

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1999 - 292
(22) Přihlášeno: 31.07.1997
(30) Právo přednosti:
02.08.1996 GB 1996/9616351
(40) Zveřejněno: 16.06.1999
(Věstník č. 6/1999)
(47) Uděleno: 21.08.2002
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 16.10.2002
(Věstník č. 10/2002)
(86) PCT číslo: PCT/EP97/04326
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 98/05355

(11) Číslo dokumentu:

290 826

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. ⁷ :

A 61 K 39/015
A 61 K 39/002
A 61 K 39/29
A 61 K 39/39
A 61 P 33/06

(73) Majitel patentu:

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A.,
Rixensart, BE;

(72) Původce vynálezu:

Cohen Joseph Dr., Rixensart, BE;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11696;

(54) Název vynálezu:

Vakcína

(57) Anotace:

Popisuje se vakcína použitelná při prevenci nebo léčení malárie, která obsahuje větší množství antigenů odvozených z malárie v kombinaci s adjuvans, které je preferenčním stimulatorem odpovědi buněk TH1.

CZ 290826 B6

Vakcína

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká nové vakcíny a jejího použití v lékařství, zvláště pro prevenci infekce malárie.

10 Dosavadní stav techniky

Malárie je jedním z hlavních světových zdravotních problémů, kdy na tuto nemoc umírají každý rok 2 až 4 miliony lidí. Jedna z nejakutnějších forem tohoto onemocnění je způsobena parazitickým prvokem Plasmodium falciparum, který je odpovědný za většinu úmrtí, která je
15 možno připsat malárii.

Životní cyklus P. falciparum je komplexní, vyžadující pro ukončení dva hostitele, člověka a moskyta. Infekce člověka je započata naočkováním sporozoitů ve slině infikovaného moskyta. Sporozoity migrují do jater a tam infikují hepatocyty, kde se diferencují přes exoerytrocitické
20 intracelulární stadium do stadia merozoitů, které infikují červené krvinky (RBC) pro iniciaci cyklické replikace v asexuálním krevním stupni. Cyklus je ukončen diferenciací velkého počtu merozoitů v červených krvinkách na gametocyty sexuálního stupně, které jsou nasáty moskytem a v něm se vyvíjejí přes řadu stupňů ve střední části střeva za vytvoření sporozoitů, které migrují do slinných žláz.

25

Stadium sporozoitů P. falciparum bylo identifikováno jako potenciální cíl vakcíny proti malárii. Hlavní povrchový protein sporozoita je znám jako cirkumsporozoitální protein (protein CS). Tento protein z kmene 7GB byl klonován, exprimován a sekvenován (Dame a další. Science 225
(1984), str. 593). Forma proteinu kmene 7GB je charakterizována přítomností centrální imunodominantní opakující se oblasti obsahující tetrapeptid Asn-Ala-Asn-Pro opakovaný 37
30 krát, ale přerušovaný čtyřmi menšími opakujícími se úseky Asn-ValAsp-Pro. U jiných kmenů se počet hlavních a vedlejších opakujících se úseků liší stejně jako jejich relativní poloha. Tato centrální část je obklopena N a C-koncovou částí složenou z neopakujících se aminokyselinových sekvencí označovaných jako část „repeatless“ proteinu CS.

35

Bylo ukázáno, že ozářené sporozoity mohou poskytnout významnou ochranu proti experimentální malárii člověka (Am. J. Trop. Med. Hyg. 24: 297 - 402, 1975). Avšak nesnáze při výrobě způsobují nepraktičnost použití ozářených sporozoitů z hlediska výroby vakcíny.

40

Několik výzkumných skupin navrhovalo podjednotkové vakcíny založené na cirkumsporozoitálním proteinu. U některých z těchto vakcín se provádělo klinické testování, jedna z nich byla syntetický peptid a druhá rekombinantní protein (Ballou a další. Lancet: i 1277 (1987) a Herrington a další. Nature 328:257 (1987).

45

Tyto vakcíny měly úspěch při stimulaci antisporozoitální odpovědi. Nicméně velikost této odpovědi byla zklamáním, přičemž některé vakcíny nevyvolávaly odpověď vůbec. Navíc nepřítomnost „zesilování“ („boosting“) hladin protilátek při následujících injekcích a výsledky testů proliferace lymfocytů in vitro naznačovaly, že T-buňky většiny těchto dobrovolníků nerozpoznaly imunodominantní opakující se sekvenci. Nicméně u jedné vakcíny v každé studii
50 se parazitémie nevyvinula.

Mezinárodní patentová přihláška WO 93/10 152 (Smith Kline Beecham Biologicals) popisuje a nárokuje hybridní protein obsahující v podstatě veškerou C-koncovou část proteinu CS, čtyři nebo více tandemových opakujících se sekvencí imunodominantní oblasti a povrchový antigen

viru hepatitidy B neboli HBsAg. Hybridní protein s výhodou obsahuje sekvenci, která obsahuje alespoň 160 aminokyselin a která je v podstatě homologní s C-koncovou částí proteinu CS. Proteinu CS může chybět alespoň 12 aminokyselin od C-konce.

- 5 Konkrétně se popisuje protein obsahující část proteinu CS *P. falciparum* v podstatě odpovídající aminokyselinám 210 až 398 *P. falciparum* 7GB fúzaný ve čtecím rámci prostřednictvím lineárního linkeru k N-konci HBsAg. Linker může obsahovat část preS2 z HBsAg.

10 Konkrétní provedení popisované ve WO 93/10 152 je hybridní protein pojmenovaný RTS. Hybrid se skládá z:

- Methioninového zbytku kódovaného nukleotidy 1059 - 1061, odvozeného z genové sekvence *TDH3 Saccharomyces cerevisiae* (nukleotidy 1-1058 v tomto čtecím rámci tvoří samotný promotor TDH3). (Musti A. M. a další. Gene 1983 25 144 - 143).

15 - Tři aminokyseliny Met, Ala, Pro, odvozených z nukleotidové sekvence 1062 až 1070 vytvořené klonovacím postupem použitým pro konstrukci hybridního genu.

20 - Sledu 189 aminokyselin kódovaných nukleotidy 1071 až 1637 reprezentujících aminokyseliny 210 až 398 cirkumsporozoitálního proteinu (CSP) *Plasmodium falciparum* kmen 7GB (Dame a další, výše).

- Aminokyseliny (Arg) kódované nukleotidy 1638 - 1640 vytvořené klonovacím postupem použitým pro konstrukci hybridního genu.

25 - Čtyř aminokyselin Pro, Val, Thr, Asn kódovaných nukleotidy 1641 - 1652 a představujících čtyři karboxykoncové zbytky viru hepatitidy B (sérotyp adw) proteinu preS2 (9).

30 - Oblasti 226 aminokyselin kódovaných nukleotidy 1653 až 2330 a specifikujících protein S viru hepatitidy B (sérotyp adw).

35 WO 93/10 152 dále popisuje expresi hybridního proteinu v hostitelském kvasinkovém kmenu, který již nesl ve svém genomu několik integrovaných kopií expresní kazety hepatitidy B. Získaný kmen syntetizuje dva polypeptidy. S a RTS (nebo jiný hybridní protein podle vynálezu), které se spontánně uspořádají do směsných (například RTS, S) lipoproteinových částic. Tyto částice výhodně prezentují sekvence CSP hybridu na svém povrchu.

40 Předmětem předkládaného vynálezu je vyvolat imunitu proti napadení *P. falciparum* a/nebo *P. vivax* imunizací prostředkem obsahujícím větší množství antigenů v kombinaci s adjuvans, kterým je preferenční stimulátor odpovědi buněk TH1.

Podstata vynálezu

45 Předkládaný vynález tedy poskytuje vakcínu pro použití při prevenci nebo léčení malárie, která obsahuje větší množství antigenů odvozených z malárie v kombinaci s adjuvans, kterým je preferenční stimulátor odpovědi buněk TH1.

50 Vakcína obsahuje alespoň dva antigeny odvozené z malárie, zvolené ze skupiny:

- a) hybridní protein obsahující v podstatě veškerou C-koncovou část proteinu CS, čtyři nebo více tandemových opakujících se sekvencí imunodominantní oblasti a povrchový antigen viru hepatitidy B, neboli HBsAg;

- b) protein TRAP klonovaného izolátu *P. falciparum* z Thajska známého jako T/9/96 a proteiny, které jsou s ním z alespoň 80 % homologní a imunogenní deriváty včetně jeho fragmentů;
- c) antigen MSP-1 *P. falciparum* nebo *P. vivax* podle US patentu 4 837 016 a proteiny, které jsou s ním z alespoň 80 % homologní a imunogenní deriváty včetně jeho fragmentů.

Alespoň jeden z antigenů je s výhodou hybridní protein, jak definováno výše, jako například RTS, výhodněji ve formě směsných částic jak je definováno výše, jako například RTS, S.

- 10 Další hledisko vynálezu poskytuje vakcínu pro použití při prevenci nebo léčení malárie, obsahující větší množství z malárie odvozených antigenů, která se vyznačuje tím, že alespoň jeden z antigenů je hybridní protein jak definováno výše, jako RTS, výhodněji ve formě směsných částic jak definováno výše, jako RTS, S.

- 15 Množství antigenu přítomného v každé dávce vakcíny je zvoleno jako množství, které indukuje imunoprotektivní odpověď bez významných nepříznivých vedlejších účinků u typických vakcín. Toto množství bude kolísat v závislosti na tom, kterých specifických imunogenů se použije. Obecně se očekává, že každá dávka bude obsahovat celkem 1 až 1000 µg proteinu, s výhodou 1 až 200 µg, nejvýhodněji 10 až 100 µg. Optimální množství pro konkrétní vakcínu je možno určit
- 20 standardními studiemi zahrnujícími pozorování imunitních odpovědí u pacientů. Po počáteční vakcinaci budou dostávat pacienti s výhodou zesilující dávku přibližně po čtyřech týdnech následovanou opakovanými zesilujícími dávkami každých šest měsíců, dokud trvá riziko infekce.

- 25 Adjuvans schopná preferenčně stimulovat odpověď buněk TH1 se popisují v mezinárodních patentových přihláškách WO 94/00 153 a WO 95/17 209.

Zvláště výhodné adjuvans obsahuje QS21, netoxickou frakci čištěnou HPLC odvozenou z kůry Quillaja Saponaria Molina a 3 De-O-acylovaný monofosforyllipid A (3 D-MPL), popřípadě společně v emulzi typu olej ve vodě.

- 30 3 De-O-acylovaný monofosforyllipid A je znám z GB 2 220 211 (Ribi). Chemicky jde o směs 3 De-O-acylovaného monofosforyllipidu A s 4, 5 nebo 6 acylovanými řetězci, vyráběnou firmou Ribi Immunochem Montana. Výhodná forma 3 De-O-acylovaného monofosforyllipidu A se popisuje v mezinárodní patentové přihlášce WO 92/ 16 556.

- 35 QS21 je netoxická frakce saponinu čištěná HPLC z kůry jihoamerického stromu Quillaja Saponaria Molina a způsob výroby se popisuje (jako QA21) v US patentu 5 057 540.

- 40 Výhodná emulze typu olej ve vodě obsahuje metabolizovatelný olej, jako je skvalen, alfa-tokoferol a tween 80. Emulze typu olej ve vodě může navíc obsahovat span 85 a/nebo lecitin.

- Poměr QS21, 3D-MPL bude typicky řádově 1:10 až 10:1, s výhodou 1:5 až 5:1 a často v podstatě 1:1. Výhodné rozmezí pro optimální synergický účinek je 2,5:1 až 1:1 3D MPL: QS21. Typicky bude pro podávání člověku QS21 a 3D MPL přítomno ve vakcíně v rozmezí 1 µg až 200 µg,
- 45 například 1 až 100 µg, s výhodou 10 µg až 50 µg na dávku. Olej ve vodě bude typicky obsahovat od 2 do 10 % skvalenu, od 2 do 10 % alfa-tokoferolu a od 0,3 do 3 % látky tween 80. S výhodou je poměr skvalen: alfa-tokoferol roven nebo menší než 1, protože se tak dosáhne stabilnější emulze. V koncentraci 1 % může být také přítomen span 85. V některých případech může být
- 50 výhodné, že vakcíny podle předkládaného vynálezu dále obsahují stabilizátor.

Výroba vakcín se obecně popisuje v New Trends and Developments in Vaccines, ed. Voller a další. University Park Press. Baltimore. Maryland. USA, 1978. Zapouzdření do lipozomů se

například popisuje v US patentu 4 235 877 (Fullerton). Konjugace proteinů na makromolekuly se popisuje například v US patentu 4 372 945 (Likhite) a US patentu 4 474 757 (Armor a další).

Antigeny odvozené z malárie použitelné v rámci předkládaného vynálezu mohou být zvoleny z následujících:

1. Hybridní protein jak definováno výše, jako je RTS, výhodněji ve formě směsných částic jak definováno výše, jako RTS, S.
 2. Protein TRAP klonovaného izolátu *P. falciparum* z Thajska známý jako T/9/96 a proteiny, které jsou s ním alespoň z 80 % homologní a imunogenní deriváty obsahující jeho fragmenty (popsané v mezinárodních patentových přihláškách WO 90/01 496 a WO 91/11 516 (3i Exploitation Limited) a WO 92/11 868 (US Navy).
 3. 16 000 protein popsany v mezinárodní patentové přihlášce WO 91/18 922 a proteiny, které s ním mají alespoň 80 % homologii a imunogenní deriváty včetně jeho fragmentů.
 4. Apikální membránový antigen-1 (AMA-1) *P. falciparum* nebo *P. vivax* a proteiny, které jsou s ním alespoň z 80 % homologní a jeho imunogenní deriváty včetně fragmentů.
 5. Cirkumsporozoitální protein (csp) *P. falciparum* nebo *P. vivax*, které jsou s ním alespoň z 80 % homologní a jeho imunogenní deriváty včetně fragmentů.
 6. Antigen MSP-1 *P. falciparum* nebo *P. vivax* (US patent 4 837 016) a proteiny, které jsou s ním alespoň z 80 % homologní a jeho imunogenní deriváty včetně fragmentů.
 7. Jiné proteiny exoerytocytního stupně a imunogenní deriváty včetně fragmentů.
 8. Popřípadě proteiny krevního stupně a imunogenní deriváty včetně fragmentů.
- Termín „imunogenní derivát“ zahrnuje jakoukoliv molekulu jako je zkrácený nebo jiný derivát proteinu, který si zachová schopnost indukovat imunitní odpověď na protein po vnitřním podání člověku.
- Takové ostatní deriváty mohou být připraveny adicí, delecí, substitucí nebo přeuspořádáním aminokyselin nebo jejich chemickou modifikací.

Imunogenní fragmenty proteinu, které mohou být použitelné při přípravě podjednotkových vakcín, mohou být připraveny expresí vhodných genových fragmentů nebo peptidovou syntézou (např. použitím Merrifieldovy syntézy (The Peptides, díl 2, Academic Press. NY, str. 3).

Imunogenní derivát může být hybrid, tj. fúzní polypeptid obsahující další sekvence, které mohou nést jeden nebo více epitopů pro další imunogeny Plasmodium nebo další neplasmodiové imunogeny. Alternativně může být imunogenní derivát podle vynálezu fúzován k nosnému polypeptidu jako je povrchový antigen nebo antigen jádra hepatitidy B nebo k jinému nosiči s imunostimulačními vlastnostmi, jak je tomu v případě adjuvans, nebo k nosiči, který jinak zesiluje imunitní odpověď na protein nebo jeho derivát, nebo kde je to užitečné při expresi, čištění nebo formulaci proteinu nebo jeho derivátu.

Proteiny nebo jejich imunogenní deriváty, které jsou při vynálezu použitelné, mohou být chemicky konjugovány s makromolekulou s použitím běžných spojovacích činidel jako je glutaraldehyd (Geerlings a další, (1988) J. Immunol. Methods, 106, 239 - 244).

Vynález ilustrují následující příklady.

Příklady provedení vynálezu

Konstrukce a exprese rekombinantního TRAP

5

Při přípravě se postupuje podle popisu v WO 90/01 496.

Konstrukce a exprese RTS, S

10 Při přípravě se postupuje podle popisu v WO 93/10 152.

Přídavek adjuvans

15 Byly připraveny dvě formulace obsahující adjuvans, každá obsahující následující emulzní složku typu olej ve vodě.

SB26: 5 % skvalen, 5 % tokoferol, 0,4 % tween 80; velikost částic 500 nm

SB62: 5 % skvalen, 5 % tokoferol, 2,0 % tween 80; velikost částic 180 nm

20 Příprava emulze SB62 (dvojnásobná koncentrace)

25 Tween 80 se rozpustí ve fyziologickém roztoku s fosfátovým pufrům (PBS) za poskytnutí 2 % roztoku v PBS. Pro získání 100 ml dvojnásobné koncentrace emulze se rozmixuje pro důkladné promíchání 5 g DL alfa-tokoferolu a 5 ml skvalenu. Potom se přidá a důkladně rozmixuje 90 ml roztoku PBS/Tween. Získaná emulze se potom protlačí stříkačkou a nakonec mikrofluidizuje použitím mikrofluidizačního přístroje M110S. Získané olejové kapičky mají velikost 180 nm.

Příprava emulze SB26

30 Tato emulze byla připravena analogickým způsobem s použitím 0,4 % tweenu 80.

Další emulze ukázané v tabulce byly vyrobeny analogickým způsobem.

35 Vždy ke 100 ml emulze byly přidány dva antigeny (10 mg každého antigenu, ekvivalent 50 µg na dávku) a rozmíchány. Tato směs byla spojena s 100 µg/ml 3D-MPL a 100 µg/ml QS21 za získání konečného prostředku. Podle koncentrace soli a pH bylo použito pufru.

Tabulka

Emulze SB	Tokoferol %	Skvalen %	Tween 80 %	Span 85 %	Lecitin %	Velikost
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	0,6	0	0	500 nm
61	5	5	1	0	0	250 - 300 nm
62	5	5	2	0	0	180 nm

40

Tabulka - pokračování

Emulze SB	Tokoferol %	Skvalen %	Tween 80 %	Span 85 %	Lecitin %	Velikost
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

5 Referenční příklad (Různé formulace s RTS, S)

RTS, S se popisuje v mezinárodní patentové přihlášce WO 93/10 152 a byl obsažen v prostředcích pro vakcinaci myši balb/c. V každé skupině bylo 5 zvířat. Sedm skupin zvířat dostalo následující vakcíny:

- 10 skupina 1 RTS, S SB62
skupina 2 RTS, S QS213D-MPL
skupina 3 RTS, S QS213D-MPL SB62
skupina 4 RTS, S 3D-MPL Al(OH)₃
15 skupina 5 RTS, S Al(OH)₃
skupina 6 prázdná
skupina 7 negativní kontrola

(RTS, S - 5 µg/dávka, 3D-MPL 5 µg/dávka QS215 µg/dávka)

- 20 Zvířata byla očkována a byly jim odebírány vzorky krve 15 dnů po první imunizaci a 7 a 15 dnů po druhé imunizaci a byly prováděny testy na protilátky subtypu anti HBSAg. Emulze SB62 při formulaci s QS21 a 3D-MPL preferenčně a synergickým způsobem zvyšovala odpověď protilátky IgG2a ve srovnání se samotným SB62.

- 25 Zvýšená odpověď protilátky IgG2a u myši je měřítkem schopnosti adjuvantního systému stimulovat odpověď typu TH1.

30

PATENTOVÉ NÁROKY

- 35 1. Vakcína, vyznačující se tím, že obsahuje alespoň dva antigeny odvozené z malárie v kombinaci s adjuvans, kterým je preferenční stimulátor odpovědi buněk TH1 a kde alespoň dva antigeny malárie jsou zvoleny ze skupiny:

- a) hybridní protein obsahující v podstatě veškerou C-koncovou část proteinu CS, čtyři nebo více tandemových opakujících se sekvencí imunodominantní oblasti a povrchový antigen viru hepatitidy B, HBsAg;
- 40

- b) protein TRAP klonovaného izolátu Plasmodium falciparum z Thajska známého jako T/9/96 a proteiny, které jsou s ním z alespoň 80 % homologní a imunogenní deriváty včetně jeho fragmentů;
- 5 c) antigen MSP-1 Plasmodium falciparum nebo Plasmodium vivax a proteiny, které jsou s ním z alespoň 80 % homologní a imunogenní deriváty včetně jeho fragmentů.
2. Vakcína podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že adjuvans obsahuje 3DE-O-acylovaný monofosforyllipid A.
- 10 3. Vakcína podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že adjuvans obsahuje čišťenou saponinovou frakci QS21.
- 15 4. Vakcína podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že adjuvans obsahuje emulzi typu olej ve vodě.
5. Použití vakcíny podle některého z nároků 1 až 6 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení nebo prevenci malárie.

20

Konec dokumentu
