

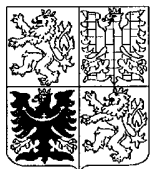
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2001 -887

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.09.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.09.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/9819898**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.10.2001**

(Věstník č. 10/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/06623**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/15255**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/02

A 61 K 39/245

A 61 K 39/12

(71) Přihlašovatel:

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

(72) Původce:

Slaoui Moncef Mohamed, Rixensart, BE;
Vandepapeliere Pierre, Rixensart, BE;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob léčby sexuálně přenosných nemocí

(57) Anotace:

Řešení se zabývá použitím jednoho nebo více antigenů
odvozených od patogenů způsobujících STD, například gD2t,
pomocné látku indukující TH-1 lymfocyty, například 3-
DMPL, a nosiče, například kamence, pro léčbu sexuálně
přenosných nemocí (STD) u žen. Vakcína se podává
intramuskulárně v režimu 0, 1 a 6 měsíců.

CZ 2001 - 887 A3

28.05.01

PV 2001 - 887

~~40233~~

Způsob léčby sexuálně přenosných nemocí

Oblast techniky

Vynález se zabývá jedním nebo více antigeny používanými k prevenci nebo léčbě sexuálně přenosných nemocí a jejich použitím v přípravě vakcíny k prevenci nebo léčbě infekcí způsobených sexuálně přenosnými patogeny u jedinců ženského pohlaví. Vynález se zabývá také způsobem podávání vakcíny ženám k prevenci nebo léčbě sexuálně přenosných nemocí.

Dosavadní stav techniky

Patogeny způsobující sexuálně přenosná onemocnění (STD) jsou všeobecně známy a význam vakcíny k prevenci nebo léčbě nemocí, které jsou těmito patogeny vyvolány, je zřejmý.

Sexuálně přenosné nemoci jsou někdy způsobeny jedním nebo více patogeny. Výhodné jsou tedy kombinované vakcíny, které předcházejí a nebo léčí jednu nebo více STD.

Překvapivě bylo ukázáno, že u žen, které jsou ohroženy nebo které již onemocněly STD, jsou určité vakcinační prostředky velmi účinné.

Podstata vynálezu

Vynález se zabývá způsobem léčby jedinců ženského pohlaví nemocných nebo ohrožených jednou nebo více sexuálně přenosnými nemocemi (STD), který spočívá v tom, že se potřebným jedincům ženského pohlaví podává účinné množství vakcíny obsahující jeden nebo více antigenů odvozených od patogenů nebo spojených s patogeny, které STD způsobují a pomocnou látku.

Pomocnou látkou je s výhodou pomocná látka indukující TH-1.

Vynález se zabývá použitím jednoho nebo více antigenů odvozených od patogenů nebo spojených s patogeny, které způsobují STD a pomocné látky, zejména pomocné látky indukující TH-1, v přípravě vakcíny k prevenci a nebo léčbě jedné nebo více STD u jedinců ženského pohlaví.

Příkladem antigenů odvozených od patogenů nebo spojených s patogeny, které jsou příčinou STD, jsou herpetické viry (HSV-1 a HSV-2), lidské papillomaviry (všechny typy HPV), Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum (syfilis) a Haemophilus ducreyi (měkký vřed, šankr).

Dalšími vhodnými zdroji antigenů jsou rekombinantní bakterie, rekombinantní viry, fúzní proteiny, peptidy a mimotopy.

Výše uvedené antigeny jsou pouze příkladem, odborníci v oboru jsou obeznámeni s řadou dalších antigenů, které je možné vyhledat v literatuře.

Pomocné látky vhodné pro použití ve vynálezu jsou známy v oboru. Pomocnou látkou indukující TH-1 se rozumí pomocná látka, která přednostně stimuluje imunitní odpověď zejména TH1 lymfocytů.

Signálem stimulace TH1 lymfocytů je zvýšená produkce TH1 cytokinů, například IFN- γ a IL2. Sekrece IFN- γ je spojena s ochrannou odpovědí proti intracelulárním patogenům, včetně parazitů, bakterií a virů. Aktivace leukocytů IFN- γ posiluje zabíjení intracelulárních patogenů a zvyšuje expresi Fc receptorů. Objevuje se také přímá cytotoxicita, zejména ve spojení s lymfotoxinem (produkovaným TH1 lymfocyty). IFN- γ je jak induktorem, tak i produktem NK buněk, které jsou hlavními přirozenými vykonavateli ochrany. Odpovědi TH1 typu uskutečněné IFN- γ nebo jiným mechanismem přednostně interagují s izotypy imunoglobulinů IgG2a u myší.

Odpovědi typu TH-2 jsou naproti tomu spojeny s humorálními mechanismy a se sekrecí IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a tumor nekrozujícího faktoru beta.

Pomocné látky přednostně stimulující odpověď TH1 lymfocytů jsou popsány v mezinárodních patentových přihláškách WO 94/00153 a WO 95/17209.

Jednou z těchto pomocných látek je 3 De-O-acylovaný monofosforyllipid A (3D-MPL) popsáný v patentové přihlášce GB 2220211 (Ribi). Chemicky jde o směs 3 De-O-acylovaného monofosforyllipidu A se 4, 5 nebo 6 acylovanými řetězci

vyráběnou firmou Ribi Immunochem Montana. V patentové přihlášce EP O 689 454B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA) je popsána preferovaná „maločástečková forma“ 3 De-O-acylovaného monofosforyllipidu A.

„Maločástečková forma“ 3-DMPL se vyznačuje tím, že částice 3D-MPL jsou tak malé, že mohou být sterilně přefiltrovány přes membránu s otvory o průměru 0,22 mikronů (popsáno v evropské patentové přihlášce číslo O 689 454).

Další pomocnou látkou vhodnou k použití podle vynálezu je QS21, netoxická frakce čištěná HPLC odvozená z kůry Quillaja Saponaria Molina. Volitelně se tato pomocná látka míchá s 3 De-O-acylovaným monofosforyllipidem A (3D-MPL), volitelně spolu s nosičem.

Způsob výroby QS21 je nárokován (jako QS21) v US patentové přihlášce č. 5, 057, 540 a je k dispozici u firmy Aquilla Pharmaceuticals.

Nereaktogenní pomocné přípravky obsahující QS21 jsou popsány v patentové přihlášce WO 96/33739. Přípravky obsahující QS21 a cholesterol při podání s antigenem úspěšně stimulují TH1 lymfocyty. Vakcíny, které obsahují kombinaci QS21 a cholesterolu, jsou také součástí vynálezu.

Dalšími pomocnými látkami, které přednostně stimulují odpověď TH1 lymfocytů, jsou imunomodulační oligonukleotidy, například nemethylované CpG sekvence, nárokované v patentové přihlášce WO 96/02555.

Jako pomocné látky přednostně stimulující odpověď TH1 lymfocytů mohou být použity také kombinace různých pomocných látek stimulujících TH1, například kombinace látek zde v textu uvedených. Tak může být například QS21 formulován dohromady s 3D-MPL. Poměr QS21 : 3D-MPL se pohybuje v rozmezí 1:10 až 10:1; s výhodou 1:5 až 5:1; nejčastěji 1:1. Optimální synergický účinek nastává v rozmezí 2,5:1 až 1:1 3D MPL : QS21.

Ve vakcíně podle vynálezu je s výhodou obsažen také nosič. Nosičem je emulze typu olej ve vodě nebo hlinitá sůl. Nosičem jsou také další minerální soli, jako jsou soli vápníku, železa nebo zinku. Mezi další nosiče patří polyfosfazen, liposomy a ISCOMS.

Netoxické emulze typu olej ve vodě obsahují s výhodou netoxický olej, např. skvalan nebo skvalen, a emulgátor, např. Tween 80, ve vodním nosiči. Vodním nosičem je, například, roztok chloridu sodného pufrovaný fosfátem. Preferovaná emulze typu olej ve vodě obsahuje metabolizovatelný olej, jako je skvalen, alfa tokoferol a Tween 80. Navíc může emulze typu olej ve vodě obsahovat span 85 a nebo lecithin.

Ve vakcíně určené k podávání lidem se množství QS21 a 3D MPL pohybuje v rozmezí 1 – 500 µg, s výhodou 10 – 100 µg, nejlépe 10 – 50 µg v dávce. Emulze typu olej ve vodě obsahuje 2 až 10% (objemových) skvalenu, 2 až 10% (objemových) alfa tokoferolu a 0,3 až 3% (objemová) Tweenu 80. Skvalen a alfa tokoferol jsou s výhodou v poměru, který je roven nebo menší

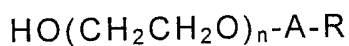
než 1, protože při tomto poměru je emulze stabilnější. Emulze může také obsahovat 1% (objemové) spanu 85. Někdy je výhodné, když vakcíny podle vynálezu obsahují navíc ještě stabilizátor.

Zvláště silný pomocný prostředek skládající se z QS21, 3D-MPL a tokoferolu v emulzi typu olej ve vodě je popsán v patentové přihlášce WO 95/17210.

Vakcína používaná a vyráběná podle vynálezu obsahuje s výhodou také hydroxid hlinitý (kamenec) nebo fosforečnan hlinitý.

Vakcína používaná a vyráběná podle vynálezu obsahuje nejlépe antigeny v kombinaci s 3D-MPL a kamencem.

Vakcíny podle vynálezu mohou, pokud je to požadováno, obsahovat pomocné molekuly obecného vzorce (I):



kde n je číslo od 1 do 50, A je vazba nebo $-\text{C}(\text{O})-$, R je alkylová skupina o 1 až 50 uhlících nebo fenylalkylová skupina o 1 až 50 uhlících.

Jedno z provedení vynálezu je vakcína obsahující polyoxyethylenether obecného vzorce (I), kde n je číslo od 1 do 50, s výhodou od 4 do 24, nejlépe 9; R je alkylová skupina o 1 až 50 uhlících, s výhodou o 4 až 20 uhlících, nejlépe o 12 uhlících; a A je vazba. Koncentrace polyoxyethylenetherů se pohybuje v rozmezí 0,1 až 20 g/100 ml, s výhodou v rozmezí 0,1 až 10 g/100 ml, nejlépe v rozmezí 0,1 až 1 g/100 ml.

Preferované polyoxyethylenethery patří do následující skupiny: polyoxyethylen-9-laurylether, polyoxyethylen-9-steorylether, polyoxyethylen-8-steorylether, polyoxyethylen-4-laurylether, polyoxyethylen-35-laurylether a polyoxyethylen-23-laurylether. Polyoxyethylenethery, jako je polyoxyethylenlaurylether, jsou popsány v manuálu Merck index (12. vydání, str. 7717).

Původcem herpes genitalis je HSV-2. Původcem herpes labialis je HSV-1. Oba tyto viry jsou charakteristické tím, že vyvolávají akutní onemocnění a zároveň jsou příčinou latentní infekce, která perzistuje primárně v buňkách nervových ganglií.

V patentové přihlášce WO 92/16231 je podrobněji popsán herpes genitalis a také vakcína určená pro léčbu lidí ohrožených infekcí HSV. Tato vakcína obsahuje glykoprotein D z HSV nebo jeho imunologický fragment ve spojení s 3-O-deacylovaným monofosforyllipidem A a vhodným nosičem.

V patentové přihlášce WO 92/16231 je detailně popsán glykoprotein D, jeho imunologické fragmenty a 3-DMPL, včetně způsobů jejich přípravy. V přihlášce jsou také popsány zkoušky vakcíny na zvířecím modelu. Výsledky u lidí nejsou k dispozici.

Jedním z preferovaných aspektů vynálezu je, že způsob nebo použití podle vynálezu spočívá zejména v léčbě nebo prevenci infekce způsobující herpes genitalis, zejména infekce HSV-2.

Vakcína, která se používá podle vynálezu, obsahuje glykoprotein D nebo jeho imunologický fragment získaný z HSV-2.

Glykoprotein D je umístěn na virové membráně a je přítomen také v cytoplasmě infikovaných buněk (Eisenberg R.J. a kol., J of Virol, 1980, 35, 428-435). Glykoprotein D obsahuje 393 aminokyselin, včetně signálního peptidu, a jeho molekulová hmotnost je přibližně 60 kD. Ze všech obalových glykoproteinů HSV je tento glykoprotein pravděpodobně popsán nejlépe (Cohen a kol., J. Virology, 60, 157-166). Je známo, že tento glykoprotein má hlavní úlohu v připojení viru k buněčným membránám in vivo. Glykoprotein D má navíc schopnost indukovat neutralizační protilátky in vivo (Eing a kol., J. Med. Virology, 127, 59-65). Navzdory vysokým titrům neutralizačních protilátek v séru pacientů může být latentní virus HSV-2 reaktivován a dochází k návratu onemocnění.

Preferovaným provedením patentové přihlášky WO 92/16231 je zkrácený glykoprotein D viru HSV-2 o 308 aminokyselinách, který obsahuje aminokyseliny 1 až 306 z přirozeně se vyskytujícího glykoproteinu. Kromě toho obsahuje asparagin a glutamin na C konci zkráceného proteinu zbaveného jeho místa ukotvení v membráně. Tato forma proteinu obsahuje signální peptid, jehož odštěpením se získá zralý protein o 283 aminokyselinách. Produkce tohoto proteinu v ovariálních buňkách čínského křečka je popsána v patentové přihlášce EP-B-139 417.

Zralý zkrácený glykoprotein používaný ve vakcíně podle vynálezu může být rekombinantní gD2t (rgD2t) nebo jednoduše gD2t (viz níže).

Antigen HSV může být chemicky nebo jinak navázán na částicový nosič tak, jak je popsáno v patentové přihlášce WO 92/16231.

V jednom z preferovaných aspektů obsahuje vakcína k použití podle vynálezu gD2t, 3-DMPL (zejména 3-DMPL ve formě malých částic) a hydroxid hlinitý (kamenec).

Papillomaviry jsou malé DNA viry, které jsou vysoce druhově specifické. Je popsáno 70 jednotlivých genotypů lidských papillomavirů (HPV). Obecně jsou HPV specifické pro kůži (např. HPV-1 a HPV-2) nebo pro slizniční povrchy (např. HPV-6 a HPV-11) a jsou obvykle příčinou benigních tumorů (bradavic), které perzistují několik měsíců nebo let. Tyto benigní tumory jsou pro postiženého jedince nepříjemné, nejsou ale, až na výjimky, život ohrožující.

Některé HPV jsou ale spojeny s nádorovým bujením. Nejvýznamnější spojení mezi HPV a nádorovým bujením je spojení mezi HPV-16 a HPV-18 a karcinomem děložního hrdla. V rozvojových zemích je karcinom děložního hrdla nejčastější malignitou, každý rok ve světě přibývá 500 000 nových případů. V současné době je možné proti infekcím HPV-16, a dokonce proti již vyvinutým nádorům způsobených HPV-16, bojovat za pomoci vakcín. Vyhlídky preventivní a léčebné vakcinace proti HPV-16 jsou diskutovány v následujících přehledných člancích: Cason J., Clin. Immunother., 1994, 1(4), 293-306 a Hagenessee M. E., Infections in Medicine, 1997, 14(7), 555-556, 559-564. Vakcinační prostředek podle

vynálezu obsahuje s výhodou velký kapsidový protein, protein L1.

Díky klonování bakterií a nověji také díky používání PCR jsou v současné době izolovány a popsány různé typy HPV. Molekulové uspořádání genomů HPV je definováno ve srovnání s dobře známým bovinním papillomavirem typu 1 (BPV1).

I když existují i menší varianty, všechny popsané genomy HPV obsahují alespoň sedm časných genů, E1 až E7, a dva pozdní geny, L1 a L2. Protisměrná regulační oblast navíc obsahuje regulační sekvence, které kontrolují většinu transkripčních dějů v genomu HPV.

Geny E1 a E2 jsou zodpovědné za replikaci viru, respektive za kontrolu transkripce, a při integraci viru mají tendenci se poškodit. Geny E6 a E7 a, jak se nyní ukazuje i E5, jsou zodpovědné za transformaci viru.

U virů způsobujících karcinom děložního hrdla, jako jsou HPV 16 a HPV 18, se onkogenní proces spustí po integraci virové DNA. Integrace má za následek inaktivaci genů kódujících proteiny kapsidy L1 a L2 a kontinuální expresi dvou časných proteinů E6 a E7, což vede k postupné ztrátě normální buněčné diferenciaci a ke vzniku karcinomu.

Karcinom děložního hrdla se u žen vyvíjí z přechodného prekancerózního stadia do invazivního karcinomu, který často vede ke smrti. Přechodné stádium se nazývá cervikální

intraepiteliální neoplazie a podle závažnosti se rozděluje do stupňů I až III.

Klinicky se HPV infekce na ženském pohlavním ústrojí projevuje jako plochá kondylomata na děložním čípku, která se vyznačují koilocytózou zejména povrchových a intermediálních buněk dlaždicového epitelu děložního čípku.

Koilocyty, které vznikají jako důsledek cytopatologického účinku viru, jsou mnohoaderné buňky se světlým perinukleárním haló. Epitel je zesílený se známkami abnormální keratinizace, která je podkladem bradavičnatého vzhledu léze.

Pokud jsou tato plochá kondylomata pozitivní na sérotypy HPV 16 a HPV 18, jsou velkým rizikem pro vznik cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN) a karcinomu in situ (CIS), ze kterých se vyvíjí invazivní karcinom děložního hrdla.

V mezinárodní patentové přihlášce číslo WO 96/19496 jsou popsány varianty proteinů E6 a E7 lidského papillomaviru, zejména fúzní proteiny E6/E7 s delecí obou proteinů E6 a E7. Tyto deleční fúzní proteiny jsou velmi imunogenní.

Vakcíny obsahující L1 z HPV jsou popsány v patentových přihláškách WO 94/00152, WO 94/20137, WO 93/02184 a WO 94/05792. Tyto vakcíny obsahují antigen L1 jako monomer, kapsomer nebo jako viru podobnou částici. Tyto částice mohou navíc obsahovat proteiny L2. Jiné vakcíny obsahují časné proteiny, jako je E7, nebo fúzní proteiny, jako je L2-E7.

Vakcína podle vynálezu obsahuje s výhodou buď protein E6 nebo protein E7 navázaný na imunologického fúzního partnera, který nese epitopy T lymfocytů.

V preferované vakcíně podle vynálezu je imunologický fúzní partner odvozen od proteinu D Haemophila influenzae B. Derivát proteinu D obsahuje s výhodou první třetinu proteinu, zejména prvních 100-110 aminokyselin z N konce.

V prostředcích podle vynálezu se používají fúzní proteiny obsahující protein D – E6 z HPV 16, protein D – E7 z HPV 16, protein D – E7 z HPV 18 a protein D – E6 z HPV 18. Část proteinu D obsahuje s výhodou první třetinu proteinu D.

Obligátní intracelulární parazit bakterie *Chlamydia trachomatis* napadá epitelové buňky sliznic spojivky a urogenitálního traktu. Tato bakterie způsobuje řadu onemocnění, jako je trachom a infekce pohlavních orgánů, které mohou mít dlouhodobé následky. V rozvojových zemích endemicky se vyskytující trachom je celosvětově hlavní příčinou slepoty, které se dá předejít. V USA ročně onemocní chlamydiózou pohlavních orgánů kolem 3 milionů lidí, z toho u 200 000 žen způsobí tato infekce, díky zánětu vejcovodů, neplodnost (1). Chlamydiózy tedy představují významný zdravotnický problém. Součástí řešení tohoto problému je vývoj vakcíny proti chlamydiózám u lidí.

Při zkouškách (u lidí a nehumanoidních primátů) vakcín, ve kterých je imunogenem celý mikroorganismus, se vytvoří

sérovarově specifická ochrana proti infekci, ale u některých vakcín dochází při reinfekci k závažnějším reakcím (2). Výsledky některých studií ukazují, že patologický obraz chlamydiózy má imunologický podklad (3); čištěná chlamydia 57 kDa (Hsp60) vyvolává podobný patologický obraz, jako při reinfekci již dříve infikovaných zvířat (4, 5). Z těchto pozorování vyplývá, že ochranu proti *Chlamydia trachomatis* zajistí podjednotková vakcína.

Druh *Chlamydia trachomatis* je stereotypizován do 15 sérovarů, které tvoří 3 séroskupiny: komplex B (sérovary B, Ba, D, E, L1 a L2), intermediální komplex (sérovary F, G, K, L3) a komplex C (sérovary A, C, H, I a J) (6). Sexuálně přenosné nemoci (STD) způsobují sérovary od D do K, které jsou obsaženy ve všech třech séroskupinách. Podjednotková vakcína proti chlamydiovým STD navodí ochranu proti mnoha sérovarům, které jsou více nebo méně antigenně příbuzné.

Při tvorbě podjednotkové vakcíny je velký důraz kladen na sérotypizační antigen, kterým je 40 kDa velký protein zevní membrány (MOMP). Tento protein má in vitro funkci porinu (7) a je přítomen v průběhu celého životního cyklu bakterie (8); tento základní povrchový protein je u lidí a zvířat velmi imunogenní. MOMP je tvořen čtyřmi variabilními doménami (VD) obklopenými pěti stálými doménami, které jsou u jednotlivých sérovarů téměř neměnné (9, 10). In vitro a in vivo neutralizační epitopy B lymfocytů jsou zmapovány na VD (11, 12, 13, 14, 15), zatímco epitopy T lymfocytů jsou identifikovány jak na variabilních, tak na konstantních doménách (16, 17). Rekombinantní MOMP je různými autory exprimován v *E. coli*

(18, 19, 20); avšak Manningem a spolupracovníky je ukázáno, že jejich rekombinantní protein s monoklonální protilátkou rozpoznávající konformační epitop MOMP nereaguje (18).

Na různých zvířecích modelech je při imunizaci rekombinantním nebo čištěným MOMP s následnou infekcí jedním nebo více typy chlamydií dosaženo rozdílných účinků na parametry infekce (21, 22, 23). V zajímavém experimentálním modelu zánětu vejcovodů je intrauterinní inokulací lidského kmene *Chlamydia trachomatis* způsobena myším dlouhodobá neplodnost (24, 25). Tuffreyem a spolupracovníky je v experimentu ukázáno, že při infekci různými typy chlamydií snižuje parenterální a slizniční imunizace rMOMP absorbovaným na alhydrogelu závažnost zánětu vejcovodů, respektive trvání kolonizace zevních pohlavních orgánů. Přípravek ale nechrání proti neplodnosti, která je infekcí způsobena (23).

V patologických procesech pohlavních orgánů způsobených *Chlamydia trachomatis* má ochrannou funkci jak humorální, tak buňkami zprostředkovaná imunita. Rankovou skupinou je ukázáno, že u myší je hlavním imunitním mechanismem při chlamydiózách pohlavního ústrojí T lymfocyty zprostředkovaná imunita (26, 27, 28) a že CD4 a CD8 pozitivní T lymfocyty jsou základem obrany proti chlamydiím in vivo (29, 30).

V jednom z provedení vynálezu je MOMP antigen ze sérovaru 2 produkován v *E. coli* technikami rekombinantní DNA. Za těchto podmínek je protein produkován bez signální sekvence.

Mezi antigeny odvozené od *N. gonorrhoea*, nebo antigeny s ní spojené, patří protein vážící transferin (Tbp). Komplex Tbp tvoří dva proteiny – TbpA a TbpB. Gonokoková TbpA DNA/proteinová sekvence je popsána v patentové přihlášce WO 92/03467 (Univerzita v Severní Karolíně). Nejnovější informace o gonokokových TbpA a TbpB a jejich úloze v infekci přináší článek v *Mol. Microbiol.*, 1998, Feb, 27(3), 611-616. Mezi další antigeny patří protein por B, viz *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, Nov, 84(22), 8135-8139 a viz *Mol Biol Evol*, 1995, May, 12(3), 363-370. Dalším antigenem je lipopolysacharid (typ R) popsáný časopise *Can J Microbiol*, 1978, Feb, 24(2), 117-123 a také v časopise *J Immunol*, 1993, Jul, 1, 151(1), 234-243. Dalším antigenem je protein FrpB, viz *J Bacteriol*, 1995, Apr, 177(8), 2041-2049 a patentová přihláška WO 96/31618. V časopise *J Clin Invest*, 1981, Oct, 68(4), 881-888 je popsána Pilus vakcína.

Mezi antigeny odvozené od patogenu způsobujícího syfilis (nebo antigeny s tímto patogenem spojené) patří proteiny zevní membrány *Treponema pallidum*, viz *Emerg Infect Dis*, 1997, Jan, 3(1), 11-20. Unikátním znakem *Treponema pallidum* je, že jeho zevní membrána obsahuje 100 násobně méně strukturálních proteinů, než obsahují zevní membrány typických gram-negativních bakterií. Tento znak souvisí s chronicitou syfilis. Řídké strukturální proteiny zevní membrány *Treponema pallidum*, nazvané TROMP, reprezentují mocné na povrch vystavené virulentní dominanty a cíle hostitelské imunity. Zevní membrána *T. pallidum* byla izolována a její konstituční proteiny jsou identifikovány. Zevní membrána obsahuje pět proteinů o velikosti molekul 17, 28,

31, 45 a 65 kDa. Při zkouškách se sérem infekčních a imunních králíků a lidí trpících syfilidou jsou tromps 1, 2 a 3 antigenní. Dalším antigenem je zevní obalový protein P6, viz J Exp Med, 1986, Oct, 1, 164(4), 1160-1170. Viz také časopis Microbiol Rev, 1993, Sep, 57(3), 750-779.

Měkký vřed (šankr) je sexuálně přenosné onemocnění způsobené bakterií *Haemophilus ducreyi*. Mezi antigeny odvozené od *Haemophilus ducreyi* (nebo antigeny s ním spojené) patří protein zevní membrány o molekulové hmotnosti 18 000, který je popsán v časopise Infect Immun, 1996, Jun, 64(6), 1950-1955. V časopise Infect Immun, 1996, Dec, 64(12), 5047-5052, je popsán *Haemophilem ducreyi* exprimovaný nový lipoprotein. Na zvířecím modelu virulence *Haemophila ducreyi* je produkován protein zevní membrány, který váže hemoglobin, viz Infect Immun, 1996, May, 64(5), 1724-1735. V časopise Infect Immun, 1995, Jun, 63(6), 2194-2200, je popsán lokus hgbA, který kóduje hemoglobinový receptor *Haemophila ducreyi*. V časopise J Med Microbiol, 1992, Dec, 37(6), 413-419, jsou popsány vysoce stálé a druhově specifické polypeptidy *Haemophila ducreyi*.

Kombinované vakcíny podle vynálezu obsahují imunoprotektivní množství antigenů. Tyto vakcíny se vyrábějí a podávají způsoby běžnými v oboru.

Výroba vakcín je obecně popsána v New Trends and Developments in Vaccines, Voller a kol., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A., 1978. Zapouzdření do liposomů je popsáno například Fullertonem v patentové

příhláše U.S. Patent 4, 235, 877. Konjugace proteinů do makromolekul je popsána například Likhitem v patentové příhláše U.S. Patent 4, 372, 945 a Armorem a spolupracovníky v patentové příhláše U.S. Patent 4, 474, 757.

Množství antigenu ve vakcíně je takové množství, které navodí imunoprotektivní nebo léčebnou odpověď bez závažných vedlejších nežádoucích účinků. Toto množství se liší podle výběru antigenu. Obecně obsahuje každá dávka 1-1000 μg proteinu, s výhodou 2-100 μg proteinu, nejlépe 4-40 μg proteinu. Optimální množství antigenu v určité vakcíně se přesně stanoví na základě výsledků studií titrů protilátek a dalších odpovědí jedince. Po podání základní dávky je možné po čtyřech týdnech podat dávku upomínací.

Množství antigenu v každé vakcinační dávce je množství, které navodí účinnou imunoprotektivní nebo léčebnou odpověď bez závažných nežádoucích vedlejších účinků.

Obecně obsahuje každá dávka 1-1000 μg antigenu, s výhodou 2-100 μg antigenu, nejlépe 4-40 μg antigenu. Pomocná látka indukující TH-1 lymfocyty, například 3-DMPL, je ve vakcíně obsažena v množství 10-200 μg , s výhodou 25-75 μg , nejlépe v množství 50 μg v dávce.

Množství nosiče je ve vakcíně různé podle znalostí odborníka, který vakcínu připravuje. Pokud je nosičem hydroxid hlinitý (kamenec) nebo fosforečnan hlinitý, je ve vakcíně obsažen v množství 100-1000 μg , například 250-750 μg , s výhodou 500 μg v dávce.

Vakcína tedy obsahuje nejlépe antigen (20 μ g), kamenec (500 μ g) a pomocnou látku, zejména pomocnou látku indukující TH-1 lymfocyty, jako je 3-DMPL (50 μ g).

V jednom z preferovaných aspektů obsahuje vakcína k použití podle vynálezu gD2t, 3-DMPL (zejména 3-DMPL ve formě malých částic) a hydroxid hlinitý (kamenec).

Vakcína se podává nejlépe režimu 0, 1 a 6 měsíců. Je možné použít i jiné režimy, včetně upomínacích dávek. Vakcínu je možné podávat intramuskulárně.

Vakcína se vyrábí způsobem, který je znám v oboru, například způsobem popsáním v patentové přihlášce WO 92/16231. Tento způsob výroby spočívá ve smíchání jednoho nebo více antigenů, které jsou odvozeny od původců STD (nebo které jsou s původci STD spojeny), s pomocnou látkou, zejména s pomocnou látkou indukující TH-1 lymfocyty a volitelně s nosičem, tak jak je popsáno výše. Výsledný vakcinační prostředek se podává jedincům ženského pohlaví, zejména sexuálně aktivním jedincům ženského pohlaví ohroženým nebo nemocným STD, způsobem podle vynálezu,

Ženy, kterým se vakcína podává, jsou obecně ve věkovém rozmezí 12-70 let. Jde zejména o ženy adolescentní a ženy mladší 60 let, například v rozmezí 14-60, zvláště 18-45 let, tak jak je popsáno ve studii níže. Vhodnou cílovou skupinou jsou ženy trpící nebo ohrožené herpetickou infekcí pohlavních orgánů. Prostředky podle vynálezu je možné používat

způsobem podle vynálezu například u zdravých séronegativních partnerů žen s herpetickou infekcí pohlavních orgánů.

Vynález je předveden na následujících příkladech, není však omezen jen na tyto příklady. V příkladech jsou uvedeny výsledky podávání protiherpetické vakcíny jedincům ženského pohlaví. Podobných výsledků se dosahuje při podávání vakcíny proti dalším původcům STD, jako je HPV nebo chlamydie, nebo při podávání kombinované nebo polyvalentní vakcíny proti více než jednomu původci STD, zejména kombinované vakcíny obsahující antigen spojený s herpes simplex virus, zvláště gD HSV-2 nebo jeho imunologické fragmenty, jako je výše popsáný gD2t.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Rozvržení studie

Zkoušená vakcína

Vakcína obsahující Herpes simplex (20 µg gD2t), kamenec (500 µg) a 3-DMPL (50 µg), SmithKline Beecham Biologicals.

Název

Dvojitě slepá, randomizovaná, placebem kontrolovaná studie k ověření účinnosti vakcíny Herpes simplex (gD2t) s 3-DMPL od firmy SmithKline Beecham Biologicals v prevenci herpetického onemocnění pohlavních orgánů u partnerů jedinců s herpetickou infekcí pohlavních orgánů.

Cílová skupina

Zdraví dospělí dobrovolníci mužského a ženského pohlaví ve věku od 18 do 45 let s negativními sérologickými markery infekce Herpes simplex (HSV-1 a HSV-2), jejichž partner má klinické známky herpetické infekce pohlavních orgánů.

Cíle studie

Primární

Ověřit protektivní účinnost gD-kamenec-3-DMPL vakcíny v prevenci klinického onemocnění herpetickou infekcí pohlavních orgánů v průběhu 17 měsíců od jednoho měsíce po podání druhé vakcinace ve srovnání s placebem.

Sekundární

Ověřit protektivní účinnost gD-kamenec-3-DMPL vakcíny v prevenci herpetické infekce pohlavních orgánů od jednoho měsíce po podání druhé vakcinace ve srovnání s placebem.
Ověřit protektivní účinnost gD-kamenec-3-DMPL vakcíny v prevenci herpetické infekce pohlavních orgánů po podání plné vakcinace ve srovnání s placebem.

Ověřit protektivní účinnost gD-kamenec-3-DMPL vakcíny v prevenci herpetické infekce pohlavních orgánů po podání plné vakcinace v průběhu rozšířeného období klinického sledování ve srovnání s placebem.

Ověřit protektivní účinnost gD-kamenec-3-DMPL vakcíny v prevenci herpetického onemocnění pohlavních orgánů po podání plné vakcinace ve srovnání s placebem.

Ověřit protektivní účinnost gD-kamenec-3-DMPL vakcíny v prevenci klinického herpetického onemocnění pohlavních orgánů po podání plné vakcinace v průběhu prodlouženého období klinického sledování ve srovnání s placebem.

Zhodnotit dobu vzniku onemocnění ve všech skupinách od jednoho měsíce po podání druhé vakcinace.

Zhodnotit dobu vzniku infekce ve všech skupinách od jednoho měsíce po podání druhé vakcinace.

Zhodnotit počet typických a atypických případů herpetického onemocnění pohlavních orgánů v každé skupině.

Zhodnotit závažnost primárního onemocnění v obou skupinách.

Zhodnotit humorální a buněčnou imunitní odpověď na vakcínu (vyjma jedinců ze studií započatých po 1. červenci 1995).

Stanovit sérologické a imunologické koreláty protektivní účinnosti (vyjma jedinců ze studií započatých po 1. červenci 1995).

V případě primárního onemocnění nebo infekce zhodnotit počet jejich následných návratů v obou skupinách.

Zhodnotit bezpečnost a reaktogenicitu herpes simplex vakcíny (s 3-DMPL) od firmy SmithKline Beecham Biologicals u zdravých HSV séronegativních jedinců.

Zhodnotit počet herpetických onemocnění úst a rtu (ne pohlavních orgánů).

Ověřit protektivní účinnost gD-kamenec-3-DMPL vakcíny v prevenci suspektních známek a příznaků herpetického onemocnění pohlavních orgánů, které jsou spojeny buď se sérokonverzí na nevakcinační antigeny stanovenou metodou western blotting anebo s detekcí HSV DNA (metodou PCR) ve výtěrech z pohlavních orgánů, od jednoho měsíce po podání druhé vakcinace ve srovnání s placebem.

Zhodnotit incidenci herpetického onemocnění pohlavních orgánů a HSV infekce u vakcinovaných jedinců v průběhu prodlouženého klinického sledování.

Popis studie

Dvojitě slepá, randomizovaná, placebem kontrolovaná studie.
Vakcinační režim: 0-1-6 měsíců.

Počáteční období sledování – 17 měsíců od 1 měsíce po podání druhé vakcinace pro každého jedince.

Prodloužené období sledování – 24 měsíců pro každého jedince (od návštěvy v měsíci 19 do návštěvy v měsíci 43).

Fáze A (dvojitě slepá, příjemci vakcíny a placeba) – je ukončena, když poslední sledovaný jedinec dokončí počáteční období sledování (v tomto čase je studie odslepena kvůli analýze).

Fáze B (otevřená, pouze příjemci vakcíny) – začíná, když poslední sledovaný jedinec ukončí počáteční období sledování (měsíc 19) a je ukončena, když poslední sledovaný jedinec dokončí návštěvu v měsíci 43.

Vzhledem k tomu, že mezi datem, kdy poslední sledovaný jedinec dokončí počáteční období sledování, a datem, kdy je studie plně odslepena, může vzniknout období několika měsíců (vzhledem k času potřebnému k uložení a vyčištění všech dat získaných během počátečního období sledování a fáze A prodlouženého období sledování), začátek fáze B prodlouženého období sledování může zahrnovat jak příjemce vakcíny, tak příjemce placeba.

2 skupiny: I. gD2t-kamenec-3-DMPL
 kamenec-3-DMPL jako placebo

Schematický popis studie HSV-007 – období studie: fáze vakcinace (V); počáteční období sledování* (počáteč. sled.*); prodloužené období sledování fáze A; prodloužené období sledování fáze B.

* poznámka: modifikované „počáteční období sledování“ zahrnuje měsíce 2-19

počet jedinců do studie je zařazeno 800 párů, tak aby zahrnovala alespoň 640 hodnotitelných jedinců

primární cíle v průběhu období 17 měsíců od jednoho měsíce po podání druhé vakcinace (měsíce 2-19) jsou cíle účinnosti následující:

prevence onemocnění

srovnání dvou skupin jedinců s alespoň jedním shodným příznakem herpetického onemocnění pohlavních orgánů A

bud' současně s pozitivní kultivací NEBO přítomností protilátek na nevakcinační antigeny stanovené metodou western blotting do šesti měsíců a pozitivní místní detekcí HSV DNA metodou polymerázové řetězcové reakce (PCR)

	klinický příznak	kultivace	protilátky na nevakcinační antigeny	PCR
onemocnění	+	+	+/-	NA
	+	-	+	+

NA: neaplikovatelné

sekundární cíle

1. prevence infekce:

srovnání (mezi skupinou, která dostává vakcínu a skupinou, která dostává placebo) se provede u jedinců s protilátkami na nevakcinační antigeny (sérokonverze) a u jedinců nemocných (kultivační zkouška)

tento cíl se hodnotí v následujících obdobích:

počáteční období sledování (měsíce 2-19)

měsíce 7-19

fáze A prodlouženého období sledování

počáteční období sledování (měsíce 2-19) a fáze A prodlouženého období sledování (spojené)

měsíce 7-19 a fáze A prodlouženého období sledování (spojené)

Analýza dat z fáze A prodlouženého období sledování zahrnuje všechny události, které se objeví po té, co

všichni jedinci vykonají návštěvu v měsíci 19 a skončí fáze A (poslední sledovaný jedinec dokončí návštěvu v měsíci 19).

		klinický příznak	kultivace	protilátky na nevakcinační antigeny	PCR
infekce	nemoc	+	+	+/-	NA
infekce	nemoc	+	-	+	+
infekce		+/-	NA	+	NA

NA: neaplikovatelný

2. prevence onemocnění v měsících 7 až 19

Srovnání jedinců s alespoň jedním shodným příznakem herpetického onemocnění pohlavních orgánů A buď se současnou pozitivní kultivací NEBO přítomností protilátek na nevakcinační antigeny stanovenými metodou western blotting a pozitivní místní detekcí herpes simplex DNA stanovenou metodou polymerázové řetězcové reakce (PCR) s placebem po podání plné vakcinace (měsíce 7-19).

3. prevence onemocnění v průběhu fáze A prodlouženého období sledování

Srovnání dvou skupin jedinců s alespoň jedním shodným příznakem herpetického onemocnění pohlavních orgánů A buď se současnou pozitivní kultivací NEBO přítomností protilátek na nevakcinační antigeny stanovenými metodou western blotting a pozitivní místní detekcí herpes simplex DNA

stanovenou metodou polymerázové řetězcové reakce (PCR) během fáze A prodlouženého období sledování.

Tento cíl bude navíc hodnocen v novém počátečním období sledování (měsíce 2-19) spojeném s fází A prodlouženého období sledování a také v měsících 7-19 spojených s fází A prodlouženého období sledování.

4. Zhodnocení doby do vzniku herpetického onemocnění pohlavních orgánů v obou skupinách v průběhu 17 měsíců od jednoho měsíce po podání druhé vakcinace.
5. Zhodnocení doby vzniku herpetické infekce pohlavních orgánů ve všech skupinách v průběhu 17 měsíců od jednoho měsíce po podání druhé vakcinace.
6. Zhodnocení počtu případů typického a atypického klinického herpetického onemocnění pohlavních orgánů ve všech skupinách.

Definice případů jsou popsány v primárních cílech.

7. Zhodnocení subjektivních místních a celkových známek a příznaků HSV onemocnění pohlavních orgánů a jejich trvání u pacientů všech skupin.
8. Zhodnocení humorální (protilátky anti-gD2 stanovené metodou ELISA a neutralizační protilátky anti-HSV) a buněčné (lymfoproliferace; sekrece interferonu gama)

odpovědi na vakcínu (vyjma jedinců ze studií započatých po 1. červenci 1995).

9. Při demonstraci klinické účinnosti se v sérech a lymfocytech periferní krve uskladněné při vyšetřování hodnotí velké množství sérologických a imunologických markerů ve snaze určit koreláty mezi protektivní účinností a laboratorními parametry (vyjma jedinců ze studií započatých po 1. červenci 1995).
10. V případě primárního onemocnění nebo infekce zhodnotit počet následných návratů herpetického onemocnění nebo infekce pohlavních orgánů v všech skupinách.
12. Zhodnocení místní a celkové reaktogenicity a bezpečnosti po každé vakcinaci zaznamenáním místních a celkových známek a příznaků po každé dávce a zaznamenáním nežádoucích účinků během celé studie. Na začátku studie a po podání poslední vakcinace se kontrolují hematologické a biochemické parametry. V průběhu prodlouženého období sledování se u příjemců vakcín zaznamenávají všechny závažné nežádoucí účinky.
12. Zhodnotit počet klinických případů herpetického onemocnění jiných než pohlavních orgánů, včetně herpetického onemocnění úst a rtu v obou skupinách.

13. Stanovit počet příjemců vakcín, u nichž se v průběhu 17 měsíců sledování od jednoho měsíce po podání druhé vakcinace vyskytly známky a příznaky herpetické infekce spojené buď se sérokonverzí na nevakcinační antigeny stanovené metodou western blotting (do šesti měsíců od vzniku známek a příznaků herpetické infekce) nebo s detekcí HSV DNA stanovené metodou PCR ve výtěrech z pohlavních orgánů ve srovnání s placebem.
14. Počet příjemců vakcíny, kteří v průběhu fáze B prodlouženého období sledování vyvinuli protilátky na nevakcinační antigeny (sérokonverze) a počet jedinců, u kterých se rozvinulo onemocnění (kultivační zkouška), se analyzuje ve vztahu k intervalu od podání poslední vakcinace. Tato data se použijí ke stanovení počtu atak herpetického onemocnění pohlavních orgánů a herpetické infekce.

Příklad 2

Analýza primárního cíle je založena na porovnání počtu atak mezi skupinou, která dostávala vakcínu a skupinou, která dostávala placebo, tak jak je popsáno v RAP. Analýza sekundárních cílů je založena buď na porovnání počtu atak nebo na porovnání doby vzniku onemocnění nebo infekce, tak jak je popsáno níže.

Pomocí softwaru SAS se provádějí dvoustranné statistické testy, hladina α je 0,05. Je třeba mít na zřeteli, že přestože je

vypracováno mnoho statistických analýz, počet chyb (α) pro sekundární cíle není znám. Protože pro sekundární cíle není α stanovena, měly by hodnoty p být interpretovány opatrně a měly by být vnímány pouze jako popisné.

Cílové skupiny, na nichž byla ověřována účinnost vakcíny

Analýza účinnosti vakcíny se provádí na dvou skupinách jedinců: skupina k léčení (intention-to-treat; ITT) a skupina podle protokolu (according-to-protocol; ATP). Skupina ATP je v textu označena také jako per-protokolová (per-protocol; PP).

Analýza skupiny podle protokolu je analýza primární. Skupina ATP (PP) je definována podle uvažovaného období studie:

1) V období mezi měsíci 2-19 se skupina ATP skládá z jedinců, kteří:

- splňují kritéria zařazení do protokolu
- dostali tři dávky vakcíny nebo placebo
- dostali dvě dávky vakcíny nebo placebo a došlo u nich ke vzniku onemocnění nebo infekce před návštěvou v měsíci 6
- neměli infekci nebo onemocnění před začátkem období měsíců 2-19

2) V období mezi měsíci 7-19 se skupina ATP skládá z jedinců, kteří

- splňují všechna kritéria pro zařazení do protokolu
- dostali tři dávky vakcíny nebo placebo

- neměli infekci nebo onemocnění před začátkem období měsíců 7-19

Analýza skupiny ITT je sekundární analýza. Jsou analyzováni všichni jedinci, kteří dostali alespoň jednu dávku studované vakcíny a měli alespoň jedno stanovení reakce na vakcínu.

Dvě analýzy se provádějí proto, aby se vyloučila porušení protokolu a ta vyřazení jedinců ze studie, která nesouvisí s léčbou a mohla by ve výsledcích vést k selektivnímu bias.

Skupiny jedinců zařazené do analýz imunogenicity a bezpečnosti jsou popsány v konečné zprávě ze studie.

Hodnocená období

Analýzy se provádějí v těchto hodnocených obdobích:

- měsíce 2-19 (skupina ATP)
- měsíce 7-19 (skupina ATP)
- měsíce 0-19 (skupina ITT)

Vybrané výsledky a souhrn všech závěrů studie jsou předvedeny níže.

tabulka 1a. Účinnost vakcíny na vznik herpetického onemocnění pohlavních orgánů u skupiny ITT podle pohlaví

termíny použité v tomto modelu	odchylka	stupeň volnosti	hodnota p
léčebná skupina	320,5561	845	
léčebná skupina, pohlaví	317,2083	844	0,067
léčebná skupina, pohlaví a interakce	312,0443	843	0,023

tabulka 1b. Účinnost vakcíny na vznik herpetické infekce pohlavních orgánů u skupiny ITT podle pohlaví

termíny použité v tomto modelu	odchylka	stupeň volnosti	hodnota p
léčebná skupina	510,8654	845	
léčebná skupina, pohlaví	494,9266	844	<0,00
léčebná skupina, pohlaví a interakce	491,5551	843	0,066

Rozložení případů herpetického onemocnění pohlavních orgánů a HSV infekce podle léčebných skupin

tabulka 2a. Případy herpetického onemocnění pohlavních orgánů podle léčebných skupin – ženy a muži

období	skupina k léčení (ITT) n = 847		skupina podle protokolu (PP)*	
	vakcína (425)	placebo (422)	vakcína	placebo
m 0-2	2	7		
m 2-7	9	8		
m 7-19	4	9	3 (349)	7 (349)
m 2-19	13	17	12 (371)	16 (369)
>m 19	1	0		
celkem	16	24		

* počet hodnotitelných jedinců ve skupině podle protokolu je pro každé období uveden v ()

tabulka 2b. Případy herpetického onemocnění pohlavních orgánů podle léčebných skupin – muži

období	skupina k léčení (ITT) n = 579		skupina podle protokolu (PP)*	
	vakcína (288)	placebo (291)	vakcína	placebo
m 0-2	2	2		
m 2-7	6	5		
m 7-19	3	3	2 (240)	2 (247)
m 2-19	9	8	8 (252)	8 (261)
>m 19	1	0		
celkem	12	10		

* počet hodnotitelných jedinců ve skupině podle protokolu je pro každé období uveden v ()

tabulka 2c. Případy herpetického onemocnění pohlavních orgánů podle léčebných skupin – ženy

období	skupina k léčení (ITT) n = 268		skupina podle protokolu (PP)*	
	vakcína (137)	placebo (131)	vakcína	placebo
m 0-2	0	5		
m 2-7	3	3		
m 7-19	1	6	1 (109)	5 (102)
m 2-19	4	9	4 (119)	8 (108)
>m 19	0	0		
celkem	4	14		

* počet hodnotitelných jedinců ve skupině podle protokolu je pro každé období uveden v ()

tabulka 3a. Případy herpetické infekce pohlavních orgánů podle léčebných skupin – ženy a muži

období	skupina k léčení (ITT) n = 847		skupina podle protokolu (PP)*	
	vakcína (425)	placebo (422)	vakcína	placebo
m 0-2	2	10		
m 2-7	17	13		
m 7-19	11	16	10 (349)	16 (349)
m 2-19	28	30	26 (371)	29 (369)
>m 19	5	2		
celkem	35	41		

* počet hodnotitelných jedinců ve skupině podle protokolu je pro každé období uveden v ()

tabulka 3b. Případy herpetické infekce pohlavních orgánů podle léčebných skupin – muži

období	skupina k léčení (ITT) n = 579		skupina podle protokolu (PP)*	
	vakcína (288)	placebo (291)	vakcína	placebo
m 0-2	2	2		
m 2-7	9	8		
m 7-19	6	6	5 (240)	6 (247)
m 2-19	15	14	13 (252)	14 (261)
>m 19	3	0		
celkem	20	16		

* počet hodnotitelných jedinců ve skupině podle protokolu je pro každé období uveden v ()

tabulka 3c. Případy herpetické infekce pohlavních orgánů podle léčebných skupin – ženy

období	skupina k léčení (ITT) n = 268		skupina podle protokolu (PP)*	
	vakcína (137)	placebo (131)	vakcína	placebo
m 0-2	0	8		
m 2-7	8	5		
m 7-19	5	10	5 (109)	10 (102)
m 2-19	13	15	13 (119)	15 (108)
>m 19	2	2		
celkem	15	25		

* počet hodnotitelných jedinců ve skupině podle protokolu je pro každé období uveden v ()

Předběžná analýza účinnosti

primární cíl

V období 17 měsíců od jednoho měsíce po druhé vakcinaci (měsíce 2-19) je primární cíl následující:

prevence onemocnění:

srovnání dvou skupin jedinců s alespoň jedním shodným příznakem herpetického onemocnění

pohlavních orgánů A buď se současnou pozitivní kultivací NEBO přítomností protilátek na nevakcinační antigeny stanovenými metodou western blotting do šesti měsíců a pozitivní místní detekcí herpes simplex DNA stanovenou metodou polymerázové řetězcové reakce (PCR)

tabulka 4a. Prevence herpetického onemocnění pohlavních orgánů – muži a ženy

období	skupina	účinnost (95% CI)
všechna	ITT	33,8 (-22,8; 64,3%)
m 2-19	PP	25,4% (-55,5; 64,2%)

tabulka 4b. Prevence herpetického onemocnění pohlavních orgánů – muži

období	skupina	účinnost (95% CI)
všechna	ITT	-21,2 (-176,2; 46,8%)
m 2-19	PP	3,6% (-171,7; 60,5%)

tabulka 4c. Prevence herpetického onemocnění pohlavních orgánů – ženy

období	skupina	účinnost (95% CI)
všechna	ITT	72,7% (19,1; 90,8%)
m 2-19	PP	54,6% (-46,4; 85,9%)

sekundární cíle

1) prevence infekce

srovnání jedinců (ze skupiny, která dostávala vakcínu a ze skupiny, která dostávala placebo) s protilátkami na nevakcinační antigeny (sérokonverze) a jedinců nemocných (kultivační zkouška) v počátečním období sledování (měsíce 2-19)

tabulka 5a. Prevence herpetické infekce pohlavních orgánů – muži a ženy

období	skupina	účinnost (95% CI)
všechna	ITT	15,2% (-30,4; 44,0%)
m 2-19	PP	10,8% (-48,4; 46,4%)

tabulka 5b. Prevence herpetické infekce pohlavních orgánů – muži

období	skupina	účinnost (95% CI)
všechna	ITT	-26,3% (-138,8; 33,2%)
m 2-19	PP	3,8% (-100,5; 53,9%)

tabulka 5c. Prevence herpetické infekce pohlavních orgánů – ženy

období	skupina	účinnost (95% CI)
všechna	ITT	42,6% (-3,9; 68,3%)
m 2-19	PP	21,3% (-57,7; 60,8%)

2) prevence infekce

srovnání jedinců (ze skupiny, která dostávala vakcínu a ze skupiny, která dostávala placebo) s protilátkami na nevakcinační antigeny (sérokonverze) a jedinců nemocných (kultivační zkouška) v měsících 7-19

tabulka 6a. Prevence herpetické infekce pohlavních orgánů – muži a ženy

období	skupina	účinnost (95% CI)
m 7-19	PP	37,5% (-35,8; 71,2%)

tabulka 6b. Prevence herpetické infekce pohlavních orgánů – muži

období	skupina	účinnost (95% CI)
m 7-19	PP	14,2% (-177,3; 73,5%)

tabulka 6c. Prevence herpetické infekce pohlavních orgánů – ženy

období	skupina	účinnost (95% CI)
m 7-19	PP	53,2% (-32,2; 83,4%)

2) prevence onemocnění v měsících 7-19

srovnání jedinců s alespoň jedním shodným příznakem herpetického onemocnění pohlavních orgánů A buď se současnou pozitivní kultivací NEBO přítomností protilátek na nevakcinační antigeny stanovené metodou western blotting a pozitivní detekcí herpes simplex DNA metodou polymerázové řetězcové reakce (PCR) s placebem po plné vakcinaci (měsíce 7-19)

tabulka 7a. Prevence herpetického onemocnění pohlavních orgánů – muži a ženy

období	skupina	účinnost (95% CI)
m 7-19	PP	57,1% (-64,4; 88,8%)

tabulka 7b. Prevence herpetického onemocnění pohlavních orgánů – muži

období	skupina	účinnost (95% CI)
m 7-19	PP	-2,9% (-624,7; 85,4%)

tabulka 7c. Prevence herpetického onemocnění pohlavních orgánů – ženy

období	skupina	účinnost (95% CI)
m 7-19	PP	81,3% (-57,5; 97,8%)

Zhodnotit dobu vzniku herpetického onemocnění pohlavních orgánů v obou skupinách v průběhu 17 měsíců od jednoho měsíce po druhé vakcinaci.

Doba vzniku herpetického onemocnění pohlavních orgánů ve skupině ITT je ukázána na obrázcích 1a (muži a ženy), 1b (muži) a 1c (ženy). Analýza účinnosti vakcíny na dobu vzniku herpetického onemocnění pohlavních orgánů ve skupině ITT je ukázána v tabulkách 8a (muži a ženy), 8b (muži) a 8c (ženy). Ve skupinách podle protokolu (PP) (měsíce 2-19) nebyla doba vzniku analyzována, protože u příjemců vakcíny a příjemců placebo je v přežívání bez onemocnění pozorován rozdíl již před měsícem 2.

Poznámka: do analýzy doby vzniku onemocnění nejsou zahrnuty případy herpetického onemocnění pohlavních orgánů po měsíci 19.

tabulka 8a. Prevence herpetického onemocnění pohlavních orgánů podle doby vzniku onemocnění – muži a ženy

období	skupina	hodnota p (Log Rank test)	účinnost (95%CI)
m 0-19	ITT	0,1432	37,96% (-18,27; 67,45%)

tabulka 8b. Prevence herpetického onemocnění pohlavních orgánů podle doby vzniku onemocnění – muži

období	skupina	hodnota p (Log Rank test)	účinnost (95%CI)
m 0-19	ITT	0,8025	-11,54% (-162,55; 52,63%)

tabulka 8c. Prevence herpetického onemocnění pohlavních orgánů podle doby vzniku onemocnění – ženy

období	skupina	hodnota p (Log Rank test)	účinnost (95%CI)
m 0-19	ITT	0,013	73,24% (18,69; 91,19%)

Souhrn a závěry z detailní analýzy výsledků studie

Demografické charakteristiky a hodnocení rizikových faktorů

Z 847 jedinců zařazených do studie (425 příjemců vakcíny, 422 příjemců placebo) dokončilo studii (do měsíce 19) 697 jedinců (344 příjemců vakcíny a 353 příjemců placebo). Ze studie bylo vyřazeno 150 jedinců; nikdo nebyl vyřazen kvůli závažným nežádoucím účinkům.

V měsících 2-19 bylo ve skupině ATP hodnotitelných 370 jedinců, kteří dostávali vakcínu a 369 jedinců, kteří dostávali placebo. Skupiny byly z hlediska demografických charakteristik

vyváženy a výběrem jedinců pro analýzu skupiny ATP nedošlo k bias.

Mezi stanovované rizikové faktory, které mohly mít vliv na počet získaných herpetických onemocnění nebo infekcí pohlavních orgánů, patří délka partnerského vztahu před zahájením studie, průměrná doba do rozchodu s nakaženým partnerem, frekvence pohlavního styku (na začátku a v průběhu období sledování účinnosti vakcíny) a frekvence používání kondomu (na začátku a v průběhu období sledování účinnosti vakcíny).

Z výsledků vyplynulo, že skupina příjemců vakcíny a skupina příjemců placebo byly z hlediska všech rizikových faktorů na začátku studie vyváženy a že tato vyváženost byla během studie udržována. Profil rizikových faktorů skupiny ITT odpovídal profilu rizikových faktorů ATP, takže vyřazení jedinců neodpovídajících protokolu nevedlo k bias.

Subanalýza z hlediska pohlaví ukázala, že v každé skupině podle pohlaví byly rizikové faktory, které mohly mít vliv na počet získaných herpetických onemocnění nebo infekcí pohlavních orgánů, vyvážené.

Analýza primárního cíle účinnosti

Při analýze primárního cíle se účinnost vakcíny proti herpesu pohlavních orgánů v kombinované (muži a ženy) skupině zdravých séronegativních partnerů jedinců s herpetickým onemocněním pohlavních orgánů neprojevila.

Výsledky analýzy primárního cíle účinnosti lze shrnout takto:

- 1) Relativní účinnost vakcíny v celé skupině (měsíce 2-19 ATP) je 25,4% (95% CI: -55,5; 64,2; $p=0,449$). Relativní účinnost vakcíny ve skupině ITT je 37,9% (95% CI: -16,6; 67,0; $p=0,143$).
- 2) Na analýzu účinnosti ve skupině ITT mělo statisticky významný vliv pohlaví ($p=0,03$).
- 3) Při oddělené analýze podle pohlaví je účinnost vakcíny v měsících 2-19 u žen ve skupině ATP 54,2% (95% CI: -47,7; 85,8; $p=0,238$) a u žen ve skupině ITT je účinnost vakcíny 72,7% statisticky významná (95% CI: 19,1; 90,8; $p=0,014$). Ve skupině mužů není vakcína účinná. V měsících 2-19 je účinnost vakcíny u mužů ve skupině ATP 3,6% (95% CI: -171; 60,5) a u mužů ve skupině ITT je účinnost vakcíny -11,1% (95% CI: -157,6; 52,1).

Bylo zjišťováno, zda na účinnost vakcíny mají vliv následující faktory: pohlaví, věk, frekvence používání kondomu na začátku studie, frekvence pohlavního styku a trvání vztahu před začátkem studie. Účinnost vakcíny souvisela s těmito faktory: ženské pohlaví, věk kolem 30 let, ne časté používání kondomu, frekvence pohlavního styku průměrná nebo nižší a kratší trvání vztahu. Tato pozorování platila u skupiny ATP i u skupiny ITT.

Analýzy sekundárních cílů účinnosti

Prevence herpetického onemocnění pohlavních orgánů (měsíce 7-19)

Po podání třech dávek vakcíny (mezi měsícem 7-19) byla účinnost vakcíny na prevenci herpetického onemocnění pohlavních orgánů u žen pozorována v 81,1% (95% CI: -58,9; 97,8; $p=0,111$). V měsících 7-19 nebyla pozorována účinnost vakcíny u mužů (účinnost vakcíny -2,9%; 95% CI: -624,7; 85,4; $p=0,99$). Účinnost vakcíny u žen ve skupině ATP v měsících 7-19 odpovídá pozorované účinnosti vakcíny u žen ve skupině ITT při analýze primárního cíle účinnosti.

Prevence HSV infekce

Účinnost vakcíny v prevenci HSV infekce byla ověřována porovnáním skupiny příjemců vakcíny a skupiny příjemců placeba. Celkově nebyla vakcína proti HSV infekci účinná. Avšak v souladu s analýzami prevence onemocnění měla vakcína tendenci být účinná v prevenci HSV infekce u žen ve skupině ITT (účinnost vakcíny 46,0%; 95% CI: -2,1; 71,4; $p=0,072$) a ve skupině ATP v měsících 7-19 (účinnost vakcíny 52,8%; 95% CI: -33,4; 83,3; $p=0,184$).

Doba vzniku herpetického onemocnění pohlavních orgánů

Doba vzniku herpetického onemocnění pohlavních orgánů byla počítána od začátku studie do objevení se nemoci. Hlavní analýza byla provedena logrank testem; pro každou skupinu byly sestrojeny Kaplan – Meierovy křivky. Křivky popisující vznik případů onemocnění se u žen (měsíce 2-19, skupina ATP) rozcházelý přibližně od devátého měsíce, kdy se případy onemocnění nadále vyskytovaly ve skupině přijímající placebo.

Účinnost vakcíny u žen byla odhadnuta na 53,6% (95% CI: - 54,2; 86,0). U žen ve skupině ITT se křivky rozcházely od měsíce 0, statisticky významná účinnost vakcíny byla odhadnuta na 73,2% (95% CI: 18,7; 91,2; $p=0,013$). U mužů nebyla vakcína účinná. Výsledky doby vzniku onemocnění opět odpovídaly analýze primárního cíle.

Závažnost herpetického onemocnění pohlavních orgánů

Ke stanovení závažnosti onemocnění byly v obou skupinách stanovovány parametry, jako je doba trvání léze, doba trvání příznaků v epizodě, počet příznaků v epizodě a intenzita příznaku v epizodě. V kombinované skupině ATP (měsíce 2-19) byla doba trvání příznaků v epizodě signifikantně delší v malém počtu případů, které se objevily ve skupině, která dostávala vakcínu ($p=0,031$). Z dat o závažnosti onemocnění podle pohlaví také vyplývá, že u žen byl ve skupině, která dostávala vakcínu, statisticky významně vyšší počet lézí herpetického onemocnění pohlavních orgánů v epizodě ($p=0,010$). Z těchto pozorování lze usuzovat na to, že ačkoli vakcinace předchází mírným a středně závažným formám onemocnění, onemocněním se závažnější manifestací nezabrání.

Celkové závěry

Přestože jsou splněny předpoklady pro účinnost vakcíny proti herpetickému onemocnění pohlavních orgánů, analýza primárního cíle účinnost vakcíny v kombinované skupině (muži a ženy) séronegativních zdravých partnerů jedinců

s herpetickým onemocněním pohlavních orgánů nepotvrdila. Na základě pozorovaného vlivu pohlaví byla při oddělené subanalýze podle pohlaví **demonstrována účinnost vakcíny u žen**, která je ve skupině ITT statisticky významná. U mužů není vakcína účinná.

Literatura

1. Washington AE, Johnson RE a Sanders LL, *Chlamydia trachomatis* infections in the United States: what are they costing us, JAMA, 1987, 257, 2070-2072.
2. Grayston JT a Wang SP, New knowledge of *Chlamydiae* and the diseases they cause, The journal of Infectious Diseases, 1975, 132, 87-105.
3. Grayston JT, Wang SP, Yeh LJ a Kuo CC, Importance of reinfection in the pathogenesis of trachoma, Reviews of Infectious Diseases, 1985, 7, 717-725.
4. Morrison RP, Belland RJ, Lyng K a Caldwell HD, Chlamydial disease pathogenesis. The 57-kD Chlamydial hypersensitivity antigen is a stress response protein, J. Exp. Med., 1989, 170, 1271-1283.
5. Blander SJ a Amortegui AJ, Mice immunized with a chlamydial extract have no increase in early protective immunity despite increased inflammation following genital infection by the mouse pneumonitis agent of *Chlamydia trachomatis*., Infect. Immun., 1994, 62, 3617-3624.
6. Wang SP, Kuo CC, Barnes RC, Stephens RS a Grayston JT, Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal

28.05.01

- antibodies, The Journal of Infectious Diseases, 1985, 152, 791-800.
7. Bavoil P, Ohlin A a Schachter J, Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*., Infect. Immun., 1984, 44, 479-485.
 8. Hatch TP, Miceli M, Sublett JE, Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during development cycle of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*., J. Bacteriol., 1986, 165, 379-385.
 9. Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, Inouye C a Urdea MS, Diversity of *Chlamydia trachomatis* Major Outer Membrane Protein genes., J. Bacteriol., 1987, 169, 3879-3885.
 10. Yuan Y, Zhang YX, Watkins NG a Caldwell HD, Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars., Infect. Immun., 1989, 57, 1040-1049.
 11. Baehr W, Zhang YX, Joseph T, Su H, Nano FE, Everett EK a Calwell HD, Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes, Proc. Natl. Sci. USA, 1988, 85, 4000-4004.
 12. Lucero ME a Kuo CC, Neutralization of *Chlamydia trachomatis* cell culture infection by serovar-specific monoclonal antibodies, Infect. Immun., 1985, 50, 595-597.
 13. Zhang YX, Stewart S, Joseph T, Taylor HR a Caldwell HD, Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, J. Immunol., 1987, 138, 575-581.

14. Peterson E, Zhong G, Carlson E a de la Maza LM, Protective role of magnesium in the neutralization by monoclonal antibodies of *Chlamydia trachomatis* infectivity, Infect. Immun, 1988, 56, 885-891.
15. Zhang YX, Stewart SJ a Caldwell HD, Protective monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis* serovar- and serogroup- specific major outer membrane protein determinants, Infect. Immun., 1989, 57, 636-638.
16. Allen JE, Loksley RM a Stephens RS, A single peptide from the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* elicits T cell help for the production of antibodies to protective determinants, J. Immunol., 1991, 147, 674-679.
17. Su H, Morrison RP, Watkins NG a Caldwell HD, Identification and characterization of T helper cell epitopes of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, J. Exp. Med., 1990, 172, 203-212.
18. Manning DS a Stewart SJ, Expression of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* in *Escherichia Coli*, Infect. Immun., 1993, 61, 4093-4098.
19. Koehler JE, Birkelund S a Stephens RS, Overexpression and surface localization of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein in *Escherichia Coli*, Molecular Microbiology, 1992, 6, 1087-1094.
20. Pickett MA, Ward ME a Clarke IN, High level expression and epitope localization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* serovar L1, Molecular Microbiology, 1988, 2, 681-685.
21. Taylor HR, Whittum-Hudson J, Schachter J, Caldwell HD a Prendergast RA, Oral immunization with chlamydial major

28.05.01

- outer membrane protein (MOMP), Investigative Ophthalmology and visual Science, 1988, 29, 1847-1853.
22. Batteiger BE, Rank RG, Bavoil PM a Soderberg LSF, Partial protection against genital reinfection by immunization of guinea-pig with isolated outer membrane proteins of the chlamydial agent of guinea-pig inclusion conjunctivitis, Journal of General Microbiology, 1993, 139, 2965-2972.
 23. Tuffrey M, Alexander F, Conlan W, Woods C a Ward M, Heterotypic protection of mice against chlamydial salpingitis and colonization of the lower genital tract with human serovar F isolate of *Chlamydia trachomatis* by prior immunization with recombinant L1 major outer- membrane protein, Journal of General Microbiology, 1992, 138, 1707-1715.
 24. Tuffrey M, Falder P, Gale J a Taylor-Robinson D, Salpingitis in mice induced by human strains of *Chlamydia trachomatis*, Br. J. exp. Path, 1986, 67, 605-616.
 25. Tuffrey M, Falder P, Gale J, Quinn R a Taylor-Robinson D, Infertility in mice infected genitally with human strains of *Chlamydia trachomatis*, Br. J. exp. Path., 1986, 78, 251-260.
 26. Ramsey KH, Soderberg LSF a Rank RG, Resolution of Chlamydial genital infection in B-cell deficient mice and immunity to reinfection, Infect. Immun., 1988, 56, 1320-1325.
 27. Rank RG, Soderberg LSF a Barron AL, Chronic chlamydial genital infection in congenitally athymic nude mice, Infect. Immun., 1985, 48, 847-849.

28. Igietseme JU a Rank RG, Susceptibility to reinfection after a primary chlamydial genital infection is associated with a decrease of antigen-specific T cell in the genital tract, *Infect. Immun.*, 1991, 59, 1346-1351.
29. Igietseme JU, Ramsey KH, Magee DM, Williams DM, Kincy TJ a Rank RG, Resolution of murine chlamydial genital infection by the adoptive transfer of a biovar-specific, TH1 Lymphocyte clone, *Regional Immunology*, 1993, 5, 317-324.
30. Igietseme JU, Magee DM, Williams DM a Rank RG, Role for CD8+ T cell in antichlamydial immunity defined by chlamydial-specific T-lymphocyte clones, *Infect. Immun.*, 1994, 62, 5195-5197.

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití jednoho nebo více antigenů odvozených od patogenu nebo spojených s patogenem způsobujícím STD a pomocné látky v přípravě vakcíny k podávání jedincům ženského pohlaví k prevenci a nebo léčbě jedné nebo více STD.

2. Použití podle nároku 1, vyznačující se tím, že pomocná látka je pomocná látka indukující TH-1 lymfocyty.

3. Použití podle kteréhokoli z nároků 1 až 2, vyznačující se tím, že jeden nebo více antigenů je glykoprotein D HSV nebo jeho imunologický fragment.

4. Použití podle nároku 3, vyznačující se tím, že glykoprotein D HSV je zkrácený glykoprotein.

5. Použití podle nároku 4, vyznačující se tím, že zkrácený glykoprotein je gD2 HSV zbavený místa ukotvení na C konci (gD2t).

6. Použití podle kteréhokoli z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že jeden nebo více antigenů je antigen odvozený od HPV nebo spojený s HPV.

7. Použití podle kteréhokoli z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že jeden nebo více antigenů je odvozený od Chlamydie nebo s ní spojený.

8. Použití podle kteréhokoli z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že jeden nebo více antigenů je odvozený od Neisseria gonorrhoeae nebo s ní spojený.

9. Použití podle kteréhokoli z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že jeden nebo více antigenů je odvozený od Treponema pallidum (syfilis) nebo Haemophilus ducreyi (měkký vřed – šankr) nebo s nimi spojený.

10. Použití podle kteréhokoli z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že antigen nebo kombinace antigenů je formulována s vhodným nosičem.

11. Použití podle nároku 9, vyznačující se tím, že nosič je hydroxid hlinitý (kamenec), fosforečnan hlinitý nebo emulze typu olej ve vodě.

12. Použití podle kteréhokoli z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že pomocná látka je pomocná látka indukující TH-1 lymfocyty, 3-DMPL.

13. Použití podle nároku 12, vyznačující se tím, že částice 3D-MPL jsou tak malé, že se sterilně přefiltrují přes membránu s otvory o průměru 0,22 mikronů.

14. Použití podle kteréhokoli z nároků 3 až 13, vyznačující se tím, že vakcína se používá k imunizaci nebo léčbě jedinců ženského pohlaví, které jsou ohroženy infekcemi herpes simplex virů.

15. Použití podle nároku 14, vyznačující se tím, že vakcína se používá k prevenci nebo léčbě herpetických infekcí pohlavních orgánů.

16. Použití podle nároku 14 nebo 15, vyznačující se tím, že vakcinační prostředek obsahuje gD2t (1-1000 μ g), 3-DMPL (10-200 μ g) a hlinitou sůl (100-1000 μ g).

17. Použití podle nároku 16, vyznačující se tím, že vakcinační prostředek obsahuje gD2t (20 μ g), 3-DMPL (50 μ g) a kamenec (500 μ g).

18. Použití podle kteréhokoli z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že vakcinační prostředek je podáván nebo zpracován k podávání jedincům ženského pohlaví v režimu 0, 1 a 6 měsíců.

19. Použití podle kteréhokoli z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že vakcinační prostředek se podává intramuskulárně.

Zastupuje: