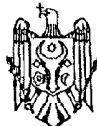




MD 1586 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **1586** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) **Int. Cl.⁷**: A 61 K 39/00;
A 61 P 31/12, 33/00,
35/00, 37/00

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: 97-0199 (22) Data depozit: 1995.11.29 (31) Nr.: 08/351,001 (32) Data: 1994.12.07 (33) Țara: US (41) Data publicării cererii: 1999.02.28	(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 2001.01.31, BOPI nr. 01/2001 (85) 1997.07.07 (86) PCT/US95/15433, 1995.11.29 (87) WO 96/17863; 1996.06.13
(71) Solicitant: IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION, US (72) Inventatori: RAYCHAUDHURI, Syamal, US; RASTETTER, William, H, US (73) Titular: IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION, US (74) Mandatar: Nicolai Glazunov, MD	

(54) **Inducere a unui răspuns citotoxic T-limfocitar**

(57) **Rezumat:**

1

Invenția se referă la medicină, în special la imunologie și poate fi utilizată în tratamentul afecțiunilor de etiologie virală, bacteriană sau parazitară, proceselor canceroase și altor maladii.

Sunt propuse metode și compoziții pentru inducerea unui răspuns citotoxic T-limfocitar (CTL) la om sau animale prin administrarea unei compoziții constituite dintr-un antigen, la care răspunsul CTL este dezirabil, și o formulare antigenică în formă de emulsie stabilă ulei-în apă, care cuprinde sau constă esențial din două sau mai multe din următoarele componente: un detergent stabilizator, un agent de formare a micelilor și un

5

10

15

2

ulei biodegradabil și biocompatibil. Formularea antigenică preferențial este lipsită de un component peptidic imunostimulator sau îl conține în cantități foarte reduse, astfel încât răspunsul citotoxic T-limfocitar dorit să nu fie diminuat.

Revendicări: 53

Figuri: 14

MD 1586 G2

MD 1586 G2

3

Descriere:

Cererea de brevet SUA 08/919 787 depusă în 24 iulie 1992 și cererea de brevet SUA 07/735 069 depusă în 25 iulie 1991 de către Syamal Raychaudhuri și William H. Rastetter, ambele întitulate "Inducerea răspunsurilor citotoxice T-limfocitare" (acum abandonate), sunt încorporate în integritatea lor, prin referire, în această cerere. Această invenție se referă la metode și compoziții utile pentru inducerea de răspunsuri citotoxice mediate de celula T la oameni și animale domestice sau importante în agricultură.

Limfocitele T citotoxice (CTL) sunt considerate a fi mecanismul principal de protecție a gazdei ca răspuns la o diversitate de infecții virale și procese neoplazice sau canceroase. Aceste celule elimină celule infectate sau transformate prin recunoașterea fragmentelor de antigeni în asociație cu diverse molecule (denumite molecule MHC de clasa I) pe celulele infectate sau transformate. Experimental CTL se pot induce prin încărcarea citoplasmatică în celulele specifice cu anumiți antigeni solubili. În general, imunizarea numai cu un antigen solubil este insuficientă pentru inducerea T-limfocitară citotoxică specifică.

O metodă prin care poate fi indus un răspuns CTL implică folosirea tehnicilor de inginerie recombinantă pentru încorporarea componentelor critice ale unui antigen în cauză în genomul unui agent infecțios benign. Scopul unei astfel de strategii este de a genera răspunsuri citotoxice T-limfocitare antigen specifice la epitopul dorit prin supunerea gazdei la o infecție slabă, care se poate autolimita. Au fost descriși vectorii himerici care folosesc virusuri vaccinia, polio, adeno- și retrovirusuri, precum și astfel de bacterii ca *Listeria* și BCG. De exemplu, Takahashi et al., 85 Proc. Natl. Acad. Sci., USA 3105, 1998 descrie utilizarea unui virus recombinant vaccinia care exprimă gena de înveliș gp160 HIV ca un instrument potențial pentru inducerea limfocitelor T citotoxice.

O a doua metodă prin care poate fi indus un răspuns mediat de celulă include folosirea de adjuvanți. Cu toate că domeniul pare a fi saturat de discuții privind utilizarea adjuvanților, este neclar dacă o astfel de imunitate mediată de celulă a fost indusă și dacă o asemenea imunitate a inclus un răspuns citotoxic T-limfocitar. Totuși, cele care urmează sunt reprezentative prin diverse publicații în domeniu.

Stover et al., 351 Nature 456, 1991 (neadmis ca fiind stadiul anterior al tehnicii pentru prezenta cerere) descrie un răspuns CTL la β -galactozidază folosind BCG recombinant care conține o genă de β -galactozidază. Nu s-a depistat nici un astfel de răspuns folosind adjuvantul Freund incomplet și β -galactozidaza.

Mitchell et al., 8 J. Clinical oncology 856, 1990 (care nu este admis ca stadiul anterior al tehnicii pentru prezenta invenție) descrie tratamentul pacienților cu melanom metastatic cu un adjuvant denumit "DETOX" și lizate melanomice alogene, administrate de 5 ori pe parcursul a 6 săptămâni. La o mică parte din pacienți s-a observat o creștere de celule T citolitice. Autorii descriu necesitatea de a spori nivelul producției de limfocite T citotoxice și sugerează o terapie combinată de adjuvant cu Interleukină-2, precum și un pretratament cu ciclofosfamidă pentru reducerea nivelului de celule supresoare T specifice tumorei, care ar putea exista. DETOX include endotoxină detoxificată (lipida A monofosforil) de la *Salmonella minnesota*, structuri de perete celular de la *Mycobacterium phlei*, ulei squalen și emulgator.

Allison și Gregoriadis, 11 Immunology Today 427, 1990 (care nu este admis ca stadiul anterior al tehnicii pentru prezenta invenție) remarcă că unicul adjuvant "autorizat pentru utilizare" în vaccinuri umane reprezintă sărurile de aluminiu (alum), care nu provoacă imunitate consistentă mediată celular. Allison și Gregoriadis afirmă că "există, prin urmare, o necesitate de a descoperi adjuvanți cu eficacitatea adjuvantului complet Freund, dar fără efectele sale secundare cum ar fi granuloamele". Ei continuă prin a afirma că există trei strategii posibile, de exemplu, utilizarea lipozomilor; utilizarea adjuvanților, denumiți complexe imunostimulatoare (ISCOM, care includ saponină sau Quil A (un triterpenoid cu două catene de carbohidrați), colesterol și fosfatidil colină), care sunt autorizate pentru utilizare într-un vaccin de gripă pentru cai (Morein et al., Immunological Adjuvants and Vaccines, Plenum Press, 153); și utilizarea unei emulsii (SAF) de squalen sau squalan (cu sau fără agent pluronic) și muramil dipeptidă (MDP). SAF este considerat că produce o imunitate mediată celular la șoareci, deși "s-a crezut mult timp că subunitatea antigenilor nu poate provoca răspunsuri citotoxice T-celulare (CTL)" [1].

Takahashi et al., 344 Nature 873, 1990, descriu inducerea de helperi de clasa II restricționată și T-limfocitară citotoxică prin folosirea de ISCOM printr-o unică imunizare subcutanată la șoareci. Ei afirmă că adjuvantul Freund, adjuvantul incomplet Freund și fosfatul tamponat salin nu induc activitate citotoxică T-limfocitară împotriva țintelor de interes pentru ei. Ei afirmă că, spre deosebire de

MD 1586 G2

4

5 rezultatele cu alte forme de antigen proteic exogen solubil, s-a dovedit că este posibil să se inițieze CTL restricționate CD⁺ CD4⁻ antigen specifice clasa I MHC prin imunizare cu proteina exogenă intactă folosind ISCOM. De asemenea, ei afirmă că experimentele descrise sugerează că poate fi posibil să se provoace CTL la oameni prin folosirea de ISCOM conținând proteine HIV și că vaccinurile bazate pe ISCOM pot atinge scopul demult dorit, și anume, de inducere atât a CTL, cât și a anticorpilor, printr-o proteină purificată.

10 Byars și Allison, 5 Vaccines 223, 1987 descriu utilizarea de SAF-1, care include Tween 80, Pluronic L121 și squalen sau squalan, cu sau fără muramil dipeptidă și sugerează că datele lor arată că formularea cu muramil dipeptidă va fi utilă pentru vaccinuri umane și veterinare. Rapelurile de adjuvant s-au furnizat fără muramil dipeptidă. Se consideră că muramil dipeptida sporește semnificativ producerea de anticorpi față de utilizarea adjuvantului fără muramil dipeptidă. Imunitatea mediată celular s-a măsurat ca hipersensibilitate de tip întârziat prin teste dermice pentru a determina inducerea celulară de T helperi. Astfel de sensibilitate a fost mai puternică și mai durabilă când s-a furnizat muramil dipeptida în adjuvant [2]. Adjuvanți similari sunt descriși de către Allison et al., brevet SUA 4 770 874 (unde se afirmă că o combinație de muramil dipeptidă și polioli pluronic este esențială pentru a provoca un răspuns puternic mediat celular și umoral împotriva albuminei de ou) [3]; Allison et al., brevet SUA 4 772 466; Murphy-Corb et al., 246 Science 1293, 1989 (unde este afirmat că utilizarea adjuvanților combinați cu muramil dipeptidă poate spori inducerea atât a ramurii umorale, cât și celei celulare ale răspunsului imun); Allison și Byars, 87 Vaccines 56, 1987 (unde se afirmă că imunitatea mediată celular este provocată de către SAF (cu muramil dipeptidă) demonstrată prin hipersensibilitatea de tip întârziat, prin răspunsuri proliferative ale celulelor T la antigen, prin producerea de Interleukină-2 și prin liza specifică genetic restricționată a celulelor țintă care poartă antigenul de imunizare); Allison și Byars, Immunopharmacology of Infectious Diseases: Vaccine Adjuvants and Modulators of Non-Specific Resistance 191-201, 1987; Morgan et al., 29 J. Medical Virology 74, 1989; Kenney et al., 121 J. Immunological Methods 157, 1989; Allison și Byars, 95 J. Immunological Methods 157, 1986 (unde sărurile de aluminiu și emulsiile de ulei mineral s-au dovedit a spori formarea de anticorpi, dar nu și imunitatea mediată celular; și formulările de muramil dipeptidă s-au dovedit a provoca imunitate mediată celular); Byars et al., 8 Vaccine 49, 1990 (neadmisă ca stadiul anterior al tehnicii pentru prezenta cerere, unde se afirmă că formularea lor de adjuvant crește semnificativ răspunsurile umorale și la un grad mai mic sporește reacțiile mediate celular la antigenul de hemaglutinină a gripei); Allison și Byars, 28 Molecular Immunology 279, 1991 (neadmisă a fi stadiul anterior al tehnicii pentru prezenta cerere; care afirmă că funcția muramil dipeptidei este de a induce expresia citokinelor și de a crește expresia genelor principale de histocompatibilitate (MHC); și că s-au obținut mult mai bune răspunsuri de anticorpi și celulare decât cu alți adjuvanți și că se speră să se convingă dacă strategii similare vor fi eficiente la oameni) [4]; Allison și Byars, Technology Advances in Vaccine Development 401, 1988 (care descrie imunitatea mediată celular folosind SAF); Epstein et al., 4 Advance Drug Delivery Reviews 223, 1990 (care asigură o vedere de ansamblu a diversilor adjuvanți folosiți în prepararea vaccinurilor); Allison și Byars, 95 J. Immunological Methods 157, 1986 (care afirmă că adăugarea de muramil dipeptidă la adjuvant mărește semnificativ răspunsurile mediate celular la diversitatea de antigeni, inclusiv imunoglobulinele monoclonale și antigenii virali) [5]; și Morgan et al., 29 J. Medical Virology 74; 1989 (care descrie utilizarea de SAF-1 pentru prepararea unui vaccin pentru virusul Epstein-Barr).

45 Kwak et al., Idiotypic Networks in Biology and Medicine, Elsevier Science Publishers, p. 163, 1990 (neadmisă ca stadiul anterior al tehnicii pentru prezenta cerere) descrie utilizarea de SAF fără muramil dipeptidă ca un adjuvant pentru un idiotip de limfom B-celular la om. Mai precis, s-a administrat o emulsie de Pluronic L121, Squalan și 0,4% TWEEN-80 în fosfat tamponat salinic. Ei afirmă că "adăugarea unui adjuvant ar putea spori în plus ... răspunsurile umorale și la fel de bine poate facilita inducerea răspunsurilor celulare".

50 Alte preparate imunologice includ lipozomi (Allison et al., brevet SUA 4 053 585 și 4 117 113); peptide ciclice (Dreesman et al., brevet SUA 4 778 784); adjuvantul Freund complet (Asherson et al., 22 Immunology 465, 1972; Berman et al., 2 International J. Cancer 539, 1967; Allison, 18 Immunopotential 73, 1973; și Allison, Non-Specific Factors Influencing Host Resistance 247, 1973); ISCOM (Letvin et al., 87 Vaccines 209, 1987); adjuvanți care conțin agenți neionici polimerizați în bloc formați cu ulei mineral, un agent superficial activ și TWEEN-80 (Hunter și Bennett, 133 J. Immunology 3167, 1984; și Hunter et al., 127 J. Immunology 1244, 1981); adjuvanți compuși din ulei mineral și agent emulgator cu sau fără micobacterii mortalizate (Sanchez-Pescador et

MD 1586 G2

5

al., 141 J. Immunology 1720, 1988) și alți adjuvanți cum ar fi derivatul lipofilic al muramil tripeptidei și muramil dipeptida covalent conjugată la proteină recombinată (id.).

Solicitantul a descoperit o metodă sigură și avantajoasă, și compoziții prin care pot fi induse răspunsuri CTL la oameni și animale domestice, sau animale importante din punct de vedere agricol. Metoda include utilizarea unei formulări antigenice care este puțin toxică sau netoxică pentru animale, lipsită de o peptidă imunostimulatoare (de exemplu, muramil dipeptidă), a cărei prezență ar descrește răspunsul celular dorit. Suplimentar, metoda este simplă în realizare și nu necesită o muncă extensivă *in vivo* pentru modificarea celulelor existente prin tehnici de ADN recombinant pentru a le face mai antigenice. Această descoperire este surprinzătoare, deoarece este neașteptat ca un astfel de răspuns CTL să poată fi indus prin utilizarea unei formulări antigenice căreia îi lipsesc peptidele imunostimulatoare sau echivalentul lor. Descoperirile solicitantului permit de a folosi asemenea formulări antigenice într-un spectru larg de afecțiuni sau ca un agent profilactic. De exemplu, administrarea acestor formulări antigenice se poate folosi în tratamentul bolilor virale în care un răspuns CTL este important, de exemplu, în tratamentul infecției HIV sau gripei; de asemenea, se poate utiliza în tratamentul infecțiilor bacteriene, cancer, infecții parazitare și altele. Ca agent profilactic, formularea antigenică combinată cu un antigen corespunzător este utilă în prevenirea infecțiilor prin virusuri responsabile de bolile virale menționate anterior, în special, profilaxia infecției HIV și de asemenea, pentru profilaxia pacienților cu risc de cancer, de exemplu, după rezecția unei tumore primare.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este extinderea gamei de formulări pentru inducerea răspunsului citotoxic T-limfocitar.

Astfel, într-un prim aspect invenția prezintă o metodă pentru inducerea unui răspuns CTL la om sau animal domestic (de exemplu, pisică sau câine), sau animal important agricol (de exemplu, cal, vacă sau porc) la un antigen, altul decât antigenul de limfom B-celular sau albumină de ou. Metoda include etapele furnizării antigenului la care se dorește răspunsul CTL și furnizarea unei formulări antigenice netoxice care cuprinde, constă, sau constă esențial dintr-un detergent stabilizator, un agent de formare a micelilor și un ulei biodegradabil și biocompatibil. Acestei formulări antigenice, de preferință, îi lipsește orice component peptidic imunostimulator sau are niveluri suficient de scăzute ale acestui component, astfel încât răspunsul celular dorit nu este diminuat. Această formulare este formulată de preferință ca o emulsie stabilă ulei-in-apă. Fiecare dintre diversele componente sunt alese astfel încât emulsia va rămâne într-o stare de emulsie pentru o perioadă de cel puțin o lună și, de preferință, mai mult decât un an, fără separarea fazei. În metodă antigenul și formularea antigenică sunt amestecate pentru a forma un amestec (de preferință, prin microfluidizare) și acest amestec se administrează la animal într-o cantitate suficientă pentru a induce un răspuns CTL la animal. Astfel de administrare este necesară numai o singură dată.

Prin "detergent stabilizator" se înțelege un detergent care permite componentelor emulsiei să rămână în formă de o emulsie stabilă. Astfel de detergenți includ polisorbitat 80 (TWEEN) (sorbitan-mono-9-octadecenoat-poli (oxi-1,2-etandil); fabricat de către ICI Americas, Wilmington, DE), TWEEN 40, TWEEN 20, TWEEN 60, Zwittergent 3-12 TEEPOL HB7 și SPAN 85. Acești detergenți sunt prevăzuți de obicei într-o cantitate aproximativ de 0,05...0,5%, de preferință, circa 0,2%.

Prin "agent de formare a micelilor" se înțelege un agent care este capabil să stabilizeze emulsia formată cu alte componente astfel că se formează o structură asemenea micelilor. Astfel de agenți produc, de preferință, o oarecare iritație la locul injectării în scopul mobilizării macrofagelor pentru creșterea răspunsului celular. Exemple de astfel de agenți includ agenți tensioactivi polimerici descriși în publicațiile BASF Wyandotte, de exemplu, Schmolka, 54, J. Am. Oil. Chem. Soc. 110, 1977 și Hunter et al., 129 J. Immunol. 1244, 1981, PLURONIC L62LF, L101 și L64, PEG1000 și TETRONIC 1501, 150R1, 701, 901, 1301 și 130R1. Structurile chimice ale acestor agenți sunt bine cunoscute în domeniu. De preferință, agentul este ales pentru a avea o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) cuprinsă în limitele dintre 0 și 2, așa cum s-a definit de către Hunter și Bennett, 133 Journal of Immunology 3167, 1984. Agentul este prevăzut, de preferință, într-o cantitate de 0,5...10%, cel mai preferat, într-o cantitate de 1,25...5%.

Uleiul este ales pentru a promova reținerea antigenului în emulsia ulei-in-apă, adică de a furniza un vehicul pentru antigenul dorit și, de preferință, are o temperatură de topire mai mică decât 65°C, astfel încât emulsia se formează fie la temperatura camerei (circa 20°C...25°C), fie că temperatura emulsiei este adusă la temperatura camerei. Exemple de astfel de uleiuri includ squalen, squalan, EICOSANE, tetratetracontan, glicerol și ulei de arahide sau alte uleiuri vegetale. De preferință, uleiul este prevăzut într-o cantitate de 1...10%, cel mai preferat, între 2,5 și 5%. Este important că uleiul este

MD 1586 G2

6

biodegradabil și biocompatibil, astfel ca organismul să poată degrada în timp uleiul, evitând manifestarea efectelor adverse, cum ar fi granuloamele, la utilizarea uleiului.

5 Este important ca din formularea menționată mai sus să lipsească componentul peptidic, în special, muramyl dipeptida (MDP). O asemenea peptidă va servi drept obstacol pentru inducerea unui răspuns CTL dacă este furnizată într-o cantitate mai mare decât circa 20 μg pentru o administrare de formulare la om normal. Este preferabil ca astfel de peptide să fie absente complet din formularea antigenică în ciuda stimulării aparente de către acestea a compartimentului umoral al sistemului imun. Astfel, solicitantul a găsit că deși asemenea peptide pot să sporească răspunsul umoral, ele sunt dezavantajoase când este dezirabil un răspuns citotoxic T-limfocitar.

10 În alte aspecte apropiate, formularea antigenică se formează numai din două dintre cele trei componente de mai sus și se folosește cu orice antigen dorit (termen care include proteine, polipeptide și fragmentele lor imunogenice) cu excepția albuminei de ou (sau alte albumine, de exemplu, HAS, BSA și ovalbumină), pentru a induce un răspuns CTL la animalele de mai sus sau oameni.

15 Solicitantul consideră că formulările de mai sus sunt semnificativ avantajoase față de formulările anterioare (inclusiv ISCOM; DETOX și SAF) pentru utilizare la oameni. Spre deosebire de aceste formulări, prezenta formulare include și un agent de formare a micelilor și nu are peptide, structuri de pereți celulari sau componente celulare bacteriene. De asemenea, prezenta formulare induce un răspuns CTL care, fie nu se întâlnește cu formulările anterioare, fie este semnificativ sporit comparativ cu acele formulări.

20 Prin "netoxic" se înțelege că se observă un efect secundar nepronunțat sau nici un efect secundar ale formulării antigenice la animalul sau omul tratat. Specialiștii în domeniile medical sau veterinar, vor recunoaște că acest termen are un înțeles larg. De exemplu, la un animal sau om practic sănătos, poate fi tolerată numai o ușoară toxicitate, în timp ce la un om care suferă de o boală iminentă, poate fi tolerată substanțial mai înaltă toxicitate.

25 În realizările de preferință, formularea antigenică constă în esență din două sau trei dintre detergent, agent de formare a micelilor și ulei; metoda constă în esență dintr-o unică administrare a amestecului (antigen plus formularea antigenică) la om sau animal, omul sau animalul fiind infectați cu un virus și suferă de unul sau mai multe simptome (așa cum este în general definit de către doctori în medicină în domeniul relevant) ale infecției virale; și formularea antigenică este netoxică pentru om sau animal.

30 În alte realizări de preferință, antigenul este ales din porțiunile antigenice ale antigenilor HIV: gp160, gag, pol, Nef, Tat și Rev; antigenii malariei: proteina CS și proteina 2 de suprafață a sporozoitului; antigenii de suprafață ai hepatitei B: Pre-S1, Pre-S2, HBc Ag și Hbe Ag; antigeni ai gripei: HA, NP și NA; antigenii de suprafață ai hepatitei A; antigenii virusului Herpes: gp340 al EBV, gp85 al EBV, gB al HSV, gD al HSV, gH al HSV, produsul proteic precoce al HSV, antigeni ai virusului papilomului uman (de exemplu, antigenii HPV astfel ca antigenii L1, E4, E6, E7, în special antigenii E6 și E7 ai HPV16 și 18, cele mai comune două tipuri de HPV asociate cu carcinomul cervical, E4 și L1 derivate ale HPV6 și HPV11, cele mai comune HPV asociate cu condilome acuminate; antigenul specific prostatei (PSA), gB al citomegalovirusului, gH al citomegalovirusului și proteina IE gp72; antigenii virusului sincițial respirator: proteina F, proteina G și proteina N; și antigenii tumorali: ACE al carcinomului, mucina asociată carcinomului, P21 al carcinomului, P53 al carcinomului, MPG al melanomului, p97 al melanomului, produsul oncogenului Neu al carcinomului, produsul genei P53 al carcinomului, antigenul melanomului numit MAGE și proteina p21 ras mutată prezentă într-o diversitate de tumori maligne.

45 În aspectul relatat invenția în prim plan se referă la o compoziție care cuprinde, constă sau care constă esențial dintr-un antigen amestecat cu o formulare antigenică descrisă mai sus, unde antigenul este ales din porțiunile antigenice enumerate mai sus.

50 În alte aspecte invenția se referă la metode de tratament al unui pacient infectat cu virus HIV, care suferă de malarie, care suferă de gripă, care suferă de hepatită, care suferă de un cancer cervical, care suferă de condilome acuminate (verucozități genitale), sau infectat cu virus sincițial respirator, prin administrarea unei compoziții incluzând un antigen corespunzător (de exemplu, selectat dintre cei indicați mai sus) amestecat cu una dintre formulările antigenice de mai sus. Acești antigeni și tratamentele sunt specifice antigenilor care pot fi folosiți în formulările antigenice referitoare la subiect.

55 Alte trăsături și avantaje ale invenției vor fi evidente din descrierea care urmează a realizărilor preferabile ale acesteia și din revendicări.

În continuare vor fi descrise pe scurt desenele care însoțesc invenția.

MD 1586 G2

7

Figurile 1A-1C și 4A-4C sunt prezentări grafice ale datelor de comparare a inducerii CTL prin diverse formulări de ovalbumină; E:T reprezintă raportul organelor-țintă în toate figurile;

Figurile 2A și 2B sunt prezentări grafice ale datelor de comparare a inducerii CTL prin diverse formulări de β -galactozidază;

5 Figura 3 este o prezentare grafică a datelor de comparare a inducerii CTL prin ovalbumină într-un lipozom și într-o formulare antigenică;

Figurile 5 și 6 sunt prezentări grafice ale datelor care arată efectul epuizării celulelor CD4 și CD8 în inducerea CTL;

Figura 7 este o reprezentare grafică a datelor care arată inducerea CTL prin gp120;

10 Figura 8 este o reprezentare grafică a datelor care arată inducerea CTL printr-un amestec de pluronic și TWEEN și un antigen;

Figura 9 este o reprezentare grafică a datelor care arată inducerea CTL cu un amestec de squalan și TWEEN și un antigen;

15 Figura 10 este o reprezentare grafică a datelor care arată inducerea CTL printr-un amestec de squalan și pluronic și un antigen;

Figura 11 este o reprezentare grafică a efectului *ova* cu diverse formulări antigenice asupra răspunsului CTL;

Figura 12 este o reprezentare grafică a inducerii anticorpilor anti-gp120IIIb la maimuțe cu diverse formulări antigenice;

20 Figura 13 ilustrează activitatea antitumorală a celulelor HOPE2 la 10 zile după o unică imunizare cu proteina E7 solubilă în adjuvant;

Figura 14 ilustrează activitatea antitumorală a celulelor HOPE2 la 10 și 19 zile după imunizări cu proteina E7 solubilă în adjuvant.

25 Formularea antigenică

Formulările antigenice utilizate în această invenție sunt descrise în general mai sus. Specialiștii ordinari în acest domeniu vor recunoaște că formulări echivalente se prepară cu ușurință și poate fi de așteptat să aibă proprietăți echivalente în inducerea unui răspuns CTL. Asemenea formulări sunt testate cu ușurință pentru proprietățile lor folosind tehnici echivalente celor descrise în exemplele de mai jos.

30 Urmează exemple ale invenției cu utilizarea unei formulări antigenice (AF) compuse din circa 2,5% squalan, 5% acid pluronic și TWEEN 80 în fosfat tamponat salin. În special, o emulsie de AF a inclus: 15 mg squalan, 37,5 mg poloxamer 401 (PLURONIC L121), 6 mg polisorbitat 80 (TWEEN 80), 0,184 mg clorură de potasiu, 0,552 mg fosfat monobazic de potasiu, 7,36 mg clorură de sodiu, 3,3 mg fosfat dibazic de sodiu (anhidru), per 1 ml apă, pH 7,4. Această emulsie s-a microfluidizat folosind tehnica standard (Microfluidics Model M110F) cu un modul de contrapresiune la 11-14,000 psi cu reîntoarcere gradată la presiunea atmosferică răcind și împachetând în gheață umedă.

40 În alte exemple, antigenul s-a amestecat cu squalan microfluidizat (S), pluronic (P) și TWEEN 80 (T) pentru a atinge o concentrație finală de 0,2% TWEEN 80, 1,25% pluronic și respectiv 5% squalan. Pentru a determina subcomponentele necesare pentru inducerea unui răspuns imun antigenspecific, Squalan- TWEEN 80, pluronic- TWEEN 80 sau Squalan-pluronic s-au preparat la aceeași concentrație ca pentru amestecul din trei componente. Pluronic, Squalan sau TWEEN 80, s-au preparat, de asemenea, individual pentru determinarea efectului componentului individual asupra inducerii CTL. De asemenea, s-au făcut substituții ale TWEEN 20, TWEEN 40 sau Zwittergent pentru TWEEN 80 pentru determinarea efectelor diverșilor derivați TWEEN asupra inducerii CTL în sistemul *ova*.

45 Substituții ale Squalanului în formulările din trei componente au fost făcute cu Eicosan sau triacontan și substituțiile pentru copolimerul pluronic în aceeași formulare din trei componente s-au făcut prin PEG 1000, Pluronic L62LF și Tetronic 1501 și 150R1. Ca și formulările din două componente, s-au amestecat diverși analogi în diverse combinații și s-au testat la inducerea CTL specifică *ova*. Ele sunt un amestec de colesterol - TWEEN 80, Squalan - TWEEN 20, Pristan - TWEEN 80, sau ulei de măsline - TWEEN 80. Pentru un studiu de stabilizare, amestecul microfluidizat de Squalan - TWEEN 80 s-a amestecat cu dextroză la o concentrație finală de 5%. În toate cazurile combinațiile de excipienți s-au amestecat într-un microfluidizor pentru a obține o emulsie stabilă. În unele experimente, formulările din 2 componente s-au amestecat cu diferite concentrații de MDP pentru inducerea răspunsurilor CTL și umoral. Tabelul 1 prezintă o listă cuprinzătoare a diferitelor formulări folosite în

55 acest studiu.

Tabelul 1

MD 1586 G2

8

Efectul diferitelor substituții în sisteme de 3 sau 2 componente

<u>Substituție în formulări din 3 componente</u>	<u>Omorare % la E:T 100:1</u>
STP	84
Tween 40 (T)	66
Tween 20 (T)	48
T1501 (P)	0
T150R1 (P)	0
Pluronic L62LF (P)	47
Eicosan	*
PEG1000 (P)	*
Triacontan (S)	*
Zwittergent (T)	*
<u>Substituție în formulări din 2 componente</u>	
ST	76
PT	45
SP	26
Cholesterol (S) + Tween 80	0
Squalan + Tween 29 (T)	65
Pristan (S) + Tween 80	42
Ulei de măsline (S) + Tween 80	69
<u>Formulare din 1 component</u>	
Pluronic L121	0
Squalan	0
Tween SO	0
Squalan + Tween 80 + dextroză %	86

* Analiza CTL este repetată

5

Ca adjuvant de control s-a folosit formularea adjuvant Syntex (microfluidizată; SAFm) care constă din două părți. Partea I constă din fosfat tamponat salin care conține o concentrație finală de 5% Squalan, 1,25% pluronic și 0,2% TWEEN 80 (vehicul sau I-SAF). Partea II constă din N-acetilmuramil-L-treonil-D-izoglutamină (Thr-MDP), un derivat al componentului peretelui celular de micobacterii. În scopul imunizării antigenul este amestecat cu vehicul microfluidizat (partea II) pentru a obține o emulsie omogenă. Se adaugă MDP pentru a obține SAFm și se centrifughează ușor. Concentrația MDP din amestec se variază pentru a determina concentrația optimă pentru inducerea CTL. În calitate de adjuvant de control, șoarecii s-au imunizat cu antigeni solubili amestecați cu alum conform manualului producătorului (Pierce Chemical, Rockford, IL) sau cu adjuvantul Freund complet (CFA).

15

Această formulare antigenică se folosește pentru inducerea răspunsurilor citotoxice T-limfocitare la șoareci. Specialiștii ordinari în domeniu vor recunoaște că un astfel de model de șoarece este indicator că experimentele sau tratamentele echivalente vor induce în mod similar răspunsuri citotoxice T-limfocitare la oameni, animale domestice sau animale din agricultură. Cantitatea formulării antigenice și de antigen utilă pentru a produce răspunsul celular dorit poate fi determinată empiric prin proceduri standard, bine cunoscute specialiștilor ordinari în domeniu fără a mai proceda la experimentare. Astfel, dacă se dorește să se reducă efectele secundare ale tratamentului cu un astfel de amestec, specialiștii ordinari în domeniu pot determina un nivel minim al unui astfel de amestec pentru administrare la om, un animal domestic sau agricol, în scopul de a provoca un răspuns CTL și prin aceasta să inducă imunitate la un antigen dorit. În folosirea normală, un asemenea amestec va fi injectat prin oricare dintre numeroasele proceduri standard, dar preferată în mod deosebit, este o injecție intramusculară la

20

25

MD 1586 G2

9

o localizare care va permite emulsiei să rămână într-o formă stabilă pentru o perioadă de câteva zile sau câteva săptămâni.

Metode

5 In exemplele date mai jos s-au folosit, cu excepția unde s-a remarcat altfel, următoarele materiale și metode:

Șoareci

S-au procurat femele C57BL/6 (H-2^b) și BALB/c (H-2^d) de la Harlen Sprague (San Diego, California).

Antigeni

10 S-a folosit ovalbumină (*ova*, Grade VII; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) în formă nativă. S-a folosit β-galactozidază (β-gal, Grade VIII, BRL) în formă nativă și după fierbere în NaOH timp de 2 minute pentru a da un digest alcalin. S-a procurat gp120 recombinat de la American Biotechnology.

Celule tumorale și transfectanți

15 S-au folosit celule tumorale la linii EL4 (C57BL/6, H-2^b timom) și P815 (DBA/2, H-2^d mastocitom). Derivarea transfectantului EK4 care produce *ova*, EG7-*ova*, este descrisă anterior de către Moore et al., 54 Cell 777, 1988. Transfectantul P13.1, care produce β-gal, s-a derivat prin electroporarea a 10⁷ celule P815 în 1 ml de fosfat tamponat salin (PBS) cu 10 mg de PstI linearizat pCH110 (Pharmacia LKB Botechnology Inc., Piscataway, NJ) și 1 mg de PvuII linearizat pSV2 neo (Southern et al., 1 J. App.1. Genet. 327, 1982), urmat de selecția în 400 μg/ml a antibioticului G418.
20 Transfectantul C3-4 s-a derivat din hibridomul Igm 662 BALB/c prin transfectare cu un plasmid care codifică gena β-gal fuzionată la al treilea și al patrulea exon al lanțului greu IgM (Rammensee et al., 30 Immunogenetics 296, 1989). S-a furnizat gp 160IIIb care exprimă fibroblastul 3T3, 15-12, asigurat de către Dr. Germain de la NIH (Bethesda, MD). Linia celulară L transfectată K^b a fost asigurată de către Dr. Carbone, Monash University, Australia. Liniile celulare L transfectate D^d și L^d au fost furnizate de către Dr. Ted Hensen, Washington University, St. Louis.

Imunizare

Șoarecii s-au imunizat intravenos cu 200 μl de suspensie de 25 x 10⁶ splenocite după o încărcare citoplasmatică (cum s-a descris de Moore et al. supra, Carbone et al., J. Exp. Med. 169:603, 1989). Pentru a imuniza cu formulările *ova*-antigen sau β-gal antigen s-au injectat subcutanat cate 30 μg per
30 șoarece de fiecare proteină antigen în talpă și baza cozii. Fiecare injectare constă din 67 μl formulare antigenică microfluidizată (obținută urmând procedurile standard) și 30 μg de proteină antigen într-un volum final de 200 μl. Volumul final s-a obținut cu HBSS, vezi, Whittaker Manual (Welkerville, MD). S-a asigurat MDP în concentrații între 0 și 300 μg. A fost stabilit că șoarecii s-au imunizat cu antigeni solubili în CFA sau în alum într-un volum total de 200 μl.

35 Stimularea in vitro a populațiilor efectoare

Celulele splenice (30 x 10⁶) de la șoareci normali sau imunizați care au fost inițiați cel puțin 14 zile în urmă, s-au incubat cu 1,5 x 10⁶ EG7-*ova* (iradiat cu 20000 rad) pentru răspunsuri *ova*, sau 1,5 x 10⁶ celule C3-4 (iradiat cu 20000 rad) pentru răspunsul β-gal în plăci de 24 godeuri la 37°C în 7% CO₂/aer. Toate culturile tisulare au fost realizate într-un mediu complex, constând din mediul IMDM,
40 vezi, Whittaker Manual (Welkerville, MD) suplimentat cu ser fetal de vițel de 10% (FCS), 2 mM glutamină, gentamicină și 2 x 10⁻⁵ M 2-mercaptoetanol. Pentru experimentele epuizării *in vitro*, celulele splenice inițiate *in vivo* sau stimulate *in vitro* s-au tratat cu anticorpi monoclonali (mAb) RL. 172 (anti-CD4) sau mAbs 3.168 (anti-CD8) pentru îndepărtarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ (Sarmiento et al., 126 J. Immunol. 2665, 1980, și Ceredig et al., 314 Nature 98, 1985). Anticorpii
45 mAb RL. 172 și mAb 3.168 au fost obținuți de la Dr. Jonathan Sprent de la Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA.

Celulele splenice (30 x 10⁶) de la șoareci normali sau imunizați care s-au inițiat cel puțin 21 zile în urmă, s-au incubat cu 1,5 x 10⁶ celule 15-12 (tratate cu 200 μg de mitomicină C timp de 45 minute per 10⁸ celule) sau cu 500 μg peptidă 18IIIb care conține epitopul CTL dominant la șoareci Balb/c în
50 mediul complex IMDM (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), care conține 10% FCS prestabilit-sortat (ICN Flow; ICN Biochemicals, Inc., Costa Mesa, CA), 2 mM glutamină, gentamicină și 2 x 10⁻⁵ M 2-mercaptoetanol. Pentru stimulare *in vitro* cu peptide, celulele splenice s-au cultivat în IMDM complex conținând supernatantul ConA de 5%.

Pentru experimente de epuizare, celulele splenice inițiate *in vitro* sau stimulate *in vitro* s-au tratat
55 cu mAb RL.172 (anti-CD4) sau mAb 3.168 (anti-CD8) în prezența unui complement de iepure de toxicitate joasă (Cederlane Laboratories, Ltd., Hornby Ontario, Canada) pentru îndepărtarea celulelor

MD 1586 G2

10

T CD4⁺ sau CD8⁺ (22, 23). Anticorpul mAb RL.172 și mAb 3.168 au fost un dar de la Dr. Jonthan Sprent de la Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CP.

Analiza citotoxicității

5 Celulele țintă (1×10^6) s-au marcat cu 100 μ Ci [⁵¹Cr] cromat de sodiu timp de 60 minute. Pentru țintele peptidice pulsate, în timpul țintirii de marcarea cu ⁵¹Cr s-au adăugat 50 μ l de soluție peptidică în HBSS de 1 mg/ml. După spălare, 10⁴ ținte marcate și diluții seriale ale celulelor efectoare s-au incubat în 200 μ l de RP10 timp de 4 ore la 37°C. S-au colectat 100 μ l de supernatant și s-a determinat liza specifică: Procent liză specifică = $100 \times \{ (\text{eliberare prin CTL} - \text{eliberare spontană}) / (\text{eliberare maximă} - \text{eliberare spontană}) \}$. Eliberarea spontană în absența răspunsului citotoxic T-limfocitar (CTL) a fost < 10 25% din eliberarea maximă prin detergent în toate experimentele.

Determinarea răspunsurilor de anticorpi la șoareci și maimuțe

Fiecare godeu al plăcii cu 96 godeuri cu fundul în formă de U (Costar, Cambridge, MA) s-a acoperit cu 150 ng de ova sau gp 120 în 50 μ l de HBSS și s-a incubat peste noapte la 4°C. Pentru determinarea răspunsurilor de anticorpi anti-gp120 și anti-ova la șoareci, plăcile s-au blocat cu 1% 15 BSA timp de 1 oră. S-au adăugat seruri diluate serial în 25 μ l volum per godeu și s-au incubat timp de 2 ore. Plăcile s-au spălat și s-a adăugat per godeu 50 μ l de IgG de capră anti-șoarece conjugat la HRPO în diluție de 1:1000 (SBT, Alabama) în 1% BSA. După 1 oră de incubare, plăcile s-au spălat și s-au adăugat 100 μ l substrat per godeu. Peste 10-15 min s-au prelevat OD₄₀₅. Pentru determinarea răspunsului de anticorpi anti-gp120 la maimuțe, au fost efectuate aceleași etape cu excepția că atât 20 blocarea plăcilor, cât și diluția serurilor s-au făcut cu ser normal de capră de 5% în soluție salină echilibrată Hank.

Sinteza peptidei

Peptidele sintetice corespunzătoare la secvențele aminoacide 253-276 (Lista de secvențe nr. 1: EQLESIINFEKLTEWTSSNVMEER; unde se folosește codul standard de o literă pentru a reprezenta 25 fiecare aminoacid) ale ovalbuminei (ova 253-276), secvențele aminoacide 84-102 ale proteinei mielince bazeice (MBP 84-102) (Lista de secvențe nr. 2: DENPVVHFFKNIVTPRTPP) și peptidele sintetice care corespund secvențelor aminoacide 308-322 (secvența 18IIIb) ale gp120IIIb, s-au asamblat prin sinteză peptidică în fază solidă folosind un sintetizator Applied Biosystems 430A. Aminoacizii s-au cuplat prin intermediul anhidrelor simetrice preformate, cu excepția asparaginei, 30 glutaminei și argininei, care s-au cuplat ca esteri hidroxibenzotriazolici. Eficiența cuplării s-a monitorizat prin reacția ninhidrină, urmând metoda Kaiser et al., 34 Anal. Biochem. 595, 1970. Peptidele s-au eliberat din suport cu HF, urmând procedura "low-high" descrisă de Tam, et al., 21 J. Am. Chem. Soc. 6442, 1983, și s-au extras din rășină cu acid acetic de 10%. După liofilizare, peptidele s-au desalinizat pe o coloană Sephadex G-25 și probele de peptide ulterior s-au purificat 35 HPLC prin cromatografie în fază inversă pe o coloană preparativă Vydac C-18. Peptidele purificate (98%) s-au solubilizat în HBSS la o concentrație finală de 10 mg/ml și s-au diluat în medii complexe până la concentrația dorită.

Digest CNBr

Proble de proteină (de exemplu, β -galactozidază) s-au tratat în exces de 100 de ori cu bromură 40 de cianogen într-o soluție de acid trifluoracetic 10 mM. Reacția s-a lăsat să se desfășoare timp de 18 ore la temperatura camerei (circa 20°C) cu rotire. După timpul de reacție prescris, fragmentele peptidice s-au separat de reactant folosind un aparat SEP-PAK C-18 (Waters), s-au diluat cu 95% acetonitril și s-au liofilizat.

Digest alcalin

45 Probele de proteină (de exemplu, β -galactozidază) s-au tratat cu NaOH 1N și s-au fiert 2 minute, iar fragmentele peptidice rezultate s-au separat de reactanți folosind un aparat C-18 SEP-PAK (Waters), apoi s-au diluat cu 95% acetonitril și s-au liofilizat.

Exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Inițierea CTL restricționat Clasa I

50 Moore et al., 113 UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 1989 și Carbone și Bevan, 171 J. Exp. Medicine 377, 1990, demonstrează că șoarecii imunizați cu celule splenice încărcate citoplasmatic cu ova s-au inițiat pentru răspuns CTL restricționat Clasa I specific ova. S-a folosit transfectantul EG7-ova care exprimă EL4-ova pentru stimularea *in vitro* a limfocitelor splenice inițiate *in vivo* și ca țintă pentru 55 CTL specific ova mediat prin omorâre. De asemenea, acest studiu a demonstrat că efectorii CD8⁺ induși prin transfectantul EG-7-ova sau prin celule splenice încărcate citoplasmatic cu ova, recunosc un determinant configurat prin peptida ova 258-276 în contextul de H-2K^b, lizează EG7-ova și de

MD 1586 G2

11

asemenea omoară celulele EL4 acoperite cu *ova* 238-276. Astfel, în scopul de a cerceta dacă un traseu endogen al celulei T CD8⁺ restricționat Clasa I poate fi indus printr-un antigen solubil, sistemul de mai sus s-a folosit pentru a determina dacă anumite formulări antigenice se pot folosi pentru a conduce antigenul solubil pe un traseu Clasa I restricționat.

5 a) *ova*

S-au inițiat o dată șoareci C57BL/6 cu diverse cantități de *ova* (30 μg - 1 mg per șoarece) cu sau fără o formulare antigenică. Șoarecii s-au injectat subcutanat și în baza cozii. S-au prelevat celulele splenice de la șoarecii imunizați la cel puțin 2 săptămâni după imunizare și s-au stimulat *in vitro* cu transfectanți EG7-*ova*. O concentrație *ova* de ordinul a 30 μg a fost la fel de eficientă ca o doză de 1 mg. Ulterior s-au efectuat studii CTL de rutină cu celule splenice de la șoarecii inițiați cu 30 μg de *ova*. După 5 zile de cultivare *in vitro* cu EG7-*ova* s-a analizat inițierea prin prezența efectorilor specifici *ova* capabili să lizeze EG7-*ova*.

Șoarecii injectați cu *ova* solubilă în HBSS în concentrația de 1 mg nu au prezentat dovada inițierii CTL (fig. 1A). Totuși, șoarecii imunizați cu 30 μg *ova* în formularea antigenică descrisă mai sus (prezentată în figuri ca AF) au demonstrat un semnificativ răspuns CTL specific transfectantului (fig. 1C). Mai mult, extinderea omorării EG7-*ova* de către celulele splenice imunizate cu *ova*-AF a fost comparabilă cu cele ale șoarecilor imunizați cu celule splenice încărcate cu *ova* (fig. 1B).

Specificitatea inițierii CTL *in vivo* a fost antigen specifică și s-a demonstrat prin lipsa celulelor splenice de la șoarecii imunizați cu β-galactozidază de a manifesta răspuns CTL secundar *in vitro* la stimularea cu EG7-*ova*. Nu s-a observat nici o inducere CTL specifică *ova*.

15 b) β-galactozidază

Rezultate similare au fost obținute folosind alt antigen proteinic solubil, β-gal. Pentru analiza răspunsului CTL specific β-gal, ținta folosită a fost BALB/c derivată a transfectantului C3-4 care exprimă β-gal. Imunizarea șoarecilor BALB/c cu β-gal a dat un răspuns CTL fondal. Ulterior pentru determinarea răspunsului CTL specific, recoltarea a fost amân timer pentru cel puțin 8 săptămâni înainte ca limfocitele splenice să fie recoltate și cultivate timp de 5 zile în prezența transfectanților C3-4 iradiați.

Figura 2B demonstrează că 30 μg de β-galactozidază în AF au indus un răspuns CTL specific puternic împotriva transfectantului. La un raport al efectorului la țintă (E:T) de 3:1, șoarecii imunizați cu β-gal-AF au prezentat circa 80% omorare C3-4 specifică. Cu toate acestea, s-a atins numai 20% omorare a aceleiași ținte cu efectori izolați de la șoareci imunizați cu β-gal în HBSS la același raport E:T (fig. 2A). Deoarece nici EL4 și nici P815 nu exprimă produsele genei MNC clasa II și liza prezintă restricție singeneică, acești efectori specifici *ova* și β-gal sunt MHC clasa I restricționați.

Pentru a demonstra utilitatea formulării antigenice, s-au imunizat șoareci cu *ova* încapsulată în două tipuri de lipozomi, din care unul a fost lipozom sensibil la pH. Peste o săptămână celulele splenice s-au stimulat *in vitro*, așa cum s-a descris mai sus, și s-au testat împotriva EG7-*ova* marcat ⁵¹Cr sau EL4. Fig. 3 arată un rezultat reprezentativ care demonstrează că *ova* în lipozom s-ar putea să nu inițieze șoarecii pentru inducere CTL substanțială. Rezultate similare s-au observat la imunizarea *ova* in alum.

40 **Exemplul 2. Recunoașterea epitopului prin CTL**

Carbone și Bevan, supra, au demonstrat că CTL induse la șoarecii C57BL/6 prin transfectantul EG7-*ova* și prin splenocite încărcate citoplasmatic cu *ova* recunosc celulele EL4 acoperite cu peptida *ova* 258-276. Pentru a determina dacă ovalbumina solubilă în AF induce răspunsuri CTL similare, s-au preparat celule splenice de la șoareci imunizați și stimulați *in vitro* cu EG7-*ova*. Efectorii s-au testat împotriva celulelor EL4 acoperite cu peptida *ova* 253-276, sau cu o peptidă de control derivată de la proteina mielinică bazică (MBP B4-102). Rezultatele demonstrează că *ova*-AF au inițiat CTL cu o specificitate similară celor inițiate prin transfectanți sau prin *ova* încărcată citoplasmatic (figurile 1A, 1B și 1C). Celulele efectorie inițiate cu *ova*-AF au lizat eficient EG7-*ova* și celulele EL4 netransfectate acoperite cu 50 μg/10⁸ celule de peptidă *ova*, dar nu lizează celulele EL4 acoperite cu 50 μg/10⁸ de peptidă MBP.

În sistemul de β-galactozidază, Carbone și Bevan, supra, au arătat că transfectantul care exprimă β-gal și splenocitele încărcate citoplasmatic cu β-galactozidază solubilă, au indus CTL care au lizat transfectantul exprimând β-gal și celulele P815 netransfectate acoperite cu β-galactozidază digestată alcalin. β-galactozidaza solubilă induce CTL care au specificitate similară celei la imunizarea cu AF (fig. 2).

55 **Exemplul 3. Efectorii CTL sunt celulele T CD8⁺**

MD 1586 G2

12

Antigenii proteici solubili în AF induc efectorii CD8⁺ ai celulelor T, după cum s-a dovedit din cele care urmează. S-au cultivat splenocite de la șoarecii imunizați timp de 5 zile cu transfectanți iradiați *in vitro*. Apoi celulele s-au recoltat și celulele T s-au epuizat de CD4⁺ sau CD8⁺ folosind anticorpi monoclonali anti-CD4 sau anti-CD8 plus complementul. Populațiile epuizate au fost testate împotriva ⁵¹Cr-EG7-ova în sistemul ova sau ⁵¹Cr-P13.1 în sistemul β-gal. Datele prezentate în fig. 4 arată că în sistemul ova epuizarea celulelor T CD8⁺ a anulat activitatea citotoxică conferită de către întreaga populație celulară efectorie. Totuși, epuizarea populației de CD4⁺ ale celulelor T nu are nici un efect asupra lizei EG7-ova.

10 În mod similar, în sistemul β-gal, epuizarea celulelor T CD8⁺ a anulat activitatea citotoxică a celulelor splenice imunizate cu formularea β-gal-antigen.

Exemplul 4. Ova solubilă în AF inițiază celulele T CD8⁺

Pentru a demonstra că ova-AF inițiază populații de celule T CD8⁺ *in vivo*, și este critică pentru răspunsul secundar *in vitro*, s-au epuizat splinele șoarecilor imunizați cu ova-AF și ale șoarecilor neinițiați de populațiile CD4⁺ sau CD8⁺. Apoi aceste populații tratate s-au stimulat *in vitro* numai cu EG7-ova, sau cu o combinație de celule T CD4⁺ și CD8⁺ de la șoarecii imunizați cu ova-AF, sau cu diverse combinații ale celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ de la șoarecii imunizați cu ova-AF cu celulele CD4⁺ sau CD8⁺ de la șoarecii neinițiați. Fig. 5 arată că celulele CD8⁺ inițiate sunt esențiale pentru manifestarea unui răspuns CTL *in vitro*. Aceste date indică, de asemenea, că pentru un răspuns CTL secundar eficient *in vitro* sunt necesare celulele T CD4⁺, pe când pentru inițiere aceste celule nu sunt necesare. În mod similar, celulele T CD8⁺ au fost necesare pentru manifestarea răspunsului CTL secundar specific β-gal *in vitro*.

Exemplele de mai sus demonstrează efectul formulării antigenice asupra inducerii răspunsurilor CTL restricționate Clasa I împotriva antigenilor proteici solubili. Formularea antigenică a mediat antigenul solubil care a indus inițierea CTL și este similară ca activitate celui indus prin transfectanți și prin splenocite încărcate citoplasmatic cu ova sau β-gal solubile. Sistemele de ovalbumină, EG7-ova, splenocite încărcate citoplasmatic cu ova și ova-AF au indus: (a) CTL CD8⁺ restricționate Clasa I; (b) CTL care recunosc ținta sensibilizată cu peptida sintetică ova 253-276; și (c) CTL de durată lungă la numai o singură imunizare. Sistemele de β-galactozidază, β-gal-AF au indus CTL care recunosc transfectantul C3-4 care exprimă β-gal și de asemenea, celulele P815 netransfectate sensibilizate cu β-gal digerată alcalin. Lucruri analoge s-au observat cu CTL induse prin imunizare cu celule splenice încărcate citoplasmatic cu β-galactozidază. Unica inducere a CTL specific ova este prin formularea antigenică, deoarece nici ova încapsulată într-un lipozom sensibil la pH, nici în alum, nu a putut să inducă inițierea CTL *in vitro*.

35 Aceste exemple demonstrează că formularea antigenică folosită mai sus și echivalentele sale sunt utile în tratamentul omului și în dezvoltarea vaccinurilor pentru a induce CTL în diverse cancere și boli virale.

Exemplul 5.

40 Acesta este un exemplu specific pentru a arăta folosirea AF de mai sus pentru inițierea CTL restricționate clasa I prin gp 120 solubilă a HIV.

Linia celulară care exprimă gp160 IIIB (15-12) s-a produs în linia de celule 3T3 derivată din fibroblast Balb/c. Ea a fost obținută de la Dr. Ron Germain și Dr. Jay Berzofsky, National Institute of Health, Bethesda, M.D. Linia de celule care exprimă gp160 s-a folosit pentru stimularea *in vitro* a limfocitelor splenice inițiate *in vitro* și s-a folosit de asemenea ca țintă pentru inducerea CTL specific gp160. S-au imunizat o dată șoarecii Balb/c cu 10 μg de gp160 per șoarece cu sau fără AF. Șoarecii s-au injectat în talpă și baza cozii subcutanat. Celulele splenice s-au prelevat de la șoarecii imunizați după 2 săptămâni de imunizare și s-au stimulat *in vitro* cu transfectanți gp160 iradiați. După 5 zile de cultură *in vitro*, inițierea s-a cercetat prin prezența efectorilor specifici capabili să lizeze transfectanții gp160, dar nu și liniile de celule netransfectate. Rezultatele sunt prezentate în Fig. 7, unde răspunsul CTL este potențat cu AF și gp120.

Exemplul care urmează demonstrează utilizarea formulărilor antigenice ale acestei invenții folosind numai 1 sau 2 componente. Aceste exemple demonstrează că răspunsurile CTL pot fi induse numai cu 2 din cele 3 componente de mai sus.

55 **Exemplul 6. Determinarea componentelor critice necesare pentru inducerea CTL**

MD 1586 G2

13

- Pentru a determina dacă toate componentele notate mai sus sunt necesare pentru inducere de CTL antigen specifice, s-au imunizat șoareci cu ovalbumină într-o formulare microfluidizată în diverse combinații de 2 din cele 3 componente prezente în AF de mai sus. Combinațiile din 2 componente folosite au fost după cum urmează: Squalan/TWEEN în PBS, Squalan/Pluronic în PBS sau Pluronic/TWEEN în PBS. Alt set de grupuri a inclus șoareci imunizați cu *ova* formulată într-un sistem de un component adică, numai Squalan în PBS, Pluronic în PBS sau TWEEN în PBS. Formularea antigenică din cele trei componente de mai sus a fost modificată pentru a exclude la un moment un component, punând în locul acestuia PBS.
- Formulările antigenice de mai sus au constat din 0,300 g TWEEN 80 (Aldrich, WI), 1, 875 g Pluronic L121 (BASE, NJ) și 7,5 g Squalan (Aldrich, WI) aduse la 50 ml cu PBS.
- Formulările din două componente au fost:
 Squalan/TWEEN: 0,300 g TWEEN 80 și 7,5 g Squalan adus la 50 ml cu PBS.
 Pluronic/TWEEN: 1, 875 g Pluronic L121 și 0,300 g TWEEN 80 adus la 50 ml cu PBS.
 Pluronic/Squalan: 1,875 g Pluronic L121 și 7,5 g Squalan adus la 50 ml cu PBS.
- Probele au fost tratate apoi printr-un microfluidizor, model 110T, Microfluidics corp și închise în sticle și depozitate la 4°C până la folosire.
- S-a cântărit ovalbumină (Sigma, MO) și s-a adus la o soluție 0,3 mg/ml în HBSS (Wittaker, *supra*). Soluția de 0,3 mg/ml s-a combinat cu formularea din două componente în următoarele cantități: 5 părți soluție 0,3 mg/ml ovalbumină, 3,3 părți de formulare din 2 componente și 1,7 părți HBSS.
- Formularea s-a agitat și s-a păstrat pe gheață până la injectare. Toate soluțiile s-au combinat chiar înainte de injectare.
- Fiecare șoarece a primit 200 μ l dintr-o formulare care conține 30 μ l de *ova* prin injectare în ambele tălpi din spate și soluția restantă s-a injectat subcutanat la baza cozii. Șoarecii s-au lăsat în repaus timp de 2-4 săptămâni până de prelevarea splinei.
- Peste două săptămâni după imunizări s-au preparat celulele splenice și s-au stimulat *in vitro* cu EG7-*ova* iradiată. După 5 zile de cultivare prezența CTL specific *ova* s-a măsurat prin testare față de ^{51}Cr -EG7-*ova* sau ^{51}Cr -EL4 printr-un test de eliberare de ^{51}Cr timp de 4 ore. Datele prezentate în fig. 8-10 demonstrează că ovalbumina formulată în sistemul din 2 componente microfluidizate poate iniția *in vivo* CTL specific *ova*.
- În continuare am evaluat contribuția componentelor individuale în funcție de capacitatea lor de a induce CTL la combinare cu antigeni proteici. În scop de imunizare antigenul solubil s-a amestecat cu excipienți microfluidizați pentru a obține o emulsie omogenă stabilă cu dimensiunea particulelor de 250-300 nm. Pentru a defini suplimentar componentele formulării squalan-Tween 80-pluronic (STP) responsabil de inducerea CTL am imunizat șoareci cu *ova* în amestec de squalan-Tween 80 (ST), amestec de pluronic-Tween 80 (PT), sau amestec de squalan-pluronic (SP) și drept martor, în squalan (S), Tween 80 (T) sau pluronic (9). De asemenea șoarecii au fost imunizați cu *ova*-SAFm (care conține 70 μ g de MDP) sau *ova*-alum ca adjuvanți-martori. Pentru un control pozitiv șoarecii au fost imunizați cu celule splenice încărcate citoplasmatic cu *ova* solubilă. S-au folosit, de asemenea, alte combinații și substituții, rezultatele fiind prezentate în tabelul 1.
- Pentru detectarea studiilor de inițiere a CTL, șoarecii au fost imunizați o singură dată. Peste două săptămâni după imunizare celulele splenice s-au amestecat cu EG7-*ova* iradiată (celule EL4 care exprimă *ova*) timp de 5 zile și s-au testat față de ^{51}Cr -EG7-*ova* sau celulele ^{51}Cr -EL4. Rezultatele (fig. 11) demonstrează că 30 μ g de *ova* în combinație cu STP sau ST inițiază la șoareci răspuns CTL restricționat clasa I. Inițierea CTL specifice *ova* prin *ova* în STP sau prin *ova* în ST se pare a fi mai bună decât cea indusă prin celulele splenice încărcate citoplasmatic cu *ova* solubilă. *Ova* în PT sau SP a putut să inducă răspunsuri CTL specifice *ova* la șoareci, dar inconsistente și slabe. Spre deosebire de SAFm, adăugarea de MDP la formularea ST nu a compromis inducerea de CTL specific *ova* la șoareci (tabelul 2). Nu s-a întâlnit inducerea de CTL specifică *ova* nici când șoarecii s-au imunizat cu *ova* amestecată cu componente individuale S, P sau T, nici când șoarecii s-au imunizat cu *ova*-SAFm sau *ova*-alum. Șoarecii imunizați cu mai mult de 1 mg *ova* în (a) HBSS, în (b) SAFm sau (c) adsorbită la alum nu inițiază CTL specific *ova*.

Tabelul 2

Inducerea răspunsului CTL specific *ova* neblocați prin ST+MDP

	Citotoxicitate: la șoareci imunizați cu *
--	---

MD 1586 G2

14

Stimulare	Tintă **	E-T	Ova-ST	Ova-ST	Ova-ST-MDP 300 µg /şoarece	Ova-ST-MDP 72 µg /şoarece
EG7-ova	EG7-ova	100:1	0	100	82	76
		33:1	0	86	67	62
		11:1	0	33	39	25
		3:1	0	6	13	3
		1:1	0	0	0	0
		3:1	0	0	0	0

* 30 µg ova în diverse formulări

** % citotoxicităţii s-a calculat prin scăderea procentului de omorâre faţă de celulele care nu exprimă antigenul

5

Exemplul 7. Componente necesare pentru producerea anticorpului specific ova

S-au imunizat şoareci de trei ori la intervale de 2 săptămâni cu 30 µg de ova în HBSS, STP, ST, PT sau SP. Drept control pozitiv şoarecii s-au imunizat de asemenea cu ova-SAFm, deoarece SAFm este cunoscut că induce un răspuns de anticorpi puternic. Peste şapte zile după a doua şi a treia imunizare s-a prelevat sânge de la şoareci şi serurile s-au testat la răspunsul de anticorpi specific ova. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3. Ele demonstrează că şoarecii imunizaţi cu ova în STP, ST sau SAFm prezintă răspunsuri anti-ova după 2 imunizări.

15

Tabelul 3

20

Inducerea răspunsului de anticorpi anti-ova

Formulare 30 µg ova/animal	# şoareci care răspund/ # şoareci injectaţi	1/diluţie a titrului serului
HBSS	0/3	<1/20, <1/120, <1/20
STP	3/3	<1/4860, >1/4860, <1/4860
ST	3/3	>1/4860, >1/4860, >1/4860
PT	NA*	NA, NA, NA
SP	NA	NA, NA, NA
SAF-M	3/3	1/4860, 1/4860, 1/4860

* NA - neaccesibil

Exemplul 8. Inducerea CTL specifice gp120 HIV

S-a folosit gp120 IIIB HIV în calitate de sistem antigenic secundar pentru inducerea CTL în STP, ST sau MP-T. Şoarecii s-au imunizat cu 1 mg de gp120 IIIB în HBSS, STP, PT sau în ST. Ca martori s-au imunizat şoareci cu 1 mg gp120IIIB în SAFm sau CFA (adjuvant Freund complet), sau cu un sistem de adjuvant RIBI care conţine MPL (lipida A monofosforil) şi TDM (dimicolit de trehaloză). Peste trei săptămâni după imunizare s-au preparat celule splenice şi s-au stimulat *in vitro* cu mitomicină tratată cu celule 15-12 transfectate sau cu peptida 18IIb. Peste cinci zile de cultivare celulele efectoare rezultante s-au testat faţă de vaccinia: gp160IIIB sau celulele materne P815 infectate cu vaccinia în calitate de ţinte. Rezultatele demonstrează că formularea gp120-Squalan-TWEEN 80 şi nu formularea gp120-Squalan-TWEEN 80 pluronic sau gp120-HBSS a indus răspunsul CTL specific la şoareci (tabelul 4).

35

Tabelul 4

Inducerea răspunsului CTL specific gp120 la şoareci

Stimulator	Tintă **	Citotoxicitate (%) la şoareci imunizaţi cu *			
		E-T	gp120-HBSS	gp120-ST	gp120-STP
18IIb/IL2	vac:120	100:1	23	42	NA***
		33:1	23	38	NA

MD 1586 G2

15

		11:1	0	0	NA
		3:1	0	35	NA
18IIIb/IL2	15-20	100:1	0	50	0
		33:1	0	35	0
		11:3	0	27	0
		3:1	0	18	0
18IIIb/IIIb	3T3+18IIIb	100:1	0	59	13
		33:1	0	59	2
		11:1	0	57	0
		3:1	0	29	0
15-12	vac:gp120	100:1	35	84	NA
		33:1	19	65	NA
		11:1	12	37	NA
		3:1	0	22	NA
		1:1	0	0	NA

* 1 mg de gp120III în diverse formulări

** % citotoxicității s-a calculat prin scăderea procentului de omorâre față de linia de celule care nu exprimă antigen

***NA - neaccesibil

5

Exemplul 9. Inducerea răspunsului umoral specific gp120 la șoareci

Pentru inducerea răspunsurilor umorale specifice gp120, s-au imunizat șoareci cu 1 mg de gp120IIIb de trei ori la intervale de 2 săptămâni. De la animale s-a prelevat sânge și s-a testat la prezența anticorpilor IgG care detectează gp120IIIb prin testul ELISA în fază solidă. Rezultatele demonstrează că gp120-ST este un imunogen mai bun decât gp120-HBSS, gp120SAFm sau gp120-STP (tabelul 5).

10

15

Tabelul 5

20

Inducerea răspunsurilor de anticorpi anti-gp120

Formulare de 1 mg gp120/animal	# șoareci care răspund/ # șoareci injectați	1/diluție a titrului serului
HBSS	0/3	<1/20, <1/20, <1/20
STP	1/3	<1/120, >1/4860, <1/20
ST	3/3	>1/4860, >1/4860, >1/4860
PT	3/3	>1/4860, >1/4860, >1/4860
SP	2/3	<1/20, <1/540, <1/540
SAF-M	2/3	1/180, >1/4860, 1/540

Exemplul 10. Răspunsuri de anticorpi specifice gp120 la maimuțe

S-au imunizat maimuțe (2 per grup) cu gp120-SAFm, gp120-SPT, gp120-ST sau gp120-HBSS.

Ca martor s-a imunizat un grup de maimuțe cu vaccinul recombinant care conține gp160 IIIb. Maimuțele s-au imunizat la intervale de 2 săptămâni și li s-a prelevat sânge la 2 săptămâni și 3 săptămâni după a doua imunizare. Serurile pre- și imune de la fiecare maimuță s-au diluat serial și s-au cercetat la activitate anti-gp120 prin ELISA, așa cum este descris în materiale și metode. Datele (fig. 12) arată că maimuțele imunizate cu gp120-STP sau gp120-SAFm au indus răspunsuri similare la ele. O maimuță imunizată cu gp120-ST a indus răspuns anti-gp120 similar grupului imunizat cu gp120-SAFm sau gp120-SPT. O maimuță imunizată cu gp120-SPT nu a indus răspuns puternic anti-gp120 după 2 imunizări.

25

30

MD 1586 G2

16

Exemplul 11. Activitatea *in vivo* a AF în combinație cu HPV 16 E7

1. Generarea proteinei HPV 16 E7 recombinante pentru imunizare

a) PCR și clonarea genei E7

Gena HPV 16 E7 s-a clonat de la un plasmid obținut de la Dr. Karen Voudsen (Ludwig Institute)
5 codificând gena E7 derivată din linia de celule de carcinom CaSKi. Regiunile codificatoare s-au amplificat prin PCR folosind inițiatori care codifică capetele 5' și 3' ale genelor flancate prin site-urile de clonare Bam HI și Sal I. Produsul PCR T7 s-a inserat în vectorul de expresie pGEX-4T-1 (Pharmacia Biotech), rezultând plasmidul de expresie pGEX.E7. S-a transfectat *E.coli* tulpina XL1-blue (stratagenă) cu plasmidul de expresie pGEX.E7. Secvența lui E7 s-a obținut din plasmidele din
10 coloniile rezultate și a fost identică secvenței E7 obținute din celule CaSKi.

b) Producerea și purificarea E7 exprimată bacterian

Plasmidul de expresie bacterian pGEX.E7 codifică o proteină de fuziune glutation-S-transferaza (GST), care constă din GST la amino-terminali, un site de clivaj a proteazei trombinice și proteina E7 la carboxi-terminali. Proteina E7 s-a produs și s-a purificat conform descrierii în literatura de
15 informare de la producătorul vectorului pGEX-4T-1 (Pharmacia Biotech). Pe scurt, bacteriile care conțin plasmidul de expresie pGEX.E7 s-au indus pentru a exprima proteina de fuziune prin adăugare de izopropil β-D-tiogalactozidază la mediul de cultură. Celulele s-au recoltat și s-au lizat prin sonificare blândă. Lizatul s-a aplicat la glutation sefaroză 4B (Pharmacia Biotech). După legarea proteinei de fuziune la matrice, rășina s-a spălat pentru îndepărtarea proteinelor legate nespecific.
20 Proteina de fuziune legată s-a digerat cu trombină pentru eliberarea proteinei E7 din partenerul de fuziune GST.

Preparatul de proteină E7 s-a analizat prin SDS-PAGE și concentrația proteinei E7 s-a determinat prin analiza Bradford (BioRad). S-au obținut 9 mg de proteină E7 solubilă la 1 litru de cultură bacteriană.

25 2. Generarea transfectantului X21 E7

Secvențele codificatoare pentru proteina HPV16 E7 (vezi mai sus) s-au inserat în plasmidul de expresie eucariot INPEP4, proprietatea IDEC. În acest vector expresia E7 este controlată de elementele transcripționale promotor/intensificator de citomegalovirus. Suplimentar, primele trei nucleotide ale secvenței de codificare E7 s-au îndepărtat și înlocuit cu o secvență lider de lanț ușor
30 imunoglobulinic plasat imediat în amonte și în cadrul cu regiunea de codificare E7. După transfectare în linia de celule de șoareci X21 s-au examinat clonurile individuale rezistente G418 prin testele Northern blot la producerea de mesaje E7. Fiecare clon a prezentat mesaj E7 detectabil. Apoi s-a efectuat testul Western blot al lizatelor celulare la 2 din aceste clonuri, 4E7 și 1C7 (HOPE1 și, respectiv, HOPE2) și s-a demonstrat producerea proteinei E7.

35 3. Activitatea *in vivo* a imunizării cu antigen solubil E7/AF

În aceste studii s-au folosit femele de șoareci de fundal C3H (H2^{k/k}, Harlan Sprague Dawley). Animalele s-au menținut conform "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (DHHS Publication No. NIH 86-23, Bethesda, MD:NIH, 1985) și au primit hrană și apă *ad libitum*. În aceste studii s-a folosit linia de celule transfectate E7 HOPE2 H2^{k/k}. Linia de celule tumorale s-a menținut
40 prin pasaj serial *in vitro*.

Această linie de celule s-a dovedit a menține expresia antigenului citoplasmic E7, așa cum s-a detectat prin analiza Western blot, care s-a repetat în pasajele *in vitro*. S-au inițiat tumore la șoarecii C3H singeneici prin injectarea subcutanată a 150 000 celule trecute *in vitro*.

Tumorele s-au măsurat în 2 direcții perpendiculare la intervale bisăptămânale. Volumul tumorii
45 (V) s-a calculat conform formulei următoare:

$$V(\text{mm}^3) = (L \times W^2) \text{ împărțit la } 2, \text{ unde:}$$

L = cea mai lungă axă măsurată în mm;

W = axa perpendiculară (mm)

În tabelul 6 sunt prezentate date despre tumore la șoareci (numărul de animale ce au tumore
50 față de numărul total al animalelor injectate). În figurile 13 și 14 sunt prezentate date despre mărimea medie a tumorii (mm³) ale fiecărui lot de tratament sau lot martor. Fiecare lot de tratament s-a comparat cu un lot martor care nu a primit terapie. Terapia a început la 10 zile după inocularea celulelor HOPE2, când majoritatea dintre tumore au fost palpabile (aproximativ 50-75 mm³). Terapia s-a inițiat prin imunizarea șoarecilor cu proteina E7 solubilă în AF sau adjuvanți de Alum (subcutanat într-un volum total de 0,2 ml). Imediat înainte de imunizare AF s-a amestecat timp de 60 de secunde
55 cu proteina E7 în soluția salină echilibrată Hanks (HBSS), astfel încât fiecare șoarece a primit fie 30 mg, fie 90 mg în 0,2 ml de proteină E7. Alum (Pierce Chemical Co.) s-a amestecat cu proteina E7

MD 1586 G2

17

conform instrucțiunilor de fabricare, astfel încât fiecare animal a primit în 0,2 ml câte 90 mg de proteină E7 per șoarece. Animalele din al doilea lot de tratament au primit a doua imunizare peste 9 zile (la 19 zile după inocularea celulei tumorale). Booster Immunization s-au preparat imediat înainte de inoculare conform descrierii de mai sus.

5 În acest exemplu (tabelul 6: Xp # 233), la 41 zile după inocularea celulelor tumorale numai 4/8 și 5/8 de șoareci care au primit o singură injecție de E7 solubilă în AF (30 mg sau, respectiv, 90 mg) au avut tumore măsurabile. În contrast, toți șoarecii imunizați cu proteină E7 în Alum (8/8) au avut tumore în creștere activă. Suplimentar, după cum este prezentat în figura 13, s-a observat inhibarea semnificativă a creșterii tumorii numai în loturile de tratament imunizate cu proteină E7 în AF comparativ cu loturile martor (netratați) sau cele de tratament cu Alum. Inhibarea creșterii tumorii (fig. 13) sau rate crescute de regresie a tumorii (tabelul 6) nu s-au observat la șoarecii care au primit o singură injecție de E7 în Alum.

10 Rezultate similare s-au observat de asemenea la loturile de tratament care au primit 2 imunizări la zilele 10 și 19 după provocarea tumorii (tabelul 6 și figura 16), deși s-a observat careva întârziere a creșterii tumorii la șoarecii care au primit 2 injecții de E7 în Alum.

15 Rezultatele demonstrează că activitate antitumorală semnificativă, după cum s-a măsurat printr-o descrescere a numărului de tumore pe care le au șoarecii și inhibarea creșterii tumorii, s-a observat după imunizare cu E7 solubilă în AF. În contrast, toate animalele imunizate fie cu o injecție unică, fie cu o injecție dublă de proteină E7 solubilă în Alum, au avut tumore în creștere. Ca rezumat, imunizarea cu proteină E7 solubilă în AF a avut ca rezultat o inhibare semnificativă a creșterii celulei tumorale care nu s-a observat folosind imunizarea cu E7 solubilă în Alum.

Tabelul 6

Activitatea antitumorală a imunizării cu E7 solubilă în adjuvant

Exp. #	Tratament	Doză (mg/șoarece)	Animale ^a cu tumoră la ziua 41
223	Martor	-	7/8
223	E7 in AF	30 mg x 1 ^b	4/8
223	E7 in AF	90 mg x 1	5/8
223	E7 in Alum	90 mg x 1	8/8
223	E7 in AF	30 mg x 2 ^c	3/8
223	E7 in AF	90 mg x 2	1/4
223	E7 in Alum	90 mg x 2	8/8

^a - numărul de șoareci purtători de tumore/număr total inoculați

^b - toate imunizările au început la ziua 10 după implantare

^c - a doua imunizare (x 2) la ziua 19 după implantare.

(57) Revendicări:

1. Compoziție pentru inducerea unui răspuns citotoxic T-limfocitar, ce conține un antigen amestecat cu o formulare antigenică microfluidizată cuprinzând:

- un detergent stabilizator,
- un agent de formare a micelilor, și
- un ulei biodegradabil și biocompatibil,

numita formulare antigenică fiind formulată ca o emulsie stabilă ulei-in-apă și fiind lipsită de peptide imunostimulatoare.

2. Compoziție, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** antigenul este ales din următorii antigeni sau din porțiunile lor antigenice: antigeni ai HIV: gp160, gag, pol, Nef, Tat și Rev; antigeni ai malariei: proteina CS și proteina 2 de suprafață a sporozoitului; antigeni de suprafață ai hepatitei B: Pre-S1, Pre-S2, HBcAg și HbeAg; antigeni ai gripei: HA, NP și NA; antigeni de suprafață ai hepatitei A; antigeni ai virusului Herpes: gp340 al EBV, gp85 al EBV, gB al HSV, gD al HSV, gH al HSV, produsul proteic precoce al HSV, gB al citomegalovirusului, gH al citomegalovirusului și proteina IE gp72; antigeni ai virusului sincițial respirator: proteina F, proteina G și proteina N; și antigeni tumorali: ACE al carcinomului, mucina asociată carcinomului, P21 al carcinomului, P53 al carcinomului, MPG al melanomului, p97 al melanomului, produsul oncogenului Neu al carcinomului, produsul genei P53 al carcinomului, antigen al virusului papilomului uman, antigen specific prostatei (PSA) și proteina p21 ras mutată.

MD 1586 G2

18

3. Compoziție pentru inducerea unui răspuns citotoxic T-limfocitar, ce conține un antigen amestecat cu o formulare antigenică microfluidizată cuprinzând două din următoarele componente:

- a) un detergent stabilizator,
 - b) un agent de formare a micelilor, și
 - 5 c) un ulei biodegradabil și biocompatibil,
- numita formulare antigenică fiind formulată ca o emulsie stabilă ulei-in-apă și fiind lipsită de peptide imunostimulatoare.

4. Compoziție, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** antigenul este ales din următorii antigeni sau din porțiunile lor antigenice: antigeni ai HIV: gp160, gag, pol, Nef, Tat și Rev; antigeni ai malariei: proteina CS și proteina 2 de suprafață a sporozoitului; antigeni de suprafață ai hepatitei B: Pre-S1, Pre-S2, HBcAg și HbeAg; antigeni ai gripei: HA, NP și NA; antigeni de suprafață ai hepatitei A; antigeni ai virusului herpes: gp340 al EBV, gp85 al EBV, gB al HSV, gD al HSV, gH al HSV, produsul proteinic precoce al HSV, gB al citomegalovirusului, gH al citomegalovirusului și proteina IE gp72; antigeni ai virusului sincițial respirator: proteina F, proteina G și proteina N; și antigeni tumorali: ACE al carcinomului, mucina asociată carcinomului, P21 al carcinomului, P53 al carcinomului, MPG al melanomului, p97 al melanomului, produsul oncogenului Neu al carcinomului, produsul genei P53 al carcinomului și proteina p21 ras mutată.

5. Compoziție, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** numita formulare antigenică constă în esență din detergent și agent de formare a micelilor.

6. Compoziție, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** numita formulare antigenică constă în esență din detergent și ulei.

7. Compoziție, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** numita formulare antigenică constă în esență din ulei și agent de formare a micelilor.

8. Compoziție pentru inducerea unui răspuns citotoxic T-limfocitar, ce conține un antigen amestecat cu o formulare antigenică microfluidizată cuprinzând:

- a) un detergent stabilizator,
 - b) un agent de formare a micelilor, și
 - c) un ulei biodegradabil și biocompatibil,
- numita formulare antigenică fiind formulată ca o emulsie stabilă ulei-in-apă și fiind substanțial lipsită de peptide imunostimulatoare.

9. Compoziție, conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** antigenul este ales din următorii antigeni sau din porțiunile lor antigenice: antigeni ai HIV: gp160, gag, pol, Nef, Tat și Rev; antigeni ai malariei: proteina CS și proteina 2 de suprafață a sporozoitului; antigeni de suprafață ai hepatitei B: Pre-S1, Pre-S2, HBcAg și HbeAg; antigeni ai gripei: HA, NP și NA; antigeni de suprafață ai hepatitei A; antigeni ai virusului Herpes: gp340 al EBV, gp85 al EBV, gB al HSV, gD al HSV, gH al HSV, produsul proteinic precoce al HSV, gB al citomegalovirusului, gH al citomegalovirusului și proteina IE gp72; antigeni ai virusului sincițial respirator: proteina F, proteina G și proteina N; și antigeni tumorali: ACE al carcinomului, mucina asociată carcinomului, P21 al carcinomului, P53 al carcinomului, MPG al melanomului, p97 al melanomului, produsul oncogenului Neu al carcinomului, produsul genei P53 al carcinomului și proteina p21 ras mutată.

10. Compoziție, conform revendicărilor 1,8, **caracterizată prin aceea că** formularea antigenică constă esențial din detergent, agent de formare a micelilor și ulei.

11. Compoziție, conform revendicărilor 1-10, **caracterizată prin aceea că** detergentul de stabilizare este selectat din grupul constituit din polisorbit 80, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Zwittergent 3-12, Teepol HB7 și Span 85.

12. Compoziție, conform revendicărilor 1-10, **caracterizată prin aceea că** cantitatea de detergent este cuprinsă în limitele de 0,05...0,5%.

13. Compoziție, conform revendicării 12, **caracterizată prin aceea că** cantitatea de detergent este de circa 0,2%.

14. Compoziție, conform revendicărilor 1-10, **caracterizată prin aceea că** agentul de formare a micelilor are o balanță hidrofil-lipofilă cuprinsă în limitele dintre 0...2.

15. Compoziție, conform revendicărilor 1-10, **caracterizată prin aceea că** agentul de formare a micelilor este selectat din grupul constituit din poloxamer 401, Pluronic L62LF, Pluronic L101, Pluronic L64, PEG1000, Tetronic 1501, Tetronic 150R1, Tetronic 701, Tetronic 901, Tetronic 1301 și Tetronic 130R1.

16. Compoziție, conform revendicărilor 1-10, **caracterizată prin aceea că** cantitatea agentului de formare a micelilor este cuprinsă în limitele de 0,5...10%.

MD 1586 G2

19

17. Compoziție, conform revendicării 16, **caracterizată prin aceea că** cantitatea agentului de formare a micelor este cuprinsă în limitele de 1,25...5%.
18. Compoziție, conform revendicărilor 1-10, **caracterizată prin aceea că** uleiul are o temperatură de topire mai mică de 60°C.
- 5 19. Compoziție, conform revendicării 1 sau 3, **caracterizată prin aceea că** uleiul este selectat din grupul constituit din squalen, eicosan, tetratetracontan, pristan, glicerol și uleiuri vegetale.
20. Compoziție, conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** uleiul este selectat din grupul constituit din squalen, squalan, eicosan, tetratetracontan, pristan, glicerol și uleiuri vegetale.
- 10 21. Compoziție, conform revendicărilor 1-10, **caracterizată prin aceea că** cantitatea de ulei este cuprinsă în limitele de 1...10%.
22. Compoziție, conform revendicării 21, **caracterizată prin aceea că** cantitatea de ulei este cuprinsă în limitele de 2,5...5%.
23. Compoziție, conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** conține mai puțin de 20 μg de muramil dipeptidă la o doză unică.
- 15 24. Compoziție, conform revendicării 1, 3 sau 8, **caracterizată prin aceea că** nu conține muramil dipeptidă.
25. Compoziție, conform revendicărilor 1-10, **caracterizată prin aceea că** detergentul este polisorbitat 80 și agentul de formare a micelor este poloxamer 401.
26. Compoziție, conform revendicării 25, **caracterizată prin aceea că** uleiul este squalan.
- 20 27. Compoziție, conform revendicării 1 sau 3, **caracterizată prin aceea că** detergentul este selectat din grupul constituit din Tween 20, Tween 40 și Tween 80, uleiul este selectat din grupul constituit din squalan, eicosan, ulei de măsline și pristan și agentul de formare a micelor este selectat din grupul constituit din Pluronic L62LF și poloxamer 401.
28. Compoziție, conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** detergentul este selectat din grupul constituit din Tween 20, Tween 40 și Tween 80, uleiul este selectat din grupul constituit din squalan, eicosan și pristan și agentul de formare a micelor este selectat din grupul constituit din Pluronic L62LF și poloxamer 401.
- 25 29. Compoziție, conform revendicărilor precedente, **caracterizată prin aceea că** mărimea particulelor din amestec este de 250...300 nm.
- 30 30. Metodă de inducere a unui răspuns citotoxic T-limfocitar la un animal sau om, care cuprinde administrarea unui agent antigenic, **caracterizată prin aceea că** în calitate de agent antigenic se administrează o compoziție conform uneia din revendicările 1, 3 într-o cantitate suficientă pentru a induce un răspuns citotoxic T-limfocitar specific antigenului conținut în numita compoziție.
- 35 31. Metodă, conform revendicării 30, **caracterizată prin aceea că** compoziția se administrează în esență o singură dată.
32. Metodă, conform revendicării 30, **caracterizată prin aceea că** omul sau animalul este infectat cu un virus sau suferă de unul sau mai multe simptome de infectare cu numitul virus.
33. Metodă, conform revendicării 30, **caracterizată prin aceea că** formularea antigenică este netoxică pentru numitul om sau animal.
- 40 34. Metodă de tratament al unei afecțiuni prin inducerea unui răspuns citotoxic T-limfocitar administrând un agent antigenic, **caracterizată prin aceea că** în calitate de agent antigenic se administrează o compoziție conform uneia din revendicările 1, 3 într-o cantitate suficientă pentru a induce un răspuns citotoxic T-limfocitar specific antigenului conținut în numita compoziție.
- 45 35. Metodă, conform revendicării 34, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea reprezintă infecție HIV.
36. Metodă, conform revendicării 35, **caracterizată prin aceea că** antigenul asociat HIV este selectat din gp160, gag, pol, Nef, Tat și Rev.
37. Metodă, conform revendicării 34, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea reprezintă malaria.
- 50 38. Metodă, conform revendicării 37, **caracterizată prin aceea că** antigenul asociat malariei este selectat din proteina CS și proteina 2 de suprafață a sporozoitului.
39. Metodă, conform revendicării 34, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea reprezintă gripă.
40. Metodă, conform revendicării 39, **caracterizată prin aceea că** antigenul asociat gripei este selectat din HA, NP și NA.
- 55 41. Metodă, conform revendicării 34, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea reprezintă hepatită.

MD 1586 G2

20

42. Metodă, conform revendicării 41, **caracterizată prin aceea că** antigenul asociat hepatitei este selectat din antigenul de suprafață ai hepatitei A, Pre-S1, Pre-S2, HBcAg și HBsAg.
43. Metodă, conform revendicării 34, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea reprezintă infectare cu virusul herpes.
- 5 44. Metodă, conform revendicării 43, **caracterizată prin aceea că** antigenul asociat virusului herpes este selectat din gp340 al EBV, gp85 al EBV, gB al HSV, gD al HSV, gH al HSV, produsul proteinic precoce al HSV, gB al citomegalovirusului, gH al citomegalovirusului și proteina IE gp72.
45. Metodă, conform revendicării 34, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea reprezintă infectare cu virusul sincițial respirator.
- 10 46. Metodă, conform revendicării 45, **caracterizată prin aceea că** antigenul asociat virusului sincițial respirator este selectat din proteina F, proteina G și proteina N.
47. Metodă, conform revendicării 34, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea reprezintă o stare canceroasă.
48. Metodă, conform revendicării 47, **caracterizată prin aceea că** antigenul asociat cancerului este selectat din ACE al carcinomului, mucina asociată carcinomului, P21 al carcinomului, P53 al carcinomului, MPG al melanomului, p97 al melanomului, produsul oncogenului Neu al carcinomului, produsul genei P53 al carcinomului și proteina p21 ras mutată.
- 15 49. Metodă, conform revendicării 34, **caracterizată prin aceea că** se administrează compoziția definită în revendicarea 1, care conține antigen al virusului papilomului uman selectat din grupul constând din antigenul E6 al HPV16, antigenul E7 al HPV16, antigenul E6 al HPV18, antigenul E7 al HPV18, antigenul E4 al HPV6, antigenul L1 al HPV6, antigenul E4 al HPV11 și antigenul L1 al HPV11.
- 20 50. Metodă, conform revendicării 49, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea reprezintă cancer cervical.
- 25 51. Metodă, conform revendicării 49, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea reprezintă condilome acuminat.
52. Metodă, conform revendicării 34, **caracterizată prin aceea că** se administrează compoziția definită în revendicarea 1, care conține antigen specific prostatei (PSA).
53. Metodă, conform revendicării 52, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea reprezintă cancerul de prostată.
- 30

(56) Referințe bibliografice:

- 35 1. ALLISON, A. C. și alții. Vaccines: recent Trends and progress. Immunology Today, 1990, vol. 11, nr. 12, p. 427-429
2. BYARS, N. E. și alții. Adjuvant Formulation for use in Vaccines to Elicit Both Cell-Mediated and Humoral Immunity. Vaccine, 1987, vol. 5, p. 223-228
3. US 4 770 874 A
- 40 4. ALLISON, A. C. și alții. Immunological Adjuvants: desirable Properties and Side-Effects. Molecular Immunology, 1991, vol. 28, nr. 3, p. 279-284
5. ALLISON, A. C. și alții. An Adjuvant Formulation that Selectively Elicits the Formation of Antibodies of protective Isotypes and of Cell-Mediated Immunity. Journal of Immunological Methods, 1986, vol. 95, p. 157-168

Șef Direcție
Invenții:

JOVMIR Tudor

Examinator:

CEBAN Aurelia

Redactor:

ANDRIUȚĂ Victoria

MD 1586 G2

21

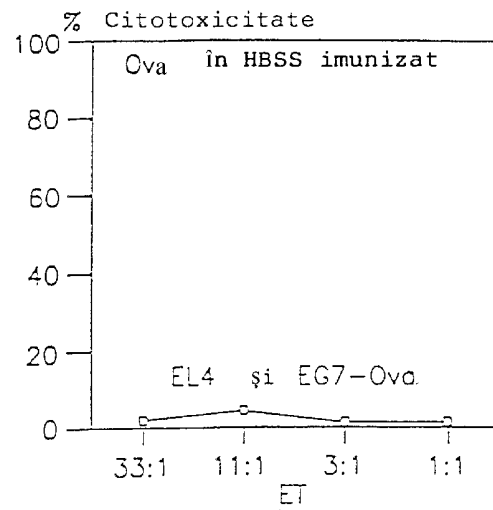


Fig. 1A

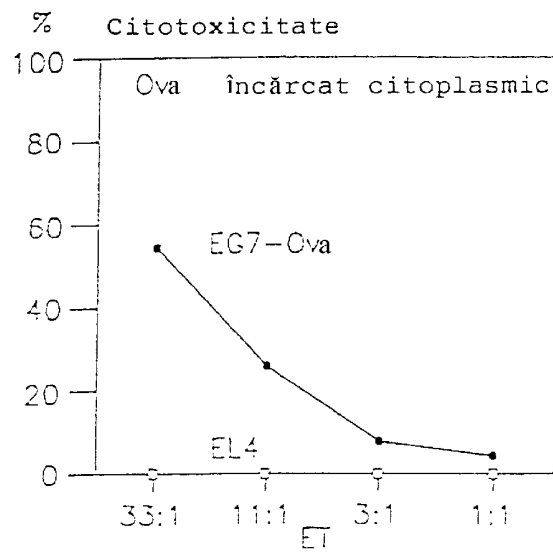


Fig. 1B

MD 1586 G2

22

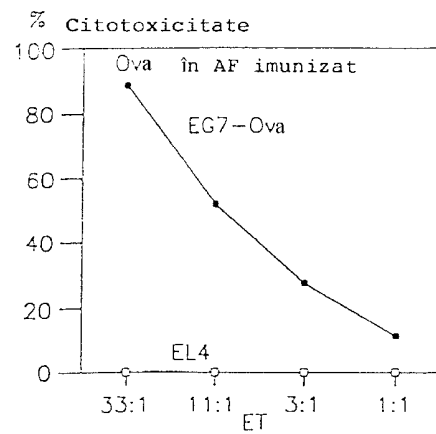


Fig. 1C

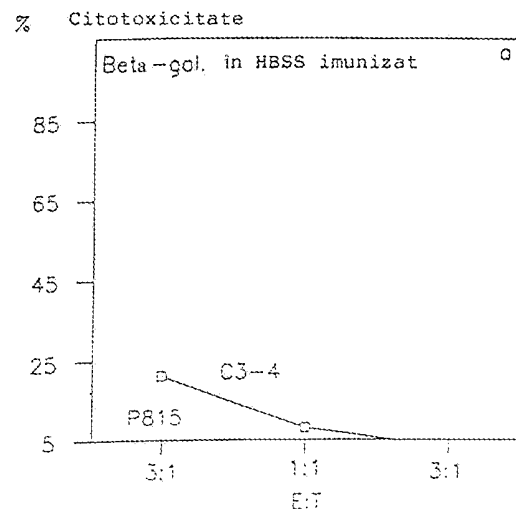


Fig. 2a

MD 1586 G2

23

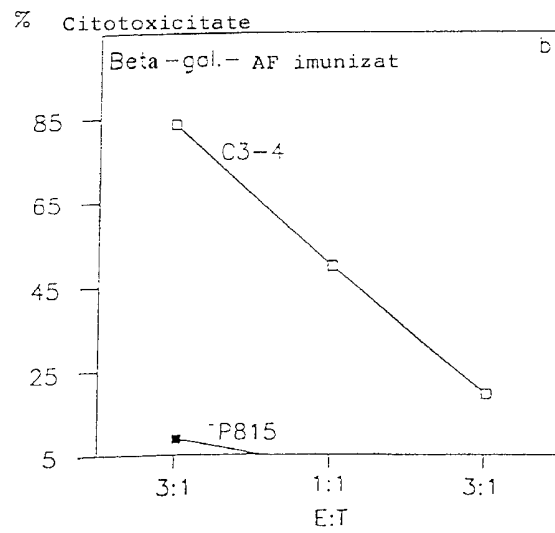


Fig. 2b

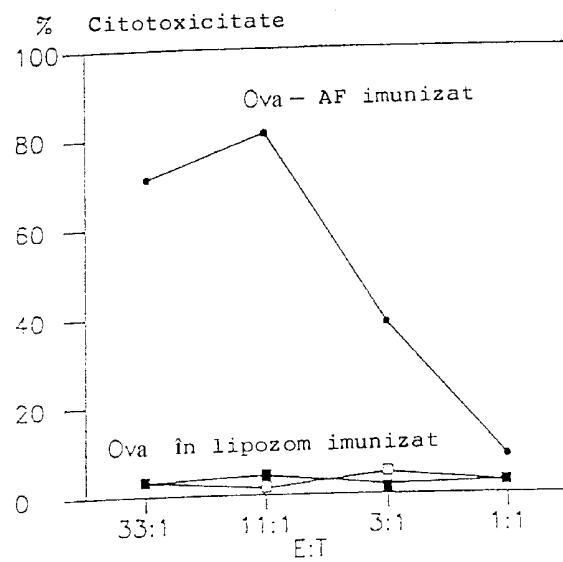


Fig. 3

MD 1586 G2

24

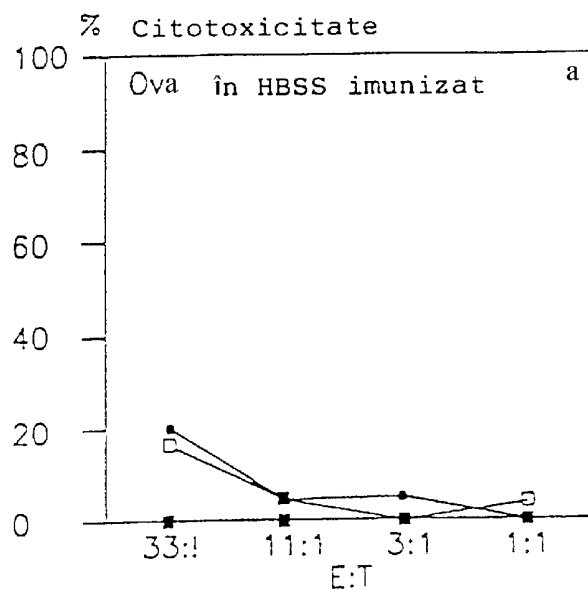


Fig. 4a

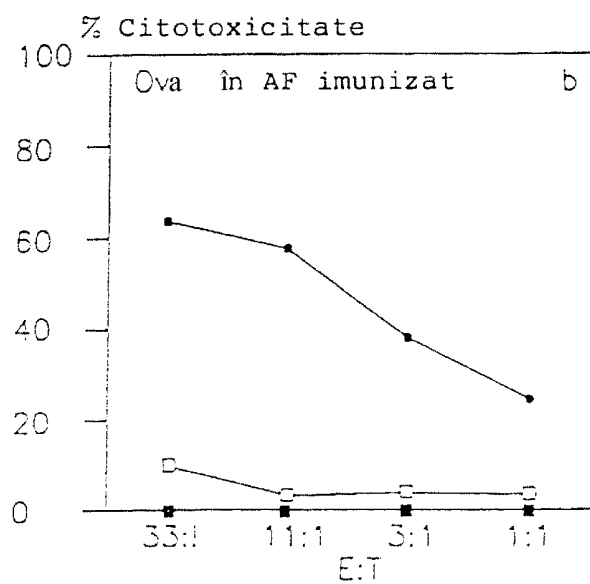


Fig. 4b

MD 1586 G2

25

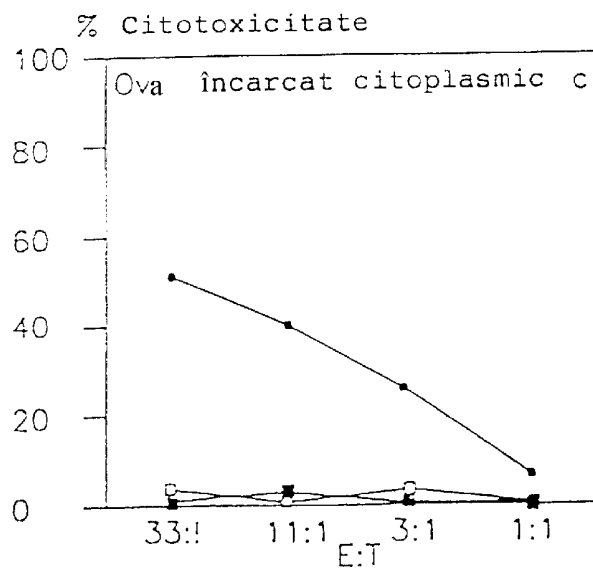


Fig. 4c

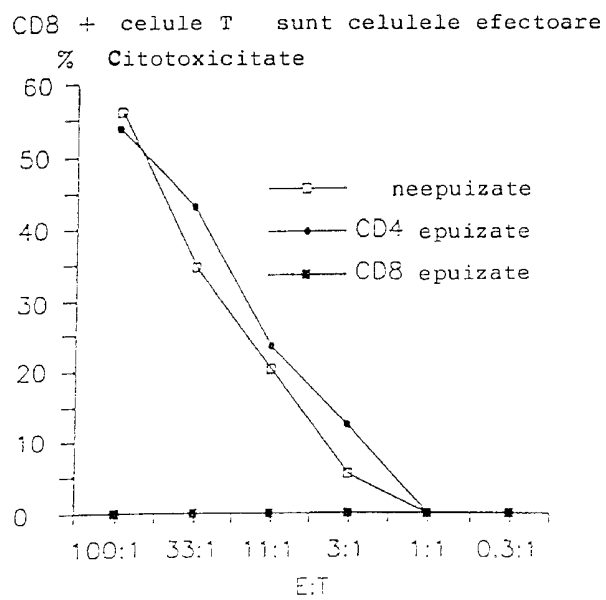


Fig. 5

MD 1586 G2

26

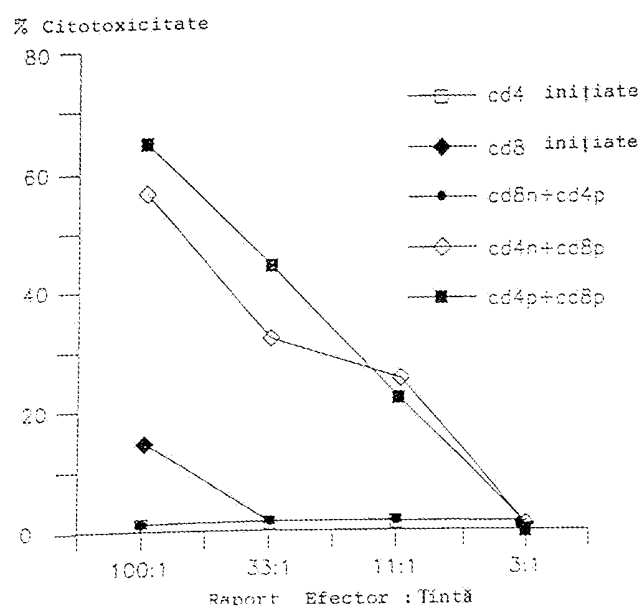


Fig. 6

Idox potențează inducerea CTL indus gp120

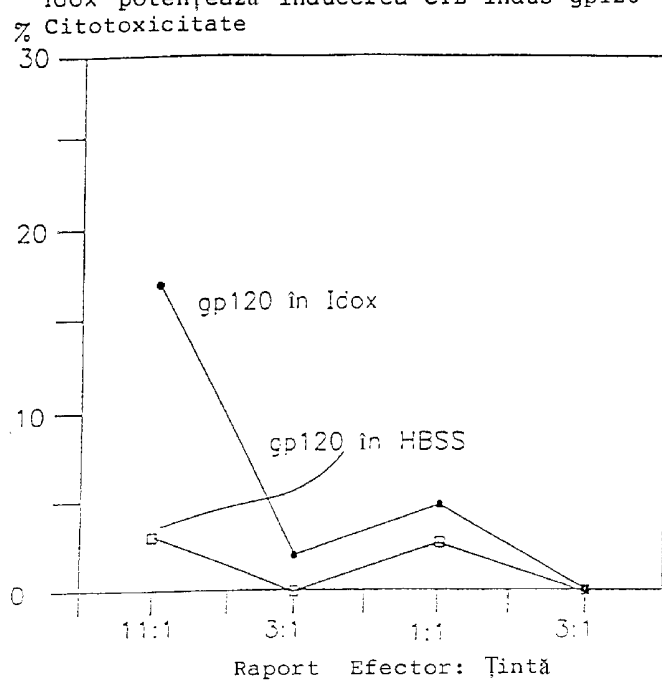


Fig. 7

MD 1586 G2

27

Efectul PL-Uronic/Tween asupra inițierii CTL
% Citotoxicitate

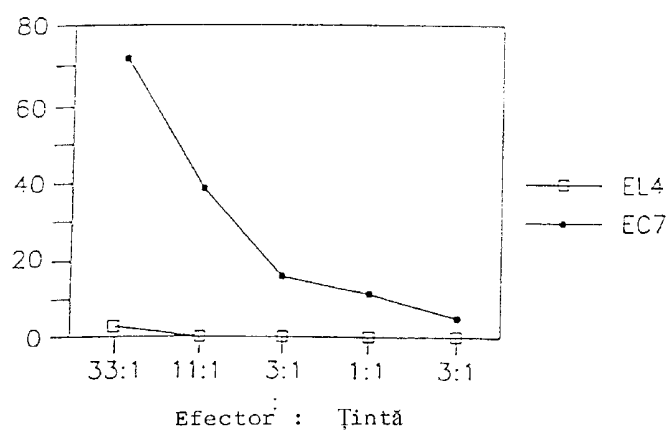


Fig. 8

Efectul Squalan /Tween asupra inițierii CTL
% Citotoxicitate

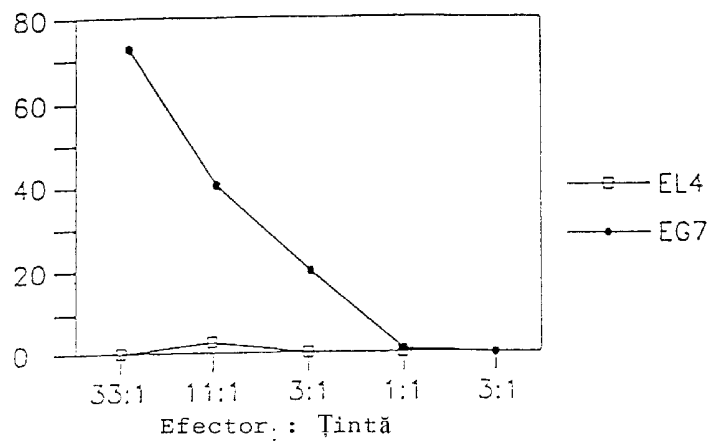


Fig. 9

MD 1586 G2

28

Efectul Squalan /PL-Uronic asupra inițierii CTL
% Citotoxicitate

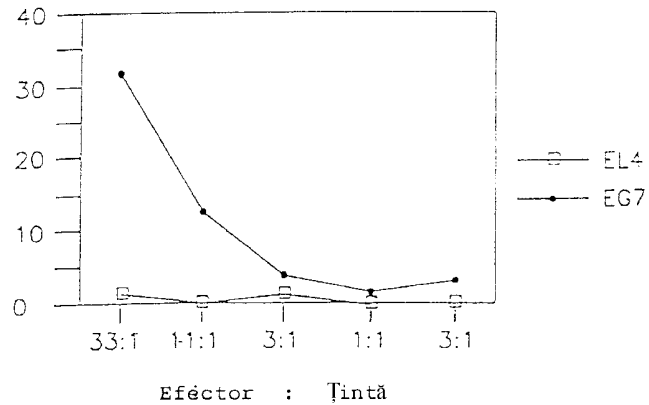


Fig. 10

Comparație a 30 μ g OVA în adjuvanți convenționali, 3 sau 2 componente

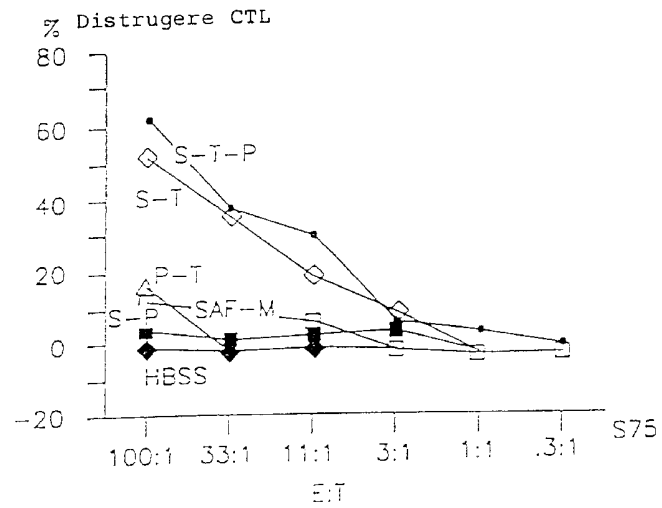


Fig. 11

MD 1586 G2

29

Inducere de anticorpi anti-gp120IIIb la maimuțe

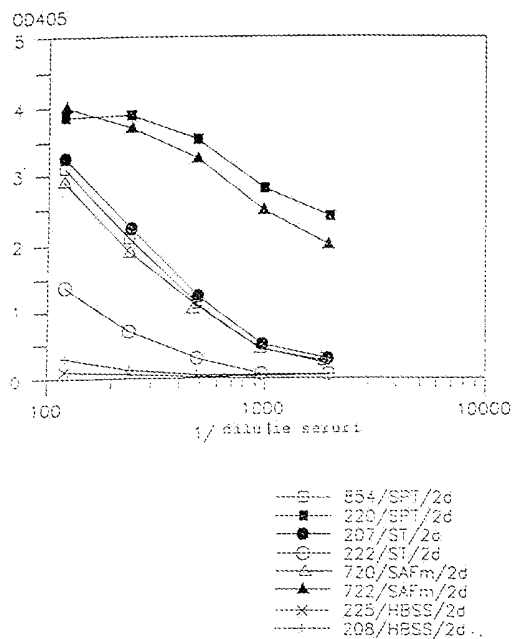


Fig. 12

Activitatea antitumorală a celulelor HOPE2 după o singură imunizare (ziua 10) cu proteina E7 solubilă în adjuvant

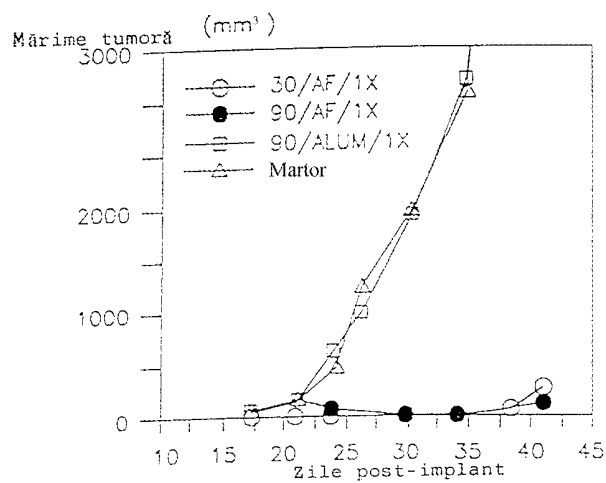


Fig. 13

MD 1586 G2

30

Activitate antitumorală a celulelor HOPE2 după două imunizări (ziua 10, 19) cu proteina E7 solubilă în adjuvant

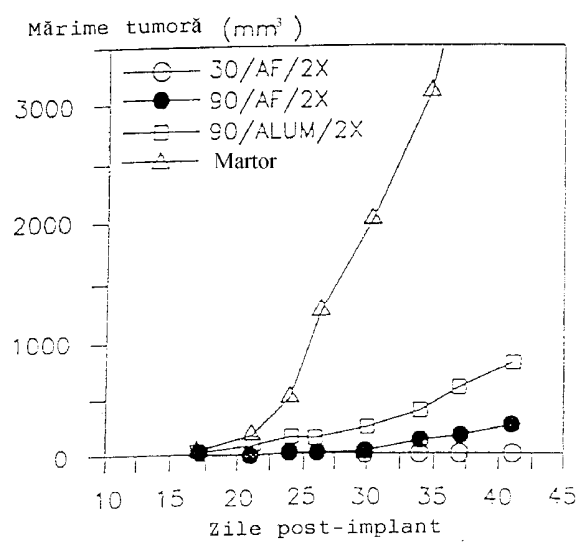


Fig. 14