

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

305 343

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2003-757**
(22) Přihlášeno: **12.09.2001**
(30) Právo přednosti: **15.09.2000 GB 2000 0022742**
(40) Zveřejněno: **15.10.2003**
(Věstník č. 10/2003)
(47) Uděleno: **01.07.2015**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **12.08.2015**
(Věstník č. 32/2015)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2001/010570**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/022168**

A61K 39/09 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
Infection and Immunity, květen 2000.
WO 98/18930 A; WO 99/15675 A; WO 00/37105 A; WO 97/41151 A.

(73) Majitel patentu:
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A.,
1330 Rixensart, BE

(72) Původce:
Philippe Hermand, 1330 Rixensart, BE
Craig Antony Joseph Laferriere, 1330 Rixensart,
BE
Yves Lobet, 1330 Rixensart, BE
Jan Poolman, 1330 Rixensart, BE

(74) Zástupce:
Dr. Karel Čermák, advokát, Národní třída 32,
110 00 Praha 1

(54) Název vynálezu:
**Imunogenní prostředek, vakcína s jeho
obsahem, její použití a způsob její výroby**

(57) Anotace:
Imunogenní prostředek, který obsahuje alespoň dva
proteiny *S. pneumoniae*, kde jedním z proteinů je PhtD a
druhým proteinem je detoxifikovaný pneumolysin, Ply.
Vakcína s obsahem tohoto imunogenního prostředku.
Lékařské aplikace této vakcíny pro prevenci zánětu plic u
pacienta staršího 55 let nebo prevenci zánětu středního
ucha u nemluvňat. Způsob výroby této vakcíny, který
zahrnuje kroky selekce a izolace dvou různých proteinů
S. pneumoniae, kterými jsou PhtD a detoxifikovaný
pneumolysin, Ply, a smísení uvedených proteinů
dohromady s farmaceuticky přijatelným nosičem.

CZ 305343 B6

Imunogenní prostředek, vakcína s jeho obsahem, její použití a způsob její výrobyOblast techniky

Vynález se týká imunogenního prostředku, který obsahuje alespoň dva proteiny *S. pneumoniae*, vakcíny s jeho obsahem a lékařských aplikací této vakcíny pro ochranu dětí a starých lidí před streptokokovou infekcí. Vynález se také týká způsobu výroby této vakcíny.

Dosavadní stav techniky

Streptococcus pneumoniae je Gram–pozitivní bakterie odpovědná za významnou morbiditu a mortalitu (zejména u mladých a starých jedinců), způsobující invazivní onemocnění jako je pneumonie, bakteremie a meningitida, a onemocnění asociovaná s kolonizací, jako je akutní otitis media. Výskyt pneumokokové pneumonie v US pro jedince starší 60 let je 3 až 8 na 100000. Ve 20 % případech tato infekce způsobuje bakteriemi a další manifestace, jako je meningitis, s mortalitou blízkou se 30 %, i při antibiotické terapii.

Pneumococcus je enkapsulovaný chemicky vázaným polysacharidem, který určuje serotypovou specifitu. Existuje 90 známých serotypů pneumokoků a kapsula je pro pneumokoky základní determinantou virulence, protože kapsule nejen chrání vnitřní povrch bakterie před komplemen-tem, ale je též slabě imunogenní. Polysacharidy jsou T–independentní antigeny a nemohou být zpracovány nebo prezentovány na MHC molekulách, aby mohly interagovat s T–lymfocyty. Nicméně, mohou stimulovat imunitní systém alternativním mechanismem, který zahrnuje zesílení povrchových receptorů na B–lymfocytech.

V několika experimentech bylo prokázáno, že ochrana proti invazivnímu pneumokokovému onemocnění nejsilněji koreluje s protilátkami specifickými pro kapsulu a že ochrana je specifická pro serotyp.

Streptococcus pneumoniae je nejčastější příčinou invazivních bakteriálních onemocnění a otitis media u kojenců a mladších dětí. Obdobně, u starých jedinců dochází ke špatné odpovědi na pneumokokové vakcíny [Roghmann et al., (1987), *J. Gerontol.* 42:265 až 270], což je důvodem zvýšené incidence bakteriální pneumonie v této populaci [Verghese a Bewrk, (1983) *Medicine (Baltimore)* 62:271 až 285].

23valentní nekonjugovaná pneumokoková vakcína vykazovala různou klinickou účinnost, od 0% do 81% (Fedson et al., (1994) *Arch Intern Med.* 154: 2531 až 2535). Zdálo se, že účinnost souvisí s rizikovou skupinou, která je imunizována, jako jsou staří pacienti, pacienti s Hodgkinovou nemocí, po splenektomii, se srpkovitou anémií a agammaglobulinemií (Fine et al., (1994) *Arch Intern Med.* 154:2666 až 2677), a také s manifestací onemocnění. 23valentní vakcína nevykazuje ochranu před pneumokokovou pneumonií (u některých rizikových jedinců, jako jsou staří lidé) a před otitis media.

Strategie, které byly navrženy pro překonání tohoto chybění imunogenicity u dětí, včetně navázání polysacharidu na velké imunogenní proteiny, které napomáhají v indukci T–lymfocytů a které indukují imunologickou paměť k polysacharidovému antigenu, se kterým jsou konjugované.

Nicméně, stále trvá potřeba vylepšené pneumokokové vakcíny, zejména takové, která by byla více účinná v prevenci nebo zmírnění pneumokokových onemocnění (zejména pneumonie) u starých jedinců a dětí.

Předkládaný vynález poskytuje takovou zlepšenou vakcínu.

Podstata vynálezu

Prvním aspektem předmětu vynálezu v hlavním provedení i) je imunogenní prostředek, který obsahuje alespoň 2 proteiny *S. pneumoniae*, kde jedním z proteinů je PhtD a druhým proteinem je detoxifikovaný pneumolysin Ply.

Přednostní provedení prvního aspektu předmětu vynálezu zahrnují zejména

- ii) imunogenní prostředek podle provedení i), který dále obsahuje NR1xR2 nebo R1xR2 z CbpA nebo PspC;
- iii) imunogenní prostředek podle provedení i) nebo ii), kde pneumolysin je detoxifikován chemicky;
- iv) imunogenní prostředek podle provedení i) nebo ii), kde pneumolysin je detoxifikován geneticky;
- v) imunogenní prostředek podle kteréhokoli z provedení i) až iv), který obsahuje další antigen zvolený ze skupiny sestávající z povrchového antigenu viru hepatitidy B, HBsAg; antigenů Polio viru; proteinů vnější membrány *Moraxella catarrhalis*; proteinů netypovatelného kmene *Haemophilus influenzae* a proteinů vnější membrány *N. meningitidis* B;
- vi) imunogenní prostředek podle provedení v), ve kterém je dalším antigenem protein netypovatelného kmene *Haemophilus influenzae*;
- vii) imunogenní prostředek podle provedení vi), ve kterém je dalším antigenem protein D netypovatelného kmene *Haemophilus influenzae*;
- viii) imunogenní prostředek podle kteréhokoli z provedení i) až vii), který dále obsahuje adjuvans;
- ix) imunogenní prostředek podle provedení viii), v němž je adjuvant přednostním induktorem odpovědi TH1 typu.

Druhým aspektem předmětu vynálezu (provedení vynálezu x)) je vakcína, která obsahuje imunogenní prostředek podle kteréhokoli z provedení i) až ix).

Třetím aspektem předmětu vynálezu (provedení vynálezu xi)) je použití vakcíny podle provedení x) pro výrobu léčiva pro prevenci zánětu plic u pacienta staršího 55 let.

Čtvrtým aspektem předmětu vynálezu (provedení vynálezu xii)) je použití vakcíny podle provedení x) pro výrobu léčiva pro prevenci zánětu středního ucha u nemluvňat.

Pátým aspektem předmětu vynálezu (provedení vynálezu xiii)) je způsob výroby vakcíny podle provedení x), který zahrnuje kroky selekce a izolace dvou různých proteinů *S. pneumoniae*, kterými jsou PhtD a detoxifikovaný pneumolysin, Ply, a smísení uvedených proteinů dohromady s farmaceuticky přijatelným nosičem.

V dalším popisu je vynález objasňován v širším kontextu než odpovídá rozsahu, který je skutečně předmětem tohoto vynálezu. Výslovně se proto uvádí, že do rozsahu vynálezu spadají jen aspekty explicitně uvedené výše, a jen ty jsou také předmětem připojených patentových nároků. Následující popis má jen ilustrativní význam.

V jednom aspektu v rámci tohoto širšího kontextu poskytuje předkládaný vynález imunogenní prostředek obsahující alespoň 2 proteiny *S. pneumoniae* vybrané ze skupiny zahrnující rodinu polyhistidinové triády (PhtX), rodinu vazebného proteinu pro cholin (CbpX), CbpX zkrácené formy, LytX rodinu, LytX zkrácené formy, chimérické proteiny CbpX zkrácená forma-LytX zkrácená forma, pneumolysin (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 a Sp133. Ve výhodném provedení je jeden protein z rodiny poly-histidinové triády (PhtX). V jiném výhodném

provedení je jeden z proteinů z rodiny vazebného proteinu pro cholin (CbpX), nebo zkrácená forma bpx, nebo chimérický protein CbpX zkrácená forma–LytX zkrácená forma.

5 V souvisejícím aspektu předkládaný vynález poskytuje vakcínu pro léčbu nebo zmírnění otitis media u dětí nebo pneumonie u starých jedinců. Volitelně vakcína dále obsahuje adjuvans, což je výhodně induktor TH1 reakce.

10 V ještě dalším příbuzném aspektu vynález poskytuje způsob pro výrobu vakcíny podle předkládaného vynálezu, ve kterém jsou selektovány a izolovány 2 různé proteiny *S. pneumoniae*, které jsou smíseny s farmaceuticky přijatelným nosičem.

15 Předkládaný vynález poskytuje vylepšenou vakcínu pro prevenci nebo zmírnění pneumokokové infekce u starých jedinců (např. pneumonie) a/nebo u dětí (např. otitis media), kde uvedená vakcína je na bázi pneumokokových proteinů. V jednom výhodném provedení je vakcína vhodná pro prevenci nebo zmírnění pneumokokové infekce starých jedinců. Protože většina dospělých se již setkala se *Streptococcus pneumoniae*, je vakcína podle předkládaného vynálezu určena pro dosycení existující imunitní reakce u dospělých a starých jedinců na protektivní úroveň, pomocí podání alespoň 2 pneumokokových proteinů identifikovaných v předkládaném vynálezu. Pneumokokové proteiny jsou podány za absence polysacharidů *S. pneumoniae*.

20 V předkládaném vynálezu je pacient považován za starého jedince, pokud je mu více než 55 let, obvykle více než 60 let, typicky více než 65 let. V jednom provedení tedy vynález poskytuje vakcinační prostředek obsahující pneumokokové proteiny pro prevenci pneumonie u starých jedinců.

25 V jiném provedení předkládaný vynález poskytuje vakcinační prostředek, vhodný pro použití u dětí (obvykle ve věku 0 až 2 let) obsahující dva nebo více pneumokokové proteiny identifikované v předkládaném vynálezu.

30 Pneumokokové proteiny podle předkládaného vynálezu

35 Proteiny *Streptococcus pneumoniae* podle předkládaného vynálezu jsou buď proteiny přítomné na povrchu, alespoň během části životního cyklu pneumokoka, nebo jsou to proteiny, které jsou secernovány nebo uvolňovány pneumokokem. Výhodně je kombinace proteinů podle předkládaného vynálezu vybrána ze 2 různých kategorií, jako jsou proteiny mající motiv signální sekvence typu II LXXC (kde X je jakákoliv aminokyselina, např., z rodiny polyhistidinové triády (PhtX), proteiny vážící cholin (CpbX), proteiny mající motiv signální sekvence typu I (např. Sp101), proteiny mající LPXTG motiv (kde X je jakákoliv aminokyselina, např., Sp128, Sp130), toxiny (např. Ply), atd. Výhodnými příklady v těchto kategoriích (nebo motivech) jsou následující proteiny nebo jejich imunologicky funkční ekvivalenty.

40 Imunogenní prostředek podle předkládaného vynálezu obsahuje alespoň 2 proteiny vybrané ze skupiny zahrnující rodinu polyhistidinové triády (PhtX), rodinu vazebných proteinů pro cholin (CbpX), CbpX zkrácené formy, LytX rodinu, LytX zkrácené formy, chimérické proteiny CbpX zkrácená forma–LytX zkrácená forma (nebo fúzní proteiny), pneumolysin (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 a Sp133. Nicméně, když je CbpX PspC, pak není druhý protein PspA nebo PsaA. Výhodně imunogenní prostředek obsahuje 2 nebo více proteinů vybraných ze skupiny zahrnující rodinu Poly Histidinové Triády (PhtX), rodinu vazebných proteinů pro cholin (CbpX), CbpX zkrácené formy, LytX rodinu, LytX zkrácené formy, chimérické proteiny (nebo fúze) CbpX zkrácená forma–LytX zkrácená forma, pneumolysin (Ply), PspA, PsaA a Sp128. Lépe imunogenní prostředek obsahuje 2 nebo více proteinů vybraných ze skupiny zahrnující rodinu poly histidinové triády (PhtX), rodinu vazebných proteinů pro cholin (CbpX), CbpX zkrácené formy, LytX rodinu, LytX zkrácené formy, chimérické proteiny (nebo fúze) CbpX zkrácená forma–LytX zkrácená forma, pneumolysin (Ply) a Sp128.

55

Pht (Poly Histidinová Triáda) rodina obsahuje proteiny PhtA, PhtB, PhtD a PhtE. Rodina je charakterizována lipidační sekvencí, dvě domény jsou separovány regionem bohatým na prolin a několika histidinovými triádami, které se snad účastní na vazbě kovů nebo nukleosidů nebo na enzymatické aktivitě, (3 až 5) stočenými regiony, a konzervovaném N-koncem a heterogenním C-koncem. Tato rodina je přítomná u všech testovaných kmenů pneumokoků. Homologní proteiny byly také zjištěny v jiných Streptokokách a Neisseriích. Mezi výhodné členy rodiny patří PhtA, PhtB a PhtD. Výhodněji obsahuje rodina PhtA nebo PhtD. Je třeba si uvědomit, že termíny Pht A, B, D a E označují proteiny mající sekvence popsané ve výše uvedených citacích, stejně jako jejich přirozené (a uměle vyrobené) variace, které mají sekvenci z alespoň 90 % identickou jako uvedené proteiny. Výhodně je sekvence alespoň z 95 % identická a nejlépe je alespoň z 97 % identická.

S ohledem na PhtX proteiny je PhtA popsán ve WO 98/18930, a je též označován jako Sp36. Jak bylo uvedeno výše, jedná se o protein z rodiny polyhistidinové triády a obsahuje typ II signálního motivu LXXC.

PhtD je popsán ve WO 00/37105, a je též označován jako Sp036D. Jak bylo uvedeno výše, jedná se také o protein z rodiny polyhistidinové triády a obsahuje typ II signálního motivu LXXC.

PhtB je popsán ve WO 00/37105, a je též označován jako Sp036B. Jiným členem PhtB rodiny je C3-degradující polypeptid, jak je popsán ve WO 00/17370. Tento protein patří též do rodiny polyhistidinové triády a obsahuje typ II LXXC signálního motivu. Výhodný imunologický funkční ekvivalent je protein Sp42 popsáný ve WO 98/18930. Zkrácená forma PhtB (přibližně 79kD) je popsána ve WO 99/15675 a je též považována za člena PhtX rodiny.

PhtE je popsán ve WO 00/30299 a je označován jako BVH-3.

Členové rodiny vazebných proteinů pro cholin (CbpX), byly původně identifikovány jako pneumokokové proteiny, které mohou být přečištěny cholinovou-afinitní chromatografií. Všechny vazebné proteiny pro cholin jsou nekovalentně navázány na fosforylcholinové skupiny kyseliny teichoové buněčné stěny a kyseliny lipoteichoové asociované s buněčnou membránou. Strukturně obsahují několik regionů společných celé rodině, ačkoliv se celkový přesný charakter proteinů může lišit (v aminokyselinové sekvenci, délce atd.). Obecně vazebné proteiny pro cholin obsahují N-terminální region (N), konzervované repetitivní regiony (R1 a/nebo R2), a region bohatý na prolin (F) a konzervovaný vazebný region pro cholin (C), tvořený mnoha repetitivními úseky, který tvoří přibližně jednu polovinu proteinu. Termín „rodina vazebných proteinů pro cholin (CbpX)“ označuje skupinu zahrnující vazebné proteiny pro cholin, jak jsou definovány ve WO 97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD a CbpG. CbpA je popsán v WO97/41151. CbpD a CbpG jsou popsány ve WO 00/29434. PspC je popsán v WO 97/09994. PbcA je popsán v WO 98/21337. SpsA je vazebný protein pro cholin popsáný ve WO 98/39450. Výhodně jsou vazebné proteiny pro cholin vybrané ze skupiny zahrnující CbpA, PbcA, SpsA a PspC.

Jiným výhodným provedením jsou CbpX zkrácené formy, kde „CbpX“ je definován výše a „zkrácené formy“ označují CbpX proteiny, kterým chybí 50 % nebo více vazebného regionu pro cholin (C). Výhodně takovým proteinům chybí celý vazebný region pro cholin. Výhodněji u takových zkrácených forem chybí (i) vazebný region pro cholin a (ii) a část N-koncové poloviny proteinu, za zachování alespoň jednoho repetitivního regionu (R1 nebo R2). Ještě výhodněji obsahuje zkrácená forma 2 repetitivní regiony (R1 a R2). Příklady takových výhodných provedení jsou NR1xR2 a R1xR2, jak jsou popsány ve WO 99/51266 nebo WO 99/51188, ale i další vazebné proteiny pro cholin bez podobného vazebného regionu spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.

LytX rodina jsou proteiny asociované s membránou asociované s buněčnou lýzou. N-koncová doména obsahuje vazebnou doménu pro cholin, ale LytX rodina nemá všechny vlastnosti uvedené u CbpA rodiny a tak je pro předkládaný vynález LytX rodina považována za rodinu odlišnou

od CbpX rodiny. Na rozdíl od CbpX rodiny C-koncová doména obsahuje katalytickou doménu rodiny LytX proteinu. Rodina zahrnuje LytA, B a C. S ohledem na LytX rodinu je LytA popsán v Ronda et al., Eur. J. Biochem, 164:621 až 624 (1987). LytB je popsán ve WO 98/18930, a je též označován jako Sp46. LytC je také popsán v WO 98/18930, a je též označován jako Sp91. Výhodným členem této rodiny je LytC.

Jiným výhodným provedením jsou LytX zkrácené formy, kde „LytX“ je definován výše a „zkrácené formy“ označují LytX proteiny bez 50 % nebo více vazebného regionu pro cholin. Výhodně takové proteiny neobsahují celý vazebný region pro cholin. Příklady takových zkrácených forem jsou uvedeny v příkladech provedení vynálezu.

Ještě dalším výhodným provedením předkládaného vynálezu jsou chimérické proteiny (nebo fúze) CbpX zkrácená forma–LytX zkrácená forma. Výhodně tyto formy obsahují NR1xR2 (nebo R1xR2) CbpX a C-koncovou část (C-term. tj. bez vazebných domén pro cholin) LytX (např., LytCCterm nebo Sp91Cterm). Výhodněji je CbpX vybraný ze skupiny zahrnující CpbA, PbcA, SpsA a PspC. Ještě výhodněji se jedná o CbpA. Výhodně je LytX LytC (též označovaný jako Sp91).

Jiným provedením předkládaného vynálezu je PspA nebo PsaA zkrácená forma bez vazebné domény pro cholin (C) a exprimovaná jako fúzní protein s LytX. Výhodně je LytX LytC.

Pneumolysin je multifunkční toxin s různými cytolytickými (hemolytickými) a komplement-aktivačními aktivitami (Rubins et al., Am. Respi. Cit Care Med., 153:1339 až 1346 (1996)). Toxin není secernován pneumokoky, ale uvolňuje se po lýze pneumokoků v důsledku působení autolysinu. Mezi jeho efekty patří, například, stimulace produkce zánětlivých cytokinů lidskými monocyty, inhibice pohybu řasinek v epitelu respiračního traktu u člověka, a snížení baktericidní aktivity a migrace neutrofilů. Nejvýznamnějším účinkem pneumolysinu je lýza erytrocytů, která zahrnuje vazbu na cholesterol. Protože se jedná o toxin, musí být detoxifikován (tj. musí být netoxický pro člověka, když je poskytnut v dávce vhodné pro ochranu) před tím, než je podán in vivo. Expres a klonování přirozeného nebo nativního pneumolysinu je známá v oboru. Viz, například, Walker et al. (Infect Immun, 55:1184 až 1189 (1987)), Mitchel et al. (Biochim Biophys Acta, 1007:67 až 72 (1989) a Mitchell et al. (Biochim Biophys Acta, 1007:67 až 72 (1989) a Mitchell et al (NAR, 18:4010 (1990)). Detoxifikace ply může být provedena chemickými prostředky, např. pomocí formalinu nebo glutaraldehydu nebo jejich kombinací. Takové metody jsou dobře známy v oboru pro různé toxiny. Tak vynález zahrnuje deriváty pneumokokových proteinů, jako jsou například mutované proteiny. Termín „mutovaný“, jak je zde použit, označuje to, že molekula, na které byla provedena delece, adice nebo substituce jedné nebo více aminokyselin za použití dobře známých technik, jako je místně cílená mutagenese nebo jiná běžná metoda. Například, jak je popsáno výše, mutantní ply protein může být pozměněn tak, že je biologicky inaktivní a zachovává si imunogenní epitopy, viz, například, WO 90/06951, Berry et al. (Infect Immun, 67:981 až 985 (1999)) a WO 99/03884.

Termín „Ply“, jak je zde použit, označuje mutovaný nebo detoxifikovaný pneumolysin vhodný pro lékařské použití (tj. netoxický).

PsaA a PspA a jsou oba známy v oboru. Například, PsaA a varianty s transmembránovou delecí byly popsány v Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255 až 62. PspA a varianty s transmembránovou delecí byly popsány v, například, US 5 804 193, WO 92/14488 a WO 99/53940.

Sp128 a Sp130 jsou popsány ve WO 00/76540.

Sp125 je příkladem povrchového proteinu pneumokoka s LPXTG motivem zakotveným v buněčné stěně (kde X je jakákoliv aminokyselina). Bylo zjištěno, že jakýkoliv protein s touto třídou pneumokokového povrchového proteinu s tímto motivem je užitečný v předkládaném vynálezu a

proto se považuje za další protein podle předkládaného vynálezu. Sp125 sám je popsán ve WO 98/18930, a je také znám jako ZmpB – zinková metaloproteinasa.

5 Sp101 je popsán ve WO 98/06734 (kde má označení #y85993). Je charakterizován signální sekvencí typu I.

Sp133 je popsán ve WO98/06734 (kde má označení #y85992). Je také charakterizován signální sekvencí typu I.

10 Proteiny podle předkládaného vynálezu mohou být také výhodně kombinovány. Mezi výhodné kombinace patří, například, PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2–Sp91Cterm chimérické nebo fúzní proteiny, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2–Sp91Cterm chimérické nebo fúzní proteiny, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + Lyt C, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Výhodně je NR1xR2 (nebo R1xR2) z CbpA nebo PspC. Výhodněji je z CbpA.

20 Zejména výhodná kombinace pneumokokových proteinů obsahuje Ply (nebo jeho zkrácenou formu nebo imunologicky funkční ekvivalent) + PhtD (nebo jeho zkrácenou formu nebo imunologicky funkční ekvivalent) + NR1xR2 (nebo R1xR2). Výhodně je NR1xR2 (nebo R1xR2) z CbpA nebo PspC. Výhodněji je z CbpA.

Předkládaný vynález také zahrnuje „imunologicky funkční ekvivalenty“ proteinů podle předkládaného vynálezu. „Imunologicky funkční ekvivalent“ je definován jako peptid nebo protein obsahující alespoň jeden protektivní epitop z proteinu podle předkládaného vynálezu. Takové epitopy jsou obvykle vystaveny na povrchu, jsou vysoce konzervovány a mohou vyvolat baktericidní protilátkovou reakci u hostitele nebo mohou zabránit toxickým účinkům. Výhodně může být použit funkční ekvivalent obsahující alespoň 15 a výhodně 30 nebo více sousedících aminokyselin z proteinu podle předkládaného vynálezu, za podmínky, že tyto ekvivalenty jsou schopné 30 vyvolat v podstatě stejnou imunologickou reakci jako přirozený protein. Pozice potenciálních B-lymfocytárních epitopů v proteinové sekvenci může snadno určena pomocí identifikace peptidů, které jsou jak vystavené na povrchu, tak antigenní, kde toto určení lze provést za použití kombinace dvou metod: 2D–strukturální predikce a predikce antigenního indexu. Predikce 2D–struktury může být provedena za použití PSIPRED programu (od David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK). Antigenní index může být vypočítán způsobem podle Jamesona a Wolfa (CABIOS 4:181 až 186 [1988]).

Předkládaný vynález má výhody oproti jiným *S. pneumoniae* polysacharidovým vakcínám v tom, (imunogenní) prostředky obsahující více *S. pneumoniae* proteinů mohou poskytovat větší zkříženou ochranu před více serotypy, mohou více inhibovat adhezenci a tvorbu kolonií a mohou potenciálně vyvolávat tvorbu protilátek, které mohou neutralizovat toxické/enzymatické funkce patogenu. Dále, další povrchové antigeny poskytují prostředky pro další stimulaci opsonofagocytosy.

45 Předkládaný vynález také zahrnuje kombinované vakcíny, které poskytují ochranu před různými patogeny. Mnoho pediatrických vakcín se v současnosti podává ve formě kombinovaných vakcín, aby se redukoval počet injekcí, které dítě musí dostat. Tak mohou být pediatrické vakcíny obsahující antigeny z jiných patogenů formulovány s vakcínami podle předkládaného vynálezu. Například mohou být vakcíny podle předkládaného vynálezu formulovány s (nebo podávány 50 samostatně, ale ve stejnou dobu) dobře známou „trivalentní“ kombinovanou vakcínou obsahující Diphtherický toxoid (DY), tetanický toxoid (IT), pertussovou složku [typicky detoxifikovaný Pertussický toxoid (P1) a filamentosní haemaglutinin (FHA) volitelně s pertactinem (PRN) a/nebo aglutininem 1+2], například s prodávanou vakcínou IFANRIX–DTPa[™] (SmithKline Beecham Biologicals), která obsahuje DT, IT, PT, FHA a PRN antigeny, nebo s pertusovou složkou tvořenou celými buňkami, jako je například vakcína prodávaná SmithKline Beecham Biologicals 55

s.a. jako Tritanrix[™]. Kombinovaná vakcína může také obsahovat další antigen, jako je povrchový antigen viru hepatitidy B (HBsAg), antigeny Polio viru (například inaktivovaný trivalentní polio virus – IPV), proteiny vnější membrány *Moraxella catarrhalis*, non-typické proteiny *Haemophilus influenzae*, proteiny vnější membrány *N. meningitidis* B.

Příklady výhodných proteinových antigenů *Moraxella catarrhalis*, které mohou být obsaženy v kombinované vakcíně (zejména pro prevenci otitis média) jsou: OMP106, [WO 97/41731 (Antex) & WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA a/nebo LbpB [WO 98/55606 (PMC)]; ThpA a/nebo ThpB [WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)]; CopB Welminen ME, et al. (1993) Infect. Immun. 61:2003–2010]; UspA1 a/nebo UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas)]; UspA1 a/nebo UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824); PilQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); lipo06 (GB9917977.2); Lipo10 (GB 99182-08.1); lipo11 (GB 9918302.2); lipo18 (GB 9918038.2); P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); Omp1A1 (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257); a OmpE. Příklady netypických antigenů *Haemophilus influenzae*, které mohou být obsaženy v kombinované vakcíně (zejména pro prevenci otitis media) jsou: Fimbrinový protein [US 5 766 708 – Ohio State Research Foundation] a fúze obsahující peptidy odvozené od tohoto proteinu (např. LB1(f) fúzní peptidy; US 5 843 464 (OSU) nebo WO 99/64067]; OMP26 (WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [HP 281673 (State University of New York)]; TbpA a/nebo ThpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmwl; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (WO 94/12641); protein D (EP 594 610); P2; a P5 (WO 94/26304).

V jiném provedení mohou být různé antigeny uvedené výše obsaženy v imunogenním prostředku podle předkládaného vynálezu jako antigeny přítomné na povrchu vnějších membránových vesi- kul (záhybů) vyrobených z bakterií, ze kterých jsou získány.

Dalšími zahrnutými kombinacemi jsou proteiny *S. pneumoniae* podle předkládaného vynálezu v kombinaci s virovými antigeny, například od chřipkového viru (atenuované, rozdělené nebo podjednotkové [např. povrchové glykoproteiny neuraminidasa (NA) a haemagglutinin (HA). Viz např., Chaloupka I. et al., Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15: 121 až 127], RSV (např. F a G antigeny nebo F/G fúze, viz např. Schmidt A. C. et al., J Virol, May 2001, p 4594 až 4603), PIV3 (např. HN a F proteiny, viz Schmidt et al., výše), Varicella (např., attenuované, gly- koproteiny I–V, atd.), a jakékoliv (nebo všechny) složky NMR (spalničky, zarděnky, příušnice).

Polysacharidové antigeny podle předkládaného vynálezu

Předkládaný vynález také zahrnuje kombinované vakcíny s 2 nebo více *S. pneumoniae* proteiny v kombinaci s polysacharidy jinými než z *S. pneumoniae*. Takové polysacharidy mohou být izo- lovány například z *H. influenzae*, *H. influenzae* typu B (Hib), *N. meningitidis* skupin A, C, W, Y, Streptokoků jiných než *S. pneumoniae* (např. Streptococcus skupiny B, *S. pyogenes*, atd.), Sta- phylococcus (např., *E. faecalis* a *E. faecium*) atd. Výhodně jsou polysacharidy z *H. influenzae* typu B (Hib), a/nebo *N. meningitidis* skupin A, C, W135, a/nebo Y.

Jak bylo uvedeno výše, problém spojený s polysacharidovým přístupem k vakcinaci spočívá v tom, že polysacharidy sami o sobě jsou slabými imunogeny. Pro překonání tohoto problému mohou být polysacharidy konjugovány na proteinové nosiče, které jsou pomocnými stimulanty T-lymfocytů. Proto je výhodné, aby byly polysacharidy použité v předkládaném vynálezu navá- zané na takové proteinové nosiče. Příklady takových nosičů, které jsou pomocnými stimulanty T-lymfocytů. Proto je výhodné, aby byly polysacharidy použité v předkládaném vynálezu navá- zané na takové proteinové nosiče. Příklady takových nosičů, které jsou v současnosti běžně pou- žívané pro produkci polysacharidových imunogenů jsou difterický a tetanický toxoid (DT, DT CRM197, jiné DT mutanty, např. v pozici Glu–148, atd. [viz, např., US 4 709 017, WO 93/- 25210, WO 95/33481, atd.] a TT (a TT fragment C), v příslušném pořadí, přílipkový haemokya- nin (KLH), OMPC z *N. meningitidis*, a přečištěný proteinový derivát tuberkulinu (PPD).

Dalším nosičem pro imunogenní prostředky na bázi polysacharidů (nebo vakcíny) je protein D Z Haemophilus influenzae (EP 594610-B), nebo jeho fragmenty. Fragmenty vhodné pro použití jsou fragmenty obsahující T-helper epitopy. Konkrétně, fragment proteinu D bude výhodně obsahovat N-koncovou 1/3 proteinu.

5

Polysacharid může být navázán na proteinový nosič jakoukoliv známou metodou (například Likhite, U.S. Patent 4 372 945 a Armor et al., U.S. Patent 4 474 757). Výhodně je provedena CDAP konjugace (WO 95/08348). Pro zesílení imunogenicity mohou mít polysacharidy upravenou velikost (mohou být depolymerizovány), mohou obsahovat adjuvans, mohou být lyofilizovány nebo

10

TH1 adjuvans podle předkládaného vynálezu

Vakcíny podle předkládaného vynálezu obsahují výhodně adjuvans. Mezi vhodná adjuvans patří soli hliníku, jako je gelový hydroxid hlinitý (kamenec) nebo fosforečnan hlinitý, ale mohou také obsahovat vápník, hořčík, železo nebo zinek, nebo obsahovat nerozpustnou suspenzi acylovaného tyrosinu, nebo acylovaných sacharidů, kationtově nebo aniontově derivatizovaných polysacharidů, nebo polyfosfazenů. Je výhodné, aby vybrané adjuvans bylo přednostním induktorem odpovědi TH1 typu. Vysoké koncentrace cytokinů Th1-typu upřednostňují indukci buněčné imunitní reakce na daný antigen, zatímco vysoké koncentrace cytokinů Th2-typu vedou přednostně k indukci protilátkové imunitní reakce na antigen.

15

20

Je důležité si uvědomit, že odlišení imunitní reakce Th1 a Th2 typu není absolutní. Ve skutečnosti se u jedinců bude rozvíjet imunitní reakce, která je převažujícím způsobem typu Th1 nebo Th2. Nicméně, často je výhodné rozdělovat rodiny cytokinů tak, jak je popsáno na myších CD4 +ve T – lymfocytárních klonech v Mosmann a Coffman (Mosmann, T. R. a Coffman, R. L. (1989) Th1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p 145–173). Tradičně jsou reakce Th1-typu asociované s produkcí IFN- γ a IL-2 cytokinů T-lymfocyty. Další cytokiny často přímo asociované s indukcí imunitní reakce Th1-typu nejsou produkovány T-lymfocyty, jako je IL-12. Naopak, reakce Th2-typu jsou asociované se sekrecí IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Vhodné adjuvantní systémy, které podporují hlavně reakce Th1 typu, jsou: Monofosforyl lipid A nebo a jeho deriváty, zejména 3-de-O-acylovaný monofosforyl lipid A (3D-MPL) (pro jeho přípravu viz GB 2220211 A); kombinace monofosforyl- lipidu A, výhodně 3-de-O-acylovaného monofosforyl-lipidu A, a soli hliníku (například fosforečnanu hlinitého nebo hydroxidu hlinitého) nebo emulze olej ve vodě. V takových kombinacích jsou antigen a 3D-MPL obsaženy ve stejné struktuře, což umožňuje účinné dodání antigenních a imunostimulačních signálů. Studie prokázaly, že 3D-MPL je schopen dále zesilovat imunogenicitu antigenu adsorbovaného na kamenec [Thoelen et al. Vaccine (1998) 16:708–14; EP 689 454 B1].

30

35

40

Posílený systém je například kombinace monofosforyl lipidu A a saponinového derivátu, zejména kombinace QS21 a 3D-MPL, jak je popsána ve WO 94/00153, nebo méně reaktogenní prostředek, kde je QS21 utlumen cholesterolem a který je popsán ve WO 96/33739.

45

Zejména účinný adjuvantní prostředek obsahující QS21, 3D-MPL a tokoferol v emulzi olej ve vodě je popsán ve WO 95/17210, a tento prostředek je výhodným prostředkem.

Výhodně vakcína dále obsahuje saponin, výhodněji QS21. Prostředek může dále obsahovat emulzi olej ve vodě a tokoferol (WO 95/17210).

50

Předkládaný vynález také poskytuje způsob pro přípravu vakcinačního prostředku, který zahrnuje smísení proteinu podle předkládaného vynálezu s farmaceuticky přijatelnou přísadou, jako je 3D-MPL.

Nemethylované CpG obsahující oligonukleotidy (WO 96/02555) jsou také přednostními induktory TH1 reakce a jsou použitelné v předkládaném vynálezu.

5 V dalším aspektu předkládaného vynálezu je poskytnuta vakcína, jak zde byla popsána, pro použití v medicíně. Jedním provedením vynálezu je způsob pro prevenci nebo zmírnění pneumonie u starších jedinců, při kterém je uvedenému staršímu pacientovi podáno bezpečné a účinné množství vakcíny podle předkládaného vynálezu a volitelně Th1 adjuvans.

10 V dalším provedení vynález poskytuje způsob pro prevenci nebo zmírnění otitis media u kojenců (do 24 měsíců) nebo batolat (24 měsíců až 5 let), při kterém je uvedenému kojenci nebo batoleti podáno bezpečné a účinné množství vakcíny obsahující *Streptococcus pneumoniae* proteiny podle předkládaného vynálezu a volitelně Th1 adjuvans.

Vakcinační prostředky podle předkládaného vynálezu

15 Vakcinační prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro chránění nebo léčbu savců (výhodně lidí) vnímavých k infekci, pomocí podání uvedené vakcíny systémovým nebo slizničním způsobem. Toto podání může být formou intramuskulární, intraperitoneální, intradermální nebo podkožní; nebo prostřednictvím sliznice, jak je tomu u orálního/alimentárního
20 podání a podání do respiračního, genitourinárního traktu. Intranasální podání vakcín pro léčbu pneumonie nebo otitis media je výhodné (protože může být zabráněno nasofaryngeálnímu přenosu pneumokoků, což zmírní infekci v jejím nejčasnějším stadiu). Ačkoliv může být vakcína podle předkládaného vynálezu podána v jedné dávce, mohou být její složky podány také současně nebo v různou dobu (například, pokud je ve vakcíně obsažen polysacharid, může být podán
25 samostatně ve stejnou dobu nebo 1 až 2 týdny, po podání kombinace bakteriálních proteinů, za účelem optimální koordinace imunitní reakce. Kromě jediného způsobu podání mohou být použity dva různé způsoby podání. Například, virové antigeny mohou být podány ID (intradermálně), zatímco bakteriální proteiny mohou být podány IM (intramuskulárně) nebo IN (intranasálně). Pokud jsou přítomné polysacharidy, tak mohou být podávány IM (nebo ID) a bakteriální proteiny
30 mohou být podávány IN (nebo ID). Dále, vakcíny podle předkládaného vynálezu mohou být podány IM pro první dávku a IN pro dosycovací injekce.

Množství konjugovaného antigenu v každé dávce vakcíny je vybráno jako množství, které indukuje imunoprotektivní reakci bez významnějších nežádoucích účinků typických u vakcín. Takové
35 množství se velmi liší podle toho, jaký imunogen je použit a jak je prezentován. Obsah proteinových antigenů ve vakcíně je obvykle v rozmezí 1 až 100 µg, výhodně 5 až 50 µg a nejlépe 5 až 25 µg. Pokud jsou použity polysacharidy, tak předkládaná, že každá dávka bude obsahovat 0,1 až 100 µg polysacharidu, výhodně 0,1 až 50 µg, výhodněji 0,1 až 10 µg, kdy 1 až 5 µg je výhodná dávka.

40 Optimální množství složek pro každou konkrétní vakcínu může být zjištěno za použití standardních studií využívajících pozorování vhodných imunitních reakcí u jedinců. Po iniciální vakcinaci může být jedinci podána jedna nebo více dosycovacích imunizací, které jsou podány v adekvátní dobu. Typicky bude vakcína obsahovat antigen (proteiny), adjuvans a přísady nebo farmaceuticky přijatelné nosiče.
45

Příprava vakcín je obecně popsána ve Vaccine Design („The subunit and adjuvans approach“ (ed. Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press, New York). Enkapsulace v liposomech je
50 popsána ve Fullerton, US Patent 4 235 877.

Ačkoliv mohou být vakcíny podle předkládaného vynálezu podány jakýmkoliv způsobem, je podání popsaných vakcín do kůže (ID) jedním z provedení předkládaného vynálezu. Lidská kůže je tvořena vnější „rohovitou“ pokožkou, která se nazývá stratum corneum, pod kterou leží epidermis. Pod epidermis je vrstva označovaná jako dermis a pod touto vrstvou je podkožní tkáň.
55 Výzkumníci prokázali, že injekce vakcíny do kůže, konkrétně do dermis, stimuluje imunitní re-

akci, která může být také asociována s mnoha dalšími výhodami. Intradermální vakcinace vakcínami podle předkládaného vynálezu tvoří výhodný rys předkládaného vynálezu.

- 5 Běžná technika intradermální vakcinace, „mantoux technika“, obsahuje kroky desinfekce kůže, a potom napnutí kůže jednou rukou zavedení tenké jehly (26–31 gauge) v úhlu 10 až 15°. Jakmile se hrana jehly zavede, tak se tělo jehly sníží a posunuje se dále, což se projeví zvedáním kůže při mírném tlaku. Potom se velmi pomalu injikuje kapalina, která vytvoří puchýř na kůži a potom se jehla vyjme.
- 10 Nověji byly popsány prostředky, které jsou specificky určené pro podání kapaliny do nebo skrz kůži, jako jsou například prostředky popsané ve WO 99/34850 a EP 1 092 444, a také tryskové injekční prostředky popsané například ve WO 01/13977; US 5 480 381, US 5 599 302, US 5 334 144, US 5 993 412, US 5 649 912, US 5 569 189, US 5 704 911, US 5 838 851, US 5 893 397, US 5 466 220, US 5 339 163, US 5 312 335, US 5 503 627, US 5 064 413, US 15 5 520 639, US 4 596 556, US 4 790 824, US 4 941 880, US 4 940 460, WO 97/37705 a WO 97/13537. Mezi alternativní metody intradermálního podání vakcíny patří použití běžných injekčních stříkaček a jehel, nebo použití zařízení pro balistické podání solidních vakcín (WO 99127961), nebo použití transdermálních náplastí (WO 97/48440; WO 98/28037); nebo aplikace na povrch kůže (transdermální nebo transkutánní podání) WO 98/20734; WO 98/28037).
- 20

Když jsou vakcíny podle předkládaného vynálezu podávány do kůže, nebo přesněji do dermis, tak jsou vakcíny v malém objemu kapaliny, konkrétně v objemu mezi přibližně 0,05 ml a 0,2 ml.

- 25 Obsah antigenů v kožních nebo intradermálních vakcínách podle předkládaného vynálezu může být podobný jako v běžných intramuskulárních vakcínách. Tak mohou být proteinové antigeny přítomny v intradermálních vakcínách v dávce v rozmezí 1 až 100 µg, výhodně 5 až 50 µg. Obdobně, pokud je polysacharid konjugovaný s antigenem přítomen, tak je polysacharid přítomen v dávce 0,1 až 100 µg, výhodně 0,1 až 50 µg, výhodněji 0,1 až 10 µg, a nejlépe v dávce mezi 1 a 5 µg. Nicméně, charakteristikou kožních nebo intradermálních vakcín je to, že mohou být tvořeny „nízkou dávkou“. Proto jsou proteinové antigeny v „nízkodávkových vakcínách“ přítomny v dávce pouze 0,1 až 10 µg, výhodně 0,1 až 5 µg na dávku; a pokud je polysacharid konjugovaný s antigenem přítomen, tak je polysacharid přítomen v dávce 0,1 až 1 µg, výhodně 0,01 až 0,5 µg polysacharidu na dávku.
- 30

- 35 Termín „intradermální podání“, jak je zde použit, označuje podání vakcíny do regionu dermis v kůži. Nicméně, vakcína nemusí být lokalizována výlučně v dermis. Dermis je vrstva kůže lokalizovaná mezi přibližně 1,0 a přibližně 2,0 mm od povrchu lidské kůže, ale existují určité variace mezi jedinci a různými částmi těla. Obecně se předkládá, že bude dosaženo dermis, pokud se pronikne 1,5 mm pod povrch kůže. Dermis je umístěna mezi stratum corneum a epidermis na povrchu a podkožní vrstvou směrem dolů. Podle způsobu podání může být vakcína nakonec lokalizována primárně nebo pouze v dermis, nebo může být nakonec umístěna v epidermis a dermis.
- 40

- 45 V jiném aspektu předkládaný vynález poskytuje DNA kódující jeden nebo více proteinů *S. pneumoniae*, takže jsou tyto proteiny generované in situ. DNA může být přítomna v jakémkoliv z mnoha systémů pro její podání známých odborníkům v oboru, včetně systémů pro expresi nukleové kyseliny, bakteriálních a virových expresních systémů. Mnoho technik pro přenos genů je známo v oboru a jsou popsány například v Rolland, Crit Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143 až 198, 1998 a odkazech citovaných v této publikaci. Vhodné systémy pro expresi nukleové kyseliny obsahují nutné DNA sekvence pro expresi u pacienta (jako je vhodný promotor a terminační signál). Když je expresním systémem rekombinantní živý mikroorganismus, jako je virus nebo bakterie, tak může být požadovaný gen insertován do genomu živého rekombinantního viru nebo bakterie. Inokulace a in vivo infekce tímto živým vektorem povede k expresi antigenu in vivo a k indukci imunitní reakce. Viry a bakterie vhodné pro tento účel jsou například: poxviry (např.; virus vakcinie, viru kuřecích neštovic, canarypoxvirus), alfaviry (Sindbis virus,
- 55

Semliky Forest Virus, virus venezuelské koňské encefalitidy), adenoviry, adeno–asociovaný virus, picornaviry (poliovirus, rhinovirus), herpesviry (virus varicella zoster virus), Listeria, Salmonella, Shigella, Neisseria, BCG. Tyto viry a bakterie mohou být virulentní nebo různými způsoby oslabené, aby byly získány živé vakcíny. Takové živé vakcíny tvoří rovněž součást předkládaného vynálezu.

V dalším aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob přípravy vakcíny podle předkládaného vynálezu, kde tento způsob zahrnuje smísení kombinace proteinů podle předkládaného vynálezu.

Výhodně jsou antigenní prostředky (a vakcíny), které obsahují polysacharidy popsané výše, lyofilizovány do doby použití, kdy jsou rekonstituovány za použití ředidla. Výhodněji jsou lyofilizovány za přítomnosti 3D–MPL a jsou rekonstituovány za použití salinického roztoku.

Lyofilizace vakcín je dobře známé v oboru. Obvykle se kapalná vakcína suší vymrácením za přítomnosti činidla zabráňujících tvorbě sraženin, jak je například sacharid, např. sacharóza nebo laktóza (která je přítomná v počáteční koncentraci 10 až 200 mg/ml). Lyofilizace má obvykle několik kroků, například začíná cyklus při -69°C , postupně se teplota upraví na -24°C během 3 hodin, potom se tato teplota udržuje po dobu 18 hodin, potom se postupně upraví na -16°C během 1 hodin, potom se tato teplota udržuje po dobu 6 hodin, potom se během 3 hodin upraví na $+34^{\circ}\text{C}$ a nakonec se tato teplota udržuje po dobu 9 hodin.

Imunogenní prostředky a vakcíny podle předkládaného vynálezu mohou být hodnoceny na různých zvířecích modelech nebo za použití lidského séra. Například následující zvířecí modely mohou být použity pro hodnocení pneumokokové infekce. C3H/HeJ Myši (stáří 6 až 8 týdnů) mohou být imunizovány s.c. 15 μg proteinu s 50 μg CFA adjuvans, a za 3 až 4 týdny potom se provede dosycovací imunizace 15 μg proteinu s IFA. Pro demonstrování pasivní a aktivní ochrany před systémovou infekcí může být myším intraperitoneálně podáno imunitní sérum nebo protein před intraperitoneální injekcí 15 až 90LD50 pneumokoků v týden 8–10. Dále mohou být proteiny testovány v myším modelu kolonizace nasopharyngu (Wu et al., Microbial Pathogenesis 1997; 23:127 až 137).

Kromě myší jsou mláďata krys citlivé na kolonizaci a infekci *S. pneumoniae*. V modelech pasivní ochrany může být podání myšího imunního séra (100 μl i.p. nebo 10 μl i.p. nebo 10 μl i.n.) provedeno před intranasálním podáním *S.pneumoniae* (10 μl) u krysích mláďat stáří 2 až 5 dnů. Kolonizace může být určena kultivací nasálních výplachů (20 až 40 μl se instiluje, 10 μl se odebere).

Výhodné interakce mezi proteinovými složkami v kombinované vakcíně mohou být demonstrovány podáním dávky každého proteinu ve vakcíně, která je sub–protektivní v monovalentní vakcíně. Zvýšená protektivní účinnost ve srovnání s monovalentními vakcínami může být přisouzena výhodným interakcím mezi jednotlivými složkami.

Vynález je dále ilustrován v následujících příkladech. Příklady jsou provedeny za použití standardních technik, které jsou známé a rutinní pro odborníky v oboru, nebo které jsou popsány podrobně. Příklady jsou uvedeny pro dokreslení předkládaného vynálezu a nijak neomezuji jeho rozsah.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1. Konstrukce a exprese antigenů

NR1xR2

CbpA je 75 kDa povrchový protein skládající se z několika domén. N–koncová doména obsahuje 2 vysoce konzervované repetitivní sekvence (R1 a R2) a C–koncová doména obsahuje 10 tandemových, přímo repetitivních sekvencí o 20 aminokyselinách. Připravila se CbpA zkrácená forma pro produkci NR1XR2, tj. forma bez vazebné domény pro cholin.

5

NR1XR2 gen se amplifikoval, pomocí PCR, z DNA získané z kmene serotypu 4 *S. pneumoniae* (viz, např., WO 97/41157, nebo WO 99/51266). PCR se provedla za použití Expand High Fidelity PCR Systému, nebo Hi–Fi (Roche). Skládala se ze směsi obsahující Taq polymerasu a „proofreading“ polymerasu. V důsledku vlastní 3'–5' exonukleasové „proofreading“ aktivity vede použití Hi–Fi ke 3krát vyšší spolehlivosti DNA syntézy ve srovnání s Taq polymerasou.

10

PCR fragmenty se klonovaly v pGEM–T vektoru od pGEM–T Vector Systems (Promega). Tento krok je nutný pro usnadnění trávení PCR fragmentu restrikcími enzymy pro další ligaci. pGEM–T vektor je použit v lineární formě a obsahuje 3'–T přesahy. Tyto přesahy usnadňují inserci PCR produktů získaných termostabilními polymerasami, které přidávají jediný deoxyadenosin, bez závislosti na templátu, k 3' koncům amplifikovaného fragmentu.

15

Fragmenty a vektory se přečistily pro enzymatické trávení (NdeI a XbaI trávení) podle Before–Parsons et al. (Nucleic Acids Research, 23, 4926 až 4927, 1995). Agaróзовые řezy se zcela lyofilizovaly během 3 až 4 hodin. 1:1 roztok ethanol–TE se přidal k lyofilizovanému gelu. Vzorek se mírně mísil po dobu 1 hodiny a agaróza se lisovala a zcela se odstranila odstředěním. DNA se získala z eluátu pomocí srážení ethanolem.

20

DNA kódující NR1XR2 se klonovala do vektoru obsahujícího dlouhý promotor L z fágu λ . Požadovaný protein může být indukován teplem, když je přítomen v AR 58 kmenu *E.coli*, nebo kyselinou nalidixovou, když je přítomen v AR 120 kmenu *E.coli*.

25

Prekultivace bakterií se provedla přes noc při teplotě 30 °C. Tato prekultura se naředila přibližně 40–krát v celkovém objemu 20 ml a ponechala se při 30 °C do dosažení O.D. 0,4 až 0,6. Potom se provedla tepelná indukce při 42 °C. Vzorky se odebíraly v různou dobu. Jeden ml kultury se odstředil 5 minut při 7000 rpm. Supernatant kultury se konzervoval při –20 °C a peleta (celkový extrakt) se resuspendovala v 500 μ l vzorkového pufru (western blot nebo SDS–PAGE analýza), nebo v 500 μ l lyzačního pufru, a provedla se inkubace po dobu 30 minut při 37 °C (ELISA). Složení lyzačního pufru je: SDS 0,1%, deoxycholát 0,1%, Na citrát: 0,015 M.

30

35

Vzorky se zpracovaly na SDS–PAGE, kde se vnesly na 4 až 20% gel (Novex, Invitrogen). Migrace se provedla při 200 V. Provedlo se barvení Coomassie modří. Vzorky se vnesly na 4 až 20 % gel (Novex, Invitrogen) pro Westernovou hybridizaci. Migrace se provedla při 200 V. Gely se přenesly na nitrocelulózu a skvrny se vizualizovaly králičí α –NR1XR2 polyklonální protilátkou (první protilátka) a α –králičí protilátkou navázanou na alkalickou fosfátasu (druhá protilátka).

40

Proužek velikosti přibližně 55 kDa se pozoroval při SDS–PAGE analýze. Klon 28B2 se vybral podle SDS–PAGE analýzy a přenesl se pro fermentaci. Tento klon se sekvenoval a jeho sekvence se potvrdila (aminokyseliny 39 (tj. po signální sekvenci) až 446 = 406 aminokyselin).

45

Také se studovala rozpustnost NR1XR2, po lýze přes noc indukovaných bakterií následované odstředěním. Provedla se SDS–PAGE analýza a ELISA. NR1XR2 se zdál být získaný hlavně (>95%) v solubilní frakci.

50

R1XR2, PhtD, Sp91, (N)RJXR2–Sp91 [C–koncová doména], a Ply

Tyto geny byly také klonovány, sekvenovány a exprimovány, podobně jako NR1XR2. R1XR2 obsahuje aminokyseliny 177 až 443 CbpA (*S. pneumoniae* serotyp 4N), PhtD obsahuje aminokyseliny

seliny 21 (tj. po signální sekvenci) až do konce (aminokyselina 839 *S. pneumoniae*, serotypu 4N), Sp91 začíná aminokyselinou 20 (VAA) a končí koncem sekvence. Pro fúzní proteiny, R1xR2–Sp91Cterm obsahuje aminokyseliny 177–446 CbpA a aminokyseliny 271 až translační stop kodon; NR1xR2–Sp91Cterm obsahuje aminokyseliny 39–446 CbpA a aminokyseliny 271 až translační stop kodon. Pro fúzní proteiny se 2 další aminokyseliny (GS) nacházejí mezi (N)R1xR2 a Sp91Cterm sekvencemi. Pro všechny konstrukty byl ATG kodon vložen 5' k začátku genu pro umožnění transkripce a translace, což znamená, že před každou sekvencí zmíněnou výše existuje další N–terminální methionin.

10

Příklad 2. Serologie

Za použití séra z klinických studií se pomocí ELISA měřily protilátkové reakce, které se přirozeně vyvíjejí na proteiny *S. pneumoniae*.

15

2.1. Postup

- Vzorky séra
 - Párové sérum od kojenců odebírané ve věku 2 až 4 měsíce a 6 až 12 měsíců, v příslušném pořadí (N = 20, studie DTP a HBV).
 - Sérum od dospělých věku ~20 let (N = 50).
 - Sérum od dospělých věku ~65 let (N = 140).
- ELISA test

Imunoplotny se potáhly přes noc při 4 °C 1 µg/ml každého proteinu. Sériová dvounásobná ředění séra (od ředění 1/10) se potom inkubovala po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti (RT) za třepání. Imunodetekce se provedla za použití monoklonální protilátky proti lidskému IgG konjugované s peroxidasou (Strateck, HP6043) ředěné 4000krát a provedla se inkubace po dobu 30 minut při teplotě místnosti za třepání. Po detekci se střední titry vypočetly za použití SoftMaxPro. Séra s titry ≥ 10 se považovala za pozitivní. Pro výpočet geometrického průměru se titr 5 (polovina hraniční hodnoty) arbitrárně přiřadil k negativnímu séru.

Koncentrace IgG v µg/ml se určily srovnáním optických densit (OD) s OD křivkou chromopure IgG (Jackson) zachyceného na plotně polyklonálními kozími protilátkami proti lidskému IgG a detekovaného za použití stejné peroxidázou značené protilátky jako výše.

2.2. Výsledky

2.2.1 Serologie Strep proteinu u kojenců

40

Nejvyšší titry protilátek a stupně seropozitivity v séru od kojenců věku 2 až 4 měsíce byly získány pro PhtD, PsaA, Sp128, NR1xR2 a méně pro Sp91 a Ply. Žádné nebo slabé odpovědi byly detekovány pro Sp101 a Sp130. Sp46 a PhtA nebyly testovány (z důvodu dostupnosti materiálu).

Protilátková reakce se obvykle snížila v séru stejných jedinců, které bylo odebráno ve věku 6 až 12 měsíců, což ukazuje, že tyto vysoké titry byly způsobeny zejména přítomností pasivně přenesených protilátek od matky.

Nicméně, u některých dětí se imunitní reakce na některé proteiny zvyšovala s věkem, pravděpodobně v důsledku přirozené expozice pneumokokům. Antigenem odpovědný za tuto serokonverzi byl jasně PsaA. U některých jedinců bylo také pozorováno zvýšení koncentrace protilátek k PhtD, NR1xR2, Sp128, Sp91 a Ply. Byly pozorovány pouze marginální variace v protilátkové reakci na Sp101 a Sp130. (Viz obr. 1 a 2).

2.2.2 Serologie Strep proteinu u mladších dospělých

Podle geometrických průměrů titrů jsou PhtD, PhtA a NR1xR2 nejvíce imunogenními proteiny v hodnocené populaci mladších dospělých, a po nich následuje Sp128, Ply a Sp91. Všichni jedinci mají detekovatelné protilátky, k těmto proteinům. Nejnižší reakce byly zjištěny pro Sp46, a zejména pro Sp130 a Sp101. PsaA nebyl testován (nebylo k dispozici dostatečné množství séra) (viz obr. 3 a 4).

2.2.3 Serologie Strep proteinu u starších dospělých

Bylo zjištěno zřetelné snížení koncentrace protilátek k Strep proteinům u starších dospělých ve srovnání s mladšími dospělými. U starších lidí je nejlepším imunogenem PhtD, a po něm Sp128, NR1xR2, Sp91, Ply a PsaA. Pouze marginální reakce byly zjištěna pro Sp101 a Sp130. Sp46 a PhtA nebyly testovány (špatná dostupnost materiálu) (viz obr. 5 a 6).

Tabulka 1: Geometrický průměr koncentrace IgG (GMC), v µg/ml, u starších lidí

Protein	IgG (GMC, µg/ml)
PhtD	19
NR1xR2	3, 5
Sp91	2, 5
Ply	2, 3

Všechny publikace, včetně patentů a patentových přihlášek, citované v předkládaném vynálezu, jsou zde uvedeny ve své úplnosti jako odkazy.

Byla popsána výhodná provedení předkládaného vynálezu. Je zřejmé, že existují různé modifikace popsaných provedení, která spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Imunogenní prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje alespoň 2 proteiny *S. pneumoniae*, kde jedním z proteinů je PhtD a druhým proteinem je detoxifikovaný pneumolysin, Ply.

2. Imunogenní prostředek podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje NR1xR2 nebo R1xR2 z CbpA nebo PspC.

3. Imunogenní prostředek podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že pneumolysin je detoxifikován chemicky.

4. Imunogenní prostředek podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že pneumolysin je detoxifikován geneticky.

5. Imunogenní prostředek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje další antigen zvolený ze skupiny sestávající z povrchového antigenu viru hepatitidy

B, HBsAg; antigenů Polio viru; proteinů vnější membrány Moraxella catarrhalis; proteinů netypovatelného kmene Haemophilus influenzae a proteinů vnější membrány N. meningitidis B.

5 **6.** Imunogenní prostředek podle nároku 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dalším antigenem je protein netypovatelného kmene Haemophilus influenzae.

7. Imunogenní prostředek podle nároku 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dalším antigenem je protein D netypovatelného kmene Haemophilus influenzae.

10 **8.** Imunogenní prostředek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje adjuvans.

9. Imunogenní prostředek podle nároku 8, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že adjuvant je přednostním induktorem odpovědi TH1 typu.

15 **10.** Vakcína, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje imunogenní prostředek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9.

20 **11.** Použití vakcíny podle nároku 10 pro výrobu léčiva pro prevenci zánětu plic u pacienta staršího 55 let.

12. Použití vakcíny podle nároku 10 pro výrobu léčiva pro prevenci zánětu středního ucha u nemluvňat.

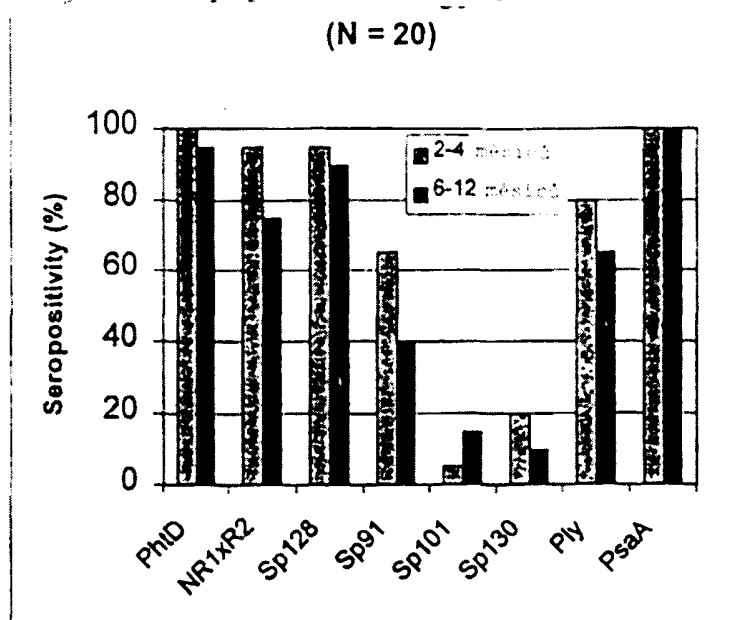
25 **13.** Způsob výroby vakcíny podle nároku 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje kroky selekce a izolace dvou různých proteinů S. pneumoniae, kterými jsou PhtD a detoxifikovaný pneumolysin, Ply, a smísení uvedených proteinů dohromady s farmaceuticky přijatelným nosičem.

30

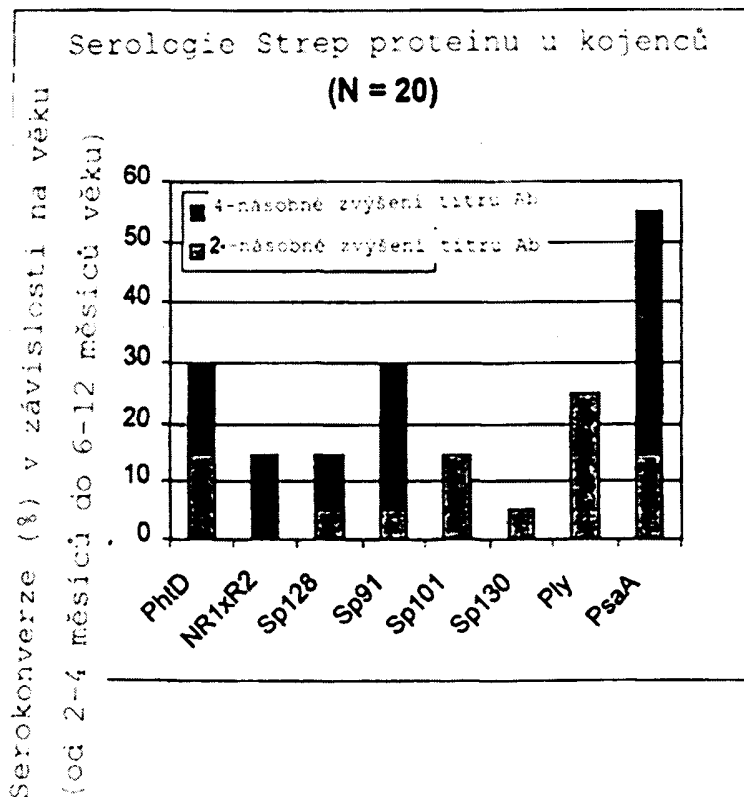
3 výkresy

Obr. 1, 3 seropozitivity u kojenců

Serologie Strep proteinu u kojenců Seropozitivita (%)

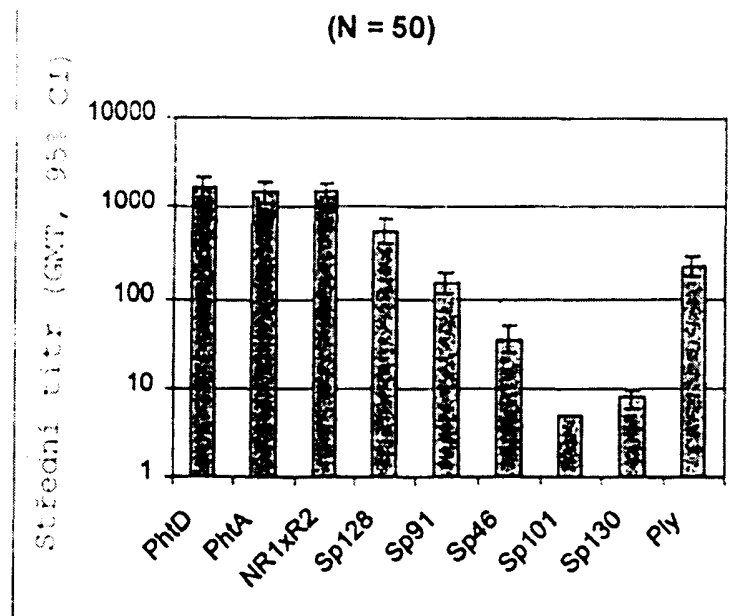


Obr. 2, Serokonverze v závislosti na věku



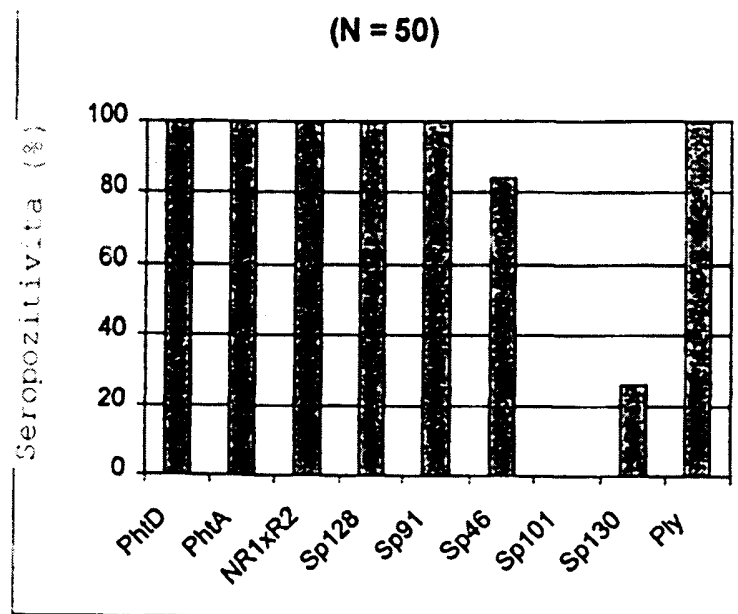
Obr. 3, střední titry u mladých dospělých

Serologie Strep proteinu u mladých dospělých



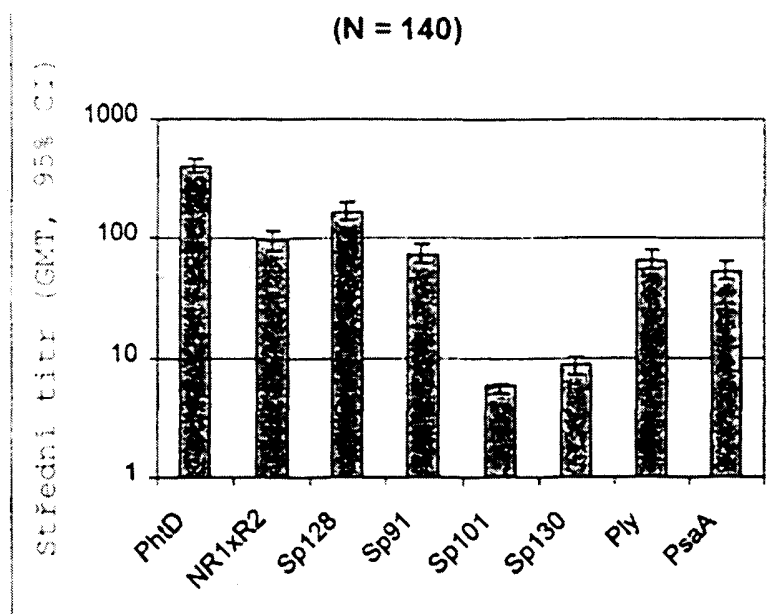
Obr. 4, % seropozitivity u mladých dospělých

Serologie Strep proteinu u mladých dospělých



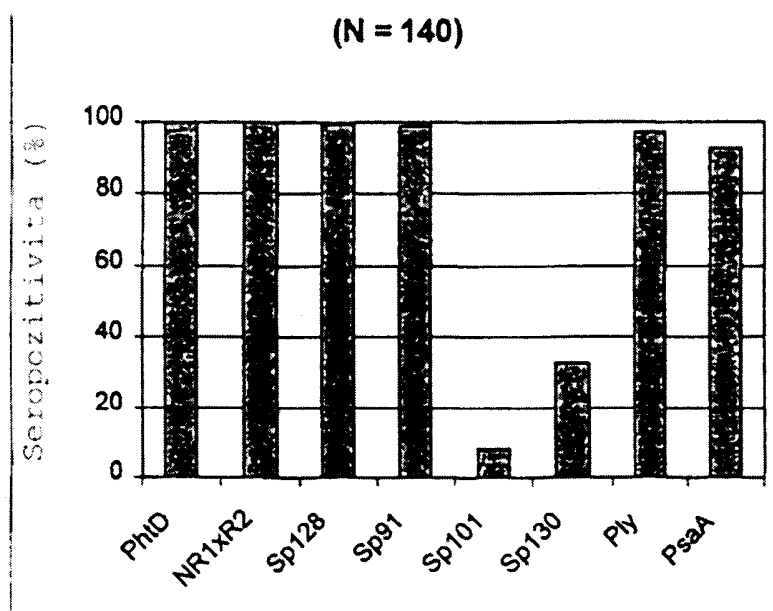
Obr. 5, střední titry u starých dospělých

Serologie Strep proteinu u starých dospělých



Obr. 6, % seropozitivity u starých dospělých

Serologie Strep proteinu u starých dospělých



Konec dokumentu