.**
12. Compoziție de vaccin, în conformitate cu revendicarea 9, **caracterizată prin aceea că aceasta cuprinde și 3D-MPL în membrana lipozomului.** 555
13. Compoziție de vaccin, în conformitate cu oricare din revendicările 1...12, **caracterizată prin aceea că aceasta cuprinde un antigen sau o compoziția antigenică, derivată din oricare dintre: virus al imunodeficienței umane, virus al imunodeficienței întâlnit la feline, virus de *Varicela Zoster*, virus *Herpes Simplex* de tip 1, virus *Herpes Simplex* de tip 2, citomegalovirus uman, virus al hepatitei A, B, C, sau E, virus respirator sincițial, virus de papilom uman, virus gripal, Hib, virus de meningită, *Salmonella*, *Neisseria*, *Borrelia*, *Chlamydia*, *Bordetella*, *Plasmodium* sau *Toxoplasma*.** 560
14. Compoziție de vaccin, în conformitate cu oricare din revendicările 1...13, **caracterizată prin aceea că aceasta cuprinde și un antigen de origine tumorală.** 565
15. Utilizarea unei compoziții definite în în oricare din revendicările 1...14, ca medicament.
16. Utilizarea unei compoziții definite în oricare din revendicările 1...14, la fabricarea unui vaccin pentru tratamentul profilactic al infecțiilor virale, bacteriene, parazitare sau al cancerului. 570

17. Procedeu de obținere a unei compoziții de vaccin, definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** acesta cuprinde următoarele etape:

- a) obținerea unei suspensii lipidice conținând un sterol;
- b) microfluidizarea suspensiei lipidice, până ce dimensiunea lipozomilor se reduce la 100 nm;
- c) adăugarea de QS21 în esență pur;
- d) amestecarea QS21 și a colesterolului cu un antigen sau o compoziție antigenică.

575

Președintele comisiei de examinare: **ing. Mirela Georgescu**

Examinator: **dr. med. vet. Iuliana-Emilia Moroianu**

