



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **331998**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

A61K 47/48 (2006.01)
A61K 31/465 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61P 25/34 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20012589	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.12.01 PCT/US1999/28272
(22)	Inng.dag	2001.05.25	(85)	Videreføringsdag	2001.05.25
(24)	Løpedag	1999.12.01	(30)	Prioritet	1998.12.01, US, 201800
(41)	Alm.tilgj	2001.07.20			
(45)	Meddelt	2012.05.21			
(73)	Innehaver	NABI Biopharmaceuticals, 12280 Wilkins Avenue, Rockville, MD 20852, USA			
(72)	Oppfinner	Ali Ibrahim Fattom, Rockville, MD, USA Robert B. Naso, Gaithersburg, MD, USA Sofiane Ennifar, Silver Spring, MD, USA			
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Haptenbærerkonjugater bundet til nikotin, og anvendt som medikament, antistoff fremstilt som en respons på disse konjugatene, funksjonelle fragmenter av antistoffene, fremgangsmåte for fremstilling av antistoffene, vaksinesammensetning omfattende haptenbærerkonjugatene, sett for å bestemme nærvær av nikotin, og anvendelse av haptenbærerkonjugatene for fremstilling av medikamenter for behandling av nikotinavhengighet.			
(56)	Anførte publikasjoner	Langone et al. Radioimmunoassay of Nicotine, Cotinine, and ζ -(3-Pyridyl)- ζ -oxo-N-methylbutyramide, Methods in Enzymology, 1982, vol.84, side 628-640 , Bjørcke et al. Stereospecific monoclonal antibodies to nicotine and cotinine and their use in enzyme-linked immunosorbent assays, Journal of Immunological Methods, 1986, vol.90, side 203-213, WO 98/14216 A2			
(57)	Sammendrag				

Nye haptenbærerkonjugater som er i stand til å indusere produksjonen av antistoffer in vivo som spesifikt binder seg til nikotin. Disse konjugatene omfatter et nikotinhapten konjugert til et immunogent bærerprotein. De nye konjugatene bevarer kiraliteten til nikotin i sin native (S)-(-) tilstand, og har gode stabilitetsegenskaper. Konjugatene er nyttige i å formulere vaksiner for aktiv immunisering, som blir benyttet for å hindre eller å behandle nikotinavhengighet. Antistoffene som er fremstilt som respons på nikotinhaptenbærerkonjugater blir benyttet til passiv immunisering. Disse antistoffene blir administrert for å hindre og behandle nikotinavhengighet.

Foreliggende oppfinnelse omhandler nye haptenbærerkonjugater som er i stand til å indusere produksjonen av antistoffer. Slike antistoffer er i stand til spesifikt å binde til nikotin. Videre betrakter den foreliggende oppfinnelsen å hindre eller å behandle nikotinavhengighet ved å administrere et medikament som er fremstilt fra et nikotinbærerkonjugat.

Røyking av sigaretter, sigarer og piper er et alminnelig forekommende problem i USA og verden over. Røyketobakk og røykfri tobakk er rik på nikotin, som er en kjent vanedannende substans. Nikotin er et alkaloid, avledet fra tobakksplanten, som er ansvarlig for røykernes psykoaktive og avhengige effekter. Nikotin er dannet av to ringer koblet sammen med en enkelt binding: En aromatisk seks-ring (pyridin) og en alifatisk fem-ring (pyrrolidin). Pyrrolidin er N-metylert og koblet via sitt karbon-2 til karbon-3 på pyridin. Således er karbon-2 kiralt, og det er vesentlig fritt for rotasjon rundt enkeltbindingen som kobler de to ringene. Det har blitt fastslått at den absolutte konfigurasjonen av karbon-2 er S. Således er den naturlige konfigurasjonen til nikotin (S)-(-)-nikotin.

Nikotinanvendelse er utbredt som en følge av den enkle tilgjengeligheten av sigaretter, sigarer, piper og røykfri tobakk. I henhold til U.S. Department of Health and Human Services, er sigarettøyking den ene ledende årsaken for død som kan forhindres i USA. Se også McGinnis et al., J. Am. Med. Assoc., 270, 2207-2211 (1993). Eksponering for passiv røyking har også blitt rapportert å ha alvorlige skadelige helseeffekter, inkludert akutt forverring av astma.

Selv om den avhengige egenskapen til nikotin er godt kjent, er sigarettøyking utbredt. Toppnivåer av nikotin i blodet, omkring 25 til 50 nanogram/ml, blir oppnådd i løpet av 10-15 minutter ved røyking av en sigarett. I mennesker resulterer røyking av en sigarett i at arterielle nikotinkonsentrasjoner blir ti ganger høyere enn venøse nikotinkonsentrasjoner som en følge av at nikotin raskt blir avlevert fra lungene til hjertet (se Henningfiels (1993) Drug Alcohol Depend. 33: 23-29). Dette resulterer i en rask avlevering av høye arterielle konsentrasjoner av nikotin til hjernen. Straks nikotin krysser blod-hjernebarrieren tyder beviser på at det binder til kolinerge reseptorer, som normalt blir aktivert av nevrotransmitteren acetylkolin, som er involvert i respirasjon, opprettholdelse av hjerterefrekvens, hukommelse, våkenhet og muskelbevegelse. Når nikotin binder til disse reseptorene kan den påvirke normal hjernefunksjon ved å utløse frigivelsen av andre nevrotransmittere så som dopamin. Dopamin er funnet i hjernen i regioner som er involvert i emosjoner, motivasjon og følelse av glede. Det er frigivelsen av nevrotransmittere, spesielt dopamin, som er ansvarlig for tobakkbrukernes avhengighet av nikotin eller andre inntak av nikotin.

Som en følge av de signifikante alvorlige effektene av røyking på helsen, forsøker røykere ofte å slutte. Imidlertid bidrar den avhengige egenskapen til nikotin og tilgjengeligheten av sigaretter, til opprettholdt avhengighet av nikotin og høy grad av mislykkethet hos dem som forsøker å slutte.

Tilbaketrekningssymptomer er lite hyggelige, og blir lindret ved røyking.

Mange terapier for nikotinavhengighet har blitt utviklet, men er stort sett ineffektive. De to mest populære terapiene forblir det nikotintransdermale plasteret og nikotin inkorporert i tyggegummi. Disse terapiene, betegnet "nikotinerstatningsterapier" (NRT) erstatter mengden av nikotin som brukeren tidligere mottok fra røyking, og virker avvendende for brukeren av nikotin. Imidlertid ses visse ulemper med denne typen av terapi. Spesielt er det lav penetrasjon av nikotin inn i blodstrømmen og derfor et økt ønske om å røyke. Problemer slik som munnirritasjon, kjevesårhet, forkjølelse, har blitt assosiert med anvendelse av nikotintyggegummi. Problemer så som hudirritasjoner, søvnforstyrrelser og nervøsitet har blitt assosiert med anvendelse av nikotintransdermale plastre.

Derfor er det behov for en alternativ metodologi for å behandle nikotinavhengighet. Litteraturen gjenkjenner behovet, og det har vært flere forsøk på å tilveiebringe en metodologi for å behandle nikotinavhengighet. En av fremgangsmåtene involverer administreringen av antistoffer som har blitt produsert som en respons på nikotin. Imidlertid er lavmolekylvektsubstanser, kalt haptener, kjent for å være ustabile med å utløse en immunrespons i vertsdyr. Nikotin er ikke noe unntak, og som et lite molekyl er det ikke immunogent. For å utløse en antistoffrespons mot haptener er det vanligvis kovalent bundet til et bærerprotein, og komplekset vil utløse produksjonen av antistoffer som gjenkjenner haptener.

For eksempel ble kotinin 4'-karboksylsyre, som var bundet kovalent til nøkkelhullalbuskjell hemocyanin (keyhole limpet hemocyanin) (KLH) benyttet for å generere antistoffer mot nikotinmetabolitten kotinin. Disse antistoffene ble benyttet for å bestemme nærværet av kotinin i fysiologiske væsker. Se Bjerke et al., J. Immunol. Methods, 96, 239-246 (1987).

Andre nikotinantistoffer ble fremstilt av Castro et al., (Eur. J. Biochem., 104, 331-340 (1980)). Castro et al fremstilte nikotinhaptener konjugert med bovin serum albumin (BSA) med bærerproteinet konjugert via en kobler ved 6-posisjonen til nikotin. Castro et al fremstilte ytterligere nikotinkonjugater av BSA som ble injisert i pattedyr for å produsere antistoffer. I en annen publikasjon Castro et al i Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 583-589 (1975) angis to nikotinalbuminkonjugater: N-succinyl-6-amino-(±)-nikotin-BSA og 6-amino-(σ-aminokapramido)-(±)-nikotin-BSA. I denne publikasjonen fra 1975

benyttet Castro et al også antistoffer mot nikotin-bærerkonjugat, 6-(σ -aminokapramido)-(±)-nikotin-BSA, for å bestemme nivåene av nikotin i blod og urin, se Res. Commun Chem. Path. Pharm., 51, 393-404 (1986).

Swain et al. (WO 98/14216) angir nikotinbærerkonjugater der haptenet er konjugert ved 1, 2, 4, 5, 6 eller 1'-posisjonen til nikotin. Hieda et al. har vist at dyr immunisert med 6-(karboksymetyllureido)-(±)-nikotin, som var koblet til KLH, fremstilte antistoffer spesifikke for nikotin. J. Pharm. and Exper. Thera. 283, 1076-1081 (1997). Langone et al. fremstilte haptenderivatet O-succinyl-3'-hydroksymetyl-nikotin, se Biochemistry, 12, 5025-5030, og brukte antistoffene mot dette haptentbærerkonjugatet i radioimmunoassayer. Se Methods in Enzymology, 84, 628-635 (1982). Konjugatet fremstilt av Langone er følsomt for hydrolyse. I tillegg beskriver Abad et al. i Anal. Chem., 65, 3227-3231 (1993) å konjugere 3'-(hydroksymetyl)nikotin-hemisuccinat til bovint serum albumin for å fremstille antistoffer mot nikotin for å være i stand til å måle nikotininnholdet i røykkondensat fra sigaretter i et ELISA-assay.

Derfor angir ikke kjent teknikk et stabilt nikotinbærerkonjugat som bevarer den kirale egenskapen til nikotinhaptenet, og som kobler haptenet til bæreren på en måte som bevarer egenskapen til nikotinepitopene. Videre angir kjent teknikk ikke fremgangsmåter for å hindre eller behandle nikotinavhengighet ved å anvende slike konjugater. Seeman i Heterocycles, 22, 165-193, (1984) angir resultater av et studie av de strukturelle analysene og den kjemisk reaktivitet til nikotin.

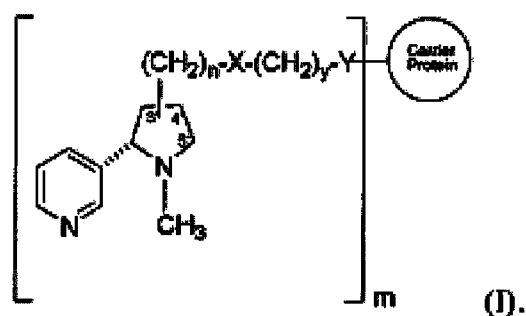
Som en respons på behovet for en mer effektiv metodologi for å behandle nikotinavhengighet er det en hensikt med den foreliggende oppfinnelsen å tilveiebringe nye nikotinbærerkonjugater som er stabile, omfatter nikotin i naturlige (S)-(-)-formasjon, og benytter en nikotinbærerkobling som bevarer egenskapen til nikotinepitopen(e) og den relative orienteringen av de to ringene av nikotinmolekylet. Begge ringene til nikotin, og deres relative orientering, er antatt å være vesentlige for antistoffets gjenkjenning av nikotin i løsning. Slike konjugater er i stand til å stimulere produksjonen av antistoffer som er i stand til spesifikt å binde til nikotin. Ved å benytte de oppfunne konjugatene har oppfinnerne økt serumnikotinnivåer, og redusert hjernenikotinnivåer i pattedyr. I tillegg, ved å benytte konjugatene i den foreliggende oppfinnelsen, har oppfinnerne også hindret nikotininduserte endringer i blodtrykk, og lokomotoriske effekter.

I en annen hensikt ved den foreliggende oppfinnelsen er det tilveiebrakt et medikament som er fremstilt ved anvendelse av et haptentbærerkonjugat ifølge oppfinnelsen for å behandle nikotinavhengighet ved å administrere et konjugat i

henhold til den foreliggende oppfinnelsen til en pasient som er avhengig av nikotin, og derved generere antinikotinantistoffer i pasienten. Således, når pasienten røyker, eller benytter tyggetobakk, vil nikotinen fra disse produktene bli bundet av antinikotinantistoffene i blodet, og hindre nikotinen fra å krysse blod-hjernebarrieren, og derved eliminere de nikotininduserte endringene i hjernekjemi, som er kilden for nikotin-avhengighet. I dette henseende er det viktig at nikotinbærerkonjugatet utløser produksjonen av antistoffer som vil gjenkjenne det native nikotinmolekylet. Som beskrevet over vil de nye nikotinbærerkonjugatene i henhold til den foreliggende oppfinnelsen bevare kiraliteten og epitopen(e) til naturlig forekommende nikotin.

Oppfinnerne har ikke til hensikt å være bundet av noen spesiell teori i forhold til hvordan nikotinkonjugatene og antistoffene produsert som en respons på slike konjugater, inhiberer effektene av nikotin inntatt av pattedyr. I tillegg til å hindre nikotin fra å krysse blod-hjernebarrieren kan antistoffene også forhindre nikotin fra å binde til andre reseptorer i det perifere nervesystemet ved enkel sterisk blokkering.

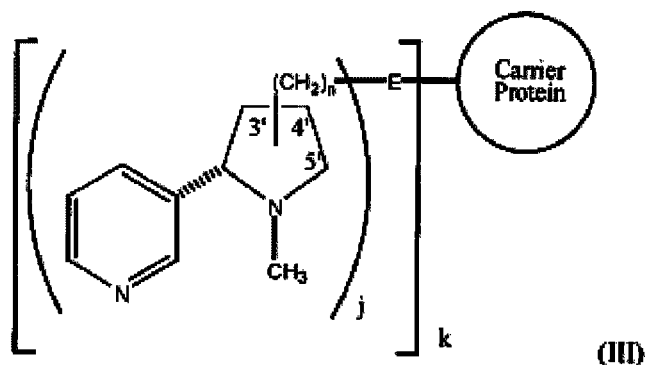
Disse hensiktene kan bli oppnådd ved å tilveiebringe et haptentbærerkonjugat med formelen (I):



der m er 1 til 2500, n er 0 til 12, y er 1 til 12, X er valgt fra gruppen som består av NH-CO, CO-NH, CO-NH-NH, NH-NH-CO, NH-CO-NH, CO-NH-NH-CO og S-S; Y er valgt fra gruppen som består av NH-CO, CO-NH, CO-NH-NH, NH-NH-CO, NH-CO-NH, CO-NH-NH-CO og S-S, og $-(CH_2)_n-X-(CH_2)_y-Y$ -enheten er bundet til en 3', 4' eller 5'-posisjonen. I en foretrukket utforming av haptentbærerkonjugatet er m 11 til 17, n er 1, y er 2, X er NH-CO, Y er CO-NH og bærerproteinet er eksoprotein A og $-(CH_2)_n-X-(CH_2)_y-Y$ -enheten er bundet til 3'-posisjonen. I en annen foretrukket utforming av haptentbærerkonjugatet er m 11 til 17, n er 1, y er 2, X er NH-CO, Y er CO-NH, bærerproteinet er eksoprotein A og $-(CH_2)_n-X-(CH_2)_y-Y$ -enheten er bundet til 4'-posisjonen. I en ytterligere foretrukket utformingen av haptentbærerkonjugatet er m 11 til 17, n er 1, y er 2, X er NH-CO, Y er CO-NH, bærerproteinet er eksoprotein A og $-(CH_2)_n-X-$

$(\text{CH}_2)_y$ -Y-enheten er bundet til 5'-poisjonen. I en ytterligere foretrukket utforming er m valgt fra gruppen som består av 1 til 20 og 1 til 200.

De ovennevnte hensiktene kan også bli oppnådd ved å tilveiebringe et haptенbærerkonjugat med formelen (III):



der n er 0 til 12, j er 1 til 1000, k er 1 til 20 og E er en aminosyreinnholdende matriks. I en foretrukket utforming er matriksen en poly-L-glutaminsyre.

Hensiktene kan også bli oppnådd ved å tilveiebringe et antistoff som er fremstilt i en respons på haptенbærerkonjugatet med formel (I). I en ytterligere utforming er antistoffet et funksjonelt fragment. I en foretrukket utforming er antistoffet et monoklonalt antistoff. I en ytterligere utforming av oppfinnelsen er antistoffet polyklonalt.

Hensiktene kan også bli oppnådd ved å tilveiebringe et antistoff som blir fremstilt som respons på haptенbærerkonjugatet med formel (III). I en ytterligere utforming er antistoffet et funksjonelt fragment. I en foretrukket utforming er antistoffet et monoklonalt antistoff. I en ytterligere utforming av oppfinnelsen er antistoffet polyklonalt.

Hensiktene kan også bli oppnådd ved å tilveiebringe et medikament som er fremstilt ved anvendelse av et haptенbærerkonjugat ifølge oppfinnelsen, for å behandle eller hindre nikotinavhengighet i en pasient med behov for slik behandling, som omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av haptенbærerkonjugatet med formel (I) eller (III).

I tillegg kan disse hensiktene bli oppnådd ved å tilveiebringe en vaksinesammensetning som omfatter haptенbærerkonjugatet med formel (I) eller formel (III). I tillegg kan vaksinen videre omfatte en ytterligere terapeutisk forbindelse for å behandle nikotinavhengighet.

Hensiktene kan også bli oppnådd ved å tilveiebringe en fremgangsmåte for å fremstille et antistoff som omfatter å immunisere et vertspattedyr med et haptенbærerkonjugat med formel (I) eller (III). I en foretrukket utforming er

antistoffet som blir fremstilt et monoklonalt antistoff. I en ytterligere utforming er antistoffet polyklonalt.

Ytterligere hensikter kan bli oppnådd ved å tilveiebringe et sett for å bestemme nærværet av nikotin i en prøve, som omfatter et antistoff oppnådd som respons på haptенbærerkonjugatet med formel (I) eller formel (III).

Disse hensiktene og andre som er åpenbare for personer med kunnskaper i faget har blitt oppnådd i den foreliggende oppfinnelsen, beskrevet i detalj nedenfor og i de vedlagte krav.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 er et diagram som viser effekten av aktiv immunisering med en 3'-AMNik-Suc-rEPA-konjugatvaksine på nikotin blodserumnivåer i rotter, etter en enkelt injeksjon av nikotin. Nikotinserumnivåer, 3 og 10 minutter etter nikotininjeksjon er vist.

Figur 2 viser effekten av passiv immunisering med antistoffer mot 3'-AMNik-Suc-rEPA på nikotinnivåer i blod og hjerne i rotter. Rotter ble behandlet med 12,5, 25 og 50 mg antistoff.

Figur 3 viser effektene av passiv immunisering med antistoffer mot 3'-AMNik-Suc-rEPA på nikotinnivåer i blodserum og hjerne i rotter. Nikotinnivåer ble målt 30 minutter og 1 dag etter antistoffadministrering, og 3 minutter før nikotininjeksjon.

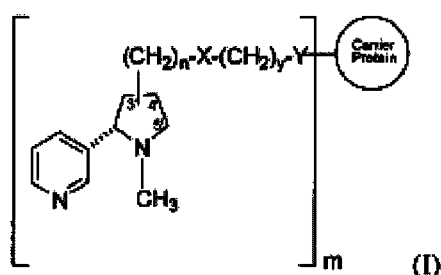
Figur 4 viser effektene av passiv immunisering med antistoffer mot 3'-AMNik-Suc-rEPA på nikotin blodserumnivåer i rotter som mottok multiple doser av nikotin.

Figur 5 viser effektene av passiv immunisering med antistoffer mot 3'-AMNik-Suc-rEPA på nikotinnivåer i rottehjerne i rotter som mottok multiple doser av nikotin.

Figur 6 viser effektene av passiv immunisering med antistoffer mot 3'-AMNik-Suc-rEPA på nikotininduserte lokomotoreffekter i rotter.

Figur 7 viser effektene av passiv immunisering med antistoffer mot 3'-AMNik-Suc-rEPA på nikotinindusert økning i systolisk blodtrykk. Figuren viser at de økende mengder av antistoff øker effektiviteten av antistoffene til å redusere nikotinøkning i blodtrykk.

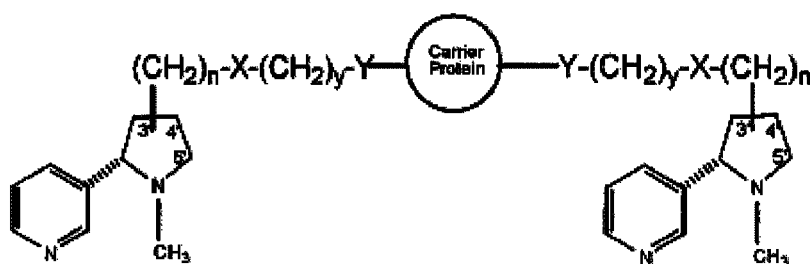
Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et nikotin-haptenbærerkonjugat for å behandle avhengighet av nikotin. Nikotin-haptenbærerkonjugatet har formelen (I):



der m er 1 til 2500; n er 0 til 12; y er 1 til 12; X er valgt fra gruppen som består av NH-CO, CO-NH, CO-NH-NH, NH-NH-CO, NH-CO-NH, CO-NH-NH-CO og S-S; Y er valgt fra gruppen som består av NH-CO, CO-NH, CO-NH-NH, NH-NH-CO, NH-CO-NH, CO-NH-NH-CO og S-S; bærerproteinet er et hvilket som helst passende immunogent protein eller polypeptid. Fortrinnsvis kan bærerproteinet omfatte en T-celleepitope og $-(CH_2)_n-X-(CH_2)_y-Y$ -enheten er bundet til den 3', 4' eller 5' posisjonen til nikotinmolekylet.

I formel (I) er m fortrinnsvis 1 til 200. I en annen foretrukket utforming er m 1 til 20. I en spesielt foretrukket utforming er m 11 til 17. I en annen foretrukket utforming er X valgt fra gruppen som består av NH-CO, CO-NH, CO-NH-NH, NH-NH-CO, NH-CO-NH, CO-NH-NH-CO.

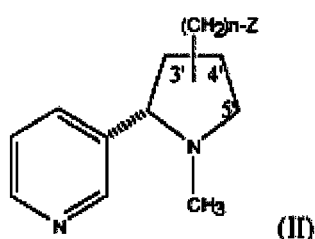
Dersom m er mer enn 1, er enheten i klammeparentesen koblet m ganger til ulike koblingspunkter i bærerproteinet. For eksempel, dersom $m = 2$, da ville formel (I) være:



Fordi antistoffer ikke kan bli dannet som respons på nikotin selv, har de foreliggende oppfinnerne utviklet et nikotinhapten som er derivatisert ved 3', 4' eller 5'-posisjonen til nikotin. Denne enheten er bundet til et bærerprotein for å gi et haptenbærerkonjugat som vil fremstille antistoffer mot nikotinenheten når de blir injisert inn i et passende vertspattedyr. I så henseende, for at en farmasøytisk sammensetning som omfatter haptenbærerkonjugatet skal indusere produksjonen av antistoffer når det administreres til et pattedyr, må bærerproteinet være immunogent. Fortrinnsvis vil det omfatte en T-celleepitope. Således, når bærerproteinet er konjugert til nikotinhaptenet og deretter blir administrert til et pattedyr, produserer eller "danner" pattedyret antistoffer som en respons på nikotinhaptenet.

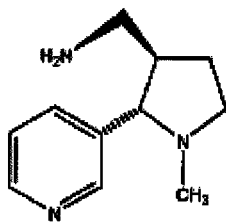
Begrepet "hapten" som benyttet i den foreliggende oppfinnelsen, refererer til en lavmolekylvekt organisk forbindelse som ikke er i stand til å utløse en immunrespons selv, men som vil utløse en immunrespons straks det er koblet til et bærermolekyl. I en foretrukket utforming er haptenet koblet til bæreren via en kobler (linker). Et hapten i henhold til den foreliggende oppfinnelsen er et nikotinderivat. Dette nikotinhaptenet inneholder en reaktiv funksjonell gruppe som bæreren kan bli koblet direkte til, eller via en kobler, eller via en matriks, eller via en kobler og en matriks. Fortrinnsvis er nikotinhaptenet koblet til bærerproteinet via et amid eller en disulfidbinding. Amid og disulfidbindinger har de ønskede egenskaper for stabilitet. Fordi haptenbærerkonjugatene i henhold til den foreliggende oppfinnelsen vil bli benyttet som vaksiner, er det viktig at konjugatene er stabile for å forlenge holdbarheten til vaksinen.

I en foretrukket utforming av den foreliggende oppfinnelsen er nikotinhaptenet representert ved formelen (II):



der n er 0 til 12, Z er NH_2 , COOH , CHO eller SH og $-(\text{CH}_2)_n\text{-Z}$ kan være bundet til den 3', 4' eller 5' posisjonen. Z -enheten er i stand til å binde til en bærer, direkte eller via en kobler. Bærerhaptenkonjugatet vil indusere produksjonen av antistoffer ved dens introduksjon inn i kroppen til en pasient eller et dyr.

I en spesielt foretrukket utforming er nikotinhaptenet av den følgende formelen (3'-aminometylnikotin):



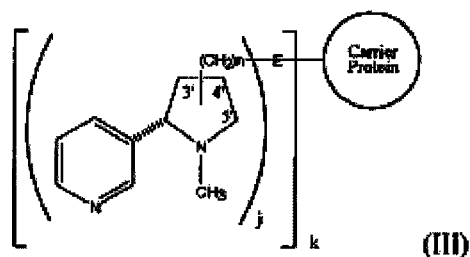
For å lage et "direkte konjugat" blir et enkelt nikotinhapten direkte koblet til en bærer, med eller uten en kobler. For eksempel kan et enkelt nikotinhapten bli koblet til hver tilgjengelige amingruppe på bæreren. Generelle fremgangsmåter for direkte å konjugere haptener til bærerproteiner ved å benytte en homobifunksjonell- eller en heterobifunksjonell krysskobler er beskrevet for eksempel av G.T. Hermanson i *Bioconjugat Techniques*, Academic Press (1996) og Dick og Beurret i *Conjugate Vaccines. Contribu. Microbiol. Immunol.*, Karger, Basel (1989) vol. 10, 48-114. Med direkte konjugering ved å benytte bifunksjonelle krysskoblere blir det molare forholdet av hapten til protein begrenset til antallet av funksjonelle grupper som er tilgjengelige på proteinet for den spesifikke konjugeringskjemien. For eksempel med et bærerprotein som har n antall lysinenheter vil det være, teoretisk, $n + 1$ primære aminer (inkludert den terminale amino) tilgjengelig for reaksjon med koblerens karboksylgruppe. Således, ved å benytte denne direkte konjugeringsfremgangsmåten, vil produktet bli begrenset til å ha $n + 1$ amidbindinger dannet, det vil si et maksimum på $n + 1$ haptener tilkoblet.

Den faglærte vil se at avhengig av konsentrasjonen av reaktantene som benyttes for å konjugere nikotinhaptenet til bærerprotein, og egenskapen til bærerprotein, vil forholdet mellom hapten til bærer også variere. Det vil også, innenfor en gitt fremstilling av nikotinbærerkonjugat, være variasjon i hapten/bærerforholdet for hvert individuelle konjugat. For eksempel har eksoprotein A, teoretisk, 15 aminoer tilgjengelige for konjugering med hapten. Imidlertid fastslo oppfinnerne at når 3'-aminometylsuccinyl-nikotin var konjugert til dette proteinet var et område på 11-17 nikotinhaptener koblet til hver eksoprotein A-bærer, i en enkel preparering av konjugatet. Dette området var eksperimentelt bestemt ved å benytte gassfiltreringskromatografi og å måle økningen i UV-absorbans ved 260 nm. 17 nikotiner var koblet til som bærere fordi nikotinhaptenet kan koble til ikke-aminenheter på bæreren. Eksempler på ikke-aminenheter som haptenet kan kobles til inkluderer, men er ikke begrenset til, -SH og -OH-enheter. Imidlertid er forekomsten av disse sidereaksjonene lav.

For å omgå begrensningene med antallet av haptener som kan bli koblet til bærere ved å benytte direkte konjugering, kan en aminosyre "matriks" bli

benyttet. Begrepet "matriks" betegner en aminosyre, et peptid, dipeptid eller et polypeptid, inkludert oligomere og polymere polypeptider. En matriks kan også være et lineært eller forgrenet polypeptid. Eksempler på aminosyrer som kan bli benyttet for å danne en matriks inkluderer, men er ikke begrenset til, aspartinsyre, lysin, cystein og L-glutaminsyre. Slike matriksmaterialer kan bli formulert inn i polymerer, så som poly-L-glutaminsyre. Når en aminosyre så som cystein blir benyttet, er tiolgruppen beskyttet, noe som derved tillater haptenet å bli koblet til karboksylgruppen til aminosyren. En faglært vil være kjent med typene av beskyttende grupper og metoder for å koble beskyttende grupper til aminosyrefunksjonaliteter. For diskusjon se Green, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Jon Wiley & Sons, New York, 1991.

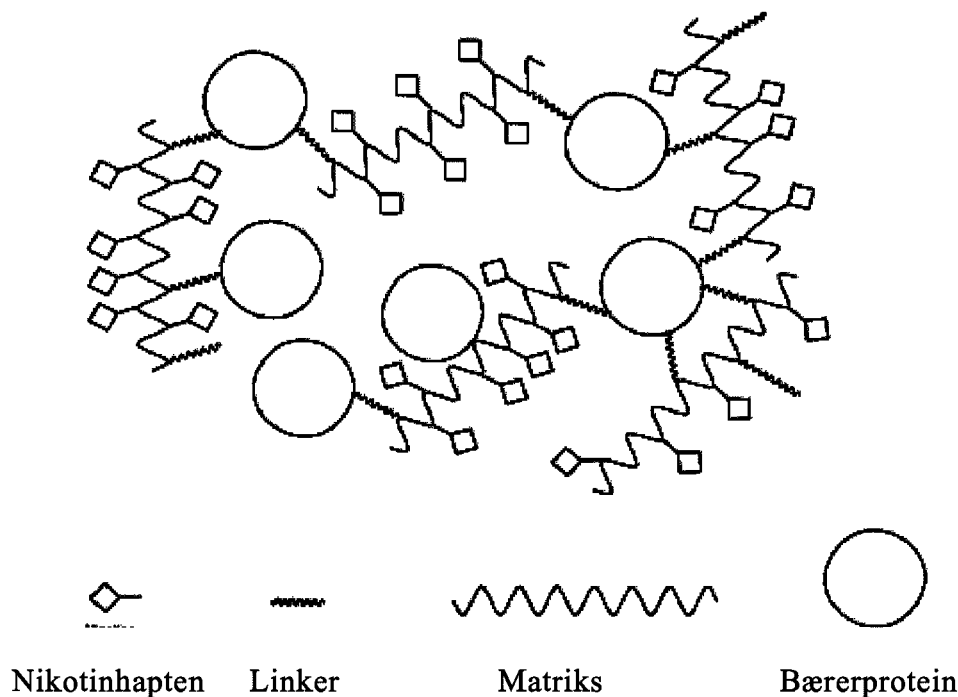
En egnet matriks viser en passende funksjonell gruppe og er lastet med to eller flere haptener. Således, i en annen foretrukket utforming av oppfinnelsen, er den nikotinsubstituerte matriksen konjugert til bærerproteinet for å øke haptenet for bærermolart forhold i haptensbærerkonjugatet. Matriksen spiller en dobbelt rolle, først som en støtte for et stort antall av haptener, og deretter som en krysskobler. Den nikotinsubstituerte matriksen konjugert til et bærerprotein er representert ved formel (III):



der n er 0 til 12, j er 1 til 1000, k er 1 til 20, E er en aminosyreinnholdende matriks som et hapten kan bindes til, og bærerproteinet er et hvilket som helst passende protein eller polypeptid som omfatter en T-celleepitop. Den aminosyreinnholdende matriksen E kan være en aminosyre, et peptid, dipeptid eller et polypeptid, inkludert oligomere så vel som polymere polypeptider. Matriksen omfatter en eller flere aminosyrer som inkluderer, men ikke er begrenset til, aspartinsyre, lysin, cystein og poly-L-glutaminsyre. I en foretrukket utforming er j 1 til 200, og i en annen foretrukket utforming er j 1 til 4.

Matriks-bærerkonjugater er i stand til å danne multimere "gittere". Et slikt gitter er representert i figuren nedenfor. Begrepet "gitter" blir benyttet for å betegne et kovalent koblet kompleks, som omfatter multiple matrikser, haptener, koblere og bærerproteiner, alle som er kovalent koblet sammen. Fordi den nikotin-substituerte matriksen omfatter multiple nikotinenheter som er tilgjengelige for konjugering med en bærer, kan et gitter som omfatter multiple bærere og

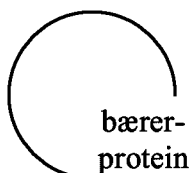
multiple nikotin-substituerte matrikser bli dannet. En forenklet representasjon av en del av et slikt gitter er representert som følger:



En person med kunnskaper i faget vil se at gitteret i henhold til den foreliggende oppfinnelsen omfatter et haptenbærerkonjugat med formel (III).

Denne konjugeringsmetoden benytter en matriks som gir fleksibilitet og kontroll over hapten til proteinmolare forhold, uavhengig av antallet av funksjonelle grupper som er tilgjengelige for konjugering på proteinet. Dette er spesielt nyttig når et spesifikt bærerprotein er blitt benyttet, og når et optimalt forhold må oppnås for å oppnå høyere immunogenitet av konjugatet. Mens det ikke er nødvendig å benytte en når man benytter en matriks, kan en slik kobler bli benyttet. For å anvende en kobler med denne utformingen blir den nikotinsubstituerte matriksen reagert med en aktiv koblerforbindelse. For eksempel ADH, adipinsyredihydrazid, kan bli benyttet som en kobler med matrikskonjugatene.

Straks nikotinhaptenet har blitt fremstilt blir det deretter konjugert til et bærerprotein som vil bli benyttet for å danne (raise) antistoffer mot nikotinbærerkonjugatet. Bærerproteinet som benyttes i det foreliggende oppfunne nikotinbærerkonjugatet er representert



i formel (I) og (III), og omfatter et hvilket som helst passende immunogent protein eller polypeptid. Et "immunogent molekyl" er et som er i stand til å utløse en immunrespons. Fortrinnsvis vil bærerproteinene omfatte en T-celleepitope. Også omfattet av representasjonen av et "bærerprotein" er MAP'er eller multi-antigene peptider, som er forgrenede peptider. Ved å benytte et MAP, blir haptentettheten og valensen maksimert som følge av multiple forgrenede aminosyrerester. Eksempler på aminosyrer som kan bli benyttet for å danne et MAP inkluderer, men er ikke begrenset til, lysin.

Et bærerprotein i henhold til den foreliggende oppfinnelsen omfatter et molekyl som inneholder minst en T-celleepitop som er i stand til å stimulere T-celler i subjektet, som deretter induserer B-celler til å produsere antistoffer mot hele haptensbærerkonjugatmolekylet. Begrepet "epitope" som benyttet for å beskrive denne oppfinnelsen, inkluderer en hvilken som helst determinant eller antigen som er ansvarlig for sin spesifikke interaksjon med et antistoffmolekyl.

Epitopiske determinanter består vanligvis av kjemisk aktive overflategrupperinger av molekyler så som aminosyrer eller sukker-sidekjeder, og har spesifikke tredimensjonale strukturelle karakteristika, så vel som spesifikke ladningskarakteristika. Det er antatt at for å ha immunogene egenskaper må et protein eller polypeptid være i stand til å stimulere T-celler. Imidlertid er det mulig at et bærerprotein som mangler en T-celleepitope også kan være immunogent.

Ved å velge ut et bærerprotein som er kjent for å utløse en sterk immunogen respons, kan en populasjon med forskjellige pasienter bli behandlet ved hjelp av de oppfunne haptensbærerkonjugatene. Bærerproteinene må være tilstrekkelig fremmed for å utløse en sterk immunrespons på vaksinen. Vanligvis vil bærerproteinene som blir benyttet fortrinnsvis være et stort molekyl som er i stand til å gi immunogenitet til et kovalent koblet haptent. Et spesielt foretrukket bærerprotein er et som er naturlig godt immunogent. Således har et bærerprotein som har høy grad av immunogenitet og er i stand til å maksimere antistoffproduksjon til haptentet svært ønskelig.

Både bovint serum albumin (BSA) og nøkkelhull albuskjell hemocyanin (KLH) har vanligvis blitt benyttet som bærere i utviklingen av konjugatvaksiner når det har vært eksperimentert med dyr. Imidlertid er disse proteinene muligens ikke passende for human anvendelse. Proteiner som er blitt benyttet i fremstillingen

av terapeutiske konjugatvaksiner inkluderer, men er ikke begrenset til, et antall av toksiner av patogene bakterier og deres toksoider. Eksempler inkluderer difteri og tetanustoksiner og deres medisinsk akseptable korresponderende toksoider. Andre kandidater er proteiner som antigenmessig sett er lignende til bakterietoksiner referert til som kryss-reagerende materialer (CRM'er).

I fremstillingen av nikotinkonjugat farmasøytiske sammensetninger kan rekombinant *Pseudomonas aeruginosa* eksoprotein A (rEPA) bli benyttet som et bærerprotein fordi dets struktur og biologiske aktiviteter har blitt godt karakterisert. Videre har dette rekombinante proteinet blitt benyttet med suksess og sikkerhet i mennesker i *Staphylococcus aureus* kapsel polysakkaridkonjugatvaksiner ved Nasjonalt Institutt for Helse, og av de foreliggende oppfinnerne. Fattom et al., *Infec. Immun.*, 61, 1023-1032 (1993). Dette proteinet har blitt identifisert som en passende proteinbærer fordi den indre enzymatiske aktiviteten til det native eksotoksinet har blitt eliminert som en følge av en aminosyredelesjon ved posisjon 553. Som et resultat har rEPA den samme immunologiske profilen som det native eksotoksin A (ETA), men viser ikke de levertoksiske egenskapene til det native ETA. Som benyttet i denne søknaden, refererer "eksoprotein A" seg til et modifisert, ikke-levertoksisk ETA. Et eksempel på et slikt eksoprotein A har en aminosyredelesjon ved posisjon 553.

Det er et stort antall med funksjonelle grupper som kan bli benyttet for å forenkle koblingen eller konjugeringen av en bærer til et lite molekyl, så som et haptent. Disse inkluderer funksjonelle enheter så som karboksylsyrer, anhydrider, blandede anhydrider, acylhalider, acylazider, alkylhalider, N-maleimider, iminoestere, isocyanater, aminer, tioler og isotiocyanater og andre kjent for personer med kunnskaper i faget. Disse enhetene er i stand til å danne en kovalent binding med en reaktiv gruppe av et proteinmolekyl. Avhengig av den funksjonelle enheten som benyttes kan den reaktive gruppen være ϵ -aminogruppen på en lysinrest eller en tiolgruppe, på et bærerprotein eller et modifisert bærerproteinmolekyl som, når det blir reagert, resulterer i amid, amin, tioeter, amidinurea eller tiourea bånddannelse. En person med kunnskaper i faget vil se at andre egnede aktiveringsgrupper og konjugeringsteknikker kan bli benyttet. Se for eksempel Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press, Inc. (1991). Se også Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: 1996 og Dick og Beurret i *Conjugate Vaccines. Contribu. Microbiol. Immunol.*, Karger, Basel (1989) vol. 10, 48-114.

Lineære koblingsenheter er foretrukket, over sykliske eller forgrenede koblere, for konjugering av haptener til bærerproteiner. En foretrukket kobler er en

succinylenhet. Imidlertid kan en kobler være en syklisk struktur så vel som en lineær enhet. Andre eksempler på koblere er ADH.

Således blir nikotinhaptenbærerkonjugatene i henhold til den foreliggende oppfinnelsen fremstilt ved å reagere ett eller flere haptener med et bærerprotein for å gi et haptenbærerkonjugat som er i stand til å stimulere T-celler, føre til T-celleproliferasjon og frigivelse av mediatorer som aktiverer spesifikke B-celler for å stimulere antistoffproduksjon som respons på det immunogene haptenbærerkonjugatet. Visse antistoffer dannet i respons på haptenbærerkonjugatet vil være spesifikke for haptendelen av haptenbærerkonjugatet. Den foreliggende oppfinnelsen omhandler anvendelsen av forskjellige egnede kombinasjoner av haptener som bærerproteiner for anvendelse i behandlingen av nikotinavhengighet.

Teknikker for å lage monoklonale antistoffer er godt kjent i faget. Monoklonale antistoffer kan bli oppnådd ved å injisere mus med en sammensetning som omfatter nikotinhaptenbærerkonjugatet, deretter å verifisere nærværet av antistoffproduksjon ved å fjerne en serumprøve, og å fjerne milten for å oppnå B-lymfocytter, og fusjonere B-lymfocytterne med myelomceller for å produsere hybridomer, å klonere hybridomene, å velge positive kloner som produserer antistoffer mot haptenbærerkonjugatet, å dyrke klonene som produserer antistoffer mot antigenet og å isolere antistoffene fra hybridomkulturene.

Monoklonale antistoffer kan bli isolert og rensset fra hybridomkulturer ved en rekke godt etablerte teknikker. Slike isolerte teknikker inkluderer affinitetskromatografi med protein-A sefarose, størrelseseksklusionskromatografi og ionutbytterkromatografi. Se for eksempel Coligan sider 2.7.1-2.7.12 og sidene 2.9.1-2.9.3. Se også Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", i *Methods in Molecular Biology*, col. 10, sidene 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992).

Teknikker for å fremstille polyklonale antistoffer også godt kjent i faget. Polyklonale antistoffer blir fremstilt i henhold til standard teknikker som er kjent i faget. For å fremstille et polyklonalt antistoff blir dyr injisert med det immunogene materialet og antistoffrikt serum blir samlet som inneholder en blanding av antistoffer som er direkte rettet mot ulike epitoper av immuno-genet som blir injisert. Egnede vertspattedyr for produksjonen av antistoffer inkluderer, men er ikke begrenset til, mennesker, rotter, mus, kaniner og geiter.

I samsvar med den foreliggende oppfinnelsen kan funksjonelle antistofffragmenter også bli benyttet. Disse fragmentene blir fremstilt ved metoder som inkluderer fordøyning med enzymer så som pepsin og papain og/eller kløyving av disulfidbindinger ved kjemisk reduksjon. Alternativt kan

antistofffragmenter som er omfattet av den foreliggende oppfinnelsen bli syntetisert ved å benytte en automatisert peptidsyntetiserer, slik som de som er kommersielt tilveiebrakt av Applied Biosystems, Multiple Peptide Systems og andre, eller de kan bli fremstilt manuelt ved å benytte teknikker som er velkjente i faget. Se Geysen et al., J. Immunol. Methods 102: 259 (1978). Direkte bestemmelse av aminosyresekvenser i de variable regionene til de tunge og lette kjedene til de monoklonale antistoffene i henhold til den foreliggende oppfinnelsen, kan bli utført ved å benytte tradisjonelle teknikker.

Et fragment i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan være et Fv-fragment. Et Fv-fragment av et antistoff er laget av den variable regionen på den tunge kjeden (Vh) av et antistoff og den variable regionen til den lette kjeden til et antistoff (Vl). Proteolytisk kløyving av et antistoff kan fremstille dobbeltkjedede Fv-fragmenter der Vh og Vl-regionene forblir ikke-kovalent assosiert og beholder antigenbindingskapasitet. Fv-fragmenter inkluderer også rekombinante enkeltkjedede antistoffmolekyler, der lette- og tunge kjede variable regioner er koblet sammen ved en peptidkobler. Se Skerra et al., Science, 240, 1038-41 (1988). Antistofffragmenter i henhold til den foreliggende oppfinnelsen inkluderer også Fab, Fab', F(ab)₂ og F(ab')₂, som mangler Fc-fragmentet til et intakt antistoff.

Fordi nikotin utviser mange av sine signifikante effekter etter at det har krysset blod-hjernebarrieren, åpner den foreliggende oppfinnelsen for terapeutiske fremgangsmåter som hindrer nikotin i å krysse blod-hjernebarrieren. Spesielt vil administrering av et nikotinnikotinhapten-bærerkonjugat til en pasient generere antistoffer mot nikotin i blodstrømmen til pasienten. Alternativt kan antinikotinantistoffer generert på utsiden av kroppen til pasienten som skal behandles, som er generert i et passende vertspattedyr, bli administrert til pasienten. Dersom pasienten røyker vil nikotinet i hans blod bli bundet til de sirkulerende antinikotinantistoffene, og hindre nikotin i å nå hjernen. Derfor vil antistoffene hindre de fysiologiske og psykologiske effektene av nikotin som oppstår i hjernen. Fordi røykeren vil erfare en minsking eller opphøring av disse effektene vil han/hun miste sin lyst til å røyke. De samme terapeutiske effektene er antatt å finne sted dersom en pasient benytter røykfri tobakk, etter å ha blitt immunisert med et nikotinhaptenbærerkonjugat i henhold til den foreliggende oppfinnelsen. I tillegg kan konjugatene og antistoffene i den foreliggende oppfinnelsen utøve sin effekt ved å påvirke evnen nikotin har til å stimulere det perifere nervesystemet.

Som diskutert over, bevarer de nye nikotinbærerkonjugatene i den foreliggende oppfinnelsen den native kiraliteten og strukturen til nikotinmolekylet. Spesielt har nikotinenheten til disse konjugatene (S)-(-)-konfigurasjonen. Derfor vil

antistoffene produsert som respons på et slikt konjugat være spesifikke for den native formen av nikotin, og vil være det mest effektive i spesifikk binding til nikotin som blir inhalert fra røyking eller absorbert fra røykfri tobakk, og i å inhibere effektene av denne inntatte nikotinen. I tillegg er de oppfunne konjugatene kjemisk stabile, og stabilitet er kritisk for å fremstille en vaksine som har en lang holdbarhet.

Den foreliggende vaksinesammensetningen kan bli benyttet i kombinasjon med forbindelser eller andre terapier som er nyttige i behandlingen av avhengighet. Dette inkluderer administrering av forbindelser som inkluderer, men ikke er begrenset til, anti-depressive medikamenter så som Zyban og Prozac.

Konjugatene i den foreliggende oppfinnelsen er egnet for å behandle og å hindre nikotinavhengighet. For å behandle nikotinavhengighet blir et nikotinbærerkonjugat i henhold til den foreliggende oppfinnelsen, administrert til en pasient som lider av nikotinavhengighet. For å hindre nikotinavhengighet blir pasienter med risiko for å utvikle nikotinavhengighet, så som tenåringer, behandlet med et konjugat i henhold til den foreliggende oppfinnelsen. Direkte administrering av konjugatet til en pasient er kalt "aktiv immunisering".

En vaksinesammensetning i henhold til den foreliggende oppfinnelsen omfatter minst ett nikotinhaptenbærerkonjugat i en mengde som er tilstrekkelig til å utløse en immunrespons mot dette. Nikotinhaptenbærerkonjugatet er i stand til å forbli in vivo ved en konsentrasjon som er tilstrekkelig til å være aktiv mot påfølgende inntak av nikotin.

Initiell vaksinerings med nikotinhaptenbærerkonjugatet i henhold til den foreliggende oppfinnelsen danner høye titer med antistoffer som er spesifikke for nikotin. Den terapeutisk effektive mengden av et konjugat som blir administrert til en pasient med behov for behandling for nikotinavhengighet, er enkelt å bestemme for en fagperson. Passende doseområder er 1-1000 µg/dose. Generelt tar det en pasient en til flere uker å generere antistoffer mot et fremmed antigen. Produksjonen av antistoffer i en pasients blod kan bli overvåket ved å benytte teknikker som er velkjente for fagpersoner, så som ELISA, radioimmunoassay og Western blot-metoder. Terapeutisk effektivitet kan også bli overvåket ved å vurdere ulike fysiske effekter av nikotin, så som blodtrykk.

Som beskrevet i detalj nedenfor, kan de oppfunne nikotinhaptenbærerkonjugatene bli prosessert for å oppnå en sammensetning som enkelt kan bli administrert til en pasient. De foretrukne måtene for administrering inkluderer, men er ikke begrenset til, intranasalt, intratrakealt, oralt, dermalt, transmukosal subkutan injeksjon og intravenøs injeksjon. Fagpersoner vil se at den initielle injeksjonen kan bli etterfulgt av en påfølgende administrering av en eller flere

"forsterkninger" av konjugatet. En slik forsterkning vil øke produksjonen av antistoffer mot nikotinhaptenbærerkonjugatet i henhold til den foreliggende oppfinnelsen.

Vaksinesammensetningene i den foreliggende oppfinnelsen kan inneholde minst ett adjuvans. Adjuvanset benyttet i den foreliggende oppfinnelsen vil bli valgt slik at effekten av bærerproteinet ikke blir inhibert. Adjuvanser benyttet i den foreliggende oppfinnelsen er de som er fysiologisk akseptable for mennesker, disse inkluderer, men er ikke begrenset til, alum, QS-21, saponin og MPLA (monofosforyl lipid A).

Vaksinesammensetningene i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan eventuelt inneholde en eller flere farmasøytisk akseptable tilsetningsstoffer. Tilsetningsstoffene som er nyttige i det foreliggende inkluderer sterilt vann, saltløsninger så som salt (saline), natriumfosfat, natriumklorid, alkohol, gummi arabikum, vegetabilske oljer, benzylalkoholer, polyetylenglykol, gelatin, mannitol, karbohydrater, magnesiumstearat, viskøs parafin, fettsyreestere, hydroksymetylcellulose og buffere. Selvfølgelig kan et hvilket som helst tilsetningsstoff som er kjent for fagpersoner bli benyttet i den foreliggende oppfinnelsen.

Haptenbærerkonjugatene i henhold til den foreliggende oppfinnelsen er, for å kunne bli administrert til en pasient med behov for behandling eller forhindring av nikotinavhengighet, inkorporert i en farmasøytisk sammensetning. Når sammensetningen som inneholder haptenbærerkonjugatet skal benyttes for injeksjon, er det fordelaktig å løse opp haptenbærerkonjugatet i en vandig saltløsning og ved en farmasøytisk akseptabel pH. Imidlertid er det mulig å anvende en injiserbar suspensjon av haptenbærerkonjugatet. I tillegg til de vanlig farmasøytisk akseptable tilsetningsstoffene kan sammensetningen inneholde eventuelle komponenter for å sikre renhet, øke biotilgjengelighet og/eller øke penetrasjon.

I tillegg kan vaksinesammensetningen eventuelt inneholde minst ett hjelpeagens, så som dispersjonsmedium, beleggende agens, mikrosfærer, liposomer, mikrokapsler, lipider, overflateaktive stoffer, smøremidler, konserveringsmidler og stabilisatorer. Selvfølgelig kan et hvilket som helst ytterligere hjelpeagens kjent for fagpersoner bli benyttet i den foreliggende oppfinnelsen. Også nyttig heri er et hvilket som helst agens som virker synergistisk på effekten til den foreliggende vaksinesammensetningen.

Den farmasøytiske sammensetningen i henhold til den foreliggende oppfinnelsen er steril og tilstrekkelig stabil til å kunne lagres, distribueres og anvendes. I tillegg kan sammensetningen inneholde ytterligere komponenter for å beskytte

sammensetningen fra angrep av og vekst av mikroorganismer. Det er foretrukket at sammensetningen blir fremstilt i form av et lyofilisert pulver som blir rekondisjonert med et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel rett før administrering. Fremgangsmåter for å fremstille sterile injiserbare løsninger er velkjent for personer med kunnskaper i faget og inkluderer, men er ikke begrenset til, vakuumbørking, frysetørking og spinntørking. Disse teknikkene gir et pulver av den aktive bestanddelen sammen med et hvilket som helst ytterligere tilsetningsstoff inkorporert inn i forblendingen.

Passiv immunisering omfatter administrering av eller eksponering for et polyklonalt antistoff eller monoklonalt antistoff som har blitt fremstilt som respons på et nikotinhaptenbærerkonjugat i henhold til den foreliggende oppfinnelsen. Slike antistoffer kan bli generert i dyr eller mennesker. Antistoffer fremstilt som respons på et nikotinkonjugat i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan bli administrert for å hindre avhengighet for nikotin. For eksempel kan slike antistoffer bli administrert til mennesker som antas å ha en risiko for å utvikle avhengighet for nikotin, så som tenåringer. Antistoffer er også egnede for å behandle en pasient som er avhengig av nikotin. Som diskutert over, vil antistoffene binde nikotin i blodet og hindre nikotin fra å krysse blod-hjernebarrieren. Antistoffer fremstilt ved administrering av det oppfunne haptenbærerkonjugatet har en molekylvekt som er i området fra omkring 150 kDa til omkring 100 kDa.

Den terapeutisk effektive mengden av et terapeutisk antistoff i henhold til den foreliggende oppfinnelsen, som blir administrert til en pasient med behov for behandling for nikotinavhengighet, blir enkelt bestemt av en fagperson. Passende doser varierer fra 1-1000 µg/dose.

En terapeutisk sammensetning omfatter i det minste antistoffer fremstilt som respons på et nikotinbærerkonjugat i henhold til den foreliggende oppfinnelsen. Sammensetningene kan eventuelt inneholde ett eller flere farmasøytisk akseptable tilsetningsstoffer. Tilsetningsstoffene som er nyttige inkluderer sterilt vann, saltløsninger som salt, natriumfosfat, natriumklorid, alkohol, gummi arabikum, vegetabilsk olje, benzylalkohol, polyetylenglykol, gelatin, mannitol, karbohydrater, magnesiumstearat, viskøs parafin, fettsyreestere, hydroksymetylcellulose og buffere. Selvfølgelig kan et hvilket som helst annet ytterligere tilsetningsstoff som er kjent for personer med kunnskaper i faget også bli benyttet.

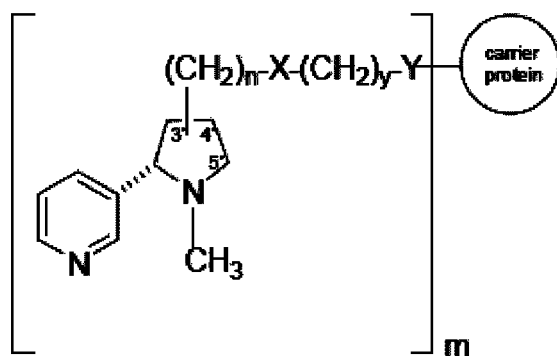
Antistoffene i den foreliggende oppfinnelsen er, for å bli administrert til en pasient med behov for behandling eller hindring av nikotinavhengighet, inkorporert i en farmasøytisk sammensetning. Når sammensetningen som inneholder et antistoff blir benyttet for injeksjon, er det fordelaktig å ha

antistoffet i en vandig saltløsning med en farmasøytisk akseptabel pH. Imidlertid er det mulig å anvende en injiserbar suspensjon av antistoffet. I tillegg til de vanlig farmasøytisk akseptable tilsetningsstoffene kan sammensetningen inneholde eventuelle komponenter for å sikre renhet, øke biotilgjengelighet og/eller øke penetrasjon.

En farmasøytisk sammensetning som omfatter et antistoff i henhold til den foreliggende oppfinnelsen er sterilt og er tilstrekkelig stabilt til å motstå lagring, distribuering og anvendelse. I tillegg kan sammensetningen inneholde ytterligere komponenter for å beskytte sammensetningen fra infiltrasjon med og vekst av mikroorganismer. Fremgangsmåter for å fremstille sterile injiserbare løsninger er velkjente for personer med kunnskaper i faget og inkluderer, men er ikke begrenset til, vakuumbørking, frysetørking og spinntørking. Disse teknikkene gir et pulver med den aktive bestanddelen sammen med et hvilket som helst ytterligere tilsetningsstoff inkorporert i forblandingen.

Antistoffene i den foreliggende oppfinnelsen er også nyttige for å fremstille et sett som kan bli benyttet for å påvise og kvantifisere nikotinnivåer i en prøve. Et sett i henhold til den foreliggende oppfinnelsen omfatter et nikotinspesifikt antistoff i henhold til oppfinnelsen i en egnet beholder. For et radioimmunoassay, kan settet også omfatte merket nikotin. Nikotin i en prøve blir påvist ved å binde merket nikotin til antistoffet og deretter la det merkede nikotinet konkurrere med antistoffet i prøven som skal testes. Et ELISA-sett vil også omfatte et antistoff i henhold til den foreliggende oppfinnelsen. ELISA kan involvere inhibisjon av antistoffbinding med kjente mengder av nikotin sammenlignet med inhibisjon med en prøve som er antatt å inneholde nikotin. Dette vil tillate bestemmelse av ukjent nikotin i en prøve, ved sammenligning av prøve med standard inhibisjonskurve for kjent nikotinkonsentrasjon. I en annen type av ELISA vil en prøve som er mistenkt for å inneholde nikotin bli inkubert med en mikrotiterplate som har blitt belagt med en substans som vil binde nikotin. Antistoffene i den foreliggende oppfinnelsen vil bli tilsatt, og enzymkoblet anti-stoff antistoffer vil bli tilsatt til platene. Tilsetting av substrat vil kvantifisere mengden av nikotin bundet til platen.

Således gjelder dermed foreliggende oppfinnelse et haptensbærerkonjugat med den følgende formelen



der m er 1 til 2500,

n er 0 til 12,

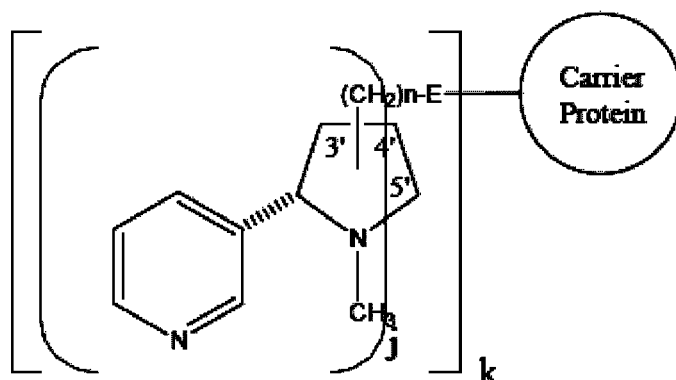
y er 1 til 12,

X er valgt fra gruppen som består av NH-CO, CO-NH, CO-NH-NH, NH-NH-CO, NH-CO-NH, CO-NH-NH-CO og S-S;

Y er valgt fra gruppen som består av NH-CO, CO-NH, CO-NH-NH, NH-NH-CO, NH-CO-NH, CO-NH-NH-CO og S-S,

og $-(CH_2)_n-X-(CH_2)_y-Y$ -enheten er bundet til 3', 4' eller 5' posisjonen på nikotin.

I tillegg gjelder oppfinnelsen et haptentbærerkonjugat med den følgende formelen:



der n er 0-12, j er 1-1000, k er 1-20 og E er en aminosyreinnholdende matriks.

Også omfattet av oppfinnelsen er et antistoff som er fremstilt som en respons på haptentbærerkonjugatet ifølge oppfinnelsen, og et funksjonelt fragment av antistoffet.

I tillegg gjelder oppfinnelsen et sett for å bestemme nærværet av nikotin i en prøve, der settet omfatter et antistoff eller et funksjonelt fragment derav i henhold til oppfinnelsen.

Også omfattet av foreliggende oppfinnelse er en fremgangsmåte for å fremstille et antistoff, som omfatter å immunisere et vertspattedyr med haptenerkonjugatet ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen gjelder også en vaksinesammensetning som omfatter minst ett haptenerkonjugat ifølge oppfinnelsen.

Videre gjelder oppfinnelsen et haptenerkonjugat ifølge oppfinnelsen, eller et antistoff eller et funksjonelt fragment derav ifølge oppfinnelsen for anvendelse som et medikament, for hindringen eller behandlingen av nikotinavhengighet, og utførelsesformer der medikamentet ytterligere omfatter en forbindelse som er nyttig i behandlingen av nikotinavhengighet.

Endelig vedrører foreliggende oppfinnelse anvendelse av et haptenerkonjugat ifølge oppfinnelsen eller et antistoff eller et funksjonelt fragment derav ifølge oppfinnelsen, for fremstillingen av et medikament for behandlingen eller hindringen av nikotinavhengighet, og anvendelse av haptenerkonjugat ifølge oppfinnelsen for fremstillingen av et medikament, der medikamentet ytterligere omfatter en forbindelse som er nyttig i behandlingen av nikotinavhengighet.

De følgende eksemplene er tilveiebrakt kun for ytterligere å illustrere fremstillingen og anvendelsen av den foreliggende oppfinnelsen. Omfanget ved oppfinnelsen er ikke begrenset til de følgende eksemplene.

Eksempel 1 - Syntese av et avledet nikotinhapten (substituert ved 3'-posisjonen)

Utgangsmaterialet for syntesen av haptenet er trans-4'-karboksy-(-)-kotlinin, tilgjengelig fra kommersielle kilder. En modifikasjon av fremgangsmåten beskrevet av Cushman og Castagnoli, Jr. (1972) J. Org. Chem. 37(8): 1268-1271 tilveiebringer alkoholen, trans-3'-hydroksymetyl-(-)-nikotin, etter metylesterifisering av syren etterfulgt av reduksjon av esteren. Alkoholen blir deretter sulfonert og sulfonatet blir erstattet med en azidogruppe, som endelig blir redusert til et amin.

4 g av trans-4'-karboksy-(-)-kotlinin blir løst opp i 50 ml av en løsning med 2 N svovelsyre i tørr metanol og rørt over natten ved romtemperatur. Den resulterende suspensjonen blir filtrert gjennom et Whatman nr. 1 filterpapir og blir tilsatt sakte til 100 ml med en mettet løsning av natriumbikarbonat. Esteren

bli ekstrahert med diklormetan for å gi 4,2 g av en rosa olje etter løsningsmiddelfordamping.

En løsning av 3,9 g av esteren i tørr tetrahydrofuran (100 ml) blir tilsatt dråpevis til en løsning med 4 ekvivalenter av litiumaluminiumhydrid i tørr tetrahydrofuran (70 ml) under tørr argon. Suspensjonen blir rørt i to timer ved romtemperatur. Overskuddshydrid blir ødelagt ved forsiktig og kontrollert tilsetning av vann mens det er kjølt ned i et isbad. Det resulterende hvite presipitatet blir filtrert vekk, og filtratet tørket over natriumsulfat og konsentrert under redusert trykk for å gi 2,7 g av alkoholen som en gul olje.

Alkoholen (1,9 g) blir løst opp i 20 ml med diklormetan. Trietylamin (0,75 ml) og p-toluensulfonylchlorid (1 g) blir deretter suksessivt tilsatt til løsningen. Den oransje løsningen blir rørt i 24 timer ved romtemperatur. Presipitert trietylaminsaltsyre blir filtrert vekk på en celiteseng, og filtratet blir konsentrert under redusert trykk for å gi en brun olje. Sulfonatet blir rensset på en silika flashkromatografikolonne, eluert med 5 % metanol i diklormetan for å gi 2,1 av en gul olje.

Sulfonatet (1,8 g) blir erstattet ved å benytte natriumazid (0,8 g) i 50 ml dimetylformamid i 1 time ved 80°C. Etter fordamping av dimetylformamid under høyt vakuum blir resten løst opp i diklormetan, vasket med vann og saltløsning og tørket over natriumsulfat. Etter løsningsmiddelfordamping blir azidet (1,1 g) oppnådd som en brunaktig olje.

Tilsetningen av azidet i tørr tetrahydrofuran (20 ml) til en suspensjon av litiumaluminiumhydrid i tørr tetrahydrofuran (50 ml), ga enkelt det ønskede aminet monitorert ved tynnsjikt-kromatografi. Proton og karbonkjerne-magnetisk resonansspektra for det rensede aminet korresponderte til den antatte strukturen.

Eksempel 2 - Syntese av et avledet niktotinhapten (substituert ved 4'-posisjonen)

Introduksjon av en funksjonalisert arm på posisjon 4' til nikotin kan bli oppnådd ved enolalkylering av kotinin, etterfulgt av reduksjon av det alkylerte produktet. Ulike alkylerende agens kan bli benyttet som et passende beskyttet 3-brom-propylamin. Som eksempler kan 3-brom-N-karbobenzyloksy-propylamin eller N-(3-brompropyl)-ftalamid bli benyttet. Den aminbeskyttende gruppen vil måtte fjernes etter alkylering og reduksjon, og før konjugering til et bærerprotein. Enolalkylering av sykliske laktamer (som inneholder pyrrolidinringen) er godt dokumentert i litteraturen (se G. Helmchen et al. 81995) Stereoselective Synthesis in Houben-Weyl-Methods of Organic Chemistry, Vol E21a, 762-881, Thieme, Stuttgart, Tyskland, for generelt overblitt og A.J.

Meyers et al. (1997) J. Am. Chem. Soc., 119, 4564-4566 for steriske vurderinger av reaksjonen). Det er også noen eksempler på enolalkylering av kotinin selv (N.-H. Lin et al. (1994) J. Med. Chem., 37, 3542-3553). En interessant preparering av 4'-acetyl-nikotin, som en 1:1 blanding av to epimerer, ble oppnådd ved å benytte en tandem kationisk aza-Cope rearrangerings Mannich sykliseringsreaksjon ved å starte fra et keton (eller et aldehyd) og et 2-alkoksy-3-alkenamin (L.E. Overman (1983) J. Am. Chem. Soc., 105, 6622-6629). Denne reaksjonen kan bli utvidet til å fremstille 4'-aldehyd-nikotin egnet for konjugering.

3-brom-propylaminhydrobromid (4,2 g) ble suspendert i 50 ml diklormetan og trietylamin (omkring 7 ml) ble tilsatt inntil en klar løsning ble oppnådd. Løsningen ble kjølt ned til 0°C og benzykloroformat (2,5 ml) ble tilsatt dråpevis. Reaksjonen ble tillatt å fortsette ved romtemperatur i 16 timer under røring. De presipiterte saltene ble filtrert vekk, og det klare organiske laget ble vasket med kaldt vann, kaldt 1 N HCl og kaldt vann, tørket på natriumsulfat og fordampet under redusert trykk til en gul olje (2,93 g av råmateriale).

Kotinin (62 mg) og 3-brom-N-karbobenzyloksy-propylamin (100 mg) ble separat ko-fordampet med tørr toluen. Kotinin ble løst opp i 5 ml med frisk destillert vannfri tetrahydrofuran, 60 µl med N,N,N',N'-tetrametylendiamin (TMEDA) ble tilsatt og løsningen ble kjølt ned til -78°C ved nedsenking i et etanol-tørrisbad. Kotininløsningen ble tilsatt dråpevis til en løsning med litium diisopropylamid (LDA, 200 µl av 2 M løsning i heptan-tetrahydrofuran) i tetrahydrofuran, tidligere kjølt ned til -78°C. Den oransje blandingen ble rørt i 15 minutter ved -78°C og deretter fikk den stå og varme seg opp på et isbad (2 til 6°C). Reaksjonen ble deretter kjølt ned igjen til -78°C, og 3-brom-N-karbobenzyloksy-propylamin ble løst opp i vannfri tetrahydrofuran ble tilsatt dråpevis i 15 minutter. Reaksjonsblandingens fikk stå og varme seg opp til -10°C, og deretter ble den undertrykket med metanol. Reaksjonsproduktet ble rensert ved flashkromatografi på silikagel-kolonne. Reduksjon av amidet av dette kotininderivatet ble oppnådd med boran etterfulgt av cesiumfluorid i varm etanol. Det endelige aminet ble oppnådd etter fjerning av karbobenzyloksygruppen i sure betingelser.

Eksempel 3 - Syntese av et avledet nikotinhapten (substituert ved 5'-posisjonen)

Introduksjon av en funksjonalisert arm på posisjon 5' til nikotin kan bli oppnådd ved å reagere passende beskyttet alkyl-litiumforbindelser med kotinin, etterfulgt av reduksjon med natriumcyanoborhydrid, i fremgangsmåter som er lignende de

som er beskrevet av Shibagaki et al. (1986) Heterocycles, 24, 423-428 og N.-H. Lin et al. (1994) supra.

Eksempel 4 - Konjugering av et avledet nikotinhapten til et bærerprotein

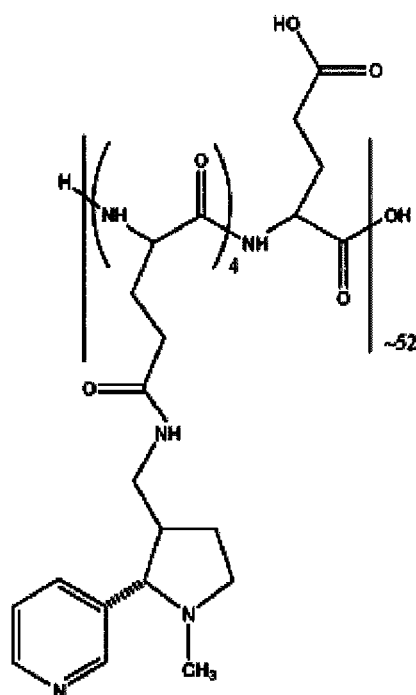
Rekombinant eksoprotein A (rEPA) er koblet til det derivatiserte nikotinhaptenet gjennom en succininsyream. De 15 lysinene i rEPA ble enkelt succinylert med succininanhydrid. Deretter i en typisk konjugerings-reaksjon, ble en 5 til 10 mg/ml løsning med det succinylerte rekombinante eksoprotein A (Suc-rEPA) i en 2-(N-morfolino)etansulfonsyre (MES) buffer 0,05 M som inneholdt 0,15 M NaCl ved pH 6,0, fremstilt. En tilsvarende vekt med 3'-aminometyl(-)-nikotin (3'AMNic) hapten oppløst i en minimal mengde med destillert vann ble tilsatt til proteinløsningen. pH på haptenløsningen ble justert til 6,0 med 0,1 N HCl før tilsetning. Til sist ble en tilsvarende vekt med 1-etyl-3-(3-diethylamino)propylkarbodiimidsaltsyre (EDC) tilsatt til haptenproteinblandingen, og reaksjonen fortsatte i 30 minutter ved romtemperatur under røring. Det derved oppnådde nikotin-konjugatet ble rensert på en Sephadex G-25 kolonne eluert med fosfatbufret saltløsning (PBS) ved pH 7,4. Konjugatgjenvinninger var i området 80 til 90 %.

Eksempel 5 - Konjugering av nikotinlastet matriks

Dette eksemplet beskriver syntesen av et haptenbærerkonjugat som omfatter 3'-aminometyl(-)-nikotin som et derivatisert hapten, rekombinant eksoprotein A (rEPA) som et bærerprotein, adipinsyredihydrazid (ADH) som en kobler og poly-L-glutaminsyre som en "matriks", eller polymer støtte for haptenet.

En poly-L-glutaminsyre som har en gjennomsnittlig molekylvekt på 39900 med en polydispersitet på 1,15 og en grad av polymerisering på 264 ble benyttet i dette eksemplet. De reagerende mengdene av hapten og polymer ble beregnet slik at målgraden av substitusjon er omkring 80 %. Det vil si at når 80 % substitusjon er nådd, var omkring 208 hapteneheter konjugert, av totalt 264 repeterte enheter i et gjennomsnittlig molekyl av glutaminsyre-polymeren.

Denne nikotinlastede poly-L-glutaminsyren har den følgende formelen:



Som indikert på figuren, omfatter polyglutaminsyrepolymere omkringing 52 glutaminrester. Dette antallet vil variere avhengig av produksjonsserien og kilden for polyaminosyrerestene valgt for matriksen. Figuren indikerer også fire nikotinhaptener for hver repeterende enhet. Dette antallet vil variere avhengig av forholdet av reaktanter som benyttes når matriksen og nikotinhaptenet er konjugert.

Etter konjugeringen med det derivatiserte nikotinet blir de ureagerte karboksylgruppene (omkring 20 %) deretter derivatisert med ADH. Når denne matriksen ble konjugert til en bærer, som beskrevet i eksempel 6, var det molare forholdet av nikotinlastet matriks til protein 1:1. Således, i dette konjugatet, vil det teoretiske nikotinhapten til proteinmolare forholdet være 200:1, ved slutten av konjugeringsreaksjonen.

Det faktiske forholdet av nikotinsubstitusjon på polyglutaminsyren ble estimert ved å benytte NMR-analyse av produktet. Intensiteten av glutaminsyre α -hydrogentoppen relativ til de fire hydrogenene i pyridinringen på nikotin tilveiebringer andelen med nikotin inkorporert. Det estimerte gjennomsnittlige forholdet var 143:1 (nikotin/bærerprotein).

Eksempel 6 - Fremstilling av nikotinkonjugatvaksine ved å benytte nikotinlastet matriks

A. Lasting av nikotinhapten på matriksen

10 mg av poly-L-glutaminsyresalt (Sigma, Cat nr. P-4761) ble løst opp i 2 ml med 0,05 M 2-(N-morfolin)etansulfonsyre (MES) buffer som inneholdt 0,15 M NaCl ved pH 6,0. 10 mg av 3'-aminometyl(-)-nikotin ble løst opp i en minimal mengde av destillert vann, og pH på løsningen ble justert til pH 6,0 med 0,1 N HCl. Nikotinhaptenløsningen ble tilsatt dråpevis til polypeptidløsningen under røring og ble deretter justert til pH 6,0. 20 mg med fast 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimidsaltsyre (EDC) ble deretter tilsatt i tre porsjoner til haptenpolypeptidblandingen over en periode på 20 minutter. Reaksjonen ble tillatt å fortsette i 1 time ved romtemperatur. Reaksjonsproduktet (nikotinsubstituert matriks) ble dialysert mot tre endringer med vann og lyofilisert. 12 mg av nikotinsubstituert polyglutaminsyre ble oppnådd som et hvitt fluffy materiale.

B. Festing av kobleren til den nikotinsubstituerte matriksen

10 mg med nikotinsubstituert polyglutaminsyre ble løst opp i 1 ml med MES-buffer ved pH 6,0. 8 mg med adipinsyredihydrazid (ADH) etterfulgt av 10 mg med EDC ble tilsatt til løsningen under røring. Reaksjonen ble tillatt å fortsette i 1 time ved romtemperatur. Den oppnådde løsningen ble endelig dialysert mot tre endringer med MES-buffer ved pH 6,0.

C. Konjugering til bærerproteinet

10 mg av rekombinant eksoprotein A (rEPA) ble løst opp i 2 ml med 0,05 M MES-buffer ved pH 5,6 som inneholdt 0,15 NaCl. ET volum med ADH-bundet nikotinsubstituert polyglutaminsyreløsning estimert til å inneholde 7,5 mg av dette derivatiserte materialet ble tilsatt til proteinløsningen. Fast EDC ble tilsatt til denne blandingen i tre porsjoner i løpet av en periode på 20 minutter mens det ble rørt ved romtemperatur. Reaksjonen ble tillatt å fortsette ved romtemperatur over natten. Det resulterende konjugatet ble endelig renset på en Sephadex G-25-kolonne og eluert med fosfatbufret saltløsning (PBS) ved pH 7,4. Dette fremstiller en renset preparering med konjugat der konjugatet inneholder kun (S)-(-)-formen med nikotin.

Eksempel 7 - Karakterisering av nikotinbærerkonjugatet i eksempel 4

Den rensede konjugatvaksinen i eksempel 4 ble analysert på en Superose 12 størrelses eksklusjonskromatografikolonne og eluert med PBS ved pH 7,4. Det molare forholdet av hapten til protein på 11 til 17 ble beregnet ved å bestemme økningen i UV-absorpsjonen ved 260 nm etter inkorporeringen av nikotin relativt til absorpsjon ved 280 nm. Dette forholdet ble bestemt ved å beregne hapten/bærerproteinforholdet for seks separat fremstilte porsjoner av

haptenerkonjugat (lot 1: 17,2, lot 2: 16,2, lot 3: 13,2, lot 4: 12,0, lot 5: 11,0, lot 6: 17,2). Ytterligere analyser for å bestemme dette forholdet ved å benytte MALDI-TOF massespektrometri ga i det vesentlige det samme antallet som oppnådd ved UV-absorbansforsøk. Proteinkonsentrasjonen til konjugatvaksinen ble bestemt ved å benytte et BCA-assay. Et stabilitetsstudie av nikotinbærerkonjugatet i eksempel 4 ble utført. Studiet benyttet vaksinen som var vasket i 1 ml glassflasker ved en konsentrasjon på 0,5 mg/ml, og stabiliteten til vaksinen pakket i flaskene ble testet ved tre ulike temperaturer: -70°C, 2 til 8 °C og romtemperatur.

Eksempel 8 - Stabilitet av nikotinbærerkonjugatet i eksempel 4

Konjugeringsprosedyren basert på dannelsen av amidbindinger mellom haptener-kobler-bærer i stedet for esterbindinger, syntes å være fordelaktig med hensyn til observasjoner gjort av stabilitet av konjugatet i løpet av 6 måneder ved -70°C, 2 til 8°C og selv ved romtemperatur. Stabilitetsstudiene besto av å måle og vurdere konjugatvaksinen ved å benytte følgende:

- 1) Synlig observasjon for å se etter partikler som var dannet (grumsethet, presipitering).
- 2) Å sjekke signifikante pH-endringer.
- 3) Størrelseseksklusionskromatografiprofil i kombinasjon med UV-absorpsjon ved 260 og 280 nm for å bestemme hvorvidt forholdet med inkorporert nikotin endret seg.
- 4) Revers fasekromatografi for å sjekke for eventuell bærerproteindegradering.
- 5) SDS PAGE med sølvfarging for å se etter proteolytisk kløyving av det konjugerte proteinet.

Konjugeringsprosedyren, basert på dannelsen av en amidbinding mellom haptener og kobleren, så vel som mellom kobleren og bæreren, syntes nyttig observert som stabiliteten til konjugatet i seks måneder ved -70°C og 2 til 8°C.

Eksempel 9 - Bevis for immunogenitet av bærerkonjugatet i eksemplene 4 og 6

To nikotinhaptenerkonjugatvaksiner ble benyttet for å immunisere mus, rotter og kaniner.

A. Dyretest-polyklonale antistoffer

Dyr ble immunisert ved å benytte standard protokoller. I mus ble tre subkutane injeksjoner av vaksine administrert med to ukers mellomrom, med testblødninger utført en uke etter den første og andre injeksjonen, og eksanguinering fant sted en uke etter den tredje injeksjonen. Serumprøver ble evaluert i et ELISA-assay beskrevet i eksempel 10. ELISA-assayet brukte 3'AMNic-pGlu-binding for mikrotiterplatene.

Rotter ble immunisert intraperitonealt med vaksiner tre ganger. Injeksjoner ble gitt med to ukers mellomrom med testblødninger utført en uke etter den første og andre injeksjonen. Rottene ble deretter eksanguinert en uke etter den tredje injeksjonen. Freund's komplette adjuvans ble benyttet for den første injeksjonen, og ukomplett Freund's adjuvans for de påfølgende injeksjonene. Serumprøver ble evaluert i et ELISA-assay.

Kaniner ble immunisert intramuskulært tre ganger, tre ukers mellomrom med 100 µg vaksine. Den initielle injeksjonen inneholdt Freund's komplette adjuvans, med påfølgende injeksjoner som inneholdt ukomplett Freund's adjuvans. Kaniner ble testblødd en uke etter den andre og tredje injeksjonen for å sikre adekvate titere for produksjonsblødning. Dersom adekvate titere ble oppnådd som målt ved ELISA, ble kaninene deretter plassert på ukentlig produksjonsblødningstabell (20 til 40 ml serum pr. kanin). Antistofftiter ble monitorert over tid og dyrene ble "forsterket" (boosted) hvis nødvendig for å gjenopprette antistoffnivåer.

Resultatene av disse immunogenitetsstudiene er vist i tabellene 1-5. Tabell 1 og 2 viser resultatene av et immunogenitetsstudie i mus. I tabell 1 var konjugatene som ble benyttet 3'aminometyl(-)-nikotin-succinyl-rEPA (eksempel 4). I tabell 2 var konjugatet som ble benyttet 3'aminometyl(-)-nikotin-polyglutaminsyre-ADH-rEPA (eksempel 6). Disse tabellene viser generering av høye titere med antistoffer som spesifikt binder nikotin. Videre viste disse konjugatene evnen til å indusere forsterkningsrespons.

Tabellene 3 og 4 viser resultater av immunogenitetsstudier i rotter. I tabell 3 var konjugatet som ble benyttet 3'aminometyl(-)-nikotin-succinyl-rEPA (eksempel 4). I tabell 4 var konjugatet som ble benyttet 3'aminometyl(-)-nikotin-polyglutaminsyre-ADH-rEPA (eksempel 6).

Disse tabellene viser genereringen av høye titere av antistoffer som spesifikt binder nikotin. Videre viste disse konjugatene evnen til å indusere forsterket respons.

Tabell 5 viser resultatene av et immunogenitetsstudie i kaniner. Ved å benytte enten 3'aminometyl(-)-nikotin-succinyl-rEPA (eksempel 4) eller 3'aminometyl-

(-)-nikotin-polyglutaminsyre-ADH-rEPA (eksempel 6) ble høyere titere med antistoffer generert mot de to konjugatene. Disse titrene ble forhøyet i mer enn 6 måneder.

Tabell 1 - Behandling av mus med 3'AMNic-Suc-rEPA

Antall dyr	Dose	Titer		
		1 injeksjon	2 injeksjoner	3 injeksjoner
10	1 µg	0	36	4,280
10	5 µg	1	884	10,727
10	15 µg	3	2,476	14,160

Dosen er basert på proteinassay.

Titer er det aritmetiske gjennomsnittet, en uke etter korresponderende injeksjon.

Tabell 2 - Behandling av mus med 3'AMNic-pGlu-ADH-rEPA

Antall dyr	Dose	Titer		
		1 injeksjon	2 injeksjoner	3 injeksjoner
10	2 µg	2	739	6,586
10	10 µg	2	2,490	9,573
10	30 µg	11	2,822	8,195

Dosen er basert på tørrvekt av lyofilisert konjugat.

Titer er det aritmetiske gjennomsnittet, en uke etter korresponderende injeksjon.

Tabell 3 - Behandling av rotter med 3'AMNic-Suc-rEPA

Antall dyr	Dose	Titer		
		1 injeksjon	2 injeksjoner	3 injeksjoner

3	15 µg	18	7,942	9,947
3	25 µg	4	1,446	5,991
3	50 µg	353	7,211	8,996

Dosen er basert på proteinassay.

Titer er det aritmetiske gjennomsnittet, en uke etter korresponderende injeksjon.

Tabell 4 - Behandling av rotter med 3'AMNic-pGlu-ADH-rEPA

Antall dyr	Dose	Titer		
		1 injeksjon	2 injeksjoner	3 injeksjoner
5	100 µg	0	1,067	3,752

Dosen er basert på tørrvekt av lyofilisert konjugat.

Titer er det aritmetiske gjennomsnittet, en uke etter korresponderende injeksjon.

Tabell 5 - Behandling av kaniner med 3'AMNic-Suc-rEPA og 3'AMNic-pGlu-ADH-rEPA

Immunogen	Antall dyr	Dose	Titer
3'AMNic-Suc-rEPA	10	100 µg	132,000
3'AMNic-pGlu-ADH-rEPA	10	100 µg	147,000

Dose basert på proteinassay for 3'AMNic-Suc-rEPA og på tørrvekt for 3'AMNic-pGlu-ADH-rEPA.

Titer er aritmetisk gjennomsnitt 6-7 uker etter tredje injeksjon.

Eksempel 10 - ELISA-assay og antistoffspesifitet

Nikotinmolekylet selv er ikke passende for å belegge ELISA plater, og må kobles til et større molekyl som har bedre adhesive egenskaper. Poly-L-lysin eller poly-L-glutaminsyre blir vanligvis benyttet i denne hensikten. Det derivatiserte nikotinhaptenet 3'-aminometyl(-)-nikotin (3'AMNic) ble konjugert til poly-L-glutaminsyre og det 3'-aminometyl(-)-nikotin-poly-L-glutaminsyrekonjugatet (3'AMNic-pGlu) som ble oppnådd ble benyttet for å belegge ELISA-platene.

Antistoffer generert mot 3'AMNic-vaksinen ble evaluert ved å benytte et 3'AMNic-pGlu ELISA som følger: Dynatech Immulon 4 mikrotiterplater (Chantilly, VA) ble belagt 100 µl/brønn med 10 ng/ml 3'AMNic-pGlu i 0,1 M bikarbonatbuffer, pH 9,6 og tillatt å inkubere over natten (ON) ved romtemperatur (RT). Platene ble deretter aspirert og blokkert med 1 % BSA i PBS i 1 time ved RT. Prøver og referanseserum ble fortynnet i PBB (1 % BSA, 0,3 % BRIJ i PBS, pH 7,2) til en fortynning som resulterte i en omtrentlig optisk tetthet (OD) ved 450 nm på 2,0. Platene ble vasket (9 % NaCl, 0,1 % BRIJ) fem ganger og fortynnede prøver og referanseserum ble lastet. Referansen og prøvene ble to ganger fortynnet ned til platene til et sluttvolum på 100 µl/brønn, og platene blir inkubert i 1 time ved 37°C. Platene blir deretter vasket igjen og lastet 100 µl/brønn med peroksidase-konjugert antiarts IgG, Fc-spesifikk (Jackson, West Grove, PA) fortynnet i PBB og inkubert ved 37°C i 1 time. Platene ble vasket og inkubert i 10 minutter ved romtemperatur med 100 µl/brønn 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB) substrat (KPL, Gaithersburg, MD) fortynnet 1:1 med H₂O₂ (supplert med TMB reagenskit). Reaksjonen blir stoppet med tilsetning av 100 µl/brønn 1 M fosforsyre og lest ved 450 nm på en MR4000 mikrotiterplateleser (Dynatech). Prøver blir kvantifisert i relasjon til referansen ved å benytte parallellinjeanalyser. Referansen blir tilordnet en numerisk verdi (U/ml) som korresponderer til fortynningen som gir en OD på omkring 2,0 ved 450 nm.

Antistoffspesifitet ble vurdert ved å benytte inhibisjons-ELISA-assay. Hvert anti-[3'AMNic-Suc-rEPA] serum ble fortynnet til en konsentrasjon to ganger den som ville resultere i en optisk tetthet på omkring 2,0 ved 450 nm. Ved å benytte den 3'AMNic-pGlu ELISA'en beskrevet ovenfor, ble det fortynnede antiserumet som skulle testes absorbert 1:1 (volum/volum) med økende mengder testantigen (inhibitor) i 3 timer ved 37°C, og den absorberte prøven ble testet i ELISA ved å benytte ikke-absorbert serum som referanse. Prosent absorpsjon med referanse til ikke-absorbert prøve ble bestemt for hver prøve.

Spesifisiteten på rotteserum som inneholdt antistoffer produsert som respons på 3'AMNic-Suc-rEPA ved å benytte inhibisjons-ELISA med nikotintartrat som inhibitor ble beregnet. IC₅₀ for dette antistoffet var $3,5 \times 10^{-6}$ M. Spesifisiteten for kaninserum som inneholdt antistoffer produsert i respons på 3'AMNic-Suc-rEPA ved å benytte inhibisjons-ELISA med nikotintartrat som inhibitor, ble beregnet. IC₅₀ for dette antistoffet var $2,3 \times 10^{-5}$ M.

Eksempel 11 - Antistoffaffinitet og bindingskapasitet

Antistoffbindingskapasitet ble målt ved å benytte likevektsdialyse i 4 timer ved 37°C ved å benytte 0,7 ml med plasma, teflon semi-mikroceller, Spectrapor 2-membraner med en molekylvektavskjæring (cutoff) på 12 til 14 kD og Sorensens buffer (0,13 fosfat, pH 7,4) se Pentel et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 246, 1061-1066 (1987). Plasma pH ble målt ved slutten av nådd likevektsdialyse kjørt, og prøver ble benyttet kun dersom den endelige pH er 7,30 til 7,45.

Antistoffaffinitet for nikotin ble beregnet ved å benytte et løselig radio-immunoassay, se Mueller, Meth. Enzymol., 92, 589-601 (1983). Molekyl-vekten til IgG ble målt til å være 150 kD.

Bindingskonstantene og affinitetene oppnådd med radioimmunoassayene var som følger. For anti-[3'AMNic-Suc-rEPA] rotteserum var IC_{50} (Molar) $1,36 \times 10^{-7}$. K_a (Molar-1) var $2,56 \times 10^7$. Bindingssetekonsentrasjon var $2,61 \times 10^{-6}$ bindings seter/l og nikotinspesifikk IgG-konsentrasjon var 0,2 mg/ml.

Eksempel 12 - Evaluering av nikotindistribuering i plasma og hjerne i dyremodeller

Den foreliggende oppfunne vaksinen er blitt evaluert i ulike dyremodeller. Rottemodeller ble benyttet for å bestemme effekten av aktiv eller passiv immunisering på nikotindistribuering i plasma og hjerne. Et studie undersøkte effektene av passiv immunisering på forventningen av de lokomotoriske effektene av nikotin som er en sentralnervesystem (CNS) virkning av nikotin. Et annet eksperiment vurderte effektene av passiv immunisering på effektene av nikotin på det kardiovaskulære systemet: Forhøyning av cystolisk blodtrykk.

For å evaluere den foreliggende immunterapien har en dyremodell blitt utviklet for å stimulere den raske absorpsjonen av nikotin fra to sigaretter i mennesker. Denne dyremodellen er beskrevet i Hieda (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther. 283(39: 1076-1081. I denne modellen ble rotter administrert 0,03 mg/kg med nikotin ved i.v. infusjon i løpet av 10 sekunder, noe som simulerer den raske absorpsjonen av nikotin fra lungene i menneskelige røykere. Blodprøver ble tatt ved 3 og 10 minutter etter nikotininjeksjon for måling av plasmanikotin. Når hjernenikotinkonsentrasjoner skulle bestemmes ble dyrene ofret 3 minutter etter nikotininjeksjon og deres hjerner ble raskt fjernet. Vaksinen i eksempel 4 ble evaluert i rotter for å bestemme dens effekt på distribueringen av nikotin i plasma og i hjerne.

A. Aktiv immunisering

Rotter ble immunisert med nikotinvaksinen ved tre i.p. injeksjoner på 25 µg totalt pr. injeksjon med vaksine (3'AMNic-Suc-rEPA) med to ukers mellomrom.

Disse dyrene hadde økte nivåer av nikotin i plasma 3 og 10 minutter etter en infusjon av 0,03 mg/kg med nikotin i løpt av 10 sekunder sammenlignet med nivåene i ikke-immuniserte kontroller. Se figur 1. Således var aktiv immunisering effektiv i å øke nikotinbinding i plasma. Det er kjent at den moderate reduksjonen i mengden med nikotin som når hjernen dramatisk kan endre oppførselseffekter av nikotin.

B. Passiv immunisering

Med passiv immunisering var det mulig å bestemme doseresponseeffekten av immun IgG i økning i plasmanikotinnivåer og å redusere hjernenikotinnivåer. Rotter ble administrert med varierende mengder av anti-(3'AMNic-Suc-rEPA) IgG (12,5 til 50 mg) totalt pr. injeksjon. Som vist i figur 2 var det en klar doseresponseeffekt - å øke dosen med IgG økte serumnikotin og reduserte hjernenikotinnivåer.

Figur 3 viser at antinikotinantistoffer (anti-3'AMNic-Suc-rEPA) var til stede og aktive i serumet hos rotter 30 minutter og 1 dag etter administrering av antistoffer (50 mg) totalt pr. injeksjon. Figur 3 viser at etter nikotinutfordring (0,03 mg/kg infusjon i løpet av 10 sekunder) var disse antistoffene effektive i å redusere nikotinkonsentrasjonen i hjernen og økte nikotinnivåer i plasma ved 30 minutter og 1 dag etter antistoffadministrering.

En annen demonstrasjon av effekten av passiv immunisering med nikotinvaksine i henhold til den foreliggende oppfinnelsen, er dens evne til å bekjempe påfølgende infusjoner av nikotin. I et separat passivt immuniseringseksperiment i rotter førte multiple doser av nikotin ikke til reduksjon i antistoffet som var tilstede eller signifikant reduksjon i deres kapasitet til å binde til friskt injisert nikotin. I figur 4 ble 50 mg med anti-[3'AMNic-Suc-rEPA] infusert ved tidspunkt null. 24 timer senere ble fem nikotininjeksjoner gjort - 0,03 mg/kg nikotin ble infusert i løpet av 10 sekunder fra høyre jugularvene hvert 20. minutt i 80 minutter. Totalt fem nikotininjeksjoner ble gjort. Den femte injeksjonen med nikotin ble toppet med ³H-nikotin. Totalt blod og hjerne ble samlet 1 minutt etter den femte injeksjonen. Resultatene er vist nedenfor og er grafisk representert i figurene 4 og 5.

	Nikotinkonsentrasjoner (gjennomsnitt $\pm$ SD)					
	Serum (ng/ml)				Hjerne (ng/g)	
	1. dose	5. dose			5. dose	
	Nikotin	Nikotin	3H-Nikotin	Kotinin	Nikotin	3H-Nikotin
Immun IgG	245 $\pm$ 30	343 $\pm$ 46	121 $\pm$ 17	30 $\pm$ 4	244 $\pm$ 33	90 $\pm$ 16
Kontroll IgG	21 $\pm$ 3	55 $\pm$ 9	41 $\pm$ 4	35 $\pm$ 5	257 $\pm$ 29	126 $\pm$ 14
% endring	+ 1067	+ 524	+ 195	- 17	- 13	- 29

Disse resultatene viser at selv etter den femte dosen med nikotin er antistoffene effektive i å øke serumnikotinnivåer og å redusere hjernenikotinnivåer. Resultatene med ^3H -nikotin demonstrerte at antistoffer er effektive mot nikotinen injisert ved den femte dosen.

Eksempel 13 - Evaluering av lokomotoreffekter av nikotin

Dette eksperimentet ble benyttet og designet for å bestemme hvorvidt passiv immunisering kunne hindre en umiddelbar CNS-mediert virkning av nikotin. Rottemodellen benyttet i dette eksperimentet ble utviklet av Dr. David Malin og er beskrevet i Malin et al., Nicotine-specific IgG reduced distribution to brain and attenuates its behavioral and cardiovascular effects in rats, fremlagt til det femte årlige møtet i Society for Research on Nicotine and Tobacco, San Diego, CA, 5-7. mars 1999. For å etablere en basislinje ble effekten av en subkutan injeksjon av 0,8 mg/kg med nikotintartrat på lokomotor-aktivitetsnivået i rotter målt. Den 0,8 mg/kg dosen av nikotintartrat er den høyeste dosen som kan bli benyttet uten å indusere lokomotorabnormaliteter.

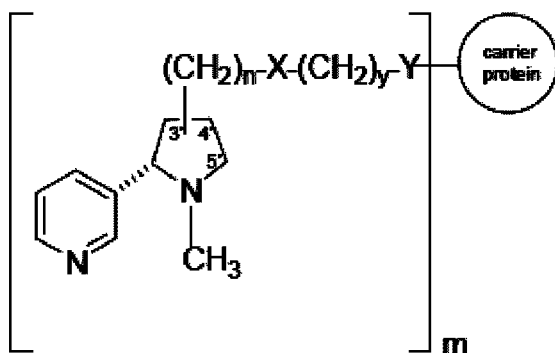
Det var en økning i aktivitetsnivået etter nikotininjeksjon i rotter som ikke var forbehandlet med anti-[3'AMNic-Suc-rEPA] og i rotter som ble forbehandlet med 50 mg med normalt kaninserum IgG. Se figur 6A, høyre stolpe og figur 6B, venstre stolpe. Denne effekten ble undertrykket ved å forbehandle dyrene med 50 mg med anti-[3'AMNic-Suc-rEPA] immun IgG (figur 6B, høyre stolpe). Dette viser at anti-nikotinantiserum eliminerte en stimulerende effekt av nikotin in vivo.

Eksempel 14 - Evaluering av nikotin på systolisk blodtrykk

I dette eksperimentet ble en annen indikator på oppførselseffekter av nikotin målt: Endringen i systolisk blodtrykk. Rotter ble forbehandlet med anti-[3'AMNic-Suc-rEPA] IgG eller kontroll IgG. Rotter ble behandlet med en subkutan injeksjon av 0,1 mg/kg nikotintartrat. Kontrollrotter viste en økning i systolisk blodtrykk på $42,6 \pm 3,2$ mm Hg, når det ble behandlet med nikotin. Når rotter ble forbehandlet med anti-nikotinantisera IgG var nikotin-utfordringen mindre effektiv. Når det ble økte mengder med anti-nikotinserum som ble administrert reduserte dette evnen av nikotin til å øke blodtrykket. Som vist i figur 7 var det en negativ lineær trend for blodtrykk som en funksjon av IgG-dose.

PATENTKRAV

1. Haptenbærerkonjugat,
karakterisert ved den følgende formelen



der m er 1 til 2500,
 n er 0 til 12,
 y er 1 til 12,

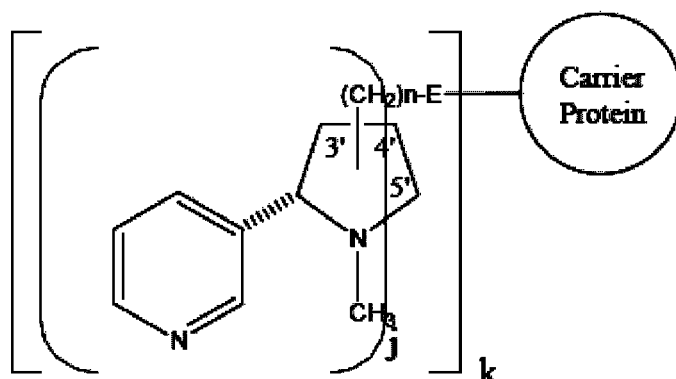
X er valgt fra gruppen som består av NH-CO, CO-NH, CO-NH-NH, NH-NH-CO, NH-CO-NH, CO-NH-NH-CO og S-S;

Y er valgt fra gruppen som består av NH-CO, CO-NH, CO-NH-NH, NH-NH-CO, NH-CO-NH, CO-NH-NH-CO og S-S,

og $-(CH_2)_n-X-(CH_2)_y-Y$ -enheten er bundet til 3', 4' eller 5' posisjonen på nikotin.

2. Konjugat ifølge i krav 1,
karakterisert ved at m er 11 til 17, n er 1, y er 2, X er NH-CO, Y er CO-NH, der $-(CH_2)_n-X-(CH_2)_y-Y$ - er bundet til den 3' posisjonen på nikotin.
3. Konjugat ifølge i krav 1,
karakterisert ved at m er 11 til 17, n er 1, y er 2, X er NH-CO, Y er CO-NH, der $-(CH_2)_n-X-(CH_2)_y-Y$ - er bundet til den 4' posisjonen på nikotin.
4. Konjugat ifølge i krav 1,
karakterisert ved at m er 11 til 17, n er 1, y er 2, X er NH-CO, Y er CO-NH, der $-(CH_2)_n-X-(CH_2)_y-Y$ - er bundet til den 5' posisjonen på nikotin.

5. Konjugat ifølge i et hvilket som helst av kravene krav 1 til 4, karakterisert ved at m er valgt fra gruppen som består av 1 til 20 og 1 til 200.
6. Konjugat ifølge i et hvilket som helst av kravene krav 1 til 5, karakterisert ved at bærerproteinet er eksoprotein A.
7. Haptenbærerkonjugat, karakterisert ved den følgende formelen:



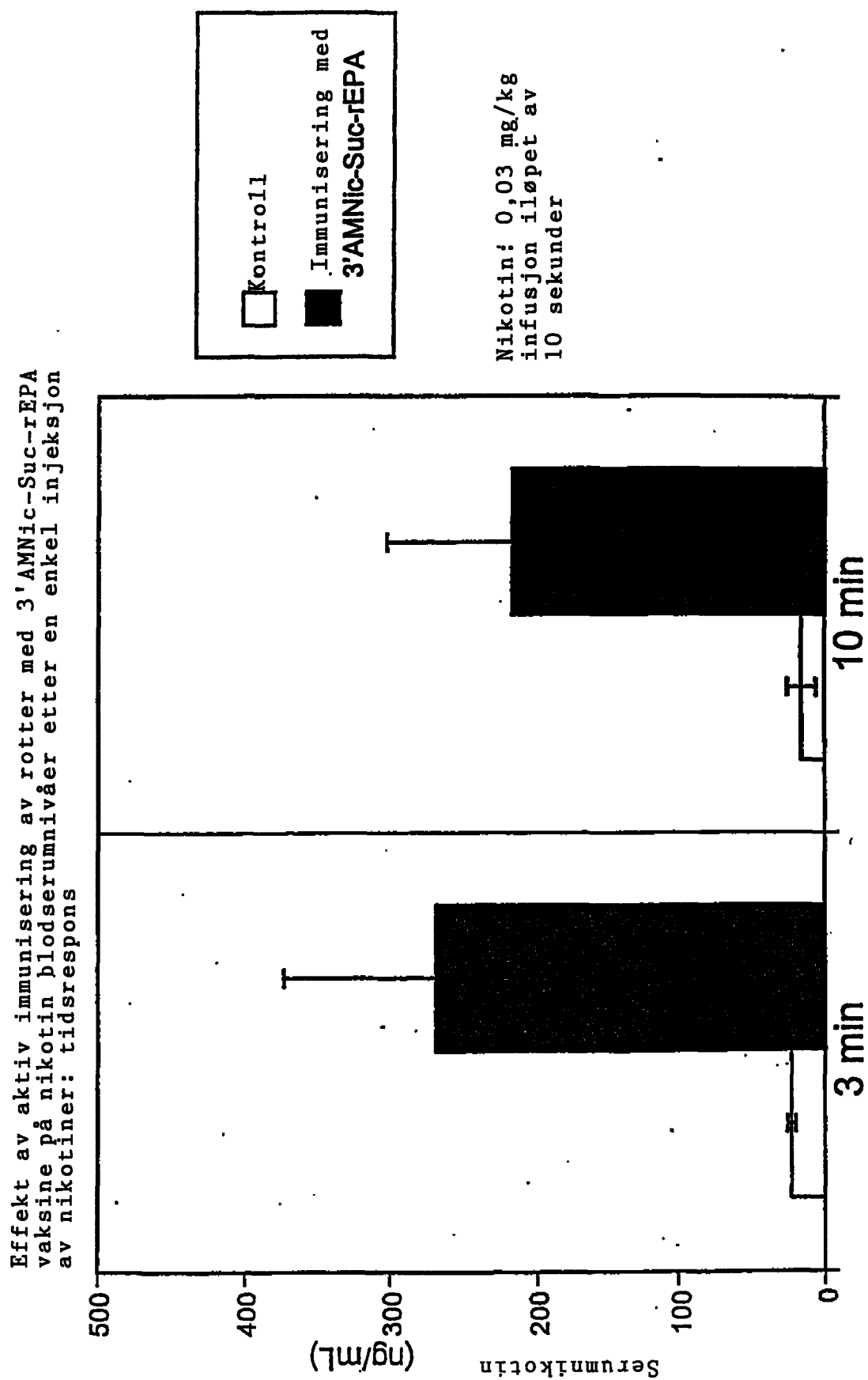
der n er 0-12, j er 1-1000, k er 1-20 og E er en aminosyreinnholdende matriks.

8. Konjugat ifølge krav 7, karakterisert ved at matriksen er poly-L-glutaminsyre.
9. Haptenbærerkonjugat ifølge i ethvert av kravene 1-8, karakterisert ved at nevnte konjugat er fremstilt ved å benytte trans-4'-karboksy-(-)-kotlinin som utgangsmateriale.
10. Antistoff, karakterisert ved at det er fremstilt som en respons på haptenbærerkonjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9.
11. Antistoff ifølge i krav 10, karakterisert ved at det er monoklonalt.
12. Antistoff ifølge i krav 10, karakterisert ved at det er polyklonalt.
13. Funksjonelt fragment, karakterisert ved at det er et fragment av antistoffet ifølge i krav 10.

14. Sett for å bestemme nærværet av nikotin i en prøve,
karakterisert ved at det omfatter et antistoff eller et funksjonelt fragment derav i henhold til et hvilket som helst av kravene 10 til 13.
15. Fremgangsmåte for å fremstille et antistoff,
karakterisert ved at den omfatter å immunisere et vertspattedyr med haptенbærerkonjugatet ifølge i et hvilket som helst av kravene 1 til 9.
16. Fremgangsmåte ifølge i krav 15,
karakterisert ved at antistoffet er monoklonalt.
17. Fremgangsmåte ifølge i krav 15,
karakterisert ved at antistoffet er polyklonalt.
18. Vaksinesammensetning,
karakterisert ved at den omfatter minst ett haptенbærerkonjugat ifølge i et hvilket som helst av kravene 1 til 9.
19. Vaksinesammensetning ifølge krav 18,
karakterisert ved at den ytterligere omfatter minst én adjuvans.
20. Vaksinesammensetning ifølge krav 19,
karakterisert ved at den ytterligere omfatter minst én eksipiens.
21. Vaksinesammensetning ifølge krav 20,
karakterisert ved at den ytterligere omfatter minst ett tilleggsmiddel.
22. Haptенbærerkonjugat ifølge i et hvilket som helst av kravene 1 til 9, eller et antistoff eller et funksjonelt fragment derav ifølge i et hvilket som helst av kravene 10 til 13 for anvendelse som et medikament.
23. Haptенbærerkonjugat ifølge i et hvilket som helst av kravene 1 til 9, eller et antistoff eller et funksjonelt fragment derav ifølge i et hvilket som helst av kravene 10 til 13 for anvendelse som et medikament ifølge i krav 22, for hindringen eller behandlingen av nikotinavhengighet.
24. Haptенbærerkonjugat ifølge i et hvilket som helst av kravene 1 til 9 for anvendelse som et medikament ifølge i krav 22 eller 23, der medikamentet ytterligere omfatter en forbindelse som er nyttig i behandlingen av nikotinavhengighet.
25. Anvendelse av et haptенbærerkonjugat ifølge i et hvilket som helst av kravene 1 til 9 eller et antistoff eller et funksjonelt fragment derav, ifølge i kravene 10 til 13, for fremstillingen av et medikament for behandlingen eller hindringen av nikotinavhengighet.

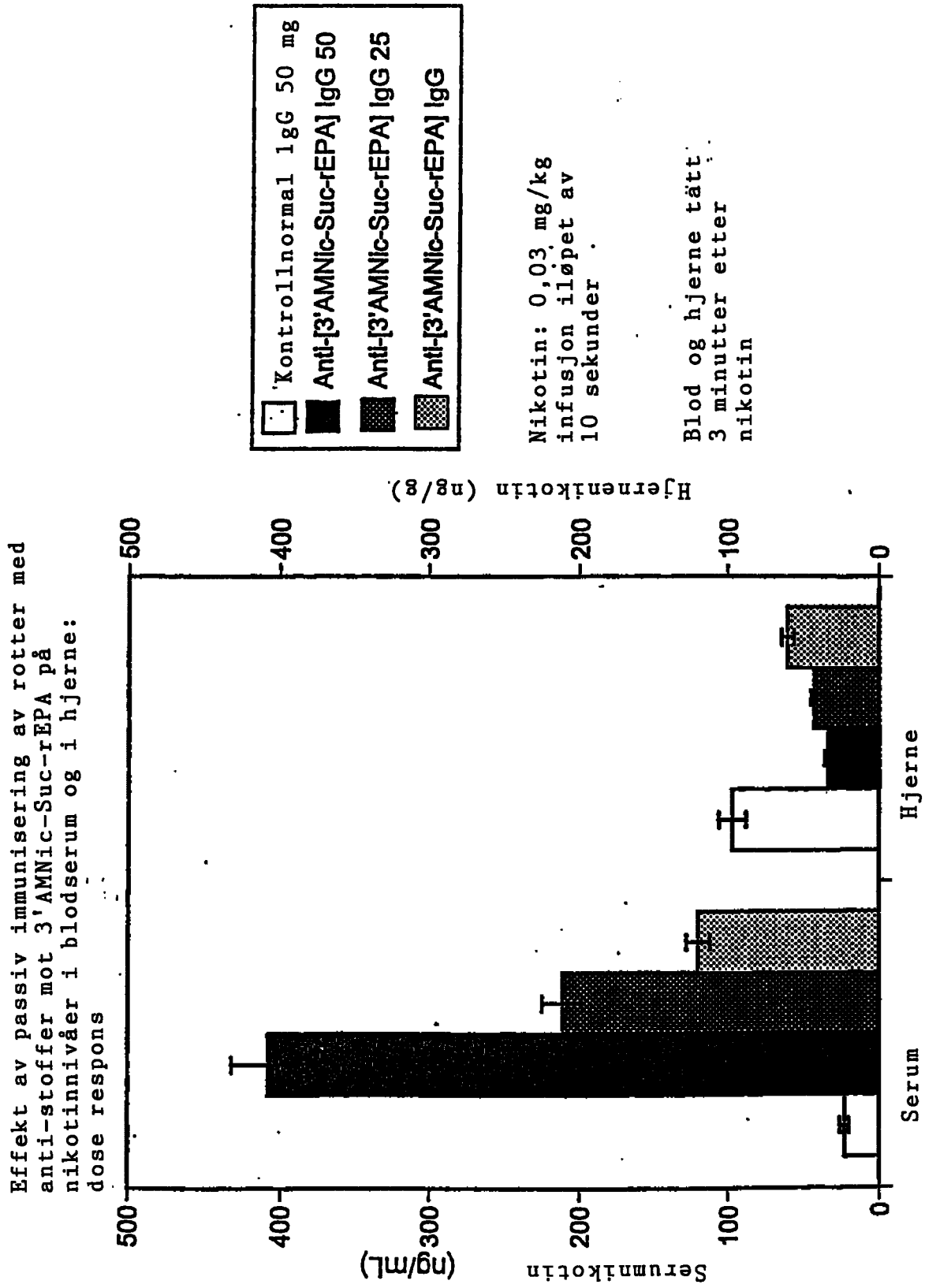
26. Anvendelse av et haptenbærerkonjugat ifølge i et hvilket som helst av kravene 1 til 9 for fremstillingen av et medikament ifølge i krav 25, der medikamentet ytterligere omfatter en forbindelse som er nyttig i behandlingen av nikotinavhengighet.

1 / 7



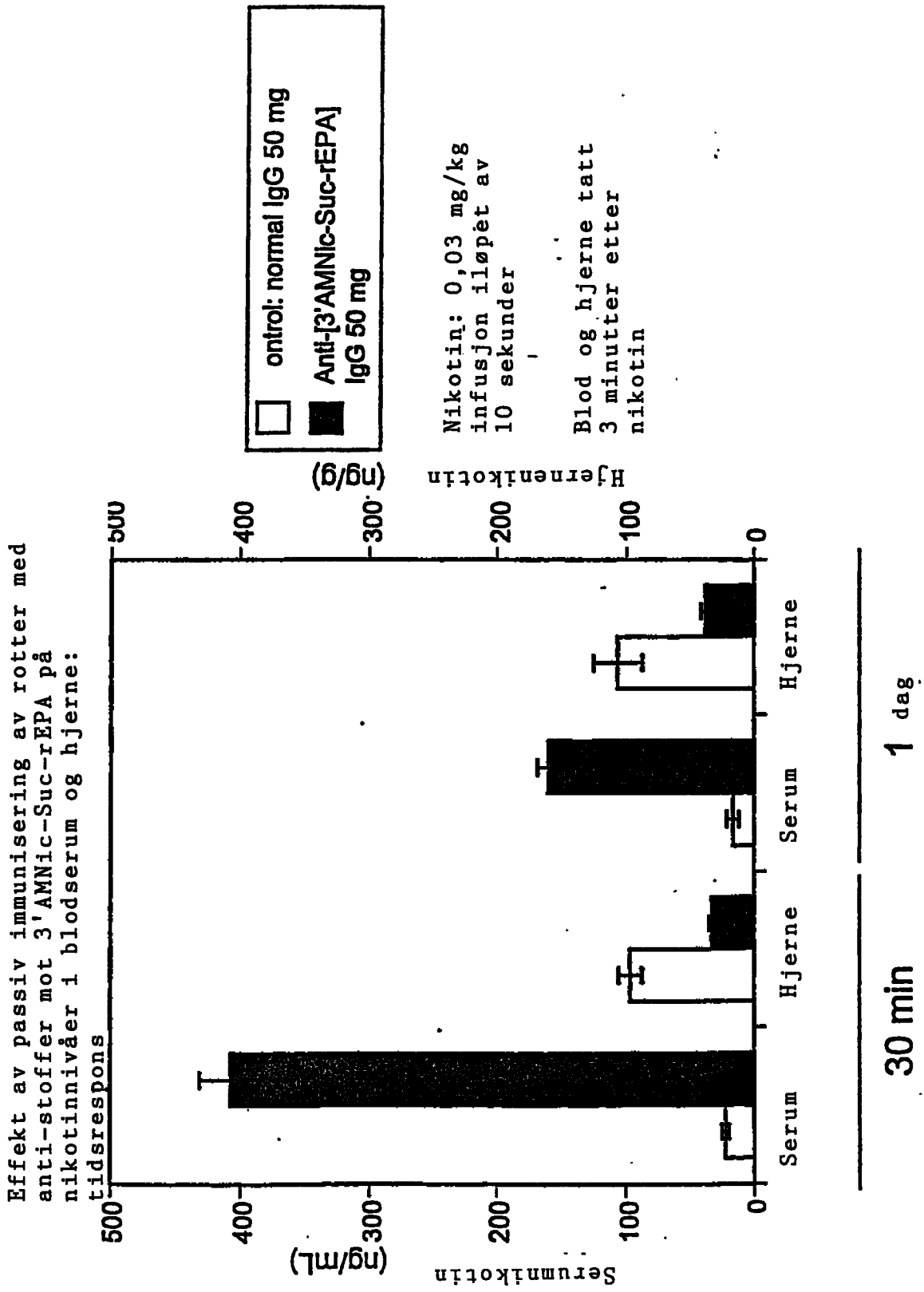
Figur 1

2 / 7



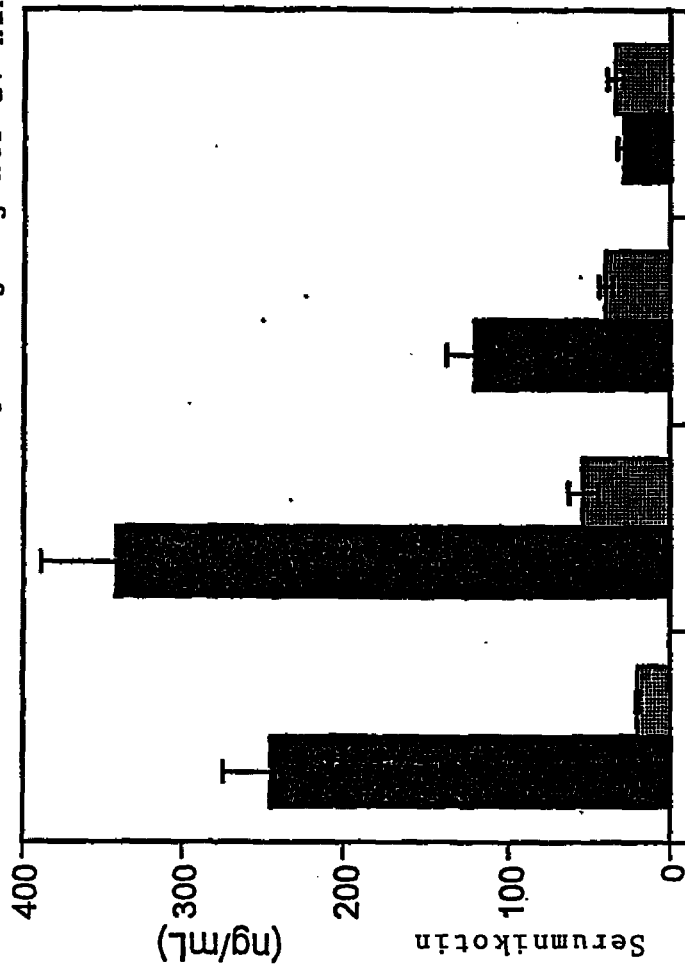
Figur 2

3 / 7



Figur 3

Effekt av passiv immunisering på rotter med anti-stoffer for 3'AMNic-Suc-rEPA på nikotinnivåer i blodserum etter multiple injeksjoner av nikotin



 Anti-[3'AMNic-Suc-rEPA] IgG
 Kontroll: normal IgG

50 mg av IgG (immun eller kontroll infisert 24 timer fra biassay

4 / 7

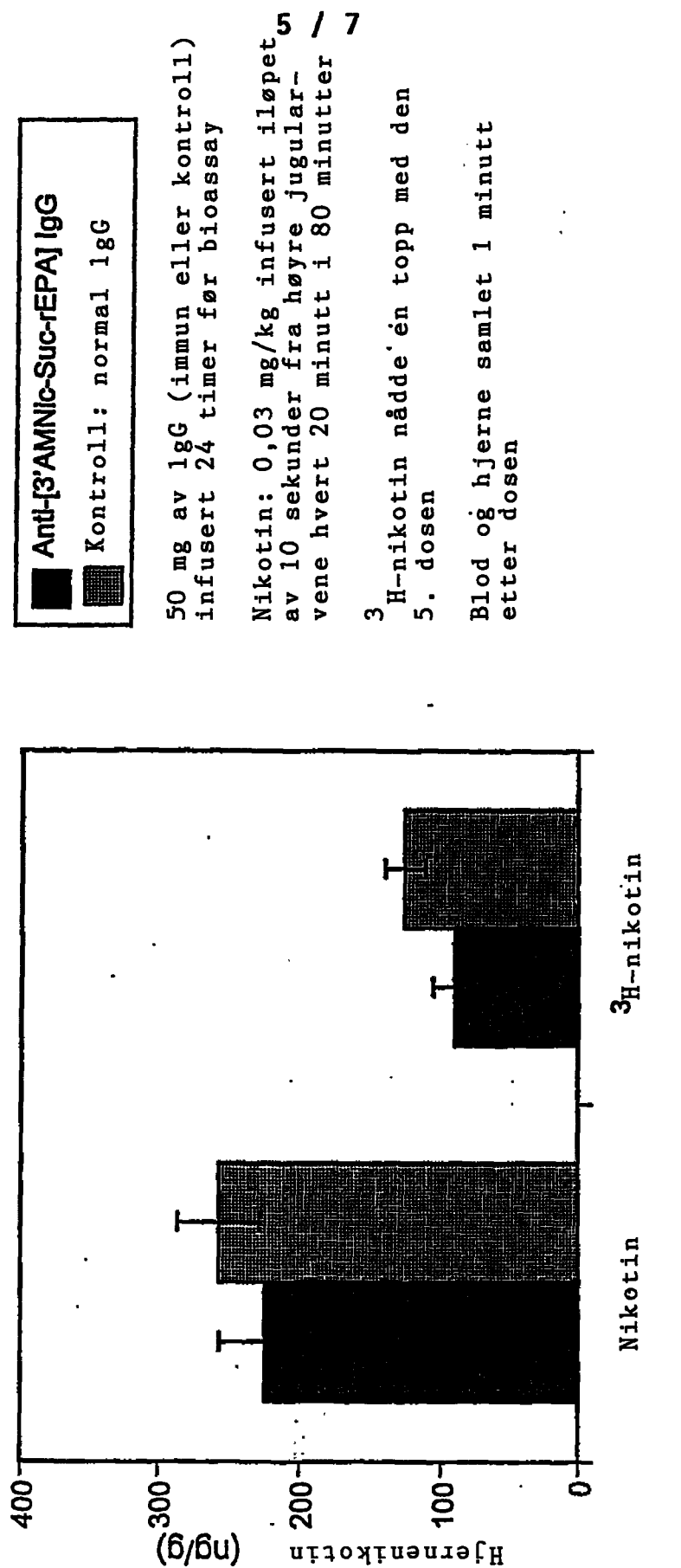
Nikotin: 0,03 mg/kg infisert over 10 sekunder fra høyre jugularvene hvert 20 minutt i 80 minutter

³H-nikotin nådde toppen (spiked) med den 5. dosen

Blod og hjerne samlet 1 minutt etter 5. dose

Figur 4

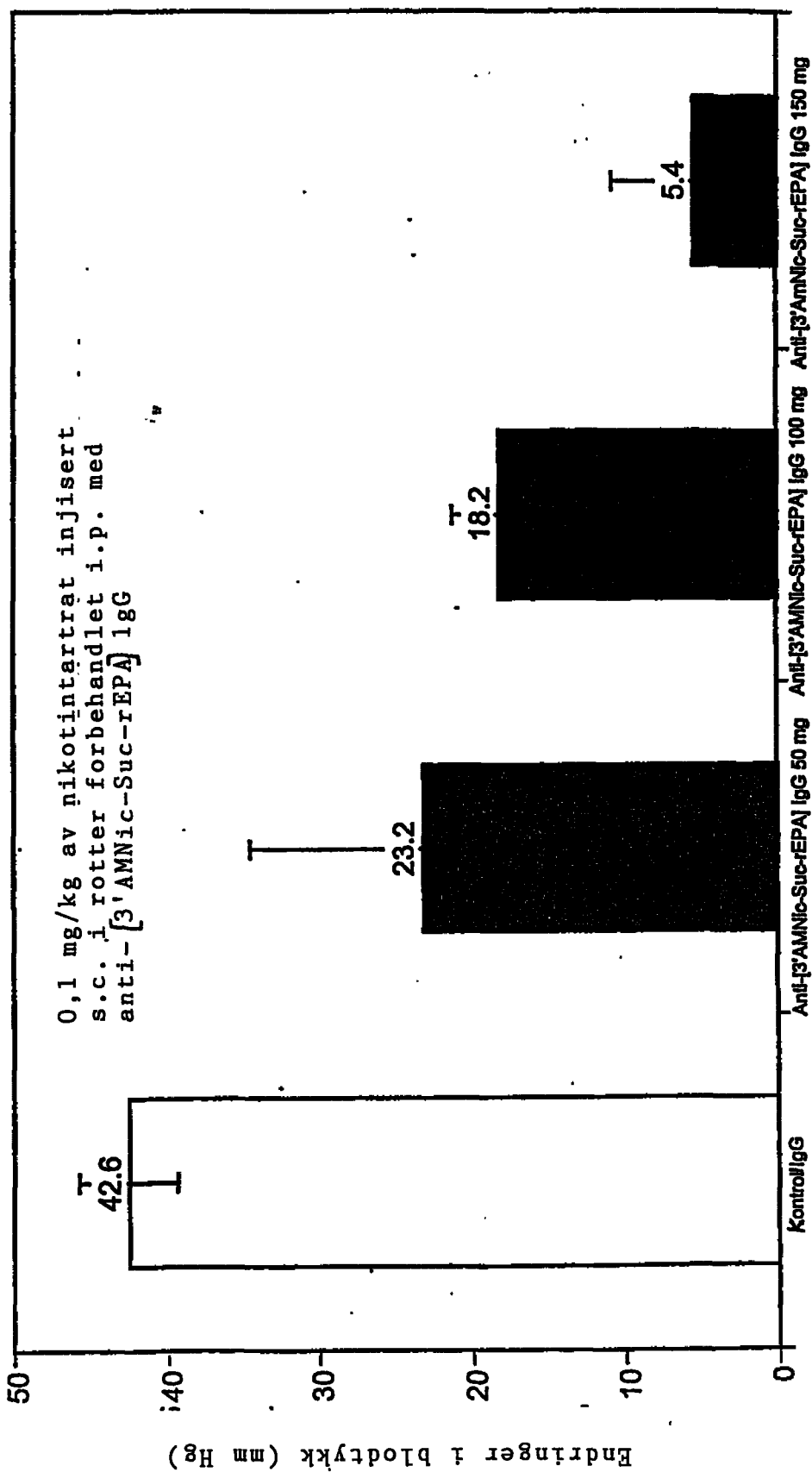
Effekt av passiv immunisering av rotter med anti-stoffer mot 3'AMNic-Suc-rEPA på nikotinnivåer i hjernen etter multiple injeksjoner av nikotin



Figur 5

7 / 7

Effekt av passiv immunisering på rotter med anti-stoffer mot
3'AMNic-Suc-rEPA på systolisk blodtrykk etter injeksjon
av nikotin: dose respons



Figur 7