(19) UA (11) 79 426 (13) C2

(51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 2003065331, 08.11.2001

(24) Дата начала действия патента: 25.06.2007

(30) Приоритет: 10.11.2000 US 60/247,100
18.10.2001 US 60/330,345

(46) Дата публикации: 25.06.2007 A61K 39/39

20070101CFI20070115RHUA	A61P	31/00
20070101CLI20070115RHUA	A61P	31/18
20070101ALI20070115RHUA	A61P	35/00
20070101CLI20070115RHUA	A61P	37/00
20070101CLI20070115RHUA	A61P	25/18
20070101ALI20070115RHUA	A61K	39/21
20070101CLI20070115RHUA	A61K	39/00
20070101CLI20070115RHUA		

(86) Заявка PCT:
PCT/US01/46943, 20011108

(72) Изобретатель:
Хейджен Майкл, US

(73) Патентовладелец:
УАЙТ ХОЛДИНГЗ КОРПОРЕЙШН, US

(54) КОМБИНИРОВАННЫЕ КОМПОЗИЦИИ АДЪЮВАНТОВ

(57) Реферат:

Описано применение аминоалкилглюкозаминфосфатного соединения либо ее производного, либо аналога в комбинации с цитокином или лимфокином, таким как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор или интерлейкин-12, как сочетания адъювантов в антигенной композиции для усиления иммунной реакции у позвоночных на заданный антиген.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2007, N 9, 25.06.2007. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

UA 79426 C2

UA 79426 C2

(19) UA (11) 79 426 (13) C2

(51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL PROPERTY

(12) DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION

(21), (22) Application: 2003065331, 08.11.2001

(24) Effective date for property rights: 25.06.2007

(30) Priority: 10.11.2000 US 60/247,100
18.10.2001 US 60/330,345

(46) Publication date: 25.06.2007A61K 39/39

20070101CFI20070115RHUA A61P 31/00
20070101CLI20070115RHUA A61P 31/18
20070101ALI20070115RHUA A61P 35/00
20070101CLI20070115RHUA A61P 37/00
20070101CLI20070115RHUA A61P 25/18
20070101ALI20070115RHUA A61K 39/21
20070101CLI20070115RHUA A61K 39/00
20070101CLI20070115RHUA

(86) PCT application:
PCT/US01/46943, 20011108

(72) Inventor:
HAGEN MICHAEL, US

(73) Proprietor:
WYETH HOLDINGS CORPORATION, US

(54) COMBINED ADJUVANT COMPOSITIONS

(57) Abstract:

The use of an aminoalkyl glucosamine phosphate compound, or a derivative or analog thereof, in combination with a cytokine or lymphokine such as granulocyte macrophage colony stimulating factor or interleukin-12, is useful as an adjuvant combination in an antigenic composition to enhance the immune response in a vertebrate host to a selected antigen.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2007, N 9, 25.06.2007. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

UA 79426 C2

UA 79426 C2

(19) **UA** (11) **79 426** (13) **C2**

(51)МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
2003065331, 08.11.2001

(24) Дата набуття чинності: 25.06.2007

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 10.11.2000 US 60/247,100
18.10.2001 US 60/330,345

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 25.06.2007

A61K	39/39	
20070101CFI20070115RHUA	A61P	31/00
20070101CLI20070115RHUA	A61P	31/18
20070101ALI20070115RHUA	A61P	35/00
20070101CLI20070115RHUA	A61P	37/00
20070101CLI20070115RHUA	A61P	25/18
20070101ALI20070115RHUA	A61K	39/21
20070101CLI20070115RHUA	A61K	39/00
20070101CLI20070115RHUA		

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору PCT:
PCT/US01/46943, 20011108

(72) Винахідник(и):
Хейджен Майкл , US

(73) Власник(и):
УАЙТ ХОЛДІНГЗ КОРПОРЕЙШН, US

(54) КОМБІНОВАНІ КОМПОЗИЦІЇ АД'ЮВАНТІВ

(57) Реферат:

Описано застосування аміноалкілглюкозамінфосфатної сполуки або її похідного, або аналога у комбінації з цитокіном або лімфокіном, таким як гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор або інтерлейкін-12, як комбінації ад'ювантів у антигенній композиції для посилення імунної реакції у хребетного хазяїна на вибраний антиген.

UA 79426 C2

UA 79426 C2

Опис винаходу

Даний винахід відноситься до застосування аміноалкілглюкозамінфосфатної сполуки, або її похідного, або аналога у комбінації з цитокіном або лімфокіном, зокрема гранулоцитарно-макрофагальним колонієстимулюючим фактором або інтерлейкіном-12, як форми (композиції) ад'юванту в антигенній або імуногенній композиції для посилення імунної реакції хребетного хазяїна на вибраний антиген.

Імунна система використовує різні механізми для боротьби з патогенами. Однак не всі з цих механізмів обов'язково активуються після імунізації. Захисний імунітет, який індукується імунізацією, залежить від здатності імуногенної композиції індукувати придатну імунну реакцію для протистояння патогену або елімінації патогену. В залежності від патогену це може вимагати клітинно-опосередкованої та/або гуморальної імунної реакції.

Існуючою парадигмою у відношенні ролі хелперних Т-клітин в імунній реакції є те, що Т-клітини можуть бути підрозділені на субпопуляції на основі цитокінів, які вони продукують, і що індивідуальний профіль цитокінів, який спостерігається у цих клітинах, визначає їх функцію. Ця модель Т-клітин містить у собі дві головні субпопуляції: TH-1-клітини, що продукують інтерлейкін-2 (IL-2), і гама інтерферон, що збільшують як клітинну, так і гуморальну (у вигляді антитіл) імунні реакції; і TH-2-клітини, що продукують інтерлейкін-4, інтерлейкін-5 і інтерлейкін-10 (IL-4, IL-5 і IL-10, відповідно), які збільшують гуморальні імунні реакції [посилання 1 у бібліографії].

Часто є бажаним посилення імуногенної ефективності антигену для одержання більш сильної імунної реакції імунізованого організму і для посилення стійкості хазяїна до агента, що несе антиген. У деяких ситуаціях бажаний зсув імунної реакції від переважно гуморальної (TH-2) реакції до більш збалансованої клітинної (TH-1) і гуморальної (TH-2) реакції.

Клітинна реакція містить у собі генерування CD8+ CTL реакції (реакції CD8+цитотоксичних Т-лімфоцитів). Така реакція є бажаною для розробки імуногенних композицій проти внутрішньоклітинних патогенів. Захист проти різних патогенів вимагає сильних мукозних реакцій, високих сироваткових титрів, індукції CTL і сильних клітинних реакцій. Ці реакції не забезпечувались більшістю антигенних препаратів, у тому числі загальноприйнятими субодиничними імуногенними композиціями. Серед таких патогенів знаходиться вірус імунодефіциту людини (ВІЛ).

Таким чином, існує потреба у розробці форм антигенних композицій, які здатні генерувати як гуморальну, так і клітинну імунні реакції хребетного хазяїна.

Таким чином, метою даного винаходу є використання комбінованих композицій (форм) ад'ювантів в антигенних композиціях, які містять аміноалкілглюкозамінфосфатну сполуку (AGP), або її похідне, або аналог, об'єднані з цитокіном або лімфокіном, зокрема гранулоцитарномакрофагальним колонієстимулюючим фактором (GM-CSF) або інтерлейкіном-12 (IL-12) або агоністом або антагоністом зазначених цитокіну або лімфокіну. Зокрема, AGP є 2-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїламіно]етил-2-дезокси-4-О-фосфоно-3-О-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїл]-2-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїламіно]- β-D-глюкопіранозидом, який відомий як 529 (раніше відомий як RC529).

Ад'ювант є речовиною, що підсилює імунну реакцію при введенні разом з імуногеном або антигеном. Композицію ад'юванта даного винаходу вводять разом з вибраним антигеном в антигенній або імуногенній композиції. Антигенні композиції даного винаходу підсилюють імунну реакцію хребетного хазяїна на цей вибраний антиген. Вибраний антиген може бути поліпептидом, пептидом або фрагментом, що походить [1] з патогенного вірусу, бактерії, гриба або паразита, або [2] з ракової клітини або пухлинної клітини, або [3] з алергену, так щоб він перешкоджав продукуванню IgE, щоб стримувати алергійні реакції на цей алерген, або [4] з білка-попередника амілоїду для запобігання або лікування захворювання, що характеризується відкладенням амілоїду у хребетного хазяїна. В одному варіанті даного винаходу вибраний антиген походить із ВІЛ. Вибраний антиген ВІЛ може бути білком ВІЛ, поліпептидом, пептидом або фрагментом, одержаним із зазначеного білка. У конкретному варіанті даного винаходу антиген ВІЛ є специфічним пептидом. В іншому варіанті даного винаходу вибраний антиген є β-амілоїдним пептидом (також названим Аβ-пептидом), який є внутрішнім фрагментом білка-попередника амілоїду (APP), що складається з 39-43 амінокислот, який утворюється процесінгом APP ферментами β- і γ-секретазами.

AGP може бути присутнім у вигляді водного розчину або у вигляді стабілізованої емульсії типу “масло у воді” (стабільної емульсії або SE). У кращому варіанті даного винаходу емульсія типу “масло у воді” містить сквален, гліцерин і фосфатидилхолін. У SE-формі AGP змішують з цитокіном або лімфокіном для одержання антигенної композиції перед введенням. Не потрібно, щоб цитокін або лімфокін входили в цю емульсію. У кращому варіанті даного винаходу AGP знаходиться у SE-формі. Антигенна композиція може додатково містити розріджувач або носій. Даний винахід відноситься також до способів для збільшення здатності антигенної композиції, що містить вибраний антиген [1] з патогенних вірусу, бактерії, гриба або паразита, щоб індукувати імунну реакцію хребетного хазяїна, або [2] з ракового антигену або пухлинної клітини, щоб індукувати терапевтичну або профілактичну антиракову дію у хребетному хазяїні, або [3] з алергену, щоб запобігати продукуванню IgE для стримування алергійних реакцій на цей алерген, або [4] з молекули або її частини, що представляє молекулу або її частину, яка продукується хазяїном (аутологічну молекулу) небажаним чином, у небажаній кількості або місці розташування, щоб зменшувати такий небажаний ефект, за допомогою включення ефективної ад'ювантної (імуностимулюючої) кількості комбінації цитокіну або лімфокіну, зокрема AGP з GM-CSF

UA 79426 C2

UA 79426 C2

або IL-12, або агоністу або антагоністу зазначених цитокіну або лімфокіну.

Далі даний винахід відноситься до способів збільшення здатності антигенної композиції, що містить антиген, вибраний з патогенних вірусу, бактерії, гриба або паразита, індукувати цитотоксичні Т-лімфоцити у хребетному хазяїні за рахунок включення ефективної ад'ювантної (імуностимулюючої) кількості комбінації цитокіну або лімфокіну, зокрема AGP з GM-CSF або IL-12, або агоністу або антагоністу зазначеного цитокіну або лімфокіну.

Фігура 1 зображує середні геометричні титри антитіл до Аβ1-42-пептиду у трансгенних мишах, імунізованих наступним чином: Група 1-Аβ1-42-пептид плюс PBS (не показаний); Група 2-Аβ1-42-пептид плюс MPL™ SE (квадрати); Група 3-Аβ1-42-пептид плюс MPL™ SE і GM-CSF (трикутники) ; Група 4-Аβ1-42-пептид плюс 529 SE і GM-CSF (перевернені трикутники).

Фігура 2 зображує загальні кортикальні рівні АР у трансгенних мишах, імунізованих чотирма групами, описаними для Фігури 1.

Фігура 3 зображує кортикальні рівні Аβ1-42-пептиду у трансгенних мишах, імунізованих чотирма групами, описаними для Фігури 1.

Фігура 4 зображує амілоїдне навантаження лобової частини кори головного мозку у трансгенних мишах, імунізованих чотирма групами, описаними для Фігури 1.

Фігура 5 зображує нейритне навантаження лобової частини кори головного мозку у трансгенних мишах, імунізованих чотирма групами, описаними для Фігури 1.

Фігура 6 зображує рівні ретроспленіального астроцитозу кори головного мозку у трансгенних мишах, імунізованих чотирма групами, описаними для Фігури 1.

Фігура 7 зображує середні геометричні титри антитіл C4(E9V)-$V3_{89.6p}$-пептид ВІЛ-специфічного IgG у сироватці у двох групах собакоголових макак (чотири тварини на групу). Тварин групи 1 імунізували інтраназально тільки C4(E9V)-$V3_{89.6p}$-пептидом. Тварин групи 2 імунізували внутрішньом'язово C4(E9V)-$V3_{89.6p}$-пептидом, приготованим з 529 SE і GM-CSF. Стрілки вказують імунізації при тижнях 0,4, 8, 18 і 23.

Фігура 8 зображує середні геометричні титри антитіл у пробах шийково-піхвового лаважу тварин, описаних для Фігури 7.

Фігура 9 зображує середні геометричні титри антитіл у пробах назальних промивань тварин, описаних для Фігури 7.

Ад'юванти, цитокіни і лімфокіни є імуномодулюючими сполуками, що мають здатність підсилювати розвиток і керувати розвитком і профілем імунних реакцій проти різних антигенів, які самі є слабоімуногенними. Придатний вибір ад'ювантів, цитокінів і лімфокінів можуть індукувати хороші гуморальні і клітинні імунні реакції, що не могли б розвинутись під час відсутності ад'юванта, цитокіну або лімфокіну. Зокрема, ад'юванти, цитокіни і лімфокіни мають істотні дії у посиленні імунної реакції до субодиничних і пептидних антигенів в імуногенних композиціях. Їх стимуляторна активність є також корисною для розвитку антиген-специфічних імунних реакцій, спрямованих проти білкових антигенів. Для різних антигенів, що вимагають сильних мукозних реакцій, високих сироваткових титрів, індукції CTL і сильних клітинних реакцій, комбінації ад'юванта і цитокіну/лімфокіну забезпечують стимули, що не забезпечуються більшістю препаратів антигенів.

У численних дослідженнях проводили оцінку різних форм ад'ювантів у моделях тварин, але в наш час квасці (гідроксид алюмінію або фосфат алюмінію) є єдиним ад'ювантом, ліцензованим для широкого застосування у людей. Іншим ад'ювантом є Стимулон™ QS-21 (Stimulon™ QS-21) (Antigenics Inc., Framingham, MA [2]). Одна група ад'ювантів, стабільні емульсії, що складаються з різних комбінацій масла або масло-у-воді, привернула велику увагу внаслідок їх імунопотенціювальної здатності. Ці форми звичайно складаються з різних комбінацій метаболізованих або інертних масел, що стабілізують або депонують антиген у місці інфекції. Одним з таких ад'ювантів є неповний ад'ювант Фрейнда (IFA), що містить у собі мінеральне масло, воду і емульгуючий агент. Повний ад'ювант Фрейнда (CFA) являє собою IFA плюс убиті нагріванням мікобактерії. Особливе занепокоєння у використанні цих типів ад'ювантів викликало подразнення, пов'язане з місцем ін'єкції, що часто є результатом інфільтрації мононуклеарних клітин, які викликають гранулематозні пошкодження. Таким чином, інші сполуки і форми досліджуються як потенційні ад'юванти.

Однією групою таких сполук є аміноалкілглюкозамінфосфатні сполуки (AGP), які описані у [Патенті Сполучених Штатів №6113918], наприклад, стовпець 2, рядок 14 - стовпець 3, рядок 38, що включений тут як посилання [3]. AGP мають аміноалкільну (аглікон) групу, які зв'язана глікозидним зв'язком з 2-дезокси-2-аміно-α-D-глюкопіранозою (глюкозаміном) з утворенням основної структури. Додаткові замісники включають в себе фосфорилювання вуглецю 4 або 6 у кільці глюкозаміну і трьох 3-алканоїлоксіалканоїльних залишків.

Один з таких AGP є сполукою, яка позначається як 529 (повною хімічною назвою якої є 2-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїламіно]етил-2-дезокси-4-О-фосфоно-3-О-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїл]-2-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїламіно]- β-D-глюкопіранозид), що виробляється Corixa (Hamilton, MT).

Corixa виготовила також метаболізовану форму емульсії типу “масло у воді”, що при об'єднанні з 529 приводить до утворення стабілізованої емульсії, названої 529 SE. Цю стабілізовану емульсію одержують мікрофлюїдизацією 529 з скваленовим маслом, гліцерином і фосфатидилхоліном. Існуюча на даний час форма є мікрофлюїдизована емульсія GMP-якості. Емульсії, що містять 1% масла (хоча можуть використовуватись й інші концентрації), описані в експериментах нижче.

UA 79426 C2

UA 79426 C2

529 SE приводила до нерозрізненої макроскопічної патології тканини при введенні підшкірно мишам Balb/c або Swiss-Webster. Одержували також стабілізовану емульсію, що містить ті ж самі компоненти, але без 529, для порівняльних цілей. Конкретно, підшкірна імунізація цистеїн-делетованою версією з 39 амінокислот (-Cys) пептиду ВІЛ з 40 амінокислот TISP10MN(A) (яка не має залишку цистеїну в положенні амінокислоти 17 пептиду з 40 амінокислот (+Cys)) або Aβ1-42 (внутрішнім фрагментом з 42 амінокислот APP), які готували з комбінацією ад'ювантів 529 SE і GM-CSF, не приводила до помітного запалення, почервоніння, набрякання або ущільнення.

В об'єм даного винаходу входять також похідні і аналоги 529 та інших AGP. Такі сполуки містять у собі, але не обмежуються ними, сполуки, описані у [Патенті Сполучених Штатів №6113918 [3]].

Включення цитокінів і лімфокінів в імуногенні композиції показало перспективність у відношенні розширення і посилення потенціалу імуногенних композицій [4]. Було показано, що цитокін інтерлейкін-12 (IL-12) індукує і підсилює клітинно-опосередкований імунітет через зсув у розширенні субпопуляції Т-хелперних клітин вбік профілю Th1-цитокінів (тобто вбік IgG2-підкласу в мишачій моделі) [5-7]. Було показано, що у мишей рекомбінантний мишачий IL-12 підсилює профіль Th1-домінуючих імунних реакцій [4].

IL-12 продукується різними антигенпредставляючими клітинами, в основному макрофагами і моноцитами. Це є критичним елементом в індукції TH1-клітин з "ненавчених" (наївних) Т-клітин. Було показано, що продукування IL-12 або здатність відповідати на нього є критичною у розвитку захисних TH1-подібних реакцій, наприклад під час паразитичних інфекцій, особливо лейшманіозу [8], а також посиленні клітинно-опосередкованої імунної реакції на антиген з патогенної бактерії або патогенного вірусу [9] або з ракової клітини [10]. Ефекти IL-12 опосередковані у значній частині інтерфероном-гама, який продукується клітинами-кілерами (NK) і Т-хелперними клітинами. Інтерферон-гама є критичним для індукції IgG2a-антитіл до залежних білкових антигенів [11] і IgG3-реакцій на Т-незалежні антигени [12]. IL-12, спочатку названий стимуляторним фактором природних клітин-кілерів, є гетеродимерним цитокіном [13]. Експресія і виділення білка IL-12 у рекомбінантних клітинах-хазяїнах описані в опублікованій [Міжнародній патентній заявці WO 90/05147 [14]].

Іншим цитокіном, що має потенціал застосування як ад'юванта, є GM-CSF. GM-CSF є особливим типом колонієстимулюючого фактора (CSF). Фактори CSF представляють сімейство лімфокінів, що індукують диференціювання клітин-попередників, виявлених у кістковому мозку, у конкретні типи зрілих клітин крові. Як описано у [Патенті Сполучених Штатів №5078996 [15]] що включений тут як посилання, GM-CSF активує макрофаги або попередники моноцитів для опосередкування неспецифічної нищівної нухлинні клітини активності. Була описана нуклеотидна послідовність, що кодує ген GM-CSF людини [15]. Плазміда, що містить кДНК GM-CSF, була трансформована в E. coli і була депонована в [Американську Колекцію Типових Культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, під номером 39900]. Як описано у [патенті США №5229496 [16]], який тим самим включений тут як посилання, ген GM-CSF був також інсертований у дріжджову експресійну плазміду і депонований в [ATCC під номером 53157]. Крім того, як описано у [Патенті США № 5073627 [17]], який включений тим самим як посилання, ДНК-послідовність, що кодує GM-CSF, який має вилучені сайти глікозилювання, була депонована в [ATCC під номером 67231].

Було показано, що GM-CSF позитивно регулює білкові молекули на антигенпредставляючих клітинах, що, як відомо, підсилюють імунні реакції [18] і впливають на секрецію Ig в очищених сортінгом мишачих В-клітинах [19]. GM-CSF був описаний також як ад'ювант для імуногенних композицій [20].

Було показано, що інші цитокіни або лімфокіни мають імуномоделюючу активність, у тому числі, але не обмежуючи ними, інтерлейкін-1-альфа, 1-бета, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 і 18, інтерферони-альфа, бета і гама, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор і фактори некрозу пухлин альфа і бета.

Важливими у зв'язку із системним введенням будь-якого цитокіну або лімфокіну є біологічні наслідки, пов'язані з активністю цитокінів або лімфокінів. Крім того, дії цитокінів або лімфокінів, пов'язаних з розвитком антиген-специфічних імунних реакцій, повинні підсилюватись, якщо підтримуються локальні концентрації цитокінів або лімфокінів.

Проводилась оцінка комбінацій 3-О-деацильованого монофосфорилліпіду А або монофосфорилліпіду А з GM-CSF або IL-12; спостерігали посилення різних параметрів імунної реакції [21].

Описаний тут винахід демонструє, що за допомогою комбінування антигену, вибраного цитокіну або лімфокіну як ад'юванта і другого ад'юванта AGP (переважно у стабільній метаболізованій емульсії), імунні реакції, специфічні для даного антигену, підсилюються.

Антигени, вибрані для включення в антигенні композиції даного винаходу, містять у собі пептиди або поліпептиди, одержані з білків, білки, а також фрагменти будь-яких з наступних компонентів: сахаридів, білків, полі- або олігосахаридів або інших макромолекулярних компонентів. У застосуванні тут, "пептид" позначає ряд з, щонайменше, трьох амінокислот і містить, щонайменше, одну антигенну детермінанту або епітоп, тоді як "поліпептид" позначає більш довгу молекулу, ніж пептид, але не складає повнорозмірний білок. Такі пептиди, поліпептиди або білки можуть бути кон'юговані з неспорідненим білком, таким як правцевий токсоїд або дифтерійний токсоїд. У застосуванні тут, "фрагмент" містить частину, меншу, ніж весь зазначений компонент, такий як сахарид, білок, полі- або олігонуклеотид або інший макромолекулярний компонент. У випадку ВІЛ, антигенні композиції даного винаходу додатково містять повнорозмірні білки ВІЛ.

Даний винахід спочатку ілюструється на прикладі модельної системи з використанням пептидних антигенів, одержаних із ВІЛ. Ці пептиди описані у [Патентах Сполучених Штатів №5013548 [22] і №5019387 [23]], що включені як посилання, або вироблені з описаних у них пептидів, і ці описи підсумовуються далі. Ці пептиди містять амінокислотні послідовності, що відповідають району білка оболонки ВІЛ, проти якого одержують нейтралізуючі антитіла і Т-клітинні реакції.

UA 79426 C2

UA 79426 C2

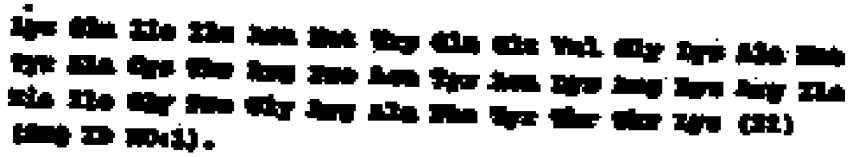
ВІЛ є ретровірусом людини, що є збудником синдрому набутого імунодефіциту (СНІДу). ВІЛ інфікує Т-лімфоцити імунної системи приєднанням глікопотеїну його зовнішньої оболонки до CD4 (Т4)-молекули на поверхні Т-лімфоцитів, використовуючи, отже, цю молекулу CD4 (Т4) як рецептор для входження в Т-клітини та інфікування їх. Спроби індукції захисної імунної реакції, специфічної для ВІЛ-інфекції, через імунізацію мали дуже обмежений успіх. В наш час ряд підходів використовують у спробі визначення ефективної і захисної стратегії для розвитку імуногенних композицій. Вони містять у собі атенуйовані і рекомбінантні бактеріальні вектори, які експресують антигенні епітопи з ВІЛ [24], рекомбінантний аденовірус [25] або вектори вірусу коров'ячої віспи [26], імунізацію ДНК і синтетичні пептиди, що містять різні Т- і В-клітинні епітопи ВІЛ [28].

Було показано, що глікопротеїн gp120 зовнішньої оболонки ВІЛ здатний індукувати нейтралізуючі антитіла в людях. Було показано, що рекомбінантний білок РВ1, що охоплює приблизно одну третину повної молекули gp120, містить у собі частину білка оболонки, яка індукує утворення нейтралізуючих антитіл. Однак дослідження на шимпанзе показали, що ані інтактний gp120, ані РВ1 не здатні індукувати продукування високих титрів нейтралізуючих антитіл.

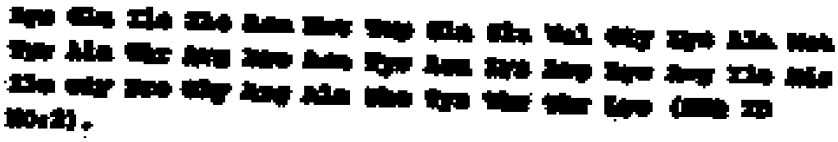
Короткі пептиди синтезували загальноприйнятими способами, і ці пептиди відповідали антигенним детермінантам gp120 і генерували реакцію у вигляді антитіл проти gp120, які нейтралізували цей вірус та індукували Т-хелперні і CTL-реакції проти цього вірусу.

Одним таким пептидом є пептид ВІЛ-Imn, який містить С4-V3-мультиепітоп, названий TISP10MN(A) (+Cys) і варіант із делетованим цистеїном TISP10MN(A) (-Cys). Ці пептиди містять у собі Th, T_{CTL} і В-епітопи, але не індукують антитіла, що перешкоджають зв'язуванню CD4. Раніше було продемонстровано, що ці С4/V3-пептиди ВІЛ є багатообіцяючими кандидатами у відношенні індукції імунних реакцій при введенні з CFA або CFA-подібними ад'ювантами [29-34]. Ці пептиди містять епітопи, що, як було показано раніше, індукують CD4+Th-клітинні реакції як у мишей, так і у людей, і вони містять як головну нейтралізуючу детермінанту, так і сайт, який упізнається CD8+CTL як у мишей Balb/c, так і у людей, які є HLA B7+. Нещодавно було показано, що пептид з 39 амінокислот має як імуногенність так і безпеку у ВІЛ-інфікованих пацієнтах [28].

TISP10MN(A) (+Cys) має наступну послідовність з 40 амінокислот:

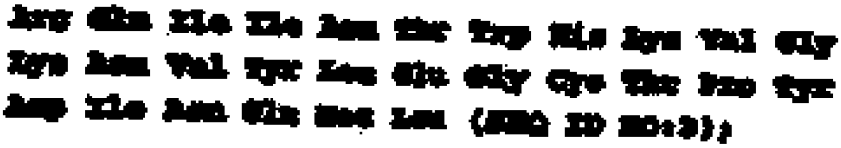


TISP10MN(A) (-Cys) синтезували без цистеїну в положенні 17 і він має наступну послідовність з 39 амінокислот:



Цей залишок цистеїну локалізований зовні від функціональних епітопів, які упізнаються Th-клітинами, CTL або В-клітинами. Інші пептиди ВІЛ з різних районів вірусного геному описані у [Патенті США №5861243 [35], Патенті США №5932218 [36], Патенті США №5939074 [37], Патенті США №5993819 [38], Патенті США №6037135 [39], Опублікованій Європейській заявці на патент №671947 [40] і Патенті США №6024965 [41]], які також включені як посилання.

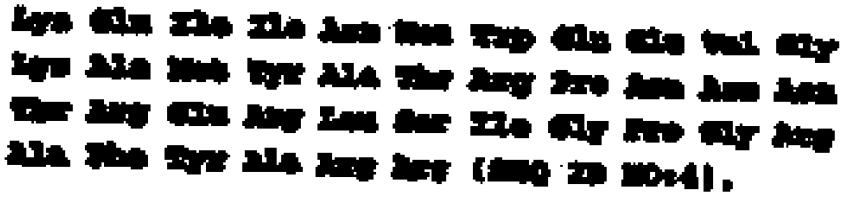
Використовували також пептидний кон'югат з 28 амінокислот, названий ST1/p11C. Цей кон'югат складається з SIV-env-похідного Т-хелперного пептиду з 16 амінокислот, названого ST-1, кон'югованого з Gag-пептидом SIV-mac 251 з 12 амінокислот (амінокислоти 179-190 Gag), названого p11C [42]. Пептид p11C у тетрамерній формі продемонстрував CTL-активність у інфікованих SIV-mac макаках-резус Mamu-A*01 [43]. Пептидний кон'югат ST1-p11C має наступну амінокислотну послідовність:



Використовували також пептидний кон'югат з 39 амінокислот, названий $C4\text{-}V3_{89.6p}$ [44]. Район С4 цього пептидного кон'югату (16 амінокислот) вироблений з четвертого константного району білка оболонки ВІЛ-1 і представляє універсальний Т-хелперний епітоп. Частина V3 цього пептиду (23 амінокислоти) вироблена з третього гіперваріабельного району білка оболонки ВІЛ-1 і представляє критичну нейтралізуючу детермінанту. Кон'югат $C4\text{-}V3_{89.6p}$ має наступну амінокислотну послідовність:

UA 79426 C2

UA 79426 C2



Антиген ВІЛ може бути білком, поліпептидом, пептидом або фрагментом, одержаним із зазначеного білка. Цей білок може бути глікопротеїном, таким як gp41, gp120 або gp1460. Альтернативно, цей білок може бути білком, кодованим такими генами, як gag, pol, vif, rev, vpr, tat, nef або env. Пептиди, вироблені з таких білків, будуть містити щонайменше одну антигенну детермінанту (епітоп) довжиною щонайменше шість амінокислот.

Імунна реакція на пептид ВІЛ може бути посилена ковалентним зв'язуванням (кон'югацією) пептиду з молекулою фармацевтично прийнятного носія. Приклади придатних молекул-носіїв містять у собі правцевий токсоїд, дифтерійний токсоїд, гемоціанін фісурели та інші пептиди, що відповідають Т-клітинним епітопам глікопротеїну gp120 ВІЛ.

В наш час передбачається, що успішна стратегія для імунізації проти ВІЛ буде вимагати індукування мукозного імунітету до ВІЛ, а також хорошої CTL-реакції. У нещодавньому дослідженні на мишах з використанням мультиепітопного пептиду TISP10MN(A) і мукозного ад'юванта, холерного токсину, було показано, що інтраназальна імунізація індукувала нейтралізуючі сироваткові антитіла IgG1 [45]. Наступне дослідження також з використанням пептидів петлі V3 ВІЛ показало індукування синтезованого мукозального IgA-антитіла і сильні клітинно-опосередковані реакції, у тому числі пептид-специфічні CTL [46]. Функціональна роль високих титрів системних і нейтралізуючих антитіл у попередженні ВІЛ або стабілізації ВІЛ-інфікованих індивідуумів є невідомою, хоча вважається, що високі титри вірус-специфічного антитіла важливі у запобіганні поширення вірусу.

У кращому варіанті даного винаходу готують стабільну емульсію типу “масло у воді”, що містить 529, яку потім змішують з цитокінами IL-12 або GM-CSF. Дані, представлені нижче, показують, що комбінація 529 плюс GM-CSF приводить до високих титрів ВІЛ-нейтралізуючих сироваткових антитіл. Комбінування 529 SE і GM-CSF індукує високі титри антиген-специфічних IgG-антитіл, у тому числі як IgG1, так і IgG2a підкласів, у зводі піхви імунізованих самок мишей. Імунізація мишей TISP10MN(A) (-Cys)-пептидом, приготованим з 529 SE і GM-CSF, індукувала сильну клітинну імунну реакцію, як визначено за посиленою антиген-специфічною клітинною проліферацією і секрецією у культуру цитокінів, а також за індукцією пептид-специфічних CTL-реакцій. Подібні результати спостерігали при імунізації мишей Aβ1-42-пептидом з APP із 529 SE і GM-CSF.

Звичайно форма антиген/ад'ювант 529 або 529 SE, об'єднана з GM-CSF або IL-12 і вибраним білком і пептидом, індукує високі титри антиген-специфічного і нейтралізуючого вірус антитіла, істотне зрушення у співвідношенні підкласів IgG вбік більшої частки комплемент-фіксуючих IgG-антитіл (на користь IgG2a у мишах), підвищене продукування цитокінів і клітинну проліферацію з мононуклеарних клітин у відповідь на стимуляцію антигеном in vitro. Ці властивості не спостерігали з формами антигену і SE під час відсутності 529, ні з GM-CSF або IL-12, ні без GM-CSF або IL-12. Форми даного винаходу також індукують хороші клітинні реакції, як визначено за індукцією CTL.

Перевага 529 SE полягає в тому, що ця форма не індукує гранулематозне нагромадження і запалення у місці ін'єкції; такі реакції у місці ін'єкції звичайно індукуються формами ад'ювантів типу “вода-у-маслі” або “масло-у-воді”.

Був проведений експеримент для порівняння введення пептиду ВІЛ TISP10MN(A) (-Cys) тільки з 529 SE або з 529 SE плюс IL-12 або 529 SE плюс GM-CSF.

У цьому експерименті (таблиця 1, нижче) миші Balb/c, імунізовані підшкірно петидом ВІЛ TISP10MN(A) (-Cys), приготованим з 529 SE, індукували пептид-специфічні сироваткові титри IgG після усього лише двох ін'єкцій. Індукувались також титри підкласів IgG1 і IgG2a. Включення другого ад'юванта, або GM-CSF, або IL-12, підвищувало загальні титри IgG, а також титри підкласу IgGI. Додавання IL-12 підвищувало титри підкласу IgG2a; додавання GM-CSF не підвищувало титри підкласу IgG2a.

В іншому експерименті як міру функціонального клітинно-опосередкованого імунітету оцінювали здатність клітин селезінки мишей, імунізованих 529 SE або 529 SE плюс IL-12 або 529 SE плюс GM-CSF, приготованих разом з мультиепітопним пептидом TISP10MN(A) (-Cys), генерувати $ВІЛ_{MN}$-специфічні CTL-реакції.

Як показано у таблиці 2, клітини селезінки мишей, імунізованих кожним з ад'ювантів, показали низьку активність проти клітин-мішеней, які були або немічеными, або короткочасно міченими стороннім CTL-епітопом IIIB. $ВІЛ_{MN}$-специфічний CTL-опосередкований лізис клітин-мішеней помітно підсилювався при введенні 529 SE плюс IL-12 у порівнянні з одним 529 SE, і все ще підсилювався додатково при введенні 529 SE плюс GM-CSF (таблиця 2).

Ще в одному варіанті макак-резус імунізували пептидами ST1-p11C або $C4\text{-}V3_{89.6P}$ і IFA або 529 SE плюс GM-CSF (груп, показаних у таблиці 15). Результати цих аналізів показані у таблицях 16-22 і тепер підсумовуються.

Сама форма пептиду ST1-p11C, очевидно, добре переноситься у всіх випробуваних тваринах. Однак з ад'ювантом IFA були відзначені істотні реактивності сайту ін'єкції. Крім того, можливі мінорні несприятливі ефекти форми ад'юванта 529 SE/GM-CSF спостерігались відразу ж після кінцевої імунізації. Форма пептиду

UA 79426 C2

UA 79426 C2

ST1-p11C, що містить IFA, була здатна індукувати сильну p11C-специфічну клітинну імунну реакцію в одній з двох випробуваних Mamu-A*01-позитивних макак-резус. Форма пептиду ST1-p11C, що містить 529 SE/GM-CSF, також була здатна індукувати p11C-специфічну клітинну імунну реакцію в одній з двох випробуваних Mamu-A*01-позитивних макак-резус.

Форма пептиду C4-$V3_{89.6P}$, що містить IFA, була здатна генерувати максимальні титри антитіл ELISA у плазмі в діапазоні 1:25600-1:102400 і титри сироваткових нейтралізуючих антитіл проти $SHIV_{89.6}$ і $SHIV_{9.6P}$. Форма пептиду C4-$V3_{89.6P}$, що містить 529 SE/GM-CSF, була здатна генерувати максимальні титри антитіл ELISA у плазмі в діапазоні 1:6400-1:12800 і низькі рівні реакцій нейтралізуючих антитіл проти $SHIV_{89.6}$, але не проти $SHIV_{89.6P}$.

При невеликому числі тварин на групу (дві) важко зробити конкретні висновки. Однак рівень імунної реакції, як гуморальної, так і клітинної, генерованої обома формами пептидів, що містять 529 SE/GM-CSF, був кількісно більш низьким, ніж імунна реакція, що спостерігається у тварин, яким вводили IFA як ад'ювант. Слід також відзначити, що IFA не є схваленим компонентом у композиціях для комерційного застосування для людей. Крім того, мається деякий обмежений доказ того, що функціональні властивості і фенотип (тобто профілі цитокінів) клітин-респондерів можуть розрізнятись у залежності від використовуваної форми ад'ювanta.

Ще в одному експерименті тварин із другого виду приматів, собакоголових макак, імунізували пептидом C4-$V3_{89.6P}$, який був модифікований заміною глутамінової кислоти при амінокислотному залишку 9 на валін. Одержаний пептидний кон'югат, названий C4(E9V)-$V3_{89.6P}$, має наступну послідовність:

[illegible] (SEQ ID NO:5).

Тварин імунізували пептидом C4(E9V)-$V3_{89.6P}$, або без ад'ювanta, або з комбінацією 529 SE плюс GM-CSF.

Ці результати вказують на те, що пептид C4(E9V)-$V3_{89.6P}$ при введенні внутрішньом'язовою ін'єкцією у комбінації з 529 SE/GM-CSF індукує значимо більш високі титри пептид-специфічних IgG у сироватці, ніж та ж сама кількість пептиду C4(E9V)-$V3_{89.6P}$, що вводиться інтраназально без ад'ювanta (Фігури 7-9). Результати цього експерименту ясно демонструють, що пептидний імуноген ВІЛ при введенні у комбінації з придатною комбінацією ад'ювантів здатний індукувати системний гуморальний імунітет.

Бажані імуногенні композиції для попередження або лікування захворювань, що характеризуються відкладенням амілоїду (аутологічної молекули) у хребетного хазяїна, які містять комбінації ад'ювантів даного винаходу, містять у собі композиції, що містять частини білка-попередника бета-амілоїду (APP). Це захворювання називають по-різному: хворобою Альцгеймера, амілоїдозом або амілоїдогенною хворобою, β-амілоїдний пептид (також названий Aβ-пептидом) є внутрішнім фрагментом APP із 39-43 амінокислот, який утворюється процесінгом APP ферментами β- і γ-секретазами. Aβ1-42-пептид має наступну послідовність:

[illegible] (SEQ ID NO:6).

У деяких пацієнтів відкладення амілоїду приймає форму агрегованого A β-пептиду. Несподівано було показано, що введення виділеного A β-пептиду індукує імунну реакцію проти Aβ-пептидного компонента відкладення амілоїду у хребетного хазяїна [47]. Таким чином, імуногенні композиції даного винаходу містять у собі комбінації ад'юванта даного винаходу плюс Aβ-пептид, а також фрагменти, похідні або модифікації Aβ-пептиду і антитіла до Aβ-пептиду або його фрагментів, похідних або модифікацій. Один такий фрагмент Aβ-пептиду є пептидом з 28 амінокислот, що мають наступну послідовність [48]:

[illegible] (SEQ ID NO:7).

Інші фрагменти Aβ-пептиду, які є цікавими, містять у собі, але не обмежуються ними, амінокислоти 1-10, 1-7, 1-6, 1-5, 3-7, 1-3 і 1-4, які можуть вводитись у некон'югованій формі або кон'югованими з стороннім білком.

Ряд досліджень був проведений з Aβ1-42-пептидом і різними ад'ювантами. Далі представлені узагальнені результати.

У першому експерименті миші Swiss-Webster, імунізовані підшкірно у сідничну область Aβ1-42-пептидом, генерували титри пептид-специфічних антитіл IgG, IgG1 і IgG2a, демонструючи, що Aβ1-42-пептид є життєздатним вакцинним антигеном. Додавання GM-CSF до 529 SE і Aβ1-42-пептиду приводило до підвищених титрів антитіл IgG, IgG1 і IgG2a у сироватці у порівнянні з реципієнтами 529 SE і Aβ1-42-пептиду (див. таблиці 3-8). Сироваткові антитіла у індивідуальних мишей, що одержують комбінацію 529 SE плюс GM-CSF, підвищувались у більшому числі випадків і підвищувались швидше, ніж у індивідуальних мишей, що одержують

UA 79426 C2
UA 79426 C2

тільки 529 SE (дані не показані). При повторенні цього першого експерименту з більш старими мишами Swiss-Webster (у віці 6-8 місяців замість менше 3 місяців) спостерігали результати, схожі з результатами у таблицях 3-8 (дані не показані).

У другому експерименті мишей Swiss-Webster імунізували підшкірно у сідничну область Аβ1-42-пептидом і 529 SE з кількостями GM-CSF, що варіюються. Титри IgG кінцевих точок збільшувались залежним від дози чином у міру збільшення GM-CSF (від 0,1 до 1 до 10мкг) (таблиця 9). Титри IgG для всіх комбінацій 529 SE плюс GM-CSF були більш високими, ніж для груп, що одержують інший ад'ювант, QS-21, один або з GM-CSF. Титри підкласу IgG1 також збільшувались для різних груп 529 SE плюс GM-CSF у порівнянні з групою, що одержувала 529 SE плюс GM-CSF у першій дозі і тільки 529 SE у другій дозі (таблиця 10). Титри підкласу IgG2a також збільшувались для різних груп 529 SE плюс GM-CSF у порівнянні з групою, що одержувала тільки 529 SE, залежним від дози чином (таблиця 11).

У третьому експерименті мишей Swiss-Webster імунізували підшкірно у сідничну область Аβ1-42-пептидом і 529 SE з кількостями GM-CSF, що варіюються, або без кількостей GM-CSF, що варіюються. Титри кінцевих точок IgG збільшувались для різних груп 529 SE плюс GM-CSF (0,5 до 2 до 5 до 10мкг), хоча і не в залежності від дози (таблиця 12). Титри підкласів як IgG1, так і IgG2a також збільшувались для різних груп 529 SE плюс GM-CSF у порівнянні з групою тільки 529 SE, хоча і не в залежності від дози (таблиці 13 [IgG1] і 14 [IgG2a]).

У четвертому експерименті використовували трансгенних мишей, що експресують варіантну форму білка-попередника амілоїду (APP), що має мутацію при залишку 717, з валіном, заміненим фенілаланіном [49]. Ця мутація пов'язана із сімейною хворобою Альцгеймера у людей. Ці трансгенні миші (названі мишами PDAPP), які прогресуючим чином розвивають багато патологічних ознак хвороби Альцгеймера, у тому числі відкладення Аβ, нейритні бляшки і астроцитоз, і, отже, служать як модель тварини для хвороби Альцгеймера людини.

У цьому четвертому експерименті мишей PDAPP імунізували підшкірно Аβ1-42-пептидом з різними ад'ювантами або без ад'ювантів і при дозах, показаних у таблиці А. Зокрема, миші групи 1 одержували Аβ1-42-пептид з MPL™ (Coriха, Hamilton, MT) у стабільній емульсійній формі (SE) як позитивний контроль; миші групи 2 одержували Аβ1-42-пептид з MPL™ SE плюс мишачий GM-CSF; миші групи 3 одержували Аβ1-42-пептид з 529 SE плюс мишачий GM-CSF; миші групи 4 одержували PBS як негативний контроль. Групи 2 і 3 виявляли більш швидке збільшення величин титрів анти-Аβ1-42-антитіла, а також більш високий максимальний титр, ніж групи 1 або 4.

Однак титри в групах 2 і 3 знижувались до еквівалентного титру позитивних титрів групи 1 у межах 2-3 місяців (Фігура А). Групи 1, 2 і 3 показали значиме зниження рівнів Аβ у головному мозку при вимірюванні за допомогою ELISA (таблиці В-С і Фігури В-С), більш низькі амілоїдні навантаження (таблиця D і Фігура D) і меншу нейритну дистрофію (таблиця Е і Фігура В), у порівнянні з негативними контролями групи 4. Групи 2 і 3 мали значиме зменшення астроцитозу в порівнянні з позитивними контролями групи 1 (Фігура F).

Таким чином, ад'ювантні (імуностимулюючі) властивості 529 SE і GM-CSF або IL-12, очевидно, є синергічними при приготуванні сумісної композиції.

Антигенні композиції даного винаходу модулюють імунну реакцію поліпшенням реакції у вигляді антитіл хребетного хазяїна і клітинно-опосередкованого імунітету після введення антигенної композиції, що містить вибраний антиген з патогенних вірусу, бактерії, гриба або паразита і ад'ювантну кількість AGP, такого як 529 (у водній формі або у формі стабільної емульсії), комбінований з цитокіном або лімфокіном, зокрема GM-CSF або IL-12. Було показано, що інші цитокіни або лімфокіни мають імуномодулюючу активність, у тому числі, але не тільки, інтерлейкін 1-альфа, 1-бета, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 і 18, інтерферони-альфа, бета і гама, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор і фактор некрозу пухлин альфа і бета.

Агоністи або антагоністи визначених цитокінів або лімфокінів також знаходяться в обсязі даного винаходу. У застосуванні тут термін "агоніст" означає молекулу, що підсилює активність зазначених цитокінів або лімфокінів або функціонує таким же чином, як зазначені цитокіни або лімфокіни. Прикладом такого агоністу є міметик зазначених цитокінів або лімфокінів. У застосуванні тут термін "антагоніст" означає молекулу, яка інгібує або запобігає активності зазначених цитокінів або лімфокінів. Прикладами таких антагоністів є розчинний рецептор IL-4 і розчинний рецептор TNF.

У застосуванні тут термін "ефективна ад'ювантна (імуностимулююча) кількість" означає дозу комбінації описаних тут ад'ювантів, яка придатна для індукції збільшеної імунної реакції на вибраний антиген у хребетного хазяїна, у порівнянні з хазяїном, що одержує цей вибраний антиген під час відсутності цієї комбінації ад'ювантів. Конкретна доза буде залежати частково від віку, ваги і медичного стану хазяїна, а також від способу введення і конкретного антигену. У кращому варіанті ця комбінація ад'ювантів буде використовувати 529 у діапазоні 0,1-500мкг на дозу; у більш кращому варіанті використовують діапазон 1-100мкг на дозу. Придатні дози легко визначаються особами з кваліфікацією у даній області. Антигенні композиції даного винаходу можуть бути також змішані з імунологічно прийнятними розріджувачами або носіями загальноприйнятим чином для приготування ін'єкційних рідких або розчинів суспензій.

Антигенні або імуногенні композиції даного винаходу вводять людині або хребетному, що не є людиною, різними шляхами, у тому числі, але не тільки, інтраназальним, пероральним, вагінальним, ректальним, парентеральним, інтрадермальним, трансдермальним [див., наприклад, Міжнародну заявку WO 98/20734, що включена як посилання], внутрішньом'язовим, внутрішньоочеревинним, підшкірним, внутрішньовенним і внутрішньоартеріальним шляхом. Кількість антигенного компонента або компонентів антигенної композиції буде варіюватись в залежності від конкретного антигену, а також від віку, ваги і медичного стану хазяїна, а також

UA 79426 C2

UA 79426 C2

від способу введення. Знову, відповідні дози легко визначаються особами з кваліфікацією у даній області. Переважно, хоча і необов'язково, антиген і комбінацію ад'ювантів вводять одночасно. Число доз і схема введення доз для антигенної композиції також легко визначаються особами з кваліфікацією у даній області. У деяких випадках ад'ювантні властивості комбінації ад'ювантів можуть зменшувати число необхідних доз або часовий хід схеми прийому лікарського засобу.

Комбінації ад'ювантів даного винаходу придатні для застосування в антигенних або імуногенних композиціях, що містять велику різноманітність антигенів з великого кола патогенних мікроорганізмів, у тому числі, але не тільки, антигенів з вірусів, бактерій, грибів або паразитичних мікроорганізмів, що інфікують людей і хребетних тварин, що не є людиною, або антигенів з ракової клітини або нухлинної клітини. Антиген може містити пептиди або поліпептиди, одержані з білків, а також фрагменти кожного з наступних компонентів: сахаридів, білків, полі- або олігонуклеотидів, ракових або пухлинних клітин, алергенів, аутологічних молекул (таких як білок-попередник амілоїду) або інших макромолекулярних компонентів. У деяких випадках в антигенну композицію може бути включена більша кількість антигенів, ніж один антиген.

Бажані вірусні імуногенні композиції, що містять комбінації ад'ювантів даного винаходу, містять у собі композиції, спрямовані на попередження та/або лікування захворювання, яке викликається, без обмеження, вірусом імунодефіциту людини, вірусом імунодефіциту мавп, респіраторно-синцитіальним вірусом, вірусом парагрипу типів 1-3, вірусом грипу, вірусом простого герпесу, цитомегаловірусом людини, вірусом гепатиту А, вірусом гепатиту В, вірусом гепатиту С, папіломавірусом людини, поліовірусом, ротавірусом, каліцивірусами, вірусом кору, вірусом паротиту, вірусом коревої краснухи, аденовірусом, вірусом сказу, вірусом чуми собачих, вірусом чуми великої рогатої худоби, метапневмовірусом людини, пневмовірусом птахів (раніше названим вірусом ринотрахеїту індичок), Хендравірусом, Ніпавірусом, коронавірусом, парвовірусом, вірусами інфекційного ринотрахеїту, вірусом котячого лейкозу, вірусом інфекційного котячого перитоніту, вірусом інфекційного бурсального захворювання птахів, вірусом Ньюкаслської хвороби птахів, вірусом хвороби Марека, вірусом респіраторного і репродуктивного синдрому свиней, вірусом кінського артеріїту і різними вірусами енцефаліту.

Бажані бактеріальні імуногенні композиції, що містять комбінації ад'ювантів даного винаходу, містять у собі композиції, спрямовані на попередження та/або лікування захворювання, яке викликається, без обмеження, Haemophilus influenzae (як типовим, так і нетиповим), Haemophilus somnus, Moraxella catarrhalis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Streptococcus faecalis, Helicobacter pylori, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia psittaci, Bordetella pertussis, Alloiococcus otiditis, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Salmonella choleraesuis, Escherichia coli, Shigella, Vibrio cholerae, Corynebacterium diphtheriae, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium-Mycobacterium istracellulare complex, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Clostridium tetani, Leptospira interrogans, Borrelia burgdorferi, Pasteurella haemolytica, Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae і Mycoplasma gallisepticum.

Бажані імуногенні композиції проти грибкових патогенів, що містять комбінації ад'ювантів даного винаходу, містять у собі композиції, спрямовані на попередження та/або лікування захворювання, яке викликається, без обмеження, Aspergillus, Blastomyces, Candida, Coccidiodes, Cryptococcus і Histoplasma.

Бажані імуногенні композиції проти паразитів, що містять комбінації ад'ювантів даного винаходу, містять у собі композиції, спрямовані на попередження та/або лікування захворювання, яке викликається, без обмеження, Leishmania major, Ascaris, Trichuris, Giardia, Schistosoma, Cryptosporidium, Trichomonas, Toxoplasma gondii і Pneumocystis carinii.

Бажані імуногенні композиції для індукування терапевтичного або профілактичного антиракового ефекту у хребетного хазяїна, що містять комбінації ад'ювантів даного винаходу, містять у собі композиції, що використовують раковий антиген або пов'язаний з пухлиною антиген, у тому числі, без обмеження, специфічний для передміхурової залози антиген, карцино-ембріональний антиген, MUC-1, Her2, CA-125 і MAGE-3.

Бажані імуногенні композиції для ослаблення реакцій на алергени у хребетному хазяїні, що містять комбінації ад'ювантів даного винаходу, містять у собі композиції, які містять алерген або його фрагмент. Приклади таких алергенів описані у [Патенті Сполучених Штатів №5830877 [51] і опублікованій Міжнародній патентній заявці № WO99/51259 [52], що включені тим самим як посилання], і містять у собі пилок, отрути комах, лупу тварин, спори грибів і лікарські засоби (такі як пеніцилін). Ці імуногенні композиції перешкоджають продукуванню IgE-антитіл, відомої причини алергійних реакцій.

Бажані імуногенні композиції для ослаблення реакцій на аутологічні молекули у хребетного хазяїна, що містять комбінації ад'ювантів даного винаходу, містять у собі композиції, що містять аутологічну молекулу або її фрагмент. Приклади таких аутологічних молекул, крім Аβ1-42-пептиду, описаного вище, містять у собі інсулін з β-ланцюгом, що бере участь у діабеті, молекулу G17, що бере участь у такому захворюванні, як гастроезофагеальний рефлюкс, і антигени, що негативно регулюють (знижують) аутоімунні реакції при захворюваннях, таких як множинний склероз, системний червоний вовчак і ревматоїдний артрит.

У випадку ВІЛ і SIV (вірусу імунодефіциту мавп) ці антигенні композиції містять, щонайменше, один білок, поліпептид, пептид або фрагмент, одержані із зазначеного білка. У деяких випадках в антигенну композицію включені множинні білки, поліпептиди, пептиди та/або фрагменти ВІЛ або SIV.

Комбіновані форми ад'ювантів даного винаходу придатні також для включення ад'юванта у полінуклеотидні імуногенні композиції (також відомі як імуногенні композиції ДНК). Такі імуногенні композиції можуть додатково містити допоміжні агенти, такі як бупівікаїн [див. Патент США №5593972 [53], який включений як посилання].

UA 79426 C2

UA 79426 C2

Для кращого розуміння даного винаходу представлені наступні приклади. Ці приклади наведені тільки з метою ілюстрації і не повинні розглядатись як такі, що обмежують об'єм даного винаходу.

Приклади

Приклад 1

Матеріали і способи

Наступні матеріали і способи використовували в експериментах, повідомлених у прикладах 2-7 нижче.

Тварини

Самок мишей Balb/c у віці 7-9 тижнів придбавали у Talconic Farms, Inc. (Germantown, NY). Самок мишей Swiss-Webster у віці 7-9 тижнів також придбавали у Talconic Farms, Inc. Всіх мишей утримували в обладнанні, схваленому Американською Асоціацією осіб з догляду за лабораторними тваринами. Мишей акліматизували до обладнання для їх утримування протягом одного тижня перед початком досліджень.

Антигени

В експериментах із ВІЛ у прикладах 2-3 нижче використовували два різних синтетичних пептиди. Послідовність мультиепітопного пептиду HIV-1-$_{MN}$ TISP10MN(A) (-Cys) (також названого тут MN-10) є наступною:

[illegible]

Цей пептид був описаний раніше [33, 34] і містить послідовності з gp120$_{MN}$ ВІЛ-1, які індукують CD4$^+$ Th-клітинні реакції як у мишей, так і у людей, головну нейтралізуючу детермінанту і сайт, який упізнається CD8$^+$ CTL у мишей Balb/c. Цей пептид був наданий доктором R. Scearce [Duke University, Durham, NC]. Для аналізу CTL з метою порівняння використовували сторонній пептид, названий ШВ. Цей пептид відповідав епітопу CTL у V3-петлі HIV-1-$_{IIIB}$ (Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile (SEQ ID N0:8)), і був придбаний у Genosys Biotechnologies Inc. [The Woodlands, TX]. Пептиди солюбілізували у стерильній воді і розбавляли у придатних буферах або культуральному середовищі для клітин перед використанням.

В експериментах з амілоїдом прикладів 4-6 і 8 нижче використовували пептид, названий Аβ1-42. Послідовність Аβ1-42 є наступною:

[illegible]

Цей пептид був описаний раніше [47] і відповідає внутрішньому фрагменту з 42 амінокислот білка-попередника амілоїду. Аβ1-42 одержували від Elan Pharmaceuticals [South San Francisco, CA]. Пептид солюбілізували у стерильній воді і розбавляли у придатних буферах або культуральному середовищі для клітин перед використанням.

Ад'юванти

Всі препарати ад'ювантів, які містять 529, одержували від Corixa [Hamilton, MT]. 529 SE готували у вигляді попередньої емульсії типу "масло у воді" (0,8-2,5% масло) на основі сквалену, що має концентрації 529 у діапазоні 0-50мкг/мл. Фосфат алюмінію готували у власній лабораторії. Повний ад'ювант Фрейнда (CFA) і неповний ад'ювант Фрейнда (IFA) придбавали у Difco Laboratories, Detroit, MI. Пептиди T1SP10MN(A) і ад'юванти Фрейнда емульгували у співвідношенні 1:1 з використанням двох спарених шприців. Рекомбінантно експресований мишачий IL-12 одержували від Genetics Institute [Cambridge, MA]. Рекомбінантний мишачий GM-CSF придбавали у Biosource Internatinal [Camarillo, CA] у вигляді ліофілізованого порошку без носія. Стимулон™ QS-21 придбавали у Antigenics Inc. [Framingham, MA].

Імунізації

Мишей імунізували підшкірно у сідничну область у загальному обсязі 0,2мл, порівну розділеному на кожну сторону сідничної області. Імунізації виконували при різних тимчасових інтервалах, зазначених нижче. Антиген і цитокіни розбавляли у забуференому фосфатом сольовому розчині до придатних концентрацій і готували з ад'ювантами менше ніж за 16 годин перед імунізацією, у стерильних умовах. Імуногенні композиції змішували обережним струшуванням і зберігали при 4 °С. Ці форми перемішували вертексом безпосередньо перед імунізацією.

Аналіз сироватки з використанням твердофазного імуноферментного аналізу

У тварин брали кров перед початковою імунізацією і у зазначених тимчасових точках. Аналіз сироватки був представлений у вигляді середнього геометричного окремих титрів. Для аналізу специфічного для пептиду ВІЛ антитіла і розподілу підкласів пептид суспендували або у карбонатному буфері (15мМ Na_2CO_3, 35мМ $NaHCO_3$, р 9,6), або у PBS, при концентрації 1мкг/мл і вміщували у 96-ямкові мікротитраційні планшети (Nunc) в обсязі 100:1. Після інкубування протягом ночі при 37 °С планшети промивали і блокували (0,1% желатин/PBS) при кімнатній температурі протягом 2-4 годин. Планшети ELISA промивали промивним буфером (PBS, 0,1% Твін™20) перед додаванням серійно розведеної сироватки (PBS, 0,1% желатин, 0,05% Твін ™20, 0,02% азид натрію). Після 4-годинного інкубування ямки промивали і придатні розведення біотинільованих антиізотип/підкласів-антитіл додавали для інкубування при 4 °С протягом ночі. Ямки промивали та інкубували з

UA 79426 C2

UA 79426 C2

кон'югованою зі стрептавідином пероксидазою хріну. Після інкубування ямки промивали і виявляли ABTS. Ямки зчитували при 405нм. Титри стандартизували з використанням контрольних сироваток.

Той же самий протокол використовували для аналізу А β1-42-пептид-специфічних антитіл і розподілу підкласів, за винятком того, що використовували концентрацію 0,3мкг/мл на мікротитраційний планшет.

Одержання клітин

Для аналізів проліферації і аналізу цитокінів in vitro одержували клітини селезінки мишей у зазначених часових точках. Суспензії окремих клітин одержували з пулів від 3-5 мишей. Для аналізу проліферації і цитокінів клітини суспендували в круглодонних 96-ямкових культуральних планшетах, попередньо покритих протягом ночі пептидными антигенами ВІЛ, контрольними білками або тільки середовищем RPMI-10. Клітини селезінки додавали при $5x10^5$ клітин на ямку з використанням культурального середовища, що має 2х добавки. Клітинні культуральні супернатанти збирали з ямок у трьох повторностях для аналізу цитокінів після трьох або шести днів після початку культивування. Відразу після збирання супернатантів культури короткочасно обробляли ^{3}Н-тимідином протягом 18-24 годин і збирали для кількісного визначення проліферації клітин.

Приклад 2

Реципрокні титри кінцевих точок анти-TISP10MN(A) (-Cys)-IgG для загальних IgG і підкласів

Реципрокні титри кінцевих точок підкласів IgG вимірювали з об'єднаної сироватки (n=5 Balb/c) через п'ять тижнів після початкової імунізації, через два тижні після вторинної імунізації. Мишей імунізували підшкірно у сідничну область 25мкг T1SP10MN(A) (-Cys) з використанням у цілому 0,2мл, розділених порівну на дві 0,1мл-ин'єкції на кожній стороні при тижні 0 і тижні 3. 529 SE розбавляли для одержання емульсії, що містить 1,25% скваленове масло і 25мкг 529 на дозу. SE є емульсією-носієм типу масло у воді, що складається зі сквалену, гліцерину і емультуючого агента. Рекомбінантний мишачий IL-12 надавали у кількості 40нг на мишу. Рекомбінантний мишачий GM-CSF вводили при 25мкг на мишу. Результати наведені у таблиці 1 із середніми геометричними титрами плюс стандартні помилки для кожної групи.

Таблиця 1

Рецмпрокні титри кінцевих точок анті-TISP10MN(A) (-Cys)-IgG для загальних IgG і підкласів IgG

		Титри кінцевих точок		
Ад'юванти	HIV-пептид, мкг	IgG	IgG1	IgG2a
529 (25) SE (1,25% масло)	25	206301±175149	37567±31526	180671±277211
529 (25) SE (1,25% масло)+rIL-12 (,04)	25	460516±690712	74269±169868	222446±400716
529 (25) SE (1,25%масло)+GM-CSF (25)	25	1085658±1064924	238379±62199	117657±25301

Приклад 3

Аналіз CTL у мишей Balb/c

Для імунізації мишей використовували протоколи прикладу 2. Оцінювали CTL-активність клітин селезінки, виділених з мишей через 14 днів після вторинної імунізації. 529 SE готували з 25мкг 529 SE, що містять 1,25% масло з 10мкг GM-CSF або 40нг IL-12 або без них, плюс 25мкг TISP10MN(A) (-Cys).

Для аналізу CTL клітини селезінки витягали з імунізованих мишей через 14 днів після вторинної імунізації. Використовували власне кажучи раніше описаний протокол. Коротко, поєднували клітини селезінок, що не містять еритроцити, із трьох мишей на групу. Ефекторні клітини селезінки ($4x10^6$ на мл) повторно стимулювали у 24-ямкових культуральних планшетах в обсязі 1,5-2мл протягом семи днів з 1мкг/мл або пептиду “MN-10”, або 10-мірного пептиду епітопу CTL “IIIB” або без пептиду HIV. Обидва епітопи CTL були обмежені H-2D^d. Культури доповнювали 10Е/мл рекомбінантного мишачого IL-2 (Biosource) протягом останніх п'яти днів культивування. Для аналізу цитотоксичної активності клітини P815 мітили Cr^{51} і короткочасно обробляли 5мкг/мл пептиду (IIIB або MN-10) протягом чотирьох годин і додавали до культивованих ефекторних клітин селезінки. Якщо не використовували пептид HIV, то серію клітин-мішеней не піддавали цій короткочасній обробці. Використовували триразові розведення відношень ефекторних клітин до клітин мішеней (“E:T”) 30:1-1,1:1. Процент CTL-активності розраховували у вигляді проценту вивільнення хрому з використанням рівняння ((специфічне вивільнення хрому-спонтанне вивільнення хрому)/(максимальне вивільнення хрому-спонтанне вивільнення хрому))*100. Вивільнення хрому оцінювали після 6-годинного періоду інкубації. Середнє спонтанне вивільнення хрому завжди було менше 15% від максимального вивільнення. Результати даних із дня 28 показані у таблиці 2.

Таблиця 2

Відношення ефектор:мішень

	Пептид MN-10			Пептид IIIB			Без пептиду		
529 SE+:E:T% специфічне вивільнення	*	IL-12	GM-CSF	*	IL-12	GM-CSF	*	IL-12	GM-CSF
30:1	31	53	71	8	11	19	4	8	8
10:1	19	41	70	5	8	21	2	5	9
3,3:1	5	11	35	2	1	5	_про	-2	-1
1,1:1	2	4	14	1	0	2	-3	-2	-3

* Без додаткового ад'юванта

Приклад 4

Реципрокні титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG для загальних IgG і підкласів

UA 79426 C2

UA 79426 C2

Одержаних аутбрідингом мишей Swiss-Webster поділяли на групи по 10 мишей кожна. Кожна група одержувала 30мкг Aβ1-42-пептиду, що відповідає внутрішньому району APP із довжиною 42 амінокислоти. Перша група не одержувала ад'юванта; друга група одержувала 50мкг 529 SE, що містить 2,5% масла; третя група одержувала 50мкг 529 SE, що містить 2,5% масла плюс 10мкг GM-CSF; четверта група одержувала 10мкг GM-CSF; п'ята група одержувала SE, що містить 1,25% масла; шоста група одержувала SE, що містить 1,25% масла плюс 10мкг GM-CSF; сьома група одержувала 50мкг QS-21. Мишей імунізували підшкірно у сідничну область загальним обсягом 0,2мл, розділеним порівну в кожну з двох ділянок у основи хвоста/сідничної області. Імунізації виконували при тижні 0 і тижні 3.

У мишей брали кров у дні 0, 20, 35 і 70. Сироватку аналізували з окремих мишей. Реципрокні титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-пептид-IgG для загальних IgG і підкласів вимірювали в окремих сироватках (n=10 Swiss-Webster) на тижні 5 і на тижні 10. Результати IgG кінцевих точок наведені у таблицях 3 (тиждень 5) і 4 (тиждень 10). Результати підкласу IgG1 наведені у таблицях 5 (тиждень 5; групи, що не одержують ад'юванта або QS-21, не вимірювали) і 6 (тиждень 10). Результати для підкласу IgG2a наведені у таблицях 7 (тиждень 5; групи, що не одержують ад'юванта або QS-21, не вимірювали) і 8 (тиждень 10).

Таблиця 3

Титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG тижня 5

Ад'юванти	Середній геометричний титр	Стандартна помилка
Відсутні	12976	±14386
529 SE (50)	16204	±225221
529 SE (50)+GM-CSF (10)	608474	±623575
GM-CSF (10)	214497	±609067
SE (1%)	33342	±15493
SE (1%)+GM-CSF (10)	453367	±162750
QS-21 (50)	4076	±9036

Таблиця 4

Титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG тижня 10

Ад'юванти	Середній геометричний титр	Стандартна помилка
Відсутні	21426	±24959
529 SE (50)	86847	±187792
529SE(50)+GM-CSF (10)	943075	±989177
GM-CSF (10)	1049414	±390525
SE (1%)	255631	±114025
SE (1%)+GM-CSF (10)	1005899	±407108
QS-21 (50)	47222	±159775

Таблиця 5

Титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG тижня 5

Ад'юванти	Середній геометричний титр	Стандартна помилка
529 SE (50)	461	±627
529 SE (50)+GM-CSF (10)	1936	±12680
GM-CSF (10)	8654	±10100
SE (1%)	4515	+6273
SE (l%)+GM-CSF (10)	24422	±19764

Таблиця 6

Титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG тижня 10

Ад'юванти	Середній геометричний титр	Стандартна помилка
Відсутні	2086	±2448
529 SE (50)	969	±521
529 SE (50)+GM-CSF (10)	2076	±4901
GM-CSF (10)	8483	±10998
SE (1%)	3623	±3456
SE (1%)+GM-CSF (10)	12472	±11502
QS-21 (50)	988	±895

Таблиця 7

Титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG тижня 5

UA 79426 C2

UA 79426 C2

Ад'юванти	Середній геометричний титр	Стандартна помилка
529 SE (50)	2224	± 10099
529 SE (50)+GM-CSF (10)	94764	±849173
GM-CSF (10)	25554	±13191
SE (1%)	1484	±2271
SE (1%)+GM-CSF (10)	8405	±31303

Таблиця 8

Титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG тижня 10		
Ад'ютанти	Середній геометричний титр	Стандартна помилка
Відсутні	5910	±39626
529 SE (50)	5944	±9100
529SE (50)+GM-CSF (10)	47694	±88053
GM-CSF (10)	64910	±54824
SE (1%)	2350	±2326
SE (1%)+GM-CSF (10)	7421	+31153
QS-21 (50)	3544	±26332

Приклад 5

Реципрокні титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG для загальних IgG і підкласів з кількостями GM-CSF, що варіюються

Одержаних аутбрідингом мишей Swiss-Webster поділяли на групи по 10 мишей кожна. Кожна група одержувала 30мкг Aβ1-42-пептиду при тижнях 0 і 3. Перша група одержувала 25мкг 529 SE плюс 10мкг GM-CSF; друга група одержувала 25мкг 529 SE плюс 1мкг GM-CSF; третя група одержувала 25мкг 529 SE плюс 0,1мкг GM-CSF; четверта група одержувала 25мкг 529 SE плюс 10мкг GM-CSF у примуючій дозі і потім 25мкг тільки 529 SE у другій дозі; п'ята група одержувала 25мкг QS-21; шоста група одержувала 25мкг QS-21 плюс 10мкг GM-CSF. Мишей імунізували підшкірно у сідничну область загальним обсягом 0,2мл, розділеним порівну в кожну з двох ділянок у основи хвоста/сідничної області.

У мишей брали кров у дні 0, 21 і 42. Реципрокні титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-пептид-IgC для загальних IgG і підкласів вимірювали в окремих сироватках (n=10) на тижні 6. Результати IgG кінцевих точок наведені у таблиці 9. Результати підкласу IgG1 наведені у таблиці 10. Результати підкласу IgG2a наведені у таблиці 11.

Таблиця 9

Титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG тижня 6		
Ад'юванти	Середній геометричний титр	Стандартна помилка
529 SE (25)+GM-CSF (10)	353660	±148940
529 SE (25)+GM-CSF (1)	150935	±218332
529 SE (25)+GM-CSF (0,1)	86145	±91724
529 SE (25)*	25365	+54083
QS-21 (25)	1866	±18430
QS-21 (25)+GM-CSF (10)	48970	±116106
* Перша доза 529 SE (25)+GM-CSF (10); друга доза тільки 529 SE (25).		

Таблиця 10

Титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG тижня 6		
Ад'юванти	Середній геометричний титр	Стандартна помилка
529 SE (25)+GM-CSF (10)	10867	±18333
529 SE (25)+GM-CSF (1)	24909	±18625
529 SE (25)+GM-CSF (0,1)	6608	±17736
529 SE (25)*	4511	±8154
QS-21 (25)	581	±126
QS-21 (25)+GM-CSF (10)	7618	±29145
* Перша доза 529 SE (25)+GM-CSF (10); друга доза тільки529 SE (25).		

Таблиця 11

Титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG тижня 6		
Ад'юванти	Середній геометричний титр	Стандартна помилка
529 SE (25)+GM-CSF (10)	243758	±354383
529 SE (25)+GM-CSF (1)	116222	±143140

UA 79426 C2
UA 79426 C2

529 SE (25)+GM-CSF (0,1)	98018	±391797
529 SE (25)*	16018	±165298
QS-21 (25)	немає даних	немає даних
* Перша доза 529 SE (25)+GM-CSF (10); друга доза тільки 529 SE (25).		

Приклад 6

Реципрокні титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG для загальних IgG і підкласів з кількостями GM-CSF, що варіюються

Одержаних аутбрідингом мишей Swiss-Webster поділяли на групи по 10 мишей кожна. Кожна група одержувала 30мкг Aβ1-42-пептиду на тижнях 0 і 3. При імунізації на тижні 0 перша група одержувала 50мкг 529 SE; друга група одержувала 50мкг 529 SE плюс 10мкг GM-CSF; третя група одержувала 50мкг 529 SE плюс 5мкг GM-CSF; четверта група одержувала 50мкг 529 SE плюс 2мкг GM-CSF; п'ята група одержувала 50мкг 529 SE плюс 0,5мкг GM-CSF; шоста група одержувала 1% SE. При імунізації на тижні 3 перша-п'ята групи одержували ту ж саму дозу, що і при імунізації на тижні 0, за винятком того, що 529 SE була зменшена з 50 до 25мкг. Кількість SE, одержувану шостою групою, збільшували з 1% при імунізації на тижні 0 до 1,2% при імунізації на тижні 3. Мишей імунізували підшкірно у сідничну область загальним об'ємом 0,2мл, розділеним порівну у кожну із двох ділянок у основи хвоста/сідничної області.

У мишей брали кров у дні 2, 20 і 35. Реципрокні титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-пептид-IgG для загальних IgG і підкласів вимірювали в окремих сироватках (n=10) при тижні 5. Результати IgG кінцевих точок наведені у таблиці 12. Результати підкласу IgG1 наведені у таблиці 13. Результати підкласу IgG2a наведені у таблиці 14.

Таблиця 12

Титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG тижня 5		
Ад'юванти	Середній геометричний титр	Стандартна помилка
529 SE (50)	6119	±3103
529 SE (50)+GM-CSF (10)	52312	±78421
529 SE (50)+GM-CSF (5)	16392	±17706
529 SE (50)+GM-CSF (2)	321524	±224875
QS-21 (25)+GM-CSF (10)	30133	±134774
529 SE (50)+CSF (0,5)	36934	±29449
SE (1%)	7784	±9041

Таблиця 13

Титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG тижня 5		
Ад'юванти	Середній геометричний титр	Стандартна помилка
529 SE (50)	499	±676
529 SE (50)+GM-CSF (10)	1424	±2468
529 SE (50)+GM-CSF (5)	3407	±5653
529 SE (50)+GM-CSF (2)	18328	±8067
529 SE (50)+CSF (0,5)	3526	±17606
SE (1%)	2556	±5615

Таблиця 14

Титри кінцевих точок анти-Aβ1-42-IgG тижня 5		
Ад'юванти	Середній геометричний титр	Стандартна помилка
529 SE (50)	1386	±5173
529 SE (50)+GM-CSF (10)	48519	±148981
529 SE (50)+GM-CSF (5)	11659	±23132
529 SE (50)+GM-CSF (2)	124815	±167340
529 SE (50)+CSF (0,5)	26190	±40254
SE (1%)	694	±1325

Приклад 7

Імунізація Th-CTL- і C4-V3-пептидом макак-резус

Наступний експеримент спланований для прямого порівняння кількості комбінованих форм пептидів і ад'ювантів у приматів (макак-резус) для ідентифікації потенційних комбінацій пептид/ад'ювант для переходу до клінічних дослідів на людині. Конкретно, форму 529 SE, що містить ад'ювант, оцінювали у порівнянні з неповним ад'вантом Фрейнда (IFA) у комбінацій з (1) пептидним кон'югатом, виробленим з SIV-env T-хелпер/Siv gag CTL (ST1-pllc), що має наступну послідовність:

UA 79426 C2
UA 79426 C2

[illegible]

або пептидним кон'югатом C4-V3, виробленим із ВІЛ-1 (C4-V3$_{89.6P}$), що має наступну послідовність:

[illegible]

Побудова дослідження:

Для цього дослідження використовували всього 8 тварин, 4 Mamu-A*01+ і 4 Mamu-A*01-, як описано у таблиці 15.

Таблиця 15

529 SE і GM-CSF у порівнянні з IFA

Група №	Число тварин	Тварина	Імуногенна композиція	Ад'ювант
1	2 Mamu-A01+	93x021	ST1-p11C	IFA
2	2 Mamu-A01+	98n002	ST1-p11C	529 SE/GM-CSF
		98n008		
3	2 Mamu-A01-	98n007	C4-V3$_{89.6P}$	IFA
		98n013		
4	2 Mamu-A01-	95x011	C4-V3$_{89.6P}$	529 SE/GM-CSF
		96x004		

Тварини групи 1 одержували 0,5мл Th-CTL-пептиду (1,0мг/мл) в емульсії типу вода у маслі з 0,5мл IFA у загальному об'ємі 1,0мл. Тварини групи 2 одержували 0,5мл ST1-p11C (1,0мг/мл), об'єднані з 240мкг GM-CSF людини, 50мкг 529 SE з кінцевою концентрацією масла 1% у загальному об'ємі 1,0мл. Тварини групи 3 одержували 0,5мл пептиду C4-V3$_{89.6P}$ (2,0мг/мл) в емульсії вода у маслі з 0,5мл IFA, кінцевий об'єм 1,0мл. Нарешті, тварини групи 4 одержували 0,5мл пептиду C4-V3$_{89.6P}$ (2,0мг/мл), об'єднані з 250мкг GM-CSF людини, 50мкг 529 SE з кінцевою концентрацією масла 1% у загальному об'ємі 1,0мл.

Усіх тварин імунізували внутрішньом'язовою ін'єкцією зі схемою введення на 0, 4 і 8 тижнях. Проби периферичної крові брали безпосередньо перед тижнями 1 або 2 після кожної імунізації для моніторингу індукції CTL за фарбуванням тетрамеру, p11C (Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gin Met; SEQ ID NO:3, амінокислоти 19-27), специфічним реакціям ELISPOT і CTL-реакціям загальної маси культури (Групи 1 і 2), а також за реакціями пептид-специфічних антитіл (Групи 1-4).

Безпека і переносимість

ST1-p11C+IFA: Форма ST1-p11C+IFA, яку вводили внутрішньом'язовою ін'єкцією в одному місці три рази тваринам групи 1, була пов'язана з істотною реактивністю місця ін'єкції. У однієї тварини (93x021) розвився абсцес розміром 1,5см у місці ін'єкції через два тижні після другої імунізації. У іншої тварини (95x009) також розвився абсцес розміром 2,0см у місці ін'єкції через два тижні після третьої імунізації, що прорвався через шкіру і зажадав накладення пов'язки.

ST1-p11C+529 SE/GM-CSF: Форма ST1-p11C+529 SE/GM-CSF, яку вводили внутрішньом'язовою ін'єкцією в одному місці три рази у тварин групи 2, була пов'язана з мінорними несприятливими ефектами. Обидві тварини групи 2 мали блювоту незабаром після одержання третьої імунізації при тижні 8. Інші несприятливі ефекти не спостерігались.

C4-V3$_{89.6P}$+IFA: Форма C4-V3$_{89.6P}$+IFA, що вводили внутрішньом'язовою ін'єкцією в одному місці три рази тваринам групи 3, була пов'язана з істотною реактивністю місця ін'єкції. У однієї тварини (98n013) розвився абсцес розміром 1,0см у місці ін'єкції через один тиждень після другої імунізації. У іншої тварини (98n007) також розвився абсцес розміром 1,5см у місці ін'єкції через один тиждень після другої імунізації. Цей абсцес у тварини зажадав дренування і накладання пов'язки через чотири тижні.

C4-V3$_{89.6P}$+529 SE/6M-CSF:

Форма C4-V3$_{89.6P}$+529 SE/GM-CSF, що вводили внутрішньом'язовою ін'єкцією в одному місці три рази тваринам групи 4, була зв'язана тільки з одним мінорним несприятливим ефектом. Одна з тварин групи 4 (95x011) мала блювоту незабаром після одержання третьої імунізації на тижні 8. Інші несприятливі ефекти не спостерігались.

У всіх тварин групи 1 і групи 3, в яких тварини одержували IFA як ад'ювант, спостерігали істотні реактивності місць ін'єкції. Ці результати вказують на те, що 0,5мл IFA погано переносяться при введенні внутрішньом'язовою ін'єкцією в одному місці ін'єкції. Слід також зазначити, що 3 з 4 тварин, що одержували 529 SE/GM-CSF як ад'ювант, мали блювоту на тижні 8 незабаром після імунізації. Хоча відомо, що анестетик (кетамін) пов'язаний із блювотою, не було документовано жодного випадку блювоти тварин протягом ходу цього дослідження. У той же час, існує недостатньо доказів, щоб зв'язувати блювоту тварин з якими-небудь

UA 79426 C2
UA 79426 C2

шкідливими ефектами, пов'язаними з 529 SE/GM-CSF.

Результати: Індукція клітинних імунних реакцій (Групи 1 і 2)

Фарбування p11C-тетрамеру свіжовиділеної крові:

Перед імунізацією і через один і два тижні після імунізації свіжовидідену периферичну кров від усіх Mamu-A*01-позитивних тварин (Групи 1 і 2) піддавали скринінгу на присутність p11C-специфічних $CD3^+CD8^+$ Т-лімфоцитів за допомогою фарбування розчинного тетрамеру MHC Класу I. Як показано у таблиці 16, тільки у однієї тварини (93x021), серед тих, які одержували ST1-p11C-петид у комбінації з IEA, виявлена наявність індукованих імунізацією клітинних імунних реакцій у нестимульованій периферичній крові.

Таблиця 16

Процентне фарбування p11C-тетрамеру і p11C-специфічніреакції ELISPOT у свіжовиділеній периферичній крові

		Тиждень ПРО Перед імунізацією		Тиждень 5 1 тиждень після 2-ої імунізації		Тиждень 6 2 тижня після 2-ої імунізації	
Тварина/група	Форма	Фарбування тетрамеру свіжої крові[a]	ELISPOT Число SFC на 10^6 клітин	Фарбування тетрамеру свіжої крові	ELISPOT Число SFC на 10^6 клітин	Фарбування тетрамеру свіжої крові	ELISPOT Число SFC на 10^6 клітин
95x009 (1)	ST1-p11C+IFA	0,02	0,0	0,00	0,0	0,00	3,8
93x021 (1)	ST1-p11C+IFA	0,02	Немає даних	0, 15	56,3	0,12	21,9
98n002 (2)	ST1-p11C+529 SE/GM-CSF	0,00	0,6	0,05	0,0	0,01	6,3
98n002 (2)	ST1-p11C+529 SE/GM-CSF	0,05	0,0	0,04	15,0	0,01	9,4

		Тиждень 8 4 тижні після 2-ої імунізації		Тиждень 9 1 тиждень після 3-ої імунізації		Тиждень 10 2 тижні після 3-ої імунізації	
Тварина	Форма	Свіжа кров	ELISPOT	Свіжа кров	ELISPOT	Свіжа кров	ELISPOT
95x009 (1)	ST1-p11C+IFA	0,00	Немає даних	0,01	2,5	0,02	1,9
93x021 (1)	ST1-p11C+IFA	0,02	Немає даних	0,14	Немає даних	0,02	Немає даних
98n002 (2)	ST1-p11C+529 SE/GM-CSF	0,06	Немає даних	0,00	Немає даних	0,00	3,8
98m002 (2)	ST1-p11C+529 SE/GM-CSF	0,02	Немає даних	0,02	Немає даних	0,00	0,0

Наведені у вигляді проценту $CD3^+CD8^+$ Т-лімфоцитів свіжовиділеної крові, що зафарбовуються позитивно p11C-тетрамером; ND, не виконували.

P11C-специфічні реакції ELISPOT: для додаткової оцінки індукції клітинних імунних реакцій у тварин Групи 1 і 2 лімфоцити свіжовиділеної периферичної крові піддавали скринінгу на присутність p11C-специфічних $CD3^+CD8^+$ Т-лімфоцитів за допомогою аналізу ELISPOT. Як показано у таблиці 16, тільки тварина 93x021, що продемонструвала детектовані рівні pHC-специфічних $CD8^+$ Т-лімфоцитів відповідно до аналізу тетрамеру свіжовиділеної крові, мала детектовані p11C-специфічні $CD8^+$ Т-лімфоцити відповідно до аналізу ELISPOT. У кожному випадку, позитивна реакція, визначена аналізом p11C-тетрамеру, підтверджувалась позитивною p11C-специфічною реакцією ELISPOT.

p11C-специфічні клітинні імунні реакції після стимуляції пептидом p11C in vitro: У спробі збільшення числа p11C-специфічних клітин перед аналізом свіжовиділені лімфоцити периферичної крові стимулювали in vitro пептидом p11C і rhIL-2. Через 14 днів одержані ефекторні клітини піддавали скринінгу на зв'язування p11C-тетрамеру, а також на p11C-специфічну літичну активність у стандартному аналізі CTL з вивільненням хрому. Результати аналізу p11C-тетрамеру і функціональних аналізів CTL показані у таблиці 17. Тварина 93x021, що постійно виявляла p11C-специфічні імунні реакції у свіжовиділених лімфоцитах, продемонструвала дуже високий рівень зв'язування тетрамеру і функціональної активності CTL через один тиждень після другої імунізації. Це свідчило про індукцію дуже ефективної p11C-специфічної клітинної імунної реакції. На противагу результатам, що спостерігаються у свіжовиділених лімфоцитах, одна тварина з групи 2 (98n008), ST1-p11C+529 SE/GM-CSF) почала виявляти доказ p111C-специфічних клітинних імунних реакцій через два тижні після другої імунізації. Однак p11C-специфічна імунна реакція, що спостерігається у тварини групи 2, була значно більш низького розміру, ніж реакція, що спостерігається у цієї відповідаючої тварини з групи 1.

Таблиця 17

Процентне фарбування p11C-тетрамеру і функціональні p11C-специфічні CTL-реакції після стимуляції пептидом p11C in vitro

		Тиждень 0 Перед імунізацією		Тиждень 5 1 тиждень після 2-ої імунізації		Тиждень 6 2 тижні після 2-ої імунізації	
Тварина/група	Форма	Фарбування тетрамеру [a]	CTL 20:1 E:T[b]	Фарбування тетрамеру	CTL 20:1 E:T	Фарбування тетрамеру	CTL 20:1 E:T

UA 79426 C2

UA 79426 C2

95x009 (1)	ST1-p11C+IFA	0,03	0,6	0,23	немає даних	0,27	0,0
93x021 (1)	ST1-p11C+IFA	0,03	0,0	34,31	66,3	15,15	4,69
98n002 (2)	ST1-p11C+529 SE/GM-CSF	0,21	0,0	немає даних	немає даних	0,73	немає даних
98n002 (2)	ST1-p11C+529 SE/GM-CSF	0,16	0,0	немає даних	немає даних	5,84	немає даних

		Тиждень 8 4 тижні після 2-ої імунізації		Тиждень 9 1 тиждень після 3-ої імунізації		Тиждень 10 2 тижні після 3-ої імунізації	
Тварина/група	Форма	Фарбування тетрамеру	CTL 20:1 E:T	Фарбування тетрамеру	CTL 20:1 E:T	Фарбування тетрамеру	CTL 20:1 E:T
95x009 (1)	ST1-p11C+IFA	немає даних	немає даних	0,76	3,0	0,72	0,0
93x021 (1)	ST1-p11C+IFA	немає даних	немає даних	4,90	7,3	немає даних	немає даних
98n002 (2)	ST1-p11C+529 SE/GM-CSF	немає даних	немає даних	0,07	5,7	0,39 j	0,0
98nOO8 (2)	ST1-p11C+529 SE/GM-CSF	немає даних	немає даних	2,24	11,4	5,00	0,0

[a]Наведені у вигляді проценту $CD3^+CD8^+$ культивованих клітин, що зафарбовуються позитивно p11C-тетрамером.

[b]Наведені у вигляді проценту p11C-специфічного лізису (мінус фон) при співвідношенні ефектор:мішень (E:T) 20:1.

Аналіз внутрішньоклітинних цитокінів: для додаткової характеристики функціональних і фенотипічних властивостей імуноген-індукованих пептид p11C-специфічних лімфоцитів внутрішньоклітинну експресію піддавали моніторингу на експресію цитокінів Th1-типу IFN-γ, TNFα, IL-2 і цитокіну Th2-типу IL-4. Внутрішньоклітинну експресію цитокінів піддавали моніторингу в лімфоцитах периферичної крові після початкової стимуляції in vitro у присутності 10мкм пептидів p11C і rhIL-2. Потім ці культури підтримували протягом 14 днів з 40Е/мл IL-2. Через два тижні культивовані клітини стимулювали або тільки середовищем, або 10мкМ пептидом p11C+anti-Human CD28 і anti-human CD49d протягом однієї години. Через одну годину ці клітини обробляли Брефелдином А протягом додаткових п'яти годин, щоб дати можливість внутрішньоклітинним цитокінам сконцентруватись в ендоплазматичному ретикулумі. Внутрішньоклітинну експресію цитокінів визначали потім кількісно проточною цитометрією (таблиці 18 і 19).

Як показано у таблиці 18, через два тижні після стимуляції пептидом p11C in vitro $CD3^+$ лімфоцити периферичної крові тварини групи 1 93x021 (ST1-p11C+IFA) показали низький рівень експресії цитокіну Th1-типу, причому менше 1,5% усіх клітин активно секретували IFN-γ, TNFα або IL-2. Приблизно 8% усіх $CD3^+$ лімфоцитів після стимуляції пептидом p11C in vitro активно секретували цитокін Th2-типу IL-4, і було виявлено, що секретуючі IL-4 клітини були обмежені субпопуляцією $CD3^+CD4^+$ лімфоцитів. Після короткочасного повторного піддавання дії пептиду p11C, субпопуляції p11C-тетрамер $^+$ і $CD3^+CD8^+$ лімфоцитів активно секретували цитокіни Th1-типу IFN-γ і TNFα, але не могли бути індуковані до секреції значимо збільшених рівнів IL-2. Після повторного впливу пептиду p11C секреція цитокіну Th2-типу IL-4 не змінилась.

Таблиця 18

Аналіз внутрішньоклітинних цитокінів тварини 93x021 групи 1 через два тижні після другої імунізації

Субпопуляція лімфоцитів	Середовище	INF-γ p11C	[a]S.I.	Середовище	TNFα p11C	S.I.
[b]p11C-тетрамер$^+$	977	27612	28,3	90	20342	226,0
[b]Загальний $CD3^+$	7628	65567	8,6	12256	51361	4,2
[b]$CD3^+CD4^+$	2488	5545	2,2	6252	2827	0,4
[b]$CD3^+CD8^+$	5273	60573	11,5	6865	48439	7,1
Субпопуляція лімфоцитів	Середовище	IL-2 p11C	S.I.	Середовище	IL-4 p11C	S.I.
[b]p11C-тетрамер$^+$	751	2004	2,7	Немає даних	Немає даних	Немає даних
[b]Загальний $CD3^+$	2879	6463	2,2	78069	90563	1,2
[b]$CD3^+CD4^+$	1377	1683	1,2	71275	81437	1,1
[b]$CD3^+CD4^+$	1502	4783	3,2	6794	9126	1,3

Таблиця 19

Аналіз внутрішньоклітинних цитокінів тварини 93x008 групи 2 через один тиждень після третьої імунізації

Субпопуляція лімфоцитів	Середовище	INF-γ p11C	[a]S.I.	Середовище	TNFα p11C	S.I.
[b]p11C-тетрамер$^+$	545	560	1,0	748	454	0,0
[b]Загальний $CD3^+$	6829	10489	1,5	3402	13443	4,0
[b]$CD3^+CD4^+$	3310	3789	1,1	1428	2567	1,8

UA 79426 C2

UA 79426 C2

[b]$CD3^+CD4^+$	3189	6825	2,1	2587	11324	4,4
Субпопуляція лімфоцитів	Середовище	IL-2 11C	S.I.	Середовище	IL-4 p11C	S.I.
[b]p11C-тетрамер$^+$	77	456	5,9	Немає даних	Немає даних	Немає даних
[b]Загальний $CD3^+$	385	2868	7,4	219789	202122	0,9
[b]$CD3^+CD4^+$	1379	1761	1,3	170804	158175	0,9
[b]$CD3^+CD4^+$	36	2095	58,2	49053	44083	0,9
[a]S.I. Індекс стимуляції.						
[b]Наведено у вигляді числа зазначених клітин, що зафарбовуються позитивно на зазначений цитокін, на 10^6 $CD3^{4+}$ клітин, мінус фонове фарбування (ізотипічний контроль).						

Як показано у таблиці 19, через два тижні після стимуляції пептидом p11C in vitro, $CD3^+$ лімфоцити периферичної крові з тварини 98n008 групи 2 (ST1-p11C+529 SE/GM-CSF) показали низький рівень експресії цитокіну Th1-типу, причому менше 1,0% усіх клітин активно секретували IFN-γ, TNFα або IL-2. Цікаво, що приблизно 20% усіх $CD3^+$ лімфоцитів активно секретували цитокін Th2-типу IL-4 з 2,5-кратним збільшенням числа IL-4 продукуючих клітин у порівнянні з твариною групи 1. Як і у випадку тварини групи 1, було винайдено, що секретуючі IL-4 клітини є обмеженими субпопуляцією $CD3^+CD4^+$ лімфоцитів. Після короткочасного повторного впливу пептиду p11C, субпопуляції p11C-тетрамер$^+$ і $CD3^+CD8^+$ лімфоцитів тварини з групи 2 могли стимулюватись до секреції TNFα, але не IFN-γ. На противагу тварині групи 1, після повторного впливу пептиду можна було спостерігати значиме збільшення експресії IL-2 $CD3^+CD8^+$ лімфоцитами. Як і у випадку тварини групи 1, після повторного впливу пептиду p11C секреція цитокіну Th1-типу IL-4 не змінилась.

Результати: Індуковані імуногеном гуморальні імунні реакції (Групи 1 і 2):

Для оцінки індукції імуноген-специфічних гуморальних (у вигляді антитіл) реакцій титри ELISA анти-ST1-p11C-антитіл вимірювали у сироватці тварин групи 1 і 2 безпосередньо перед імунізацією і через 1 і 2 тижні після другої і третьої імунізації. Результати підсумовані у таблиці 20.

Таблиця 20

Титри кінцевих точок ELISA сироватки з макак-резус, імунізованих ST1-p11C (групи 1 і 2)

Тварина	Група	Форма	Тиждень	Титр ST1-p11C-антитіл[a]
95x009	1	ST1-p11C+IFA	5	12800
			6	12800
			9	6400
			10	12800
93x021	1	ST1-p11C+IFA	5	51200
			6	102400
			9	51200
			10	51200
98x002	2	ST1-p11C+529 SE/GM-CSF	5	<50
			6	<50
			9	1600
			10	<50
98n008	2	ST1-p11C+529 SE/GM-CSF	5	200
			6	200
			9	12800
			10	6400

[a] Титри зв'язування кінцевих точок антитіл у вигляді величин, реципрокних щодо найвищого розведення плазми, що дає зчитування OD експеримент/контроль (E/C)>3,0.

Індуковані імуногеном гуморальні Імунні реакції (Групи 3 і 4):

Для оцінки індукції імуноген-специфічних і ад'ювант-специфічних гуморальних (у вигляді антитіл) реакцій титри ELISA анти-C4-$V3_{89.6p}$ і анти-GM-CSF-антитіл вимірювали у сироватці тварин групи 3 і 4 безпосередньо перед імунізацією і через 1 і 2 тижні після другої і третьої імунізації. Результати підсумовані у таблиці 21. Результати показують, що максимальні титри C4-$V3_{89\cdot6p}$-антитіла у плазмі генерувались на першому тижні після другої імунізації у всіх випробуваних тваринах. Максимальні титри антитіл у плазмі у тварин групи 3 (C4-$V3_{89\cdot6p}$+IFA) були на кілька порядків величин більш високими, ніж максимальні титри антитіл у плазмі, що спостерігаються у групі 4 (C4-$V3_{89\cdot6p}^+$529 SE/GM-CSF). Тварини групи 4 показали низькі, але детектовані рівні титру анти-GM-CSF-антитіл, що мали максимум через один тиждень після третьої імунізації.

Таблиця 21

Титри кінцевих точок ELISA плазми з макак-резус, імунізованих C4-$V3_{89\cdot6p}$ (групи 3 і 4)

Тварина/група	Форма	Тиждень	Титр[a] C4-V3 антитіл	Титр анти-human-GM-CSF-Ab

UA 79426 C2
UA 79426 C2

98n007 (3)	C4-V3$_{89.6p}$+IFA	5	102400	<10
		6	25600	<10
		9	25600	<10
		10	25600	<10
98n013 (3)	C4-V3$_{89.6p}$+IFA	5	12800	<10
		6	6400	<10
		9	12800	10
		10	12800	<10
96x004 (4)	C4-V3$_{89.6p}$+529 SE/GM-CSF	5	6400	320
		6	1600	160
		9	3200	2560
		10	1600	1280
95x011 (4)	C4-V3$_{89.6p}$+529 SE/GM-CSF	5	1600	160
		6	800	80
		9	1600	1280
		10	1600	1280

[a] Титри зв'язування кінцевих точок антитіл визначали у вигляді величин, реципрокних щодо найвищого розведення плазми, що дає зчитування OD експеримент/контроль (E/C)>3,0.

Індукцію нейтралізуючих антитіл у тварин групи 3 і 4 також піддавали моніторингу; результати підсумовані у таблиці 22. Ці результати показують, що як у тварин групи 3, так і у тварин групи 4 розвивались нейтралізуючі антитіла, що були здатні нейтралізувати вірус SHIV$_{89.6}$ in vitro. Титри SHIV$_{89.6}$-нейтралізуючих антитіл, що спостерігаються у тварин групи 3, були звичайно більш високими, ніж спостерігаються у тварин групи 4. Крім того, після кінцевої імунізації сироватка трьох тварин із групи 3 показала низький рівень нейтралізуючої активності проти SHIV$_{89.6}$-штаму цього вірусу, який є важко нейтралізованим.

Таблиця 22

Титри кінцевих точок нейтралізуючих антитіл сироватки з макак-резус, імунізованих C4-V389.6P (групи 3 і 4)

		Нейтралізуючі антитіла к[a]		
Тварина/група	Форма	Тиждень	SHIV$_{89.6}$	SHIV$_{89.6}$
98n007 (3)	C4-V3$_{89.6p}$+IFA	0	<10	<10
		5	22	<10
		6	46	<10
		9	113	46
		10	74	71
98n013 (3)	C4-V3$_{89.6P}$+IFA	0	<10	<10
		5	12	<10
		б	19	<10
		9	36	18
		10	22	<10
96x004 (4)	C4-V3$_{89.6p}$+529 SE/GM-CSF	0	<10	<10
		5	<10	<10
		б	<10	<10
		9	26	<10
		10	<10	<10
95x011(4)	C4-V3$_{89.6p}$+529 SE/GM-CSF	0	<10	<10
		5	11	<10
		6	<10	<10
		9	19	<10
		10	<10	<10

[a] Титри нейтралізуючих антитіл є реципрокним розведенням сироватки, при якому 50% клітин захищені від індукованої вірусом загибелі, вимірюваної за поглинанням барвника нейтрального червоного.

Приклад 8

Дослідження терапевтичної ефективності на трансгенних мишах PDAPP, оброблених Aβ1-42 і ад'ювантами

Наступний експеримент був призначений для порівняння числа комбінованих форм ад'ювантів у трансгенних мишах PDAPP для випробування терапевтичної ефективності Aβ1-42-пептиду.

Побудова експерименту: Трансгенних мишей PDAPP у віці 10,5-12,5 місяців (самців і самок) поділяли на чотири групи з 40 мишей, відсортованих таким чином, що кожна група відповідала кожній інший, якнайближче, у відношенні віку, статі і трансгенного батька. Ці групи описані у таблиці 23:

Таблиця 23

UA 79426 C2
UA 79426 C2

Групи обробки трансгенних мишей					
Група	Ад'ювант	Доза	Доза Aβ1-42	Число на початку	Число наприкінці
1	MPLSE	25мкг	75/60мкг	40	35
2	MPL SE+GM-CSF	25мкг/10мкг	64/60мкг	41	34
3	529+GM-CSF	25мкг/10мкг	64/60мкг	40	31
4	PBS	не аналіз.	не аналіз.	40	37

Aβ1-42-пептид був одержаний від Elan Pharmaceuticals, 529 SE і MPL™ SE були від Corixa і мишачий GM-CSF був від Biosource. Усі миші одержували ін'єкції на тижнях 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 і 24. У мишей брали кров через 5-7 днів після ін'єкції, починаючи після другої ін'єкції. Групи 1, 2 і 3 ін'єкували підшкірно обсягом 200мкл, тоді як група 4 одержувала дози 250мкл підшкірним введенням. Тварин умертвляли на тижні 25 даного дослідження. Титри одержували з використанням розведення, що дає величину 50% максимального зчитування оптичної щільності.

Результати:

Імуногенність і реакція у вигляді антитіл: Усі групи досягали їх максимального середнього геометричного титру (GMT) антитіл до Aβ1-42-пептиду або при другому (RC529+GM-CSF), або при третьому крововидаленні (MPL™ SE, MPL™ SE+GM-CSF) (див. Фігуру 1). При максимумі GMT, MPL™ SE+GM-CSF був 16400, тоді 529 SE+GM-CSF був 13400 або приблизно у 1,5 разів більше контролю MPL™ SE 9700. Однак ці титри на двох GM-CSF-вмісних формах (групи 2 і 3) падали до приблизних рівнів MPL™ SE-контролю з кінцевими GMT MPL™ SE=4600, MPL™ SE+GM-CSF=5350, 529 SE+GM-CSF=4650.

Для визначення, чи було кінцеве зменшення титру двох GM-CSF-вмісних форм обумовлено реакцією анти-GM-CSF-антитіл, застосовували ELISA для визначення, чи утворювались анти-GM-CSF-антитіла в ході імунізації. Сироватки з усіх тварин, що одержують GM-CSF, титрували проти мишачого GM-CSF, використовуваного у всьому цьому експерименті. Не був одержаний доказ анти-GM-CSF-антитіл у жодній з оброблених тварин (дані не показані).

Рівні AP у головному мозку: Усі три групи обробки значимо зменшували нагромадження як загального Aβ-пептиду (Фігура 2 - окремі результати; Таблиця 24 - об'єднані результати) у кортикальній області головного мозку миші PDAPP. Аналізи ELISA AP (загального і форми 1-42) виконували як описано раніше [54] з використанням солюбілізованих гуанідином гомогенатів головного мозку. Статистичні порівняння виконані з використанням критерію вірогідності Манна-Уітні.

Таблиця 24

Кортикальні рівні загального Aβ				
	PBS	MPLSE	MPL SE+GM-CSF	529 SE+GM-CSF
Медіана (нг/г)	6478	1707	925	1313
Діапазон	64-7208	33-8501	67-5293	79-5271
% зменшення	-	74	86	80
Величина P (M-W) N	37	0,0001 35	0,0001 34	0,000131

Таблиця 25

Кортикальні рівні Aβ-42				
	PBS	MFLSE	MPLSE+GM-CSF	529 SE+GM-CSF
Медіана (нг/г)	5,609	1799	779	1127
Діапазон	284-14004	10-6715		29-4442
% зменшення	-	68	86	80
Величина P (M-W)	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
N	36	35	34	31

Амілоїдне навантаження: Ступінь амілоїдозу визначали кількісно в лобовій частині кори головного мозку з використанням імуногістохімічних способів, як описано раніше [55]. Усі три групи обробки знайшли значиме зменшення амілоїдного навантаження (Фігура 4 - окремі результати; Таблиця 26 - об'єднані результати).

Таблиця 26

Амілоїдне навантаження лобової частини кори головного мозку				
	PBS	MPLSE	MPL SE+GM-CSF	529 SE+GM-CSF
Медіана (%AB)	7,98	0,49	0,00	0,04
Діапазон	0,00-27,37	0,00-9,63	0,00-0,83	0,00-5,53
% зменшення	-	94	100	99,5
Величина P (M-W)	-	<0,0001	<0,0001	0,0001
N	29	33	29	30

Нейритне навантаження: Дія обробки на розвиток нейритної дистрофії у лобовій частині кори головного мозку оцінювали імуногістохімічно, як описано раніше [55]. Усі три групи обробки значимо зменшували нейритне

UA 79426 C2
UA 79426 C2

навантаження (Фігура 5 - окремі результати; Таблиця 27 - об'єднані результати).

Таблиця 27

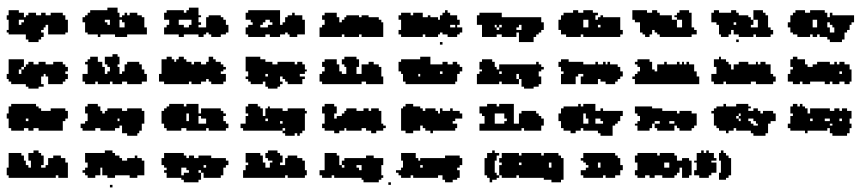
Нейритне навантаження лобової частини кори головного мозку				
	PBS	MPLSE	MPL SE+GM-CSF	529 SE+GM-CSF
Медіана (%NB)	0,35	0,14	0,04	0,02
Діапазон	0,00-1,21	0,00-0,82	0,00-0, 60	0,00-0,91
% зменшення	-	60	88	95
Величина P (M-W)		<0,0153	<0,0001	<0,0001
N	29	33	29	30

Астроцитоз: Ступінь астроцитозу в ретроспленіальній частини кору головного мозку визначали кількісно, як описано раніше [55]. Групи обробки, що містить GM-CSF, знайшли значимо зменшений астроцитоз (Фігура 6).

Приклад 9

Імунізація пептидом C4(E9У)-V3$_{83/6p}$ собакоголових макак

Метою цього експерименту була оцінка імуногенності виробленого з Hiv-1 Env пептидного кон'югату C4(E9V)-V3$_{83.6p}$, який вводиться з комбінованою формою ад'ювантів даного винаходу іншому виду приматів, собакоголовим макакам (Macaca fascicularis). C4-V3$_{83.6p}$-пептид, описаний у прикладі 7, модифікували заміною глутамінової кислоти в амінокислотному залишку 9 на валін. Одержаний пептидний кон'югат, названнй C4(E9V)-V3$_{83.6p}$, використовували, і він має наступну послідовність:



Заміна глутамінової кислоти на валін (E9V) у районі C4 цього пептиду збільшує імуногенність пептиду вище імуногенності немодифікованого пептиду в мишачій моделі.

Цей вироблений з HIV-1 Env пептид здатний індукувати гуморальні імунні реакції у мишей. Однак внаслідок труднощів екстраполяції результатів, одержаних на мишах, до людей, необхідно випробувати потенціальні ВІЛ-1-імуногенні композиції на приматах (не людині) перед переходом до клінічних випробувань Фази I людини. У цьому експерименті оцінювали як внутрішньом'язовий (IM), так і інтраназальний (IN) способи введення. Тварин імунізували п'ять разів на тижнях 0, 4, 8, 18 і 23. Один раз на тиждень до тижня 25 включно брали проби крові і шийково-піхвові і мукозні промивання і аналізували на присутність антитіл до цієї імуногенної композиції.

Побудова експерименту: Для цього експерименту використовували всього вісім собакоголових макак. Група 1 не одержувала ад'ювант; група 2 одержувала форму ад'юванта 529 SE плюс GM-CSF. Тварин містили і оцінювали в обладнанні з догляду за тваринами.

Таблиця 28

529 SE плюс GM-CSF у порівнянні з ад'ювантом			
Група	Імуноген	Ад'ювант	Спосіб
1	C4(E9V)-V3$_{89.6p}$-пептид	Немає	IN
2	C4(E9V)-V3$_{89.6p}$-пептид	529 SE/GM-CSF	IM

Імунізації: Всі інтраназальні імунізації доставлялись з використанням розпилювального (спрей) пристрою для носа з відміряними дозами по 100мкл. Всі внутрішньом'язові ін'єкції робили у чотириглавий м'яз за допомогою голки і шприца. Усіх тварин імунізували за схемою 0, 4, 8, 18 і 23 тижні.

Форми:

Група 1: 1000мкг C4(E9V)-V3$_{89.6p}$-пептиду в стерильному нормальному сольовому розчині, кінцевий обсяг 200мкл (по 100мкл у кожну ніздрю).

Група 2: 1000мкг C4(E9V)-V3 $_{89.6p}$-пептиду, 50мкг 529 SE і 250мкг GM-CSF людини, кінцева концентрація масла 1%, кінцевий обсяг 1,0мл (500мкл у кожен чотириглавий м'яз за допомогою IM ін'єкції).

Аналізи для моніторингу імуноген-індукованих імунних реакцій: Безпосередньо до і після імунізації всіх тварин уважно спостерігали у відношенні імуноген-індукованих гуморальних імунних реакцій з використанням наступних аналізів:

(1) Визначення сироваткових титрів анти C4(E9V)-V3$_{89.6p}$-пептид-lgG-антитіл за допомогою ELISA.

(2) Визначення мукозних (шийково-піхвових, назальних) титрів анти-C4(E9V)-V3 $_{89.6p}$-пептид-lgG-антитіл за допомогою ELISA.

Результати: Безпека і переносимість імуногену:

C4(E9V)-V3$_{89.6p}$пептид при введень окремо або у комбінації з ад'ювантами 529 SE/GM-CSF дуже добре переносився. У тварин, імунізованих внутрішньом'язово з використанням голки і шприца, не були відмічені несприятливі реактивності у місці ін'єкції. Всіх тварин уважно спостерігали на зміну в температурі тіла

UA 79426 C2

UA 79426 C2

протягом 24 годин безпосередньо після кожного введення імуногену. В жодний момент часу під час дослідження жодна з тварин не показала ненормально підвищених показників температури тіла.

Імуноген-специфічні реакції у вигляді сироваткових антитіл:

Проби сироватки від усіх тварин одержували безпосередньо до і через один і два тижні після кожної імунізації (протягом 25 тижнів). Через два тижні після кінцевої імунізації всі проби сироваток аналізували на присутність анти-C4(E9V)-V3-пептид-IgG-антитіл. Інтраназально імунізовані тварини групи 1 (тільки C4(E9V)-$V3_{89.6p}$-пептид) не показали більш високих титрів анти-C4(E9V)-$V3_{89.6p}$-пептид-IgC-антитіл у сироватці, ніж неімунні рівні (Фігура 7). На противагу цьому, тварини групи 2 (IM-введення C4(E9V)-$V3_{89.6p}$-пептиду+529 SE/GM-CSF) розвили значні рівні C4(E9V)-V3 специфічних IgG-антитіл, (Фігура 7). Середній геометричний титр кінцевої точки, що повідомляється, розраховували з використанням найнижчого титру з кожної окремої тварини, який є в 3 рази більшим, ніж показник для об'єднаної "ненавченої" сироватки при тому ж самому розведенні.

Тварини групи 1 (без ад'юванта) мали титри aHra-C4(E9V)-$V3_{89}$.6_P-IgG-антиTm у пробах шийково-піхвових лаважей, які були більш високими, ніж неімунні рівні, тільки після четвертої імунізації, але після цього знижувались (фігура 8). На противагу цьому, тварини групи 2 (з ад'ювантом) мали титри анти-C4(E9У)-$У3_{896p}$-IgG-антитіл у пробах шийково-піхвових лаважей, що були більш високими, ніж неімунні рівні, після першої імунізації і збільшувались після кожної наступної імунізації (хоча було якесь більш пізніше зниження у кожному випадку) (фігура 8).

Тварини групи 1 (без ад'юванта) не показали титри анти-C4(E9V)-$V3_{89.6p}$-IgC-антитіл у назальних промиваннях більш високі, ніж неімунні рівні (Фігура 9). На противагу цьому, тварини групи 2 (з ад'ювантом) розвили значні рівні титрів анти-C4(E9V)-$V3_{89.6p}$-IgG-антитіл у пробах назальних промивань (Фігура 9).

Бібліографія

1. Mosmann, T.R., et al., J. Immunol., 136, 2348-2357 (1986).
2. U.S. Patent №5057540
3. U.S. Patent №6113918.
4. Ahlers, J.D., et al., J. Immunol., 158, 3947-3958 (1997).
5. Scharton-Kersten, T., et al., J. Immunol. 154, 5320-5330 (1995).
6. Ghalib, H.W., et al., J. Immunol., 154, 4623-4629 (1995).
7. Murray, H.W, and Hariprashad, J., J. Exp. Med., 181, 387-391 (1995).
8. U.S. Patent №5571515.
9. U.S. Patent №5723127.
10. U.S. Patent №5976539.
11. Finkelman, F.D., and Holmes, J., Ann. Rev. Immunol., 8, 303-333 (1990).
12. Snapper, CM., et al., J. Exp. Med., 175, 1367-1371 (1992).
13. Kobayashi, M., et al., J. Exp. Med., 170, 827-845 (1989).
14. Published International Patent Application №WO 90/05147.
15. U.S. Patent №5078996.
16. U.S. Patent №5229496.
17. U.S. Patent №5073627.
18. Alderson, M.R., et al., J. Exp. Med., 178, 669-674 (1993).
19. Snapper, CM., et al., J. Immunol., 154, 5842-5850 (1995).
20. U.S. Patent №5679356.
21. Published International Patent Application № WO 00/69456.
22. U.S. Patent №5013548.
23. U.S. Patent №5019387.
24. Charbit, A., et al., Vaccine, 11, 1221-1228 (1993).
25. Natuk, R.J., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 9, 395-404 (1993).
26. Johnson, R.P., et al., J. Virol., 68, 3145-3153 (1994).
27. Fuller, D.H., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 10, 1433-1441 (1994).
28. Berzofsky, J.A., et al., J. Clin. Invest, 88, 876-884 (1991).
29. Palker, T.J., et al., J. Immunol., 142, 3612-3619 (1989).
30. Hart, M.K., et al., J. Immunol., 145, 2677-2685 (1990).
31. Haynes, B.F., et al., J. Immunol., 151, 1646-1653 (1993).
32. Hart, M.K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 9448-9452 (1991).
33. Bartlett, J.A., et al., AIDS, 12, 1291-1300 (1998).
34. Haynes, B.F., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 11, 211-221 (1998).
35. U.S. Patent №5861243.
36. U.S. Patent №5932218.
37. U.S. Patent №5939074.
38. U.S. Patent №5993819.
39. U.S. Patent №6037135.
40. Published European Patent Application №671947.
41. U.S. Patent №6024965.
42. Miller, M.D., et al., J. Immunol., 147, 320-329 (1991).
43. Kuroda, M.J., et al., J. Exp. Med., 187, 1373-1381 (1998).

UA 79426 C2

UA 79426 C2

44. Liao, H-X, et al., J. Virol., 74, 254-263 (2000).
45. Staats, H.F., et al., J. Immunol., 157, 462-472 (1996).
46. Porgador, A., et al., J. Immunol., 158, 834-841 (1997).
47. Published International Patent Application №WO 9/27944.
48. U.S. Patent №4666829.
49. Games, D., et al., Nature, 373, 523-527 (1995).
50. Published International Patent Application №WO 98/20734.
51. U.S. Patent №5830877.
52. Published International Patent Application №WO 99/51259.
53. U.S. Patent №5593972.
54. Johnson-Wood, D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94, 1550-1555 (1997).
55. Schenk, D., et al., Nature, 400, 173-177 (1999).

Формула винаходу

1. Антигенна композиція, яка містить вибраний антиген з патогенних вірусу, бактерії, гриба або паразита, або з ракової клітини, або пухлинної клітини, або з алергену, або з аутологічної молекули і ефективну ад'ювантну (імуностимулюючу) кількість комбінації (1) аміноалкілглюкозамінфосфатної сполуки (AGP) або її похідного, або аналога і (2) цитокіну або лімфокіну або агоніста зазначеного цитокіну або лімфокіну, де ця комбінація ад'ювантів підсилює імунну реакцію у хребетного хазяїна на зазначений антиген.

2. Антигенна композиція за п. 1, де вибраний антиген є поліпептидом, пептидом або фрагментом, виробленим з білка.

3. Антигенна композиція за п. 1, де AGP використовують у формі стабільної емульсії типу "масло у воді".

4. Антигенна композиція за п. 1, де цитокін або лімфокін вибраний із групи, що складається з гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора та інтерлейкіну-12.

5. Антигенна композиція за п. 4, де цитокін або лімфокін є гранулоцитарно-макрофагальним колонієстимулюючим фактором.

6. Антигенна композиція за п. 5, де AGP використовують у формі стабільної емульсії типу "масло у воді".

7. Антигенна композиція за п. 4, де цитокін або лімфокін є інтерлейкіном-12.

8. Антигенна композиція за п. 7, де AGP використовують у формі стабільної емульсії типу "масло у воді".

9. Антигенна композиція за п.1, яка додатково містить розріджувач або носій.

10. Антигенна композиція за п. 9, де AGP використовують у формі стабільної емульсії типу "масло у воді".

11. Антигенна композиція за п. 1, де AGP є 2-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїламіно]етил-2-дезокси-4-0-фосфоно-3-0-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїл]-2-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїламіно]- β -D-глюкопіранозидом (529).

12. Антигенна композиція за п. 1, де вибраний антиген є антигеном з вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ).

13. Антигенна композиція за п. 12, де вибраний антиген ВІЛ є білком ВІЛ, поліпептидом, пептидом або фрагментом, одержаним із зазначеного білка.

14. Антигенна композиція за п. 13, де вибрані антигени є пептидами ВІЛ, вибраними з групи, що складається з пептидів, які мають наступну амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:1);

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:2);

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu Gln Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEQ ID NO:3);

UA 79426 C2

UA 79426 C2

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEQ ID NO:4); и

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEQ ID NO:5).

15. Антигенна композиція за п. 14, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:1).

16. Антигенна композиція за п. 14, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:2).

17. Антигенна композиція за п. 14, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu Gln Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEQ ID NO:3).

18. Антигенна композиція за п. 14, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEQ ID NO:4).

19. Антигенна композиція за п. 14, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEQ ID NO:5).

20. Антигенна композиція за п. 12, де AGP використовують у формі стабільної емульсії типу "масло у воді".

21. Антигенна композиція за п. 12, де цитокін або лімфокін вибраний з групи, яка складається з гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора та інтерлейкіну-12.

22. Антигенна композиція за п. 21, де цитокін або лімфокін є гранулоцитарно-макрофагальним колонієстимулюючим фактором.

23. Антигенна композиція за п. 22, де AGP використовують у формі стабільної емульсії типу "масло у воді".

24. Антигенна композиція за п. 21, де цитокін або лімфокін є інтерлейкіном-12.

25. Антигенна композиція за п. 24, де AGP використовують у формі стабільної емульсії типу "масло у воді".

26. Антигенна композиція за п. 12, яка додатково містить розріджувач або носій.

27. Антигенна композиція за п. 26, де AGP використовують у формі стабільної емульсії типу "масло у воді".

28. Антигенна композиція за п. 12, де AGP є 529.

29. Спосіб збільшення здатності антигенної композиції, яка містить вибраний антиген з патогенних вірусу, бактерії, гриба або паразита, індукувати імунну реакцію хребетного хазяїна, що передбачає введення зазначеному хазяїну антигенної композиції за п. 1.

30. Спосіб збільшення здатності антигенної композиції, яка містить вибраний антиген з патогенних вірусу, бактерії, гриба або паразита, індукувати імунну реакцію хребетного хазяїна, що передбачає введення

UA 79426 C2

UA 79426 C2

зазначеному хазяїну антигенної композиції за п. 9.

31. Спосіб збільшення здатності антигенної композиції, яка містить антиген ВІЛ, індукувати імунну реакцію хребетного хазяїна, що передбачає введення зазначеному хазяїну антигенної композиції за п. 12.

32. Спосіб збільшення здатності антигенної композиції, яка містить антиген ВІЛ, індукувати імунну реакцію хребетного хазяїна, що передбачає введення зазначеному хазяїну антигенної композиції за п. 26.

33. Спосіб за п. 32, де вибрані антигени є пептидами ВІЛ, вибраними з групи, яка складається з пептидів, що мають амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:1);

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Gln Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:2);

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu Gln Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEQ ID NO:3);

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEQ ID NO:4); and

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEQ ID NO:5).

34. Спосіб за п. 33, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:1).

35. Спосіб за п. 33, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:2).

36. Спосіб за п. 33, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu Gln Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEQ ID NO:3).

37. Спосіб за п. 33, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

UA 79426 C2

UA 79426 C2

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEQ ID NO:4).

38. Спосіб за п. 33, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEQ ID NO:5).

39. Спосіб збільшення здатності антигенної композиції, яка містить вибраний антиген з патогенних вірусу, бактерії, гриба або паразита, індукувати цитотоксичні Т-лімфоцити у хребетному хазяїні, що передбачає введення зазначеному хазяїну антигенної композиції за п. 1.

40. Спосіб збільшення здатності антигенної композиції, яка містить вибраний антиген з патогенних вірусу, бактерії, гриба або паразита, індукувати цитотоксичні Т-лімфоцити у хребетному хазяїні, що передбачає введення зазначеному хазяїну антигенної композиції за п. 9.

41. Спосіб збільшення здатності антигенної композиції, яка містить антиген ВІЛ, індукувати цитотоксичні Т-лімфоцити у хребетному хазяїні, що передбачає введення зазначеному хазяїну антигенної композиції за п. 12.

42. Спосіб збільшення здатності антигенної композиції, яка містить антиген ВІЛ, індукувати цитотоксичні Т-лімфоцити у хребетному хазяїні, що передбачає введення зазначеному хазяїну антигенної композиції за п. 26.

43. Спосіб за п. 42, де вибрані антигени є пептидами ВІЛ, вибраними з групи, яка складається з пептидів, що мають амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:1);

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:2);

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu Glu Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEQ ID NO:3);

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEQ ID NO:4); и

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEQ ID NO:5).

44. Спосіб за п. 43, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:1).

45. Спосіб за п. 43, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

UA 79426 C2

UA 79426 C2

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (SEQ ID NO:2).

46. Спосіб за п. 43, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Arg Gln Ile Ile Asn Thr Trp His Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu Glu Gly Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu (SEQ ID NO:3).

47. Спосіб за п. 43, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Gln Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEQ ID NO:4).

48. Спосіб за п. 43, де пептид ВІЛ є пептидом, що має амінокислотну послідовність:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Val Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Gln Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg (SEQ ID NO:5).

49. Спосіб збільшення здатності антигенної композиції, що містить раковий антиген або зв'язаний з пухлиною антиген з ракової клітини або пухлинної клітини, індукувати терапевтичний або профілактичний антираковий ефект у хребетного хазяїна, що передбачає введення зазначеному хазяїну антигенної композиції, яка містить зазначений раковий антиген або зв'язаний з пухлиною антиген з ракової клітини або пухлинної клітини, і ефективну ад'ювантну (імуностимулюючу) кількість комбінації (1) AGP, або її похідного, або аналога і (2) цитокіну або лімфокіну, або агоніста зазначеного цитокіну або лімфокіну.

50. Спосіб збільшення здатності антигенної композиції, яка містить вибраний алерген, пом'якшувати алергійну реакцію у хребетному хазяїні, що передбачає введення зазначеному хазяїну антигенної композиції, яка містить зазначений алерген і ефективну ад'ювантну (імуностимулюючу) кількість комбінації (1) AGP, або її похідного, або аналога і (2) цитокіну або лімфокіну, або агоніста зазначеного цитокіну або лімфокіну.

51. Антигенна композиція, яка містить вибраний антиген з молекули або її частини, що представляє молекулу або її частину, яка продукується хазяїном небажаним чином, у небажаній кількості або місці розташування, щоб зменшувати такий небажаний ефект за допомогою включення ефективної ад'ювантної (імуностимулюючої) кількості комбінації (1) AGP, або її похідного, або аналога і (2) цитокіну або лімфокіну, або агоніста зазначеного цитокіну або лімфокіну.

52. Антигенна композиція за п. 51, де вибраний антиген є поліпептидом, пептидом або фрагментом, виробленим з білка-попередника амілоїду або антитіла до нього.

53. Антигенна композиція за п. 52, де вибраний антиген є пептидом $A\beta$, який є внутрішнім фрагментом з 39-43 амінокислот білка-попередника амілоїду, або фрагментом пептиду $A\beta$.

54. Антигенна композиція за п. 53, де вибраний антиген є пептидом $A\beta$, що має амінокислотну послідовність:

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (SEQ ID NO:6).

55. Антигенна композиція за п. 54, де AGP є 529.

56. Спосіб збільшення здатності антигенної композиції, яка містить вибраний антиген з молекули або її частини, що представляє молекулу або її частину, яка продукується хазяїном небажаним чином, у небажаній кількості або місці розташування, зменшувати такий небажаний ефект за допомогою включення ефективної ад'ювантної (імуностимулюючої) кількості комбінації (1) AGP, або її похідного, або аналога і (2) цитокіну або лімфокіну, або агоніста зазначеного цитокіну або лімфокіну.

57. Спосіб збільшення здатності антигенної композиції запобігати або лікувати захворювання, що характеризується відкладенням амілоїду у хребетного хазяїна, що передбачає введення зазначеному хазяїну

UA 79426 C2

UA 79426 C2

поліпептиду, пептиду або фрагмента, вироблених з білка-попередника амілоїду або антитіла до нього, і ад'ювантної (імуностимулюючої) кількості комбінації (1) AGP, або її похідного, або аналога і (2) цитокіну або лімфокіну, або агоніста зазначеного цитокіну або лімфокіну.

58. Спосіб за п. 57, де вибраний антиген є пептидом $A\beta$, який є внутрішнім фрагментом з 39-43 амінокислот білка-попередника амілоїду, або фрагментом пептиду $A\beta$.

59. Спосіб за п. 58, де вибраний антиген є пептидом $A\beta$, що має амінокислотну послідовність:

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (SEQ ID NO:6).

60. Спосіб за п. 59, де AGP є 529.

61. Ад'ювантна композиція, яка містить комбінацію (1) аміноалкілглюкозамінфосфатної сполуки (AGP), або її похідного, або аналога і (2) цитокіну або лімфокіну, або агоніста зазначеного цитокіну або лімфокіну.

62. Ад'ювантна композиція за п. 61, де AGP використовують у формі стабільної емульсії типу "масло у воді".

63. Ад'ювантна композиція за п. 61, де цитокін або лімфокін вибрані з групи, що складається з гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора та інтерлейкіну-12.

64. Ад'ювантна композиція за п. 61, що додатково містить розріджувач або носій.

65. Ад'ювантна композиція за п. 61, де цитокін або лімфокін є гранулоцитарно-макрофагальним колонієстимулюючим фактором.

66. Ад'ювантна композиція за п. 61, де цитокін або лімфокін є інтерлейкіном-12.

67. Ад'ювантна композиція за п. 61, де AGP є 529.

UA 79426 C2

UA 79426 C2

<110> [illegible]

<120> [illegible]

<130> [illegible]

<150> 9

<160> Patentin version 3.1

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Синтетична поліпептидна послідовність

<400> 1

Lys Glu Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
1 5 10 15

Cys Ser Arg Tyr Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Arg Ile Ile Gly Pro
20 25 30

Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys
35 40

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Синтетична поліпептидна послідовність

<400> 2

Lys Gln Ile Ile Ash Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
1 5 10 15

Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Asn Ile Ile Gly Pro Gly
20 25 30

Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys
35

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Синтетична поліпептидна послідовність

<400> 3

Arg Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys Asn Val Tyr Leu
1 5 10 15

Glu Gly Lys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met Leu
20 25

UA 79426 C2

UA 79426 C2

UA 79426 C2

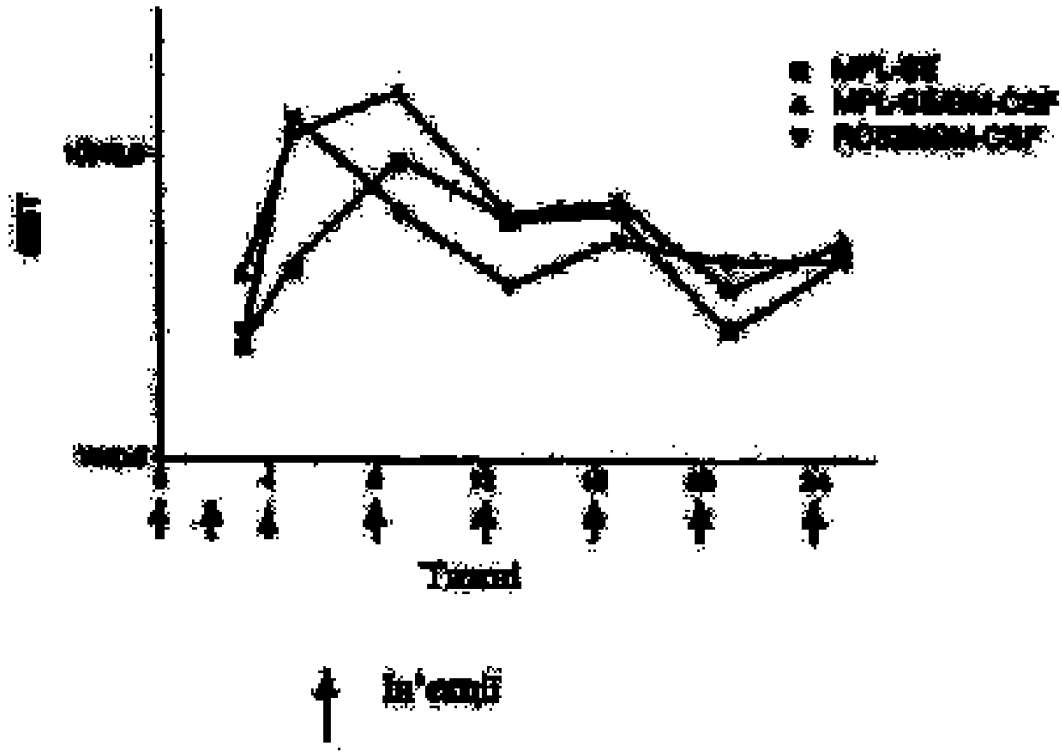
Leu Val Pro Arg Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
20 25

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Синтетична послідовність з відсутньою природною ознакою

<400> 8

Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile
1 5 10

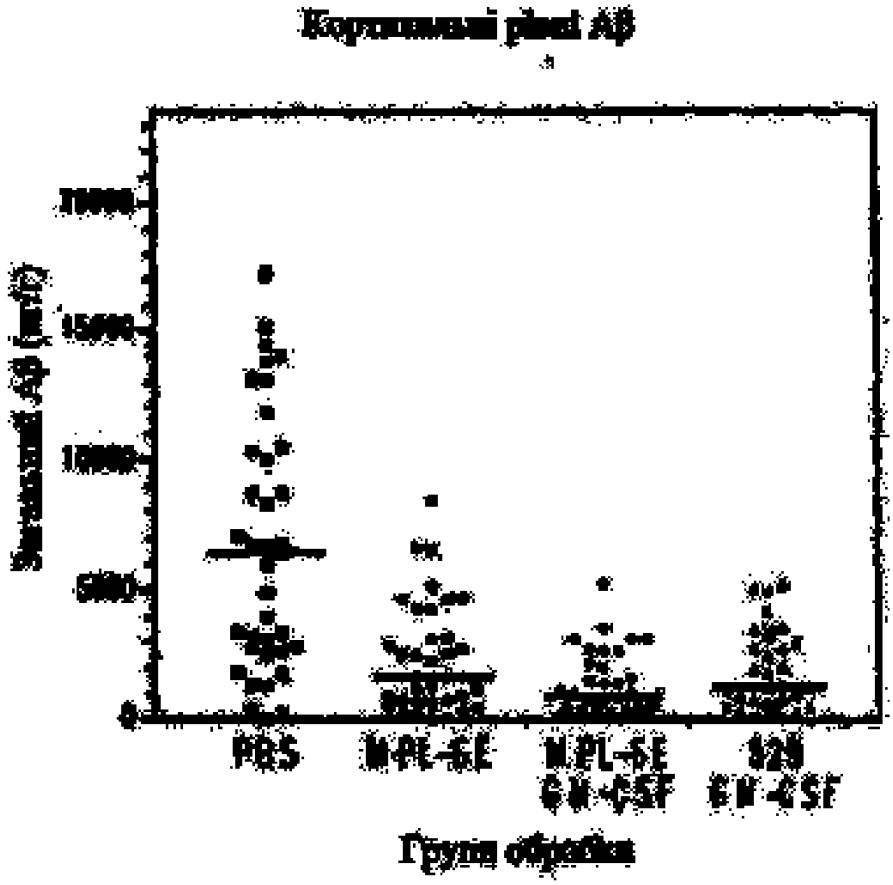
Подовження ПІВТ форм GM-CSF в одиниці MPL-SE



Фіг. 1

UA 79426 C2

UA 79426 C2



Фіг. 2

UA 79426 C2

UA 79426 C2

Фиг. 3

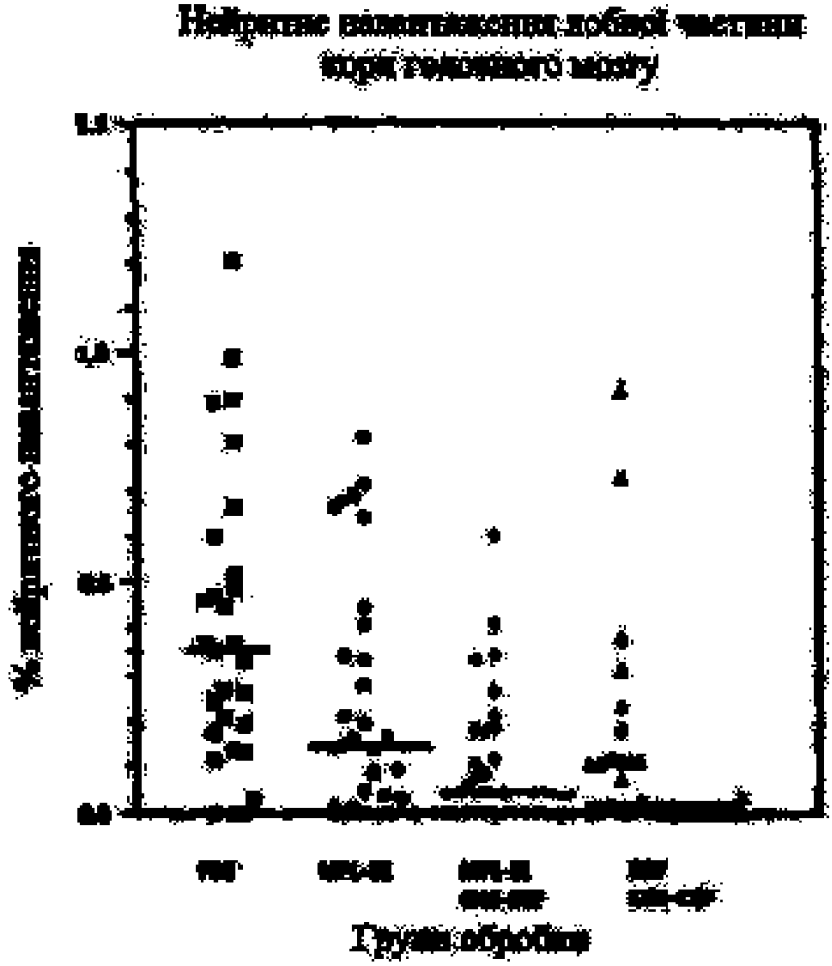
UA 79426 C2

UA 79426 C2

Фіг. 4

UA 79426 C2

UA 79426 C2



Фіг. 5

UA 79426 C2

UA 79426 C2

Фіг. 6

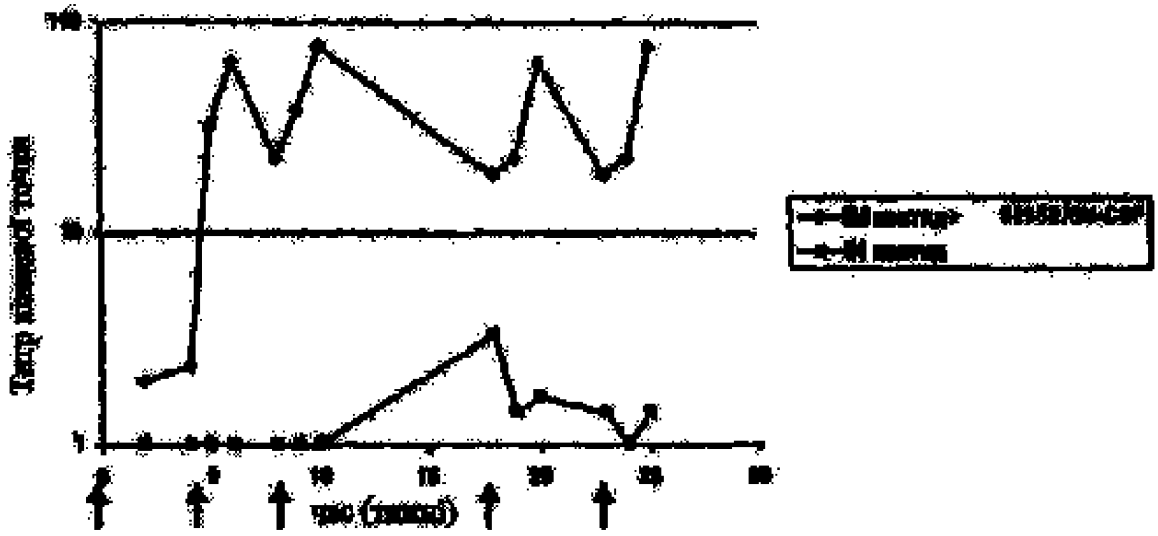
UA 79426 C2

UA 79426 C2

Фіг. 7

UA 79426 C2

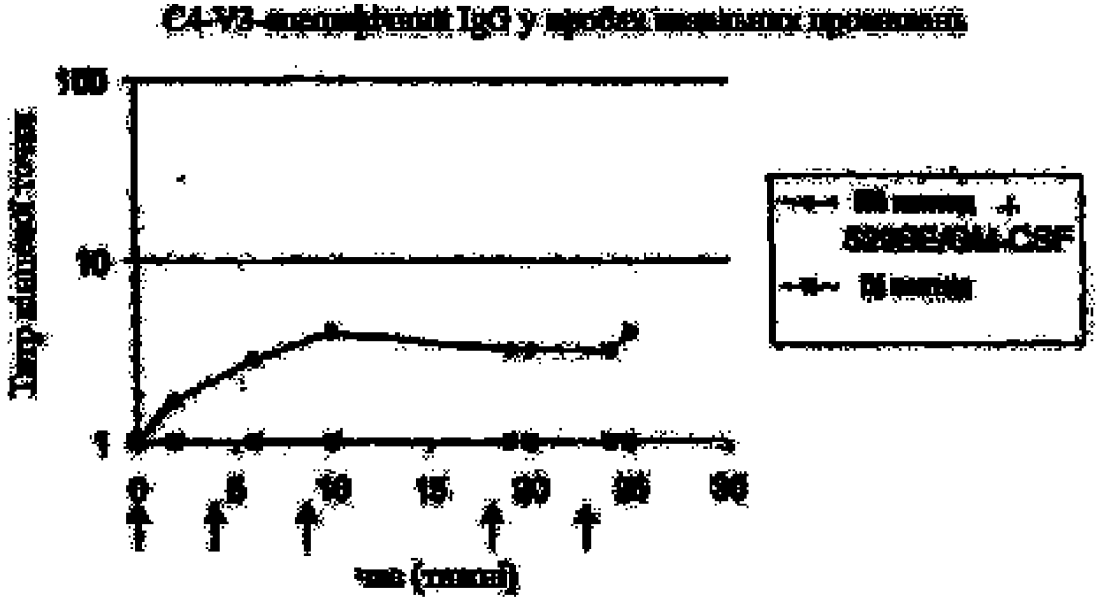
UA 79426 C2



Фіг. 8

UA 79426 C2

UA 79426 C2



Фіг. 9

Офіційний бюлетень "Промислоава власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2007, N 9, 25.06.2007. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

UA 79426 C2

UA 79426 C2