

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 63290 B1

7(51) A 61 K 39/015

A 61 K 39/002

A 61 K 39/29

A 61 K 39/39

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 103141

(22) Заявено на 02.02.99

(24) Начало на действие
на патента от: 31.07.97

Приоритетни данни

(31) 9616351 (32) 02.08.96 (33) GB

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 8 на 31.08.99

(45) Отпечатано на 28.09.2001

(46) Публикувано в бюлетин № 9
на 28.09.2001

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS
S.A., RIXENSART (BE)

(72) Изобретател(и):

Joseph Cohen
Rixensart (BE)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Искра Владимирова Христова, 1000
София, ул. "Любен Каравелов" 20

(86) № и дата на РСТ заявка:

PCT/EP97/04326, 31.07.97

(87) № и дата на РСТ публикация:

WO98/05355, 12.02.98

(54) ВАКСИНА ПРОТИВ МАЛАРИЯ

(57) Съставът се прилага при предотвратяване или лечение на малария. Той съдържа множество маларийни антигени в комбинация с адювант, който е преференциален стимулатор на ТН1 клетъчния отговор.

5 претенции

BG 63290 B1

(54) ВАКСИНА ПРОТИВ МАЛАРИЯ

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до състав на ваксина и до неговото използване в медицината, по-специално за предотвратяване на инфекции от малария.

Предшестващо състояние на техниката

Маларията е един от главните световни проблеми с 2 до 4 милиона души, умиращи от тази болест всяка година. Една от най-острите форми на болестта се причинява от протозойния паразит *Plasmodium falciparum*, на когото се дължат болшинството от смъртните случаи, приписвани на маларията.

Жизненият цикъл на *P. falciparum* е сложен, изискващ два гостоприемника - човек и комар, за завършване на цикъла. Инфекцията у човека започва с вкарване на спорозоити от слюнка на инфектиран комар. Спорозоитите мигрират в черния дроб и там инфектират хепатоцитите, когато те се диференцират през екзоеритроцитния интрацелуларен стадий в мерозоитния стадий, което инфектира червените кръвни клетки (RBC) да започнат циклична репликация в безполовия кръвен стадий. Цикълът се завършва чрез диференциация на множество мерозоити в RBC в половия стадий гаметоцити, които се поглъщат от комара, където се развиват през серия от етапи в средните черва, като продуцират спорозоити, мигриращи в слюнчените жлези.

Спорозоитният стадий на *P. falciparum* е идентифициран като потенциална цел за маларийна ваксина. Главният повърхностен протеин на спорозоита е известен като периферноспорозоитен протеин (CS-протеин). Този протеин от щам 7G8 е клониран, експресиран и секвенциониран (Dame et al., Science 225 (1984), p. 593). Протеинът от щам 7G8 се характеризира с това, че има централна имунодоминантна повтаряща се област, съдържаща тетрапептид Asp-Ala-Asp-Pro, повтарящ се 37 пъти, но разнообразен с четири по-малки повторения Asp-Val-Asp-

Pro. В други щамове броят на главните и малките повторения варира, както и тяхното относително местоположение. Тази централна част е разклонена с N- и C-крайни части, съставени от неповтарящи се аминокиселинни последователности, означавани като неповтаряща се част на CS-протеина.

Показано е, че облъчени спорозоити могат да осигурят значителна защита против експериментална човешка малария (Am. J. Trop. Med. Hyg., 24, 297-402, 1975). Обаче производствени трудности правят използването на облъчени спорозоити непрактично от гледна точка на производството на ваксина.

Няколко групи са предложили подединици ваксини на база на периферния протеин. С няколко от тези ваксини е проведено клинично изпитание; едната е синтетичен пептид, другата е рекомбинантен протеин (Ballou et al., Lancet: i 1277 (1987) и Herrington et al., Nature, 328: 257 (1987)).

Тези ваксини са успешни за стимулирането на антиспорозоитния отговор. Независимо от това, величината на отговора е незадоволителна, като някои ваксини не предизвикват отговор изобщо. Освен това отсъствието на "реваксинация" на ниво антигела при последователно инжектиране и резултатите от *in vitro* анализ на пролиферацията на лимфоцитите подсказват, че Т-клетките на болшинството от тези доброволци не разпознават имунодоминантните повторения. Независимо от това един ваксиниран при всяко изследване не развива паразитемия.

В WO 93/10152 се описва и се претендира за хибриден протеин, съдържащ по същество всички C-крайни части на CS-протеина, четири или повече тандема от повтарящи се единици от имунодоминантната област и повърхностния антиген от вируса на хепатит В (HBsAg). За предпочитане хибридният протеин съдържа последователност, която съдържа най-малко 160 аминокиселини, която е по същество хомоложна на C-крайната част на CS-протеина. CS-протеинът може да бъде лишен от последните 12 аминокиселини от C-края.

В частност там е описан протеин, който съдържа част от CS-протеина на *P. falciparum*, по същество отговаряща на аминокиселини-

те 210-398 на *P. falciparum* 7G8, свързана в рамка през линейен линкер до N-края на HBsAg. Линкерът може да обхваща част от preS2 от HBsAg.

Едно специфично изпълнение, описано в WO 93/10152, е хибридният протеин, означен RTS. Този хибрид се състои от:

- метионинов остатък, кодиран чрез нуклеотиди 1059 до 1061, произлезли от *Saccharomyces cerevisiae* TDH3 генна последователност (нуклеотиди 1-1058 в тази четяща рамка изработва самият TDH3 промотор) (Musti A. M. et al., Gene 1983, 25, 133-134);

- три аминокиселини, Met Ala Pro, произлезли от нуклеотидна последователност (1062 до 1070), създадена чрез метод на клониране, използван за конструиране на хибридният ген;

- интервал от 189 аминокиселини, кодирани чрез нуклеотиди 1071 до 1637, представлява аминокиселини 210 до 398 от периферния протеин (CSP) на *Plasmodium falciparum* щам 7G8 (Dame et al., supra);

- аминокиселина (Arg), кодирана чрез нуклеотиди 1638 до 1640, създадени чрез метод за клониране, използван за конструиране на хибридният ген;

- четири аминокиселини Pro Val Thr Asn, кодирани от нуклеотиди 1641 до 1652 и представляващи четирите крайни карбокси-остатъци на вируса на хепатит В (adw серотип) preS2 протеин (9);

- интервал от 226 аминокиселини, кодирани чрез нуклеотиди 1653 до 2330 и определящи S-протеина на вируса на хепатит В (adw серотип).

В WO 93/10152 освен това се описва експресията на хибридният протеин в приемник щам дрожди, който вече носи в неговия геном няколко интегрирани копия на хепатит В S експресионна касета. Полученият щам синтезира два полипептида, S и RTS (или друг хибриден протеин от изобретението), които спонтанно се комплектуват в смесени (например RTS, S) липопротеинови частици. Тези частици благоприятно представят CSP-последователностите на хибрида на техните повърхности.

Техническа същност на изобретението

Предмет на настоящото изобретение е придаване имунитет срещу инфекции, с *P. falciparum* и/или *P. vivax* чрез имунизирание със състав, съдържащ множество антигени в комбинация с адювант, който е изгоден стимулатор на TH1 клетъчния отговор.

Съобразно това настоящото изобретение осигурява състав на ваксина за предотвратяване или лечение на малария, съдържащ множество маларийни антигени в комбинация с адювант, който е изгоден стимулатор на TH1 клетъчен отговор.

За предпочитане най-малко един от антигените е хибриден протеин, както е дефиниран по-горе, като RTS, повече за предпочитане под формата на смесени частици, както са дефинирани по-горе, като RTS, S.

Друг аспект на изобретението е осигуряване на състав на ваксина за предотвратяване или лечение на малария, съдържащ множество маларийни антигени, характеризираш се с това, че най-малко един от антигените е хибриден протеин, както е дефиниран по-горе, като RTS, повече за предпочитане под формата на смесени частици, както са дефинирани по-горе, като RTS, S.

Количеството антиген, съдържащо се във всяка доза ваксина, се избира като количество, което предизвиква имунозащитен отговор без значителните нежелани странични действия на типичните ваксини. Това количество варира в зависимост от това кой специфичен имуноген е използван. Най-общо, очаквано е всяка доза да съдържа общо 1-1000 µg протеин, за предпочитане 1-2000µg, особено за предпочитане 10-100µg. Оптималното количество за дадена ваксина може да се определи чрез стандартни изследвания, включващи наблюдение на имунния отговор на субектите. След първоначалното ваксиниране субектите за предпочитане получават повторна ваксинация след около 4 седмици, последвана от повтаряща се реваксинация на всеки шест месеца, докато съществува риск от инфекция.

Друг аспект на изобретението е метод за лечение на пациент, податлив на инфекции с плазмодия, чрез прилагане на ефек-

тивно количество от ваксината, както е описана тук по-горе.

Адюванти, които са способни да стимулират изгоден TH1 клетъчен отговор, са описани в WO 94/00153 и WO 95/17209.

Специално предпочитан адювант съдържа QS21, пречистена чрез HPLC нетоксична фракция, получена от кората на *Quillaja saponaria* Molina, и 3-де-О-ацилиран монофосфориллипид А (3 D-MPL), в даден случай заедно с емулсия масло във вода.

3-де-О-ацилираният монофосфориллипид А е известен от GB 2220211 (Ribi). Химически той е смес от 3-де-О-ацилиран монофосфориллипид А с 4, 5 или 6 ацилирани вериги и е произвеждан от Ribi Immunochem Montana. Предпочитана форма на 3-де-О-ацилиран монофосфориллипид А е описан в WP 92/116556.

QS21 е пречистена чрез HPLC нетоксична фракция на сапонин от кората на южноамериканското дърво *Quillaja saponaria* Molina и методът за производството ѝ е описан (като QA21) в US 5 057 540.

Предпочитаната емулсия масло във вода съдържа масло, което може да се метаболизира, като сквален, α - токоферол и Tween 80. В допълнение емулсията масло във вода може да съдържа Span 85 и/или лецитин.

Съотношението QS21:3D-MPL обикновено е в порядъка 1:10 до 10:1; за предпочитане 1:5 до 5:1 и често по същество 1:1. Предпочитаният порядък за оптимален синергизъм е 2,5:1 до 1:1 3D MPL:QS21. Обикновено за приложение на човек QS21 и 3D MPL се съдържат във ваксината в порядъка 1 μ g - 200 μ g, като 1-100 μ g, за предпочитане 10 μ g - 50 μ g за доза. Обикновено емулсията масло във вода съдържа от 2 до 10% сквален, от 2 до 10% α - токоферол и от 0,3 до 3% Tween 80. За предпочитане съотношението на сквалена и α -токоферола е равно или по-малко от 1, тъй като това осигурява по-стабилна емулсия. Може също да се съдържа Span 85 в концентрация от 1%. В някои случаи може да бъде изгодно ваксините съгласно настоящото изобретение да съдържат още стабилизатор.

Приготвянето на ваксината най-общо е описано в New Trends and Developments in Vaccines, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A., 1978. Кап-

сулиране с липозоми например е описано от Fullerton, US 4 235 877. Конюгация на протеини с макромолекули е описано например от Likhite, US 4 372 945 и Armor et al., US 4 474 757.

Получените маларийни антигени, полезни за настоящото изобретение, могат да бъдат избрани от следните:

1. Хибриден протеин, както е дефиниран по-горе, като RTS, повече за предпочитане под формата на смесени частици, както са дефинирани по-горе, като RTS, S;

2. TRAP на клониран изолат от *P. falciparum* от Тайланд, известен като T/9/96, и протеини, имащи най-малко 80% хомология със същия, и имуногенни производни, включително фрагменти от същия (описани в WO 90/01496 и WO 91/11516 (3i Exploitation Limited) и WO 92/11868 (US Navy);

3. Протеина 16 KD, описан в WO91/18922, и протеини, имащи най-малко 80% хомология със същия, и имуногенни производни, включително фрагменти от тях;

4. Апликалният мембранен антиген-1 (AMA-1) от *P. falciparum* или *P. vivax* и протеини, имащи най-малко 80% хомология със същия, и имуногенни производни, включително фрагменти от тях;

5. Периферноспорозоитен протеин (csp) от *P. falciparum* или *P. vivax* и протеини, имащи най-малко 80% хомология със същия, и имуногенни производни, включително фрагменти от тях;

6. MSP-1 от *P. falciparum* или *P. vivax* (US 4 837 016) и протеини, имащи най-малко 80% хомология със същия, и имуногенни производни, включително фрагменти от тях;

7. Други протеини от екзоеритроцитния стадий и имуногенни производни, включително фрагменти от тях;

8. В даден случай протеини от кръвния стадий и имуногенни производни, включително фрагменти от тях.

Терминът "имуногенно производно" се отнася до всяка молекула, като отрязан или друго производно на протеин, което запазва способността да възбужда имунен отговор към протеина след вътрешно прилагане на човек. Такива други производни могат да се получат чрез добавяне, изпускане, заместване или прегрупиране на аминокиселини или чрез химическа модификация на същите.

Имуногенни фрагменти на протеина, които могат да бъдат полезни при приготвянето на поединици ваксини, могат да се приготвят чрез експресиране на подходящи генни фрагменти или чрез пептиден синтез, например като се използва Merrifield-синтез (The Peptides, vol. 2, Academic Press, NY, p. 3).

Имуногенното производно може да бъде хибрид, т.е. слят полипептид, съдържащ допълнителни последователности, които могат да носят един или повече епитопи за други имуногени Plasmodium или други имуногени не-Plasmodium. Алтернативно, имуногенните производни съгласно изобретението могат да бъдат слети с носещ полипептид като антиген от повърхността или съцевината на хепатит В, или с друг носител, който има имуностимулиращи свойства, както в случая на адювант, или който по друг начин усилва имунния отговор към протеина или неговото производно, или който може да се използва за експресиране, пречистване или приготвяне на готова форма с протеина или неговото производно.

Протеините или техните имуногенни производни, които са полезни съгласно изобретението, могат да бъдат химически конюгирани с макромолекула, като се използва обичайно свързващо средство като глутаралдехид (Geerlings et al., (1988) J. Immunol. Methods, 106, 239-244).

Примери за изпълнение на изобретението

Следващият пример илюстрира изобретението.

Пример. Конструирание и експресия на рекомбинантен TRAP

Приготвя се, както е описано в WO 90/01496.

Конструирание и експресия на RTS, S

Приготвя се, както е описано в WO 93/10152.

Приготвяне на адювант

Приготвят се две готови форми на адюванти, като всяка съдържа следния мас-ло във вода емулсионен компонент:

SB 26: 5% сквален, 5% токоферол, 0,4% Tween 80; размерът на частиците е 500 nm.

SB62: 5% сквален, 5% токоферол, 2,0% Tween 80; размерът на частиците е 180 nm.

Приготвяне на емулсията SB62 (2-кратен концентрат)

Разтваря се Tween 80 в буфериран с фосфат физиологичен разтвор (PBS), като се получава 2% разтвор в PBS. За да се приготвят 100 ml двукратен концентрат на емулсията, 5 g DL α токоферол и 5 ml сквален се разбъркват чрез завихряне, за да се смесят напълно. Прибавя се 90 ml от разтвора PBS/Tween и се разбърква пълно. Получената емулсия след това се прокарва през шприц и накрая се микрофлуидизира чрез използване на апарат за микрофлуидизиране M110S. Получените маслени капки имат размер приблизително 180 nm.

Приготвяне на емулсията SB26.

Емулсията се приготвя по аналогичен начин, като се използва 0,4% Tween 80.

Други емулсии, както са посочени в таблицата, са приготвени по аналогичен начин.

Към всеки 100 ml от емулсията се прибавят двата антигена (10 mg от всеки антиген, еквивалентни на 50 μ g за доза) и се смесват. Обединяват се със 100 μ g/ml 3-D-MPL и 100 μ g/ml QS21, като се получава крайната готова форма. Буферът се нагажда съгласно съдържанието на сол и pH.

ТАБЛИЦА

Двукратно концентрирани носители

Емулсии SB	Токоферол (%)	Сквален (%)	Tween 80 (%)	Span 85 (%)	Лецитин (%)	Размер
26	5	5	0,4	0	0	500 nm 90-100 % 800 nm 10-0 %
26,1	5	5	0,4	0	0,1	500 nm
63	5	5	0,6	0	0	500 nm
64	5	5	0,8	0	0	500 nm
61	5	5	1	0	0	250-300 nm
62	5	5	2	0	0	180 nm
40	5	5	0,4	1	0	500 nm 80-100 % 800 nm 20-0 %
40,1	5	5	0,4	1	0,1	500 nm
60	5	5	1	1	0	300 nm
65	5	5	0,4	1,5	0	500 nm
66	5	5	0,4	2	0	500 nm

Сравнителен пример

Различни готови форми на RTS, S
RTS, S е описан в WO 93/10152 и е
пригответена форма за ваксиниране на мишки
порода balb/c. Във всяка група има по 5 жи- 45
вотни, 7 групи животни получават следните
готови форми:

Група 1	RTS,S SB62
Група 2	RTS,S QS21 3D-MPL
Група 3	RTS,S QS21 2D-MPL SB62 50
Група 4	RTS,S 3D-MPL AL(OH) ₃
Група 5	RTS,S AL(OH) ₃

40

Група 6

Обикновена

Група 7

Отрицателен контрол

(RTS,S - 5µg/доза, 3 D-MPL- 5µg/до-
за, QS21- 5µg/доза)

Животните се инокулират и им се взе-
ма кръв след 15 дни след първата имуниза-
цията и в дните 7-ми и 15-и след втората
имунизацията и се изследват за анти HBsAg
подтип антитела. Емулсията SB62, когато е
пригответена с QS21 и 3D-MPL, усилва пре-
ференциално и по синергичен начин отго-
вора IgG2a антитяло в сравнение с SB62 са-
мостоятелно.

Усиленият отговор IgG2a антитяло у мишки е мярка за способността на адювантната система да стимулира отговор от TH1 тип.

Патентни претенции

1. Ваксина против малария, характеризираща се с това, че съдържа най-малко два маларийни антигена в комбинация с адювант, който е преференциален стимулатор на TH1 клетъчен отговор и в чийто състав най-малко двата маларийни антигена са избрани от групата:

а) хибриден протеин, съдържащ по същество всички С-крайни части на CS-протеин, четири или повече тандемни повторения на имунодоминантната област и повърхностния антиген от вируса на хепатит В (HBsAg);

б) TRAP от клониран изолат от *P. falciparum* от Тайланд, известен като T/9/96,

и протеини, имащи най-малко 80% хомология със същия, и имуногенни производни, включително фрагменти от тях;

5 с) MSP-1 *P. falciparum* или *P. vivax* и протеини, имащи най-малко 80% хомология със същия, и имуногенни производни, включително фрагменти от тях.

2. Ваксина съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че адювантът съдържа MPL.

3. Ваксина съгласно претенция 1 или 2, характеризираща се с това, че адювантът съдържа QS21.

4. Ваксина съгласно някоя от предходните претенции, характеризираща се с това, че адювантът съдържа емулсия масло във вода.

5. Метод за лечение или предотвратяване на малария, характеризиращ се с това, че на пациента се прилага ефективно количество от ваксина съгласно някоя от претенциите 1 до 4.

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: И. Червенякова

Редактор: А. Ерменкова

Пор. № 40848

Тираж: 40 СР