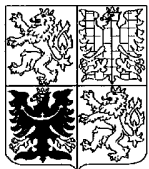


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03.06.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.06.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9711990**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.06.2000**
(Věstník č. 6/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/03479**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/56414**

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 4476

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/39

A 61 K 47/44

A 61 P 37/08

A 61 P 31/04

A 61 P 31/12

A 61 P 33/00

A 61 P 35/00

/(A 61 K 39/39, A 61 K 39:21)

(71) Přihlašovatel:

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS
S. A., Rixensart, BE;

(72) Původce:

Garcon Nathalie, Rixensart, BE;
Momin Patricia Marie Christine Aline
Francoise, Rixensart, BE;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Vakcína typu olej ve vodě

(57) Anotace:

Toto řešení se zabývá zlepšením stabilních emulsí oleje ve vodě, kde olejové kapky mají střední průměr 300-600 nm, olejová fáze obsahuje squalen, α -tokoferol a triglycerid. Dále se řešení zabývá užitím těchto emulsí jako pomocných prostředků vakcín.

20.03.00

1999-4446

VAKCÍNA TYPU OLEJ VE VODĚ

Oblast techniky

Vynález se týká zdokonalení vakcíny typu olej ve vodě. Zejména se předkládáný vynález týká pomocného prostředku vakcíny, založeném na emulsi oleje ve vodě, která obsahuje metabolisovatelný olej squalen, α -tokoferol, TWEEN 80, který byl zlepšen začleněním triglyceridu. Dále tyto pomocné prostředky pro vakcínu mohou popřípadě obsahovat imunologicky aktivní složku QuilA (výhodně QS21) a 3D-MPL.

Dosavadní stav techniky

Trikaprylin ($C_{27}H_{50}O_6$) je olej původem z triglyceridů a je znám v oboru (The Lipid Handbook (1986) Eds. Gunstone, F. Harwood, J. and Padley, F. vydavatel Chapman and Hall, stránky 368-377).

QS21 je HPLC čištěná netoxická složka saponinu z kůry stromu Quillaja Saponaria Molina z Jižní Ameriky. Způsob jeho výroby je popsán (také známý jako QA21) v US č. 5,057,540.

3 De-O-acylovaný monofosforyl lipid A je dobře známý pomocný prostředek, vyráběný v Ribi Immunochem v Montaně. Chemicky je zastoupený jako směs 3-De-O-acylovaného monofosforylu lipidu A s 4, 5 nebo 6 acylovanými řetězci. Obdobně může být tento pomocný prostředek vyrobený podle GB 2,220,211 (Ribi). Výhodná forma 3-DE-O-acylovaného monofosforylu lipidu A a jeho způsob výroby je popsán v mezinárodní patentové přihlášce č. WO 92/116556.

Emulze oleje ve vodě jsou samy o sobě dobře známy v oboru, jsou navrhovány jako výhodné pomocné prostředky (EPO 399843).

Mezinárodní patentová přihláška č. WO 95/17210 popisuje systém emulze, založený na squalenu, α -tokoferolu a TWEENU 80, popřípadě sestavený s imunostimulancii QS21 a/nebo 3D-MPL. Toto jsou velmi silní vyvolavatelé z širokého pásma imunitních reakcí,

systému. Indukce CTL reakcí probíhají přirozeně během infekce cílových buněk nebo nekontrolované synthese nádorových antigenů, přičemž enzymatická degradace cílových antigenů probíhá v buněčné cytoplasmě. Tento jev umožňuje cytoplasmatickým bílkovinám, které jsou získané z patogenů nebo nádorových specifických antigenů, vstoupit do dráhy Th1 a být přítomen na povrchu buněk spojených s molekulou MHC skupiny I. Jestliže antigen vakcíny nevstupuje a nezdvojuje se uvnitř hostitelské buňky, pak vstoupí do dráhy Th2 a nakonec bude přítomen na povrchu buněk spojených s molekulou MHC skupiny II. Tato jiná cesta má hlavně za výsledek reakce pomocných T buněk a vznik protilátek specifických pro antigeny.

Jak zmíněno výše, antigen specifický pro patogen není po vakcinaci v cytoplasmě hostitelské buňky a tudíž nevstoupí do dráhy Th1 a nakonec vyvolá reakci CTL. Zjištěný ukazatel, že reakce Th1 je stimulována, je zesílená produkce cytokinů typu Th1, například IFN- γ a IL-2. Sekrece IFN- γ je spojována s ochrannými reakcemi proti nitrobuněčným patogenům, které zahrnují parazity, bakterie a viry. Aktivace leukocytů IFN- γ zesiluje útlum nitrobuněčných patogenů a zvyšuje expresi Fc receptorů. Může se také vyskytovat přímá cytotoxicita, zejména v součinnosti s lymfotoxinem (jiný produkt Th1 buněk). IFN- γ je také jak vyvolavatel tak produkt NK buněk, které jsou vyššími přirozenými efektoři ochrany. Th1 typ reakcí, přes IFN- γ nebo jiným způsobem, poskytuje přednostní pomoc IgG2a isotypům imunoglobulinů myši.

Emulze oleje ve vodě, zmíněné ve výše uvedené patentové přihlášce (mezinárodní patentová přihláška č. WO 95/17210), pokud jsou tvořeny s 3D-MPL a QS21, pak jsou mocnými vyvolavateli Th1 typu imunitních reakcí. Tudíž, pokud jsou tyto pomocné látky spojovány s antigenem, přednostně stimulují podtyp IgG spojovaný s Th1 reakcemi (myši IgG2a) a také budou vyvolávat významné hladiny produkce IFN- γ a reakce antigen specifických cytotoxických T lymfocytů (CTL).

Je významné pozorování, že základní prostředek oleje ve vodě /QS21/3D-MPL může vyvolávat mohutné reakce cytolytických T lymfocytů, protože tyto reakce v určitých modelech na zvířatech ukazují vyvolání ochrany proti nemocím.

Příklady popisované ve výše zmíněné mezinárodní patentové přihlášce č. WO 95/17210, srovnávají různé způsoby zpracování, které vedou k olejovým kapkám odlišných průměrů. Přípravky, které mají částice o průměru kolem 500 nm, jak měřené fotonovou korelační spektroskopií (distribuce hmoty), vykazují lepší pomocné schopnosti. Tato práce osvětlila velký užitek k získání pomocné látky s větším rozměrem olejové kapky, v době zvýšených titrů protilátek IgG2a/b a buňkami zprostředkované imunity.

Emulse dle mezinárodní patentové přihlášky č. WO 95/17210, jejíž užití je probíráno výše, jasně ponechávají velké výhody nad běžnými pomocnými prostředky nevyvolávajícími Th1. Nehledě na skutečnost, že větší částice vyniknou mezi přípravky, ježto mají lepší rozměr kapek k vyvolání imunitních reakcí, trpí nevýhodou z nedostatku stability. Na neštěstí, pro velké rozměry olejových kapek v emulsi, i když jsou užitečné pro indukci imunitních reakcí, emulse se rozrušuje. Ovšem, za účelem dosažení homogenního vakcinačního přípravku, emulse má být vyráběna přímo před užitím.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález řeší problém nestability emulse a zachovává výhodný průměr velikosti olejových kapek ve vodě pro optimální účinnost. Ta může být dosažena prostředkem emulse oleje ve vodě za přítomnosti triglyceridového oleje.

Emulse oleje ve vodě v předkládaném vynálezu jsou stabilní. Průměr olejových kapek tak setrvává v relativně konstantní hladině delší dobu. Výhodou je, že emulse v předkládaném vynálezu nebudou tvořit pěnu nebo se rozdělovat do dvou fází, po období 1 roku, při 4°C a nejvíce výhodně po dobu 2 let. Tudíž v jednom výhodném provedení předkládaný vynález poskytuje vakcínu nebo farmaceutický

20.03.00

prostředek zahrnující antigen ve spojení s 3-De-O-acylovaným monofosforem lipidu A, QS21 a triglyceridem a emulsi oleje ve vodě, kde triglyceridem může být trikaprylin a emulsi oleje ve vodě, která zahrnuje metabolisovatelný olej (jako je squalen), α -tokoferol a TWEEN 80. Takový prostředek je vhodný pro široké rozmezí monovalentních nebo polyvalentních vakcín. Dále emulsi oleje ve vodě může obsahovat span 85. Výhodná forma 3-De-O-acylovaného monofosforu lipidu A je popsána v Mezinárodní patentové přihlášce vydané pod č. 92116556 SmithKline Beecham Biologicals s.a.

Důležité hledisko vynálezu je rozmezí velikosti olejových kapek, zjištěné ve stabilní emulsi oleje ve vodě. Je uvažováno, že provedení tohoto vynálezu bude v rozmezí 300-600nm, výhodně zejména kolem 350-550nm v průměru a nejvíce výhodně zejména 450-500nm v průměru měřeno fotonovou korelační spektroskopií. Ačkoliv mnoho příkladů zde popisovaných má rozměry kapek v rozmezí 500nm, bylo by oceňováno odborníky, že vynález se týká emulsi oleje ve vodě, kde olejové kapky jsou větší než zejména 500nm v průměru, tedy olejové kapky mohou mít rozměry 600nm a více. Tudiž, průměr olejových kapek může být v rozmezí zejména 500-600nm. Je stanoveno zejména ve vztahu k vynálezu, že z daného množství kapek je více jak 80% stanovených rozměrů, výhodně více jak 90% a nejvíce výhodně více jak 95%.

Za účelem k podávání některých prostředků oleje ve vodě člověku, má olejová fáze emulsního systému obsahovat metabolisovatelný olej. Význam pojmu metabolisovatelný olej je v oboru dobře znám. Metabolisovatelný může být definováno jako „mající schopnost transformovat se během metabolismu“ (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25th edition (1974)). Tento olej může být rostlinný, rybí, živočišný nebo syntetický. Není toxický pro příjemce a je schopný se během metabolismu transformovat. Obecnými zdroji rostlinného oleje jsou ořechy, semena a obilí. Syntetické oleje jsou také součástí vynálezu a mohou zahrnovat komerčně dostupné oleje jako je NEOBEE®

a další. Squalen (2,6,10,15,19,23-hexametyl-2,6,10,14,18,22-tetrakosaheptaen) je nenasycený olej, který se nachází ve velkém množství v tuku žraločích jater a ve větším množství v olivovém oleji, v oleji zárodku pšenice, v oleji rýžových otrub a v kvasnicích. Pro užití je v tomto vynálezu mimořádně dávana přednost tomuto oleji. Squalen je metabolisovatelný olej a podstatná je skutečnost, že je meziproduktem v biosynthese cholesterolu (Merck index, 10th Edition, entry no. 8619).

Emulze oleje ve vodě mohou být použity samotné nebo s jinými pomocnými látkami nebo imunostimulancií a tak důležité provedení vynálezu je prostředek oleje ve vodě, který obsahuje squalen nebo jiný metabolisovatelný olej, triglycerid jako je trikaprylin, a-tokoferol a polyoxyetylen sorbitan monooleat (TWEEN 80^(tm)). Emulze oleje ve vodě mohou obsahovat span 85 a/nebo lecitin. Tak v důležitém provedení, předkládaný vynález obsahuje pomocný prostředek, který zahrnuje emulsi oleje ve vodě. Ta sestává ze squalenu, TWEENU 80^(tm), a-tokoferolu, kde olejové kapky v emulsi mají střední průměr v rozmezí 300-600nm. Předkládaný vynález také poskytuje vakcínu, která obsahuje emulsi oleje ve vodě sestávající ze squalenu, TWEENU 80^(tm), a-tokoferolu, kde olejové kapky mají střední průměr v rozmezí 300-600nm a antigen nebo antigenní přípravek. Pomocný prostředek nebo vakcína (jak popsáno výše), v jiném výhodném provedení vynálezu dále obsahuje QS21 a 3D-MPL.

Výhodné vakcíny v předkládaném vynálezu obsahují antigen nebo antigenní přípravek, který umožňuje vyvolání imunitních reakcí proti lidským patogenům. Tento antigen nebo antigenní přípravek je získán z HIV-1 (tak jako tat, nef, gp120 nebo gp 160), z lidského herpes viru jako je gD nebo jeho deriváty nebo z časných pohotových proteinů jako je ICP27 z HSV1 nebo HSV2, z cytomegaloviru (zvláště lidského, jako je gB nebo jeho deriváty), z rotaviru (zahrnujícím živé oslabené viry), z viru Epstein Barrové (jako je gp350 nebo jeho deriváty), z viru varicella zoster (jako je gpI, II a IE63), nebo z viru hepatitidy jako je virus hepatitidy B (například povrchový antigen viru

hepatitidy B nebo jeho deriváty), virus hepatitidy A, virus hepatitidy B a virus hepatitidy E. Dále mohou být antigeny nebo antigenní prostředky získány z dalších virových patogenů, tak jako z paramyxovirů: respirační syncytiální virus (tak jako F a G proteiny nebo jejich deriváty), virus parainfluenzy, virus spalniček, virus příušnic; z papillomaviru (např. HPV6, 11, 16, 18, tak jako antigeny L1, L2, E6 nebo E7); z flavovirů (např. virus žluté zimnice, virus Dengue, virus klíšťové encefalitidy, virus japonské encefalitidy) nebo z viru chřipky. Antigeny nebo antigenní přípravky mohou být také získány z bakteriálních patogenů jako je *Neisseria* spp., zahrnující *N. gonorrhea* a *N. meningitidis* (např. kapsulární polysacharidy a jejich konjugáty, proteiny vázající transferin, proteiny vázající laktoferin, PilC, adhesiny); *Streptococcus* sp., zahrnující *S. pneumoniae* (např. kapsulární polysacharidy a jejich konjugáty, PsaA, PspA, streptolysin, proteiny vázající cholin), *S. pyogenes* (např. M proteiny nebo jejich fragmenty, C5A proteasa, kyseliny lipoteichové), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *Haemophilus* spp., zahrnující *H. influenzae* typu B (např. PRP a jejich konjugáty), netypické *H. influenzae* (např. OMP26, adhesiny vyšší molekulové hmotnosti, P5, P6, lipoprotein D), *H. ducreyi*; *Moraxella* spp., zahrnující *M. catarrhalis*, také známou jako *Branhamella catarrhalis* (např. adhesiny a invasiny vyšší a nižší molekulové hmotnosti; *Bordetella* spp., zahrnující *B. pertussis* (např. pertactin, toxin pertusse a jeho deriváty, vláknitý hemagglutinin, adenylátcyklázu, fimbrie), *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium* spp., zahrnující *M. tuberculosis* (např. ESAT6, antigen 85A, 85B nebo 85C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella* spp., zahrnující *L. pneumophila*; *Escherichia* spp., zahrnující enterotoxické *E. coli* (např. kolonizační faktory, termolabilní toxin nebo jeho deriváty, termostabilní toxin nebo jeho deriváty), enterohemorhagické *E. coli*, enteropatogenní *E. coli* (např. toxin podobný toxinu shigely nebo jeho deriváty; *Vibrio* spp., zahrnující *V. cholera* (např. toxin cholery nebo jeho deriváty); *Shigella* spp., zahrnující *S.*

sonnei, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia* spp., zahrnující *Y. enterocolitica* (např. protein YOP), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter* spp., zahrnující *C. jejuni* (např. toxiny, adhesiny a invasin) a *C. coli*; *Salmonella* spp., zahrnující *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. cholerae suis*, *S. enteritidis*; *Listeria* spp., zahrnující *L. monocytogenes*; *Helicobacter* spp., zahrnující *H. pylori* (např. ureasa, katalasa, toxin tvořící vakuoly); *Pseudomonas* spp., zahrnující *P. aeruginosa*; *Staphylococcus* spp., zahrnující *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus* spp., zahrnující *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium* spp., zahrnující *C. tetani* (např. toxin tetanu a jeho deriváty), *C. botulinum* (např. botulotoxin a jeho deriváty), *C. difficile* (např. toxiny clostridia A nebo B a jejich deriváty); *Bacillus* spp., zahrnující *B. anthracis* (např. toxin anthraxu a jeho deriváty); *Corynebacterium* spp., zahrnující *C. diphtheriae* (např. toxin diphterie a jeho deriváty), *Borrelia* spp., zahrnující *B. burgdorferi* (např. OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (např. OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (např. OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (např. OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia* spp., zahrnující *E. equi* vyvolavatele lidské granulocytární Ehrlichiosi; z *Rickettsia* spp., zahrnující *R. rickettsii*; *Chlamydia* spp., zahrnující *C. trachomatis* (např. MOMP, proteiny vázající heparin), *C. pneumoniae* (např. MOMP, proteiny vázající heparin), *C. psittaci*; *Leptospira* spp., zahrnující *L. interrogans*; *Treponema* spp., zahrnující *T. pallidum* (např. vzácné proteiny vnější membrány), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*. Antigeny nebo antigenní přípravky mohou být získány také z parazitů jako je *Plasmodium* spp., zahrnující *P. falciparum*; *Toxoplasma* spp., zahrnující *T. gondii* (např. SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba* spp., zahrnující *E. histolytica*; *Babesia* spp., zahrnující *B. microti*; *Trypanosoma* spp., zahrnující *T. cruzi*; *Giardia* spp., zahrnující *G. Lamblia*; *Leshmania* spp., zahrnující *L. major*; *Pneumocystis* spp., zahrnující *P. carinii*; *Trichomonas* spp., zahrnující *T. vaginalis*; *Schistosoma* spp., zahrnující *S. mansoni*. Antigeny nebo antigenní přípravky mohou být také získané

z kvasinek jako je *Candida* spp., zahrnující *C. albicans*; *Cryptococcus* spp., zahrnující *C. neoformans*.

Deriváty povrchového antigenu hepatitidy B jsou dobře známé v oboru a zahrnují, mezi jinými, soubor vnějších S antigenů PreS1, PreS2, popsaných v evropských patentových přihláškách EP-A-414 374; EP-A-0304 578 a EP 198-474. V jednom výhodném hledisku vynálezu, vakcína obsahuje antigen HIV-1, gp 120, zvláště pokud k jeho expresi dochází v buňkách CHO. V dalším provedení, vakcína podle vynálezu, obsahuje gD2t jak blíže určeno výše.

Ve výhodném provedení tohoto vynálezu, vakcíny obsahují nárokové pomocné prostředky zahrnující viry HPV, které jsou odpovědné za genitální bradavice (HPV 6 nebo HPV 11 a jiné) a HPV viry odpovědné za cervikální rakovinu (HPV 16, HPV 18 a jiné). Zvláště výhodné formy vakcíny zahrnují částice L1 nebo kapsomery a složené proteiny, zahrnující jeden nebo více antigenů vybraných z proteinů E6, E7, L+ a L2 z HPV 6 a HPV 11. Nejvíce výhodnými formami spojovacích proteinů jsou: L2E7 jak popsáno v GB 95 15478.7 a protein D(1/3)-E7 popsáný v GB 9717953.5.

Vakcíny v předkládaném vynálezu dále obsahují antigeny získané z parazitů, způsobujících malárii. Například výhodné antigeny z *Plasmodia falciparum* zahrnují RTS,S a TRAP. RTS je hybridní protein obsahující zejména všechny C-terminální části proteinu circumsporozoitu (CS) z *P. falciparum* vázané přes čtyři aminokyseliny části preS2 povrchového antigenu viru hepatitidy B na povrchový (S) antigen viru hepatitidy C. Tato úplná struktura je popsána v Mezinárodní patentové přihlášce č. PCT/EP92/02591, vydané pod č. WO 93/10152, prioritou z UK patentové přihlášky č. 9124390.7. Při expresi v kvasinkách je RTS produkováno jako lipoproteinová částice a pokud je exprimováno spolu s S antigenem z HBV, pak je produkována smíšená částice známa jako RTS,S. TRAP antigeny jsou popsány v Mezinárodní patentové přihlášce č. PCT/GB89/00895, vydané pod WO 90/01496. Výhodným provedením vynálezu je vakcína proti malárii, kde antigenní přípravek

obsahuje kombinaci RTS,S a TRAP antigenů. Jiné antigeny plasmodia, které jsou pravděpodobnými uchazeči stát se složkami vícestupňové vakcíny proti malárii, jsou MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Sequestrin, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS 27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 z *P. falciparum* a jím analogické antigeny *Plasmodia* spp.. Prostředky také mohou obsahovat protinádorový antigen a mohou být prospěšné v imunoterapii rakovin. Například, pomocný prostředek nalézá užitek u tumor rejekčních antigenů, tak jako u rakoviny prostaty, prsu, kolorektálního karcinomu, rakoviny plic, slinivky břišní, ledvin a u melanomu. Na ukázkou uvedené antigeny zahrnují MAGE1 a MAGE3 nebo další MAGE antigeny pro léčbu melanomu, PRAME, BAGE nebo GAGE (Robbins and Kawakami, 1996, Current Opinions in immunology 8, pps 628-636; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research (1997); Correale et al. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89,p293). Tyto antigeny jsou ovšem exprimovány u širokého pásma typů nádorů jako je melanom, plicní karcinom, sarkom a rakovina močového měchýře. Jiné nádorově specifické antigeny jsou vyhovující pro užití s pomocným prostředkem, podle vynálezu, a zahrnují ale nejsou vyhrazené, specifické antigeny prostaty (PSA) nebo Her-2/neu, KSA(GA733), MUC-1a karcinoembryonální antigen (CEA). Tudiž v některém hledisku předkládaného vynálezu je připravována vakcína, která obsahuje pomocný prostředek, podle vynálezu, a tumor rejekční antigen.

Zvláště preferovaným provedením předkládaného vynálezu je vakcína, která obsahuje antigen gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH). Imunogenní konjugáty tohoto antigeny jsou popsány v WO 95/20600, EP 0117934, US 4,302,386 a US 5,006,334. Takové vakcíny jsou zejména výhodné při léčbě rakoviny.

Je předvídáno, že prostředky v předkládaném vynálezu, budou užívány zejména k přípravě vakcín, které obsahují antigeny získané z *Borrelia* sp.. Antigeny mohou například obsahovat nukleovou kyselinu, antigen získaný z patogenu nebo antigenní přípravky,

rekombinantně vytvářené proteiny nebo peptidy a chimericky složené proteiny. Zvláštním antigenem je OspA. OspA může být plně zralý protein účinný v lipidové formě hostitelské buňky (E. coli), nazvaný (Lipo-OspA) nebo v nelipidovém derivátu. Takové nelipidové deriváty obsahují nelipidový složený protein NS1-OspA, který má prvních 81 N-terminálních aminokyselin nestrukturálního proteinu(NS1) viru chřipky a kompletní OspA protein, a jiný, MDP-OspA je nelipidová forma OspA nesoucí 3 přídavné N-terminální aminokyseliny.

Vakcíny, podle vynálezu, mohou být užity pro profylaxi nebo léčbu alergií. Takové vakcíny budou obsahovat specifický alergen (např. Der p1) a alergen nespecifické antigeny (např. stanworth dekaeptid).

V dalším hledisku předkládaného vynálezu je připravována vakcína, jak zde popsáno, pro užití v lékařství.

Je uvažováno, že přípravek vakcíny, podle vynálezu, může být užit prostřednictvím podávání uvedené vakcíny slizniční cestou např. ústy nebo nosem, nebo parenterální cestou, např. nitrosvalově k předcházení nemocím u savců náchylných k nemoci nebo k léčení savců nemocí trpících.

V předkládaném vynálezu poměr trikaprylin:metabolizovatelný olej, především squalen, bude kolem 1:10 až 10:1, výhodně 1:5-5:1. Poměr QS21:3D-MPL bude typicky kolem 1:10 až 10:1, výhodně 1:5 až 5:1, zvláště často 1:1. Výhodný rozsah pro optimální synergii je 2,5:1 až 1:1 3D-MPL:QS21. Pro podávání člověku bude QS21 a 3D-MPL přítomno ve vakcíně typicky v rozmezí 1 μ g-1000 μ g, výhodně 10 μ g-500 μ g, více výhodně 20-200 μ g na dávku a nejvíce výhodně 10-50 μ g na dávku. Olej ve vodě bude typicky obsahovat 2-10% α -tokoferolu a 0,3-3% TWEENU80. Výhodný poměr squalen: α -tokoferol se rovná 1 nebo je menší než 1. Může být také přítomen span85 v 1% hladině. V některých případech může být výhodné, pokud vakcíny, podle vynálezu, budou dále obsahovat další stabilisátor.

Přípravek vakcíny je obecně popsán v New Trends and Developments in Vaccines, vydáno Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. Zapouzdření v liposomech je popsáno, například, Fullertonem, U.S. 4,235,877. Konjugace proteinů do makromolekul je popsána, například, Likhitem, U.S. 4,372,945 a Armor et al., U.S. 4,474,757.

Množství proteinu v každé dávce vakcíny je vybráno jako množství, které v typických vakcínách vyvolá imunoprotektivní reakci bez významných vedlejších nepříznivých účinků. Toto množství se bude měnit v závislosti na specifickém imunogenu a jeho použití. Obecně je očekáváno, že každá dávka bude obsahovat 1-1000 μ g proteinu, výhodně 2-100 μ g, nejvíce výhodně 4-40 μ g. Optimální množství pro jednotlivou vakcínu může být stanoveno standardními studiemi, které zahrnují sledování příslušných imunitních reakcí u subjektů. Subjekty, po původní vakcinaci, mohou přijmout jednu nebo více zvyšujících se imunizací, adekvátně rozdělených.

Způsob výroby emulsi oleje ve vodě, popisované v příkladech, zahrnují míchání olejové složky s roztokem PBS/TWEEN80^(tm) s následnou homogenizací za užití homogenizátoru. Odborníkům bude jasné, že způsob zahrnující předcházející míchání dvakrát skrz injekční jehlu, bude vhodný pro homogenizaci malých objemů kapaliny. Stejně, emulsifikační proces v mikrofluidiseru (M110S mikrofluidisační zařízení, maximálně 50 průchodů) po dobu 2 minut při maximálním vstupním tlaku 0,6Mpa (výstupní tlak kolem 85Mpa) by mohl být upraven odborníky k výrobě menších nebo větších objemů emulze. Tato úprava by mohla být dosažena běžným prováděním pokusů, které zahrnují měření výsledné emulze, až by byl dosažen přípravek s olejovými kapkami požadovaného průměru. Prostředky, podle vynálezu, mohou být užity pro obojí účel- profylaktický a terapeutický.

Také je, podle vynálezu, poskytnut způsob stabilizace emulze oleje ve vodě. Zmíněná emulze oleje ve vodě nebývá stabilní po

20.03.00

dobu dvou let, ale přidáním triglyceridů k olejové složce je možno její stabilitu zvýšit. Výhodně užívaným triglyceridem je v této metodě trikaprylin.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 Pomocný prostředek

Pomocné emulze oleje ve vodě se skládají z organické fáze (a-tokoferolu, trikaprylinu a squalenu) a vodné fáze (PBS) a jednoho nebo několika emulgátorů (zahrnujících TWEEN 80) a jsou vyráběné v podobných postupech, které jsou popsány v WO 95/17210.

TWEEN 80 je rozpuštěn ve fyziologickém roztoku chloridu sodného s fosfátovým pufrem za vzniku 0,4% roztoku PBS. K získání 100 ml emulze je pomalu přidáno 5g DL a-tokoferolu, 0-5ml squalenu a 0-5ml trikaprylinu a pak důkladně mícháno mechanickým míchadlem.

Zatímco je olejová fáze míchána, je přidáno 90ml roztoku PBS, TWEEN 80 v kapkách a důkladně mícháno. Výsledný prostředek je pak homogenizován za užití homogenizátoru (typ ultrathurax). (Malé objemy materiálu mohou být obdobně homogenizovány dvojím průchodem injekční jehlou).

Prostředek je emulgován v mikrofluidiseru (M110 mikrofluidizační přístroj). Emulze snese maximálně 50 průchodů během 2 minut, při maximálním vstupním tlaku 0,6Mpa, výstupní tlak je kolem 85Mpa). Výsledné olejové kapky mají rozměr přibližně 300-600nm.

Podrobnosti o emulsi oleje ve vodě k provádění zkoušek viz tabulka 1.

Tabulka 1, prostředek emulsi SB26 popřípadě obsahující trikaprylin, pro užití ve zkouškách stability.

20.03.00

Emulze	α -tokoferol (%)	Squalen (%)	Trikaprylin (%)	Tween 80 (%)
SB26	5	5	0	0,4
SB26T	5	0	5	0,4
SB26T1	5	4	1	0,4
SB26T2.5	5	2,5	2,5	0,4
SB26T4	5	1	4	0,4

Příklad 2 Stabilita pomocného prostředku 1

Stabilita pomocných prostředků, popsanych ve výše uvedeném příkladu, byla zkoumána po různě dlouhou dobu a při odlišných skladovacích podmínkách. Počáteční rozměry pomocných prostředků byly srovnány se získanými po skladování po dobu 8 hod. při 75°C, po 1 měsíci při 37°C nebo 45°C, po 12 měsících při 4°C nebo po zrychlené zkoušce rozkladu, která zahrnuje centrifugaci při 3000xg.

Průměrný rozměr olejových kapek ve vodě byl měřený korelační fotonovou spektroskopií a vyjádřen jako poměrné číslo (CR), distribuce intensity, distribuce hmoty a střední průměr částic (tabulka 5).

Přidáním trikaprylinu k velkým částicím pomocného prostředku emulze oleje ve vodě, který byl předtím nestabilní, stává se emulze stabilní po dlouhé období. Vynález umožňuje tento účinný laboratorně založený systém k užití po dlouhou dobu v běžném prostředí.

20.03.00

Příklad 3 Stabilita pomocného prostředku 2

Pokus se stabilitou pomocného prostředku (viz příklad 2) byl opakován delší dobu. Výsledky viz tabulka 6.

Výsledky ukazují, že emulze oleje ve vodě, které obsahují trikaprylin, jsou stabilní po delší období ve srovnání s emulsemi, které trikaprylin neobsahují.

Příklad 4 Pokusy s očkováním u myši za použití stabilní pomocné emulze oleje ve vodě

Skupiny myši Balb/C byly imunizovány nitrosvalově ve třech dávkách (dny 0, 14, 28) experimentálními vakcínami, které obsahují antigen malárie RTS,S, HIV gp 120, emulsi oleje ve vodě a popřípadě trikaprylin. Emulze oleje ve vodě SB26, pokud byly použity, byly připraveny podle postupu popsáném v WO 95/17210. Tyto emulze měly střední průměr olejových kapek 500nm a trvanlivost měly 1 měsíc. SB62(150nm- stabilní více než 2 roky) byla také připravena podle postupu popsáném v WO 95/17210 a byla porovnána k zjištění, že výsledky imunitních reakcí nebudou ztíženy přidáním trikaprylinu.

Název	Prostředek emulze
SB26T1	α -tokoferol (2,5%), squalen (2%), trikaprylin (0,5%), TWEEN 80 (0,2%), QS21 (5 μ g), 3D-MPL (5 μ g)
SB26T2.5	α -tokoferol (2,5%), squalen (1,25%), trikaprylin (1,25%), TWEEN 80 (0,2%), QS21 (5 μ g), 3D-MPL (5 μ g)
SB62	SB62 (α -tokoferol (2,5%), squalen (2,5%), TWEEN 80 (2%), QS21 (5 μ g), 3D-MPL (5 μ g)

SB26T1 a SB26T2 mají střední průměr částic kolem 500nm a jsou stabilní po dobu 2 let. 3 De-O-acylovaný monofosforyl lipid A (3D-

20.03.00

MPL) je známý z GB2220 211(Ribi). QS21 je HPLC čištěná netoxická frakce saponinu z kůry stromu Quillaja Saponaria Molina z Jižní Ameriky a způsob jeho výroby je popsán (jako QA21) v US 4. 5,057,540.

Výsledky humorálních reakcí 14 dní po třetím očkování jsou udány v tabulce 2. Stručně, SB26T působí jako velmi silný pomocný prostředek vakcíny. Vytvářené reakce byly větší než ty, které byly vytvořené emulsi oleje ve vodě z kapek menšího průměru (SB62).

Tabulka 2, Reakce protilátek specifických pro HbsAg

Prostředek	IgG (celkový) titr
RTS,S/gp120/3D-MPL/QS21/SB26T1	43004
RTS,S/gp120/3D-MPL/QS21/SB26T2.5	40287
RTS,S/gp120/3D-MPL/QS21/SB62	28465

Byly také změněny reakce CTL, vylučovaných jak buňkami sleziny tak buňkami lymfatických uzlin poplitea. Výsledky jsou zobrazeny na obr. 2. Stručně, prostředek SB62 zdárně indukoval činnost specifického CTL pro RTS,S (jak měřeno CTL antigenem specifickým pro Hbs), měřeno 14 dní po třetím očkování. Dva prostředky SB26T také vyvolávaly srovnatelné hladiny činnosti CTL.

Příklad 5, Zkoumání profilu isotypů protilátek, tvořených pomocnými systémy u myši.

Vzorky byly odebrány během vakcinačního pokusu popsaném v příkladu 4 a 14 dní po posledním očkování. Vzorky byly zkoumány běžně dostupnými standardními zkouškami ELISA k vyhledání profilu subisotypů IgG, které byly vytvořeny. Výsledky jsou ilustrovány na obr. 1 a v tabulce 3. Stručně, stabilní pomocné emulze, stimulované podobnými subisotypy IgG, vyvolávají silné imunitní reakce typu Th1 a Th2.

20.03.00

Tabulka 3, Poměr isotypů protilátek specifických pro HbsAg

Prostředek	IgG2a/IgG1
RTS,S/gp120/3D-MPL/QS21/SB26T1	2,13
RTS,S/gp120/3D-MPL/QS21/SB26T2.5	1,8
RTS,S/gp120/3D-MPL/QS21/SB62	1,56

Příklad 6 Pokusy s očkováním u opic rhesus při použití stabilní pomocné emulze oleje ve vodě.

Skupina 5ti opic rhesus byla imunizována třemi dávkami vakcíny (dny 0, 28 a 84) ,jak udáno v tabulce 4. Antigeny RTS,S a gp120 byly vyrobeny způsobem dříve popsáným. Vakcíny byly podávány nitrosvalově jako injekce do zadní části levé (gp120) nebo pravé (RTS,S) končetiny. Konečný objem každé vakcíny byl 0,5ml.

Tabulka 4, Vakcíny použité při pokusech u opic rhesus

Skupina	Levá končetina		Pravá končetina	
	Antigen	Pomocný prostředek	Antigen	Pomocný prostředek
1	gp120(100µg)	SB62,QS21,3D-MPL	RTS,S(50µg)	SB62,QS21,3D-MPL
2	gp120(100µg)	SB26T,QS21,3D-MPL	RTS,S(50µg)	SB26T,QS21,3D-MPL

Krevní vzorky byly odebrány 14 dní po každém očkování a byly zkoumány antigen specifické humorální reakce a buňkami zprostředkované reakce.

Proliferační reakce specifické pro antigen u periferních

krevních opičích mononukleárních buněk (PBMC) byly zkoumány za užití následujících postupů:

- Kultury byly založeny ve čtverém zhotovení 100 μ l ficollu izolovaném PBLs o hustotě $2 \cdot 10^6$ /ml (v plotně s 96 vyhloubeními naočkované kulturou z láhve s okrouhlým dnem Falcon) v prostředku RPMI1640, který obsahuje 5%FCS a antibiotika. Znamená to, že tkáňové plotny s rovným dnem jsou užívány pro Eli bodové zkoušky.

- Přidání 100 μ l proteinu v ředění na požadovanou koncentraci. Samotné prostředí je zahrnuto jako negativní kontrola a ConA(5 μ g/ml) jako pozitivní kontrola.

- Buňky se pěstují 72 hod. před přidáním 1 μ Ci/3H-tymidinu na vyhloubení.

- Přidá se 20 μ l 3H-T-dR(1mCi/ml zásobního roztoku) ředěného 20x v úplném prostředí po dobu 16-18 hodin.

- Kultura se sklídí pomocí speciálních filtračních desek.

- Určí se radioaktivita v počítači beta záření.

Všechny buněčné kultury jsou inkubovány při 37°C, 7% CO₂, 90% vlhkosti. Humorální reakce anti- RTS,S (jak měřeno užitím antigenu HBs) byly zkoumány použitím postupu ELISA (viz příklad 1) a výsledky jsou zobrazeny na obrázku 3. Humorální reakce anti-gp120 byly zkoumány užitím postupu ELISA (viz příklad 1) a výsledky jsou zobrazeny na obr. 4. Buňkami zprostředkované reakce anti RTS,S a gp120, jak měřené proliferací PBMC, jsou zobrazeny na obr. 5.

20.03.00

Tabulka 5, Stabilita pomocného prostředku (viz příklad 2)

Emulse	Skladovací	Rozměr			Střední průměr
		CR	Distr.intensity	Distr. hmoty	
SB26	Počát.rozměr	81	523 (82%) 837 (24%)	449 (65%) 772 (43%)	NA
	5min.3000xg	NA			
	8 hod. 75°C	40	398 (61%) 727 (51%)	451 (16%) 832 (90%)	NA
	1 měsíc 37°C	43	458 (61%) 745 (53%)	503 (91%) 865 (13%)	NA
	1 měsíc 45°C	45	425 (66%) 733 (49%)	512 (71%) 874 (44%)	NA
SB26T	12měs. 4°C	Dvě přítomné fáze			
	Počát.rozměr	82	384	351	378
	5min.3000xg	77	420	487	374
	8 hod. 75°C	60	407	493	366
	1 měsíc 37°C	60	347	480	309
	1 měsíc 45°C	68	395	474	343
	12 měs. 4°C	54	275 (55%) 503 (54%)	481	307
SB26T1	Počát.rozměr	86	430	428	430
	5min. 3000xg	97	461	494	412
	8 hod. 75°C	66	506	530	440
	1 měsíc 37°C	84	434	490	381
	1 měsíc 45°C	48	437	475	413
	12 měs. 4°C	42	302 (44%) 546 (65%)	491	331
SB26T2.5	Počát.rozměr	91	446	475	394
	5 min.3000xg	84	411	494	378
	8 hod. 75°C	78	378 (67%) 602 (48%)	494	402
	1 měsíc 37°C	68	394	493	335
	1 měsíc 45°C	70	378	511	328
	12 měs. 4°C	57	290 (42%) 497 (68%)	480	311
SB26T4	Počát.rozměr	93	424	489	401
	5 min.3000xg	82	368	323	359
	8 hod. 75°C	64	434	470	390
	1 měsíc 37°C	68	385	467	339
	1 měsíc 45°C	78	397	493	345
	12 měs. 4°C	52	286 (54%) 594 (52%)	507	336

Poznámka: NA=není k dispozici

20.03.00

Tabulka 6, Stabilita pomocného prostředku (viz příklad 3)

Emulze	Časový	Rozměr PCS (nm)				
		Ředě- ní (X)	CR	Distribuce intensity	Distribuce hmoty	Střed. průměr
SB26T	Počáteční	2000	99	471	493	401
			97	434	486 (94%) 786 (10%)	393
	5min. 3000g	4000	39	420	487	374
	8hod. 75°C	4000	30	407	493	366
	1měsíc 37°C	4000	30	347	480	309
	1měsíc 45°C	4000	34	395	474	343
	12měs. 4°C	4000	54	275 (55%) 503 (54%)	481	307
	23měs. 4°C	4000	32	272 (58%) 511 (52%)	488	305
			33	272 (53%) 454 (60%)	484	291
	23měs. 20°C	4000	34	259 (68%) 515 (38%)	243 (17%) 510 (88%)	297
			34	257 (55%) 475 (54%)	233 (5%) 505 (96%)	287
SB26T1	Poč.rozměr	2000	86	430	428	430
	5min. 3000g	4000	49	461	494	412
	8hod. 75°C	4000	33	506	530	440
	1měsíc 37°C	4000	42	434	490	381
	1měsíc 45°C	4000	24	437	475	413
	12měs. 4°C	4000	42	302 (44%) 546 (65%)	491	331
	23měs. 20°C	4000	36	298 (65%) 541 (45%)	489 (98%) 795 (4%)	331
			36	284 (53%) 566 (53%)	492 (92%) 791 (14%)	326

20.03.00

SB26T2.5	Poč. rozměr	2000	91	446	475	394
	5min. 3000g	4000	42	320 (56%) 501 (44%)	494	378
	8hod. 75°C	4000	39	378 (67%) 602 (48%)	494 (97%) 796 (5%)	402
	1měsíc 37°C	4000	34	394	493	335
	1měsíc 45°C	4000	35	378	511	328
	12měs. 4°C	4000	57	290 (42%) 497 (68%)	480	311
	23měs. 4°C	4000	39	296 (69%) 491 (46%)	482	318
			39	373	456	299
	23měs. 20°C	4000	36	347	441	305
			36	358	445	305
SB26T4	Poč. rozměr	2000	93	424	489	401
	5min. 3000g	4000	41	368	323	359
	8hod. 37°C	4000	32	434	470	391
	1měsíc 37°C	4000	34	385	467	339
	1měsíc 45°C	4000	39	397	493	345
	12měs. 4°C	4000	52	286 (54%) 594 (52%)	507	336
	23měs. 4°C	4000	40	274 (64%) 524 (45%)	254 (12%) 522 (92%)	309
			40	285 (56%) 495 (56%)	474	311
	23měs. 20°C	4000	37	275 (66%) 475 (46%)	463	300
			37	268 (64%) 471 (47%)	244 (12%) 494 (92%)	295

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Pomocný prostředek, který obsahuje stabilní emulsi oleje ve vodě, kde olejové kapky mají střední průměr v rozmezí 300-600nm, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e olejová fáze obsahuje squalen, α -tokoferol a triglycerid.
2. Pomocný prostředek, který obsahuje stabilní emulsi oleje ve vodě, kde olejové kapky mají střední průměr v rozmezí 300-600nm, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e emulze oleje ve vodě obsahuje squalen, α -tokoferol, emulgátor zahrnující TWEEN 80^(tm) a triglycerid.
3. Pomocný prostředek, který obsahuje stabilní emulsi oleje ve vodě, kde olejové kapky mají střední průměr v rozmezí 300-600nm, zmíněná emulze oleje ve vodě obsahuje metabolisovatelný olej a triglycerid, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e pomocný prostředek dále obsahuje imunostimulační látku, zvolenou z QS21 a 3D-MPL.
4. Pomocný prostředek, podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zmíněným metabolisovatelným olejem je squalen.
5. Pomocný prostředek, podle některého z nároků 1-4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e, zmíněným triglyceridem je trikaprylin.
6. Pomocný prostředek, podle některého z předchozích nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e poměr triglycerid:metabolisovatelný olej je v rozmezí 1:10 až 10:1.
7. Pomocný prostředek, podle některého z předchozích nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e poměr triglycerid:metabolisovatelný olej je v rozmezí 1:5 až 5:1.
8. Pomocný prostředek, podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zmíněná emulze oleje ve vodě dále

obsahuje jeden nebo více imunomodulancií.

9. Pomocný prostředek, podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená imunomodulancia jsou vybraná ze skupiny, která zahrnuje QS21 a 3D-MPL.
10. Pomocný prostředek, podle nároku 1 nebo 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje stabilisátor jako je polyoxyetylen sorbitan monooleát (TWEEN 80^(tm)).
11. Vakcína obsahující pomocný prostředek, podle některého z nároků 1 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje antigen nebo antigenní přípravek.
12. Vakcína, podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e antigen nebo antigenní přípravek je vybrán ze skupiny, která obsahuje: virus lidské imunodeficiency, virus herpes simplex typ 1, virus herpes simplex typ 2, Cytomegalovirus, virus hepatitidy A,B,C nebo E, respirační syncytiální virus, lidský papillomavirus, virus chřipky, salmonelu, neisserii, borrelii, chlamydii, bordetellu, plasmodii a toxoplasmu.
13. Vakcína, podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e antigenní přípravek je získán z nádorového antigenu.
14. Vakcína, podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e antigenní přípravek je získán z gonadotropin uvolňujícího hormonu.
15. Vakcína obsahující emulsi oleje ve vodě, kde olejové kapky mají střední průměr v rozmezí 300-600nm, antigen nebo antigenní přípravek, QS21 a 3D-MPL, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e emulze oleje ve vodě obsahuje metabolisovatelný olej, trikaprylin, TWEEN 80^(tm) a tokoferol.
16. Způsob pro přípravu vakcíny, podle některého z nároků 11-15, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje přimíchání

20.03.00

emulse oleje ve vodě, trikaprylinu, 3D-MPL, QS21 a antigenu nebo antigenního přípravku.

17. Užití vakcíny, podle některého z nároků 11-14, pro výrobu léků vhodných pro léčení osob vnímavých nebo trpících virovým, bakteriálním nebo parazitárním onemocněním.
18. Užití vakcíny, podle některého z nároků 11-14, pro výrobu léků vhodných pro léčení osob trpících rakovinou.
19. Způsob stabilizace emulse oleje ve vodě, kde zmíněná olejová fáze obsahuje metabolizovatelný olej a α -tokoferol, zmíněná emulse není stabilní po dobu 2 let, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje přídavek triglyceridu k olejové fázi emulse oleje ve vodě.
20. Způsob stabilizace, podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e triglyceridem je trikaprylin.
21. Způsob stabilizace, podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e metabolizovatelným olejem je squalen.

Zastupuje: