

Humán papillómavírus oltóanyag

Kivonat

A találmány tárgya hordozó anyag sejtekbe történő bejuttatására, amely a humán papillómavírus L1 jelű, fő burokfehérjéjét (HPV-L1) tartalmazza, amelyet szándékosan úgy módosítottunk, hogy eltávolítottuk a neutralizáló ellenanyagokat termeltető típus-specifikus epitópo(ka)t. A találmány tárgyat képezik továbbá a hordozót kódoló oligo- és polinukleotid, a hordozót vagy az oligo- és polinukleotidot tartalmazó oltóanyagok, valamint eljárások a hordozó vagy oligo- és polinukleotid alkalmazására humán papillómavírus fertőzések elleni immunizálásban, vagy ilyen fertőzés következményeinek kialakulása ellen, vagy rák bizonyos fajtáinak kialakulása ellen.

Beni.

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY - A2

Humán papillómavírus oltóanyag

A találmány tárgya hordozó anyagok sejtbe történő bejuttatására, amely humán papillómavírus módosított kapszid-fehérjét (HPV-L1 fehérje) tartalmazza, és amely nem tartalmaz semlegesítő ellenanyagok termelését okozó típuspecifikus epitópokat. A találmány tárgya továbbá a hordozót kódoló oligo- és polinukleotid, a hordozót vagy az oligo- vagy polinukleotidot tartalmazó oltóanyagok, valamint eljárások a hordozó vagy az oligo- vagy polinukleotid alkalmazására vakcinálásban virális, bakteriális vagy parazita-fertőzések ellen, valamint bizonyos rákok kialakulása ellen. Különösen humán papillómavírus fertőzések és az ilyen fertőzések következtében kialakuló rákok ellen.

A humán papillómavírusról régóta megállapították, hogy méhnyakrák fő okozója (1), és a közelmúltban szintén megállapították, hogy a hímvesző, szeméremtest, hüvely, végbél és az orofarynx rákjainak okozója. Annak is vannak jelei, hogy a vírus közrejátszhat a prosztatata, nyelőcső bizonyos rákjaiban, és egyéb feji és nyaki rákokban. A HPV-oltóanyag-fejlesztés tehát elsődleges jelentőségű napjaink megelőző rákkutatásában (2).

A HPV-nek több mint 100 különböző típusa létezik. Habár a típusokat genetikai homológia alapján definiálják, a



genotípusok mindeddig rendkívüli jó egyezést mutattak a szerotípusokkal, azaz hiperimmun antiszérumok egy típus ellen csak az azonos típust semlegesítik, és más genotípusokat nem. Kereszt-semlegesítést csak bizonyos közeli rokonságban álló típusokra mutattak ki, és 2 nagyságrenddel kisebb titerrel, mint a típus-specifikus semlegesítésre (2,3).

A HPV-kapszid 72 kapszomerből áll, amelyek mindegyike az HPV L1 fő kapszidfehérjének 5 példányát tartalmazza. Egy minor kapszidfehérje, az L2 sokkal kisebb mennyiségben van jelen a kapszidban (1:12 az L1-fehérjéhez hasonlítva) és az L2 elhelyezkedése bizonytalan (2).

Számos kis vírus expresszáll kapszidfehérjét, amelyek amikor expresszállódnak, maguktól összeállnak vírusszerű részecskékké (VLP) (azaz alaktanilag vírusrészecskékhöz hasonló részecskékké, csak nem tartalmaznak virális genomot). A HPV L1 fő kapszidfehérjéje a legjobban tanulmányozottak között van (2). A csak L1-et tartalmazó HPV VLP-k alaktanilag hasonlóak a mind L1-et, mind L2-t tartalmazó VLP-khez (2). Mind a csak L1-et tartalmazó részecskék, mind az L1-et és L2-t tartalmazó részecskék nagyon hatékonyak magas titerű semlegesítő ellenanyag-válasz kiváltásában számos állati modellrendszerben (nyulak, szarvasmarhák, kutya és rhesus-majmok), még akkor is, amikor adjuváns nélkül vannak injektálva (2).

A papillómavírus VLP-vel történő vakcinálásról kimutatták, hogy nagyon hatékony semlegesítő ellenanyagok által közvetített védelemre, papillómavírusokkal történő későbbi kután és nyálkahártyai fertőzés ellen, de csak típus-speci-



fikus módon (2). Ez az erős típuspecifitás meglepő, mivel a HPV-k fő kapszidfehérjéje evolúciósan nagyon konzervált fehérje, nagyon kevés aminosav-cserével a genetikailag rokon, de nem kereszt-semlegesítő HPV-típusok között.

A legáltalánosabb onkogén HPV-k a HPV16, 18, 31 és 45. A HPV16 megtalálható a méhnyakrák körülbelül 50%-ában, HPV18 körülbelül 20%-ában, és ez a négy típus együtt megfelel az összes méhnyakrák több, mint 80%-ának. Tehát általánosan elfogadott stratégia a 4 leggyakoribb HPV-típus HPV-kapszidját együtt tartalmazó oltóanyag gyártása.

Jóllehet ez a stratégia valószínűnek látszik, hogy működik rák szignifikáns csökkentésére, vannak határozott hátrányai. 4 hatóanyagot együtt összekeverve tartalmazó oltóanyagok kisserelése jelentős további költségeket igényel a gyártásban, és minden egyes komponens hatékonysági tesztelésében és minőségellenőrzésében.

Ezenkívül a méhnyakrák 10-20%-át olyan HPV-típusok okozzák, amelyek nincsenek benne a jelenleg gyártott potenciális oltóanyagokban. Eltekintve attól a tényről, hogy az oltóanyagok lehetetlen, hogy ezen típusok mindegyike ellen védjenek, fennáll annak a lehetősége, hogy a 4 leggyakoribb onkogén HPV-típus eliminálása növekedést okozhat a többi onkogén HPV elterjedtségében, ezáltal tovább csökkentve a rákmegelőzéssel nyert előnyöket. Ez az utóbbi forgatókönyv - amint populációbiológiai vizsgálatok jósolják - valószínűleg bekövetkezik, ha interferencia létezik a különböző vírustípusok között. Számos közvetett bizonyíték jelzi, hogy a HPV-típusok közötti interferencia létezik.



Számos egyéb HPV-típus okoz szignifikáns morbiditást és mortalitást, legnevezetesebben a HPV6 és 11, amelyek genitális kondilómákat és visszatérő légúti papillomatózisokat okoznak, és a HPV5 és 8, amelyek után bőrrákokat okoznak immunszupresszált gazdában. A széles körben keresztreagáló oltóanyagok nyilvánvaló előnyei ellenére, nem javasolták széles körben keresztreagáló oltóanyag létrehozásának lehetőségét azáltal, hogy az L1-fehérjét úgy módosítják, hogy ne tartalmazzon immundomináns típus-specifikus epitópokat. Számos felszíni kitettségű és keresztreaktív epitóp van a papillómavírus részecskék felszínén (WO 96/33737. számú nemzetközi közzétételi irat), de azok nem immunogének az immundomináns típus-specifikus epitóp jelenlétében (4). Tehát az L1 módosításával, eltávolítva az immundomináns típus-specifikus epitópokat, lehetséges kell legyen keresztreaktív papillómavírus oltóanyag előállítás, a módosított HPV-L1-fehérje alkalmazásával felszíni kitettségű, HPV-eredetű ellenanyag epitópok hordozójaként.

Ezenkívül a VLP-k nagyon hatékonyak citotoxikus T-limfocita (CTL) válasz kiváltására, és VLP-oltóanyagokról közölték, hogy nagyon hatékonyak (CD8+-sejt-függő mechanizmuson keresztül) átültethető rákok megelőzésében és kezelésében számos egérmódelben, annak a ténynek ellenére, hogy az immunizálást exogén fehérjével végzik (5). A magas immunogenitás látszólag részben a sejtek fertőzése hatásmechanizmusának megőrzése miatt van (amit pseudo-fertőzésnek neveznek, mivel nem juttatnak be virális genomot), ami azt eredményezi, hogy a kapszidfehérje feldolgozódik és prezen-



tálódik az I-es MHC osztályba tartozó prezentálási útvonalon (6). A VLP-k tehát általános jelentőségűek oltóanyag-biotechnológiai szempontból, mivel alkalmazhatók bármilyen antigén hatékony immunogén bejuttatása hordozóeszközeként (7).

Számos rendszerben demonstráltak hatékony immunizálást idegen antigéneket hordozó vad típusú HPV VLP-k alkalmazásával, például a MAGE melanóma antigénekkal és a humán immundeficiencia vírus antigénjeivel.

VLP-k immunogén bejuttatás hordozóeszközeként történő alkalmazásának lehetséges problémája a típusspecifikus semlegesítő ellenanyagok gátlása. Svédországban a felnőtt populáció 16%-a szeropozitív HPV16-ra, mutatva a probléma fontosságát. Ezenfelül a terápiás vakcinálástól azt várják, hogy ismétlődő kezeléseket igényel, ami valószínűleg típus-specifikus ellenanyag-választ indukál a vad típusú VLP-hordozó ellen.

Tehát az L1-fehérje módosításával, eltávolítva a semlegesítő ellenanyagok termelését okozó típusspecifikus epitópokat, amint azt leírták (8), és ellenanyag vagy T-sejt epitópok beépítésével ebbe a hordozóba, lehetséges kell legyen immunológia válasz létrehozása a bejuttatott peptid ellen, a magának a hordozó ellen irányuló típusspecifikus semlegesítő ellenanyagok zavarása nélkül.

A találmány célja eszköz biztosítása virális, bakteriális és parazita-fertőzések, különösen humán papillómavírus fertőzések, és ilyen fertőzések jóindulatú és rosszindulatú



következményeinek megelőzésére és kezelésére, valamint esz-
köz biztosítása rák kezelésére és megelőzésére.

A találmány tárgya semlegesítő ellenanyagok termelését
okozó típusspecifikus epitópoktól mentes módosított HPV-
L1-fehérje alkalmazása anyag sejtbe történő bejuttatásának
hordozójaként. A módosítás eredményeképpen ez a HPV-L1-
fehérje hordozó nem indukál nyilvánvaló semlegesítő ellen-
anyagokat önmaga, a hordozó ellen. Egy megvalósítási mód
szerint egy vagy több aminosavat deletálhatunk a fehérjé-
ből.

Közelebbről a találmány tárgya ilyen HPV-L1-fehérje
egy peptiddel fuzionáltatva.

A találmány tárgya ilyen hordozó is, amely képes védő
ellenanyag-válasz kialakítására, amely ellenanyag-válasz
keresztreaktív lehet humán papillómavírus két vagy több
szerológiaiailag definiált altípusával.

A hordozónak fizikailag kapcsolva, azaz fuzionáltatva
kell lennie a peptidhez, amelynek a hordozójaként hat,
ezáltal fúziós fehérje alakul ki.

Közelebbről HPV-fehérjékből származó, és lineáris el-
lenanyag és T-sejt epitópot meghatározó peptidek elfogadot-
tak.

A hordozónak a humán papillómavírus minor burokfehér-
jéjével (HPV-L2-fehérje) - natív vagy módosított - való
kombinációi is elképzelhetők. Ez a HPV-L2-fehérje önmagában
is fuzionáltatva lehet egy vagy több további peptidhez.

A találmány tárgya a hordozót kódoló oligo- vagy
polinukleotid is. A találmány lehetővé teszi jobb I-es MHC



osztály által közvetített válasz létrehozását, azaz citotoxikus T-sejtek létrehozását, a hordozó iránti típusspecifikus semlegesítő ellenanyagok kialakítása nélkül, vagy kezdetben jelen lévő típusspecifikus semlegesítő ellenanyagok nélkül.

Az is lehetséges, hogy fent leírt módon módosított HPV-L1-fehérjét alkalmazunk oligo- vagy polinukleotidok sejtekbe történő hordozójaként.

Egy megvalósítási mód szerint a találmány tárgya anyag sejtekbe történő bejuttatására alkalmas hordozó, amely humán papillómavírus olyan L1 kapszidfehérjéjét tartalmazza, amelyet szándékosan módosítottunk, hogy eltávolítsunk semlegesítő ellenanyagok előállítását okozó típusspecifikus epitópo(ka)t. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a HPV-L1-fehérje peptidhez van fuzionáltatva.

Előnyösen a peptid egy vagy több T-sejt-epitópot tartalmaz, különösen daganat-, bakteriális, parazita-, virális vagy autó-antigénekből származó epitópokat. Egy másik előnyös megvalósítási mód szerint a peptid egy vagy több ellenanyag-epitópot tartalmaz, különösen daganat-, bakteriális, parazita-, virális vagy autó-antigéneket, különösen papillómavírus antigéneket.

A hordozót kombinálhatjuk humán papillómavírus L2 minor kapszidfehérjéjével (HPV-L2-fehérje) is, amely pedig fuzionáltatva lehet egy vagy több további peptidhez. Ezen további peptidek például T-sejt- vagy ellenanyag-epitópok, amelyek daganat-, bakteriális, parazita-, virális vagy autó-antigénekből származhatnak.



Egy további megvalósítási mód szerint a fúziós fehérjét alkalmazzuk oligo- vagy polinukleotidok hordozójaként, például olyan oligo- vagy polinukleotidok hordozójaként, amelyek antigént vagy immunstimuláns (poli)peptidet kódolnak.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya találmány szerinti hordozót kódoló oligo- vagy polinukleotid.

További megvalósítási módok szerint a találmány tárgyát oltóanyagok képezik, amelyek hatóanyagként fent definiált hordozót vagy oligo- vagy polinukleotidot tartalmaznak.

A találmány további megvalósítási módjai szerint a találmány tárgyát eljárások képezik virális, bakteriális vagy parazita-fertőzések megelőzésére vagy kezelésére fent definiált hordozóval vagy oligo- vagy polinukleotiddal történő vakcinálással. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a fertőzést papillómavírus okozza.

A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások humán papillómavírus fertőzés jóindulatú vagy rosszindulatú következményei kialakulásának megelőzésére vagy kezelésére fent definiált fúziós fehérjével vagy oligo- vagy polinukleotiddal történő vakcinálással.

Az eljárások megvalósítási módjaiban a humán papillómavírus fertőzés szemölcs, vagy gége papillomatózis.

A találmány további megvalósítási módjainak tárgyát eljárások képezik rák, beleértve a méhnyak, hímvesző, szeméremtest, hüvely, végbél és orofarynx rákjainak megelőzé-



sére vagy kezelésére fent definiált fúziós fehérjével vagy oligo- vagy polinukleotiddal történő vakcinálással.

Hivatkozások

1. H. zur Hausen, „Viruses in human cancers.“, Science 254, 1167-1173. old. (1991)
2. D. R. Lowy és J. T. Schiller, “Papillomaviruses and cervical cancer: Pathogenesis and vaccine development.“, J. Natl. Cancer Inst. Monographs 23, 27-30. old. (1998)
3. W. I. White, S. D. Wilson, W. Bonne, R. C. Rose, S. Koenig és J. A. Suzich, “In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16.“, J. Virol. 72, 959-964. old. (1998)
4. H. L. Greenstone, J. D. Nieland, K. E. deVisser, M. E. De Bruijn, R. Kirnbauer, R. B. Roden, D. R. Lowy, W. M. Kast és J. T. Schiller, “Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model.“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1800-1805. old. (1998)
5. S. Peng, I. H. Frazer, G. J. Fernando és J. Zhou, “Papillomavirus virus-like particles can deliver defined CTL epitopes to the MHC class I pathway.“, Virology 240, 147-157. old. (1998)
6. M. Muller, J. Zhou, T. D. Reed, C. Rittmuller, A. Burger, J. Gabelsberger, J. Braspenning és L. Gissmann, “Chimeric papillomavirus-like particles.“, Virology 234, 93-111. old. (1997)
7. White, W.I., Wilson, S.D., Palmer-Hill, F.J., Woods, R.M., Ghim, S.-J., Hewitt, L.A., Goldman, D.M.,



Burke, S.J., Jenson, A.B., Koenig, S. és Suzich, J.A.,
"Characterization of a Major Neutralizing Epitope on Human
Papillomavirus Type 16 L1." Virology 73, 4882-4889. old.
(1999)

8. Wang, Z., Christensen, N.D., Schiller, J.T. és
Dillner, J., "A monoclonal antibody against intact Human
Papillomavirus type 16 capsids blocks the serological
reactivity of most human sera.", J. Gen. Virol. 78, 2209-
2215. old. (1997).



Szabadalmi igénypontok

1. Hordozó anyag sejtekbe történő bejuttatására, amely humán papillómavírus L1 fő kapszidfehérjét (HPV-L1-fehérje) tartalmaz, amely szándékosan úgy lett módosítva, hogy semlegesítő ellenanyagok termelését okozó fő típusspecifikus epitóp(ok) el lett(ek) távolítva.

2. Az 1. igénypont szerinti hordozó, amelyben egy vagy több aminosav deletálva lett.

3. Az 1. igénypont szerinti hordozó, amelyben a HPV-L1-fehérje peptiddel van fuzionáltatva.

4. A 3. igénypont szerinti hordozó, amelyben a peptid egy vagy több T-sejt-epitópot tartalmaz.

5. A 4. igénypont szerinti hordozó, amelyben az egy vagy több T-sejt epitóp daganat-, bakteriális, parazita-, virális vagy autó-antigének bármelyikéből származik.

6. A 3. igénypont szerinti hordozó, amelyben a peptid egy vagy több ellenanyag-epitópot tartalmaz.

7. A 6. igénypont szerinti hordozó, amelyben az egy vagy több ellenanyag-epitóp daganat-, bakteriális, parazita-, virális vagy autó-antigének bármelyikéből származik.

8. A 7. igénypont szerinti hordozó, amelyben az egy vagy több ellenanyag-epitóp humán papillómavírus antigének-ből származik.

9. A 6-8. igénypontok bármelyike szerinti hordozó, amely védő ellenanyag-válasz kialakítására képes.

10. A 9. igénypont szerinti hordozó, amellyel kialakított védő ellenanyag-válasz keresztreaktív humán papillóma-



vírusok két vagy több szerológiailag meghatározott altípusával.

11. A 10. igénypont szerinti hordozó, amellyel kialakított védő válasz daganatindukálással kapcsolatba hozott humán papillómavírusból származó HPV-L1-fehérjék bármelyike közül kettő vagy több ellen alakul ki.

12. A 11. igénypont szerinti hordozó, amellyel kialakított védő ellenanyag-válasz keresztreaktív a HV-16, HPV-18, HPV-31 vagy HPV-45 HPV-L1-fehérjék bármelyike közül kettővel vagy többel.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti hordozó, együtt humán papillómavírus minor kapszidfehérjéjével (HPV-L2-fehérje).

14. A 13. igénypont szerinti hordozó, amelyben a HPV-L2-fehérje egy vagy több további peptiddel van fuzionáltatva.

15. A 14. igénypont szerinti hordozó, amelyben az egy vagy több további peptid daganat-, bakteriális, parazita-, virális vagy autó-antigének bármelyike.

16. Az 1-15. igénypontok bármelyike szerinti hordozó, amelyben az anyag oligo- vagy polinukleotid.

17. A 16. igénypont szerinti hordozó, amelyben az oligo- vagy polinukleotid egy vagy több további antigént vagy immunstimuláns (poli)peptidet kódol.

18. Oltóanyag, amely hatóanyagként 1-17. igénypontok bármelyike szerint definiált hordozót tartalmaz.

19. Polinukleotid, amely 1-17. igénypontok bármelyike szerint definiált hordozót kódol.



20. Oltóanyag, amely hatóanyagként 19. igénypont szerinti definiált polinukleotidot tartalmaz.

21. Eljárás virális, bakteriális vagy parazita-fertőzés megelőzésére vagy kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy 1-17. igénypontok bármelyike szerint definiált hordozóval vakcinálunk.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy humán papillómavírus fertőzését előzzük meg vagy kezeljük.

23. Eljárás humán papillómavírus fertőzés jóindulatú vagy rosszindulatú következményei kialakulásának megelőzésére vagy kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy 1-17. igénypontok bármelyike szerint definiált hordozóval vakcinálunk.

24. A 23. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy humán papillómavírus fertőzés következményeként szemölcsöket vagy gége papillomatózist előzünk meg vagy kezelünk.

25. Eljárás rák megelőzésére vagy kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy 1-17. igénypontok bármelyike szerint definiált hordozóval vakcinálunk.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rákként méhnyak, himvessző, szeméremtest, hüvely, végbél vagy orofarinx rákját akadályozzuk meg vagy kezeljük.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Lengyel Zsolt

szabadalmi ügyvivőjelölt

Földvár