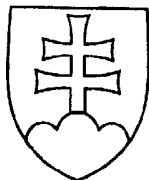


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

282 438

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

A61K 39/015

A61K 39/002

A61K 39/29

A61K 39/39

- (21) Číslo prihlášky: **115-99**
(22) Dátum podania prihlášky: **31. 7. 1997**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **5. 2. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **2/2002**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **9616351.4**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **2. 8. 1996**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **GB**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **13. 3. 2000**
Vestník ÚPV SR č.: **03/2000**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **31. 12. 2001**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP97/04326**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO98/05355**

(73) Majiteľ: **SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A., Rixensart, BE;**

(72) Pôvodca: **Cohen Joseph, Rixensart, BE;**

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Vakcínový prostriedok obsahujúci antigény proti malárii**

(57) Anotácia:
Vakcínový prostriedok, užitočný pri prevencii alebo liečení malárie, zahŕňa viaceré pri malárii vytvorené antigény v kombinácii s adjuvans, ktoré je výhodným stimulátorom TH1 bunkovej odpovede.

SK 282438 B6

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka vakcínového prostriedku a jeho použitia v medicíne, najmä pri prevencii maláriových infekcií.

Doterajší stav techniky

Malária je jedným z najväčších svetových zdravotných problémov s 2 až 4 miliónmi ľudí, zomierajúcich na túto chorobu každý rok. Jedna z najakútnejších foriem tejto choroby je spôsobená protozoálnym parazitom *Plasmodium falciparum*, ktorý je zodpovedný za väčšinu úmrtí, ktoré sa dajú pripísať malárii.

Životný cyklus *P. falciparum* je zložitý, vyžadujúci dvoch hostiteľov, človeka a moskytu na dokončenie cyklu. Infekcia človeka sa iniciuje naočkovaním sporozoitmi v slinách infikovaného moskyta. Sporozoity migrujú do pečene a tam infikujú hepatocyty, kde dozrejú cez exoerytrocytové vnútrobunkové štádium do merozoitového štádia, v ktorom infikujú červené krvné bunky (RBC), aby sa iniciovala cyklická replikácia v nepohľavnom krvnom štádiu. Tento cyklus sa uzavrie dozretím viacerých merozoitov v RBC do pohlavného štádia gametocytov, ktoré prijme ako potravu moskyt, kde sa vyvíjajú cez rad štádií v strednom čreve, aby vytvorili sporozoity, ktoré migrujú k slinnej žľaze.

Sporozoitové štádium *P. falciparum* sa identifikovalo ako potenciálny cieľ malárievej vakcíny. Hlavný povrchový proteín sporozoitu je známy ako cirkumsporozoitový proteín (CS proteín). Tento proteín z kmeňa 7G8 sa klonoval, exprimoval a sekvenoval (Dame a kol., Science 225, 593, 1984). Proteín z kmeňa 7G8 sa vyznačuje tým, že má centrálnu imunodominantnú opakovaciu oblasť, obsahujúcu tetrapeptid Asn-Val-Asn-Pro, opakovaný 37-krát, ale s roztrúsenými štyrmi minoritnými opakovanými sekvenciami Asn-Val-Asp-Pro. V iných kmeňoch sa počet hlavných a minoritných opakovaných sekvencií mení, ako aj ich relatívna poloha. Táto centrálna časť je na okrajoch zakončená N a C terminálnou časťou, skladajúcou sa z neopakujúcich sa aminokyselinových sekvencií, označovaných ako neopakujúca sa časť CS proteínu.

Ukázalo sa, že ožiarené sporozoity môžu poskytnúť významnú ochranu proti experimentálnej ľudskej malárii (Am. J. Trop. Med. Hyg. 24, 297 až 402, 1975). Ale výrobné problémy spôsobujú, že použitie ožiarovaných sporozoitov je nepraktické z hľadiska výroby vakcíny.

Niekoľko skupín navrhlo podjednotkové vakcíny na základe cirkumsporozoitového proteínu. Niekoľko z týchto vakcín prešlo klinickým testovaním; jednou je syntetický peptid, druhou je rekombinantný proteín (Ballou a kol., Lancet, i 1277, 1987 a Herrington a kol., Nature 328, 257, 1987).

Tieto vakcíny boli úspešné pri stimulovaní antiparazitárnej odpovede. Napriek tomu sila odpovede bola nespokojivá, pričom niektoré vakcíny nevyvolali odpoveď vôbec. Ďalej, neprítomnosť „zvýšenia“ hladín protilátok pri následných injekciách a výsledky testov proliferácie lymfocytov in vitro viedli k predpokladu, že T-bunky väčšiny týchto dobrovoľníkov nerozpoznali imunodominantnú opakovanú sekvenciu. Napriek tomu pri jednej vakcínovej každej štúdii sa nevyvinula parazitémia.

Medzinárodná patentová prihláška č. WO 93/10152 (Smithkline Beecham Biologicals) opisuje a nárokuje si hybridný proteín, obsahujúci v podstate celú C-terminálnu časť CS proteínu, štyri alebo viaceré tandemové, opakujúce

sa sekvencie imunodominantnej oblasti a povrchový antigén (HBsAg) z vírusu hepatitídy B. Hybridný výhodne zahŕňa sekvenciu, ktorá obsahuje najmenej 160 aminokyselín, ktorá je v podstate homologická s C-terminálnou časťou CS proteínu. CS proteín môže byť zbavený posledných 12 aminokyselín z C-konca.

Najmä sa tam opisuje proteín, ktorý zahŕňa časť CS proteínu *P. falciparum*, v podstate zodpovedajúcu aminokyselinám 210 až 398 *P. falciparum* 7G8, fúzanú v rámci cez lineárnu spojku k N-koncu HBsAg. Spojka môže zahŕňať časť preS2 z HBsAg.

Konkrétnym uskutočnením, opísaným vo WO 93/10152, je hybridný proteín, označený ako RTS. Tento hybrid pozostáva z:

- metionínového zvyšku, kódovaného nukleotidmi 1059 až 1061, získaného zo *Saccharomyces cerevisiae* TDH3 génovej sekvencie (nukleotidy 1 až 1058 v tomto čítacom rámci tvoria TDH3 promótor samotný) (Musti A.M. a kol., Gene 25, 133 až 143, 1983).

- troch aminokyselín, Met Ala Pro, získaných z nukleotidovej sekvencie (1062 až 1070), vytvorenej klonovacím postupom, použitým na konštrukciu hybridného génu;

- reťazca 189 aminokyselín, kódovaného nukleotidmi 1071 až 1637, reprezentujúceho aminokyseliny 210 až 398 cirkumsporozoálneho proteínu (CSP) *Plasmodium falciparum* kmeňa 7G8 (Dame a kol., pozri);

- aminokyseliny (Arg), kódovanej nukleotidmi 1638 až 1640, vytvorenej klonovacou procedúrou použitou na konštrukciu hybridného génu

- štyroch aminokyselín, Pro Val Thr Asn, kódovaných nukleotidmi 1641 až 1652 a reprezentujúcich štyri karboxy koncové zvyšky proteínu (9) preS2 vírusu hepatitídy B (adw serotyp)

- reťazca 226 aminokyselín, kódovaného nukleotidmi 1653 až 2330 a špecifikujúceho S proteín vírusu hepatitídy B (adw serotyp)

WO 93/10152 ďalej opisuje expresiu hybridného proteínu v prijímajúcom kvasinkovom kmeni, ktorý už nesie vo svojom genóme niekoľko integrovaných kópií kazety S expresie hepatitídy B. Výsledný kmeň syntetizuje dva polypeptidy, S a RTS (alebo iný hybridný proteín podľa tohto vynálezu), ktoré sa spontánne spoja do zmiešaných (napríklad RTS, S) lipoproteínových častíc. Tieto častice výhodne prezentujú CSP sekvencie hybridu na svojom povrchu.

Podstata vynálezu

Cieľom tohto vynálezu je dodať imunitu proti zamoreniam *P. falciparum* a/alebo *P. vivax* imunizáciou prostriedkom, zahŕňajúcim viaceré antigény v kombinácii s adjuvans, ktoré je výhodným stimulátorom TH1 bunkovej odpovede.

V súlade s tým tento vynález poskytuje vakcínový prostriedok na použitie pri prevencii alebo liečení malárie, zahŕňajúci viaceré, pri malárii vytvorené antigény v kombinácii s adjuvans, ktoré je výhodným stimulátorom TH1 bunkovej odpovede.

Výhodne najmenej jedným z týchto antigénov je hybridný proteín, ako bol definovaný, ako je RTS, výhodnejšie vo forme zmiešaných častíc, ako už boli definované, ako je RTS, S.

Z ďalšieho aspektu tento vynález poskytuje vakcínový prostriedok na použitie pri prevencii alebo liečení malárie, zahrňujúcu viaceré pri malárii vytvorené antigény, pričom najmenej jedným z antigénov je hybridný proteín, ako bol

definovaný, ako je RTS, výhodnejšie vo forme zmiešaných častíc, ako boli definované, ako je RTS, S.

Množstvo antigénu, prítomného v každej dávke vakcíny, sa zvolí ako množstvo, ktoré vyvolá imunoprotektívnu odpoveď bez významných nepriaznivých vedľajších účinkov typických vakcín. Toto množstvo sa bude meniť v závislosti od toho, aké špecifické imunogény sa použijú. Vo všeobecnosti sa očakáva, že každá dávka bude obsahovať celkovo 1 až 1000 µg proteínu, výhodne 1 až 200 µg, najvýhodnejšie 10 až 100 µg. Optimálne množstvo pre konkrétnu vakcínu sa dá určiť štandardnými štúdiami, vrátane pozorovania imunitnej odpovede subjektov. Po prvej vakcinácii subjekty výhodne dostanú posilňovaciu dávku asi o 4 týždne, po ktorej nasledujú opakované posilňovacie dávky každých šesť mesiacov tak dlho, kým existuje riziko infekcie.

Ďalší aspekt tohto vynálezu spočíva v spôsobe liečenia pacienta, náchylného na plazmódiové infekcie, podaním účinného množstva vakcíny, ako sme už opisali.

Adjuvans, ktoré sú schopné stimulovať TH1 bunkovú odpoveď, sú opísané v medzinárodných patentových prihláškach č. WO 94/00153 a WO 95/17209.

Zvlášť výhodné adjuvans zahŕňa QS21, Hplc čistenú netoxickú frakciu, získanú z kôry Quillaja Saponaria Molina, a 3 de-O-acylovaný monofosforylový lipid A (3D-MPL), voliteľne spolu s nejakým olejom vo vodnej emulzii.

3 De-O-acylovaný monofosforylový lipid A je známy z GB 2220211 (Ribi). Chemicky je to zmes 3 de-O-acylovaného monofosforylového lipidu A so 4, 5 alebo 6 acylovanými reťazcami a vyrába ho Ribi Immunochem Montana. Výhodná forma 3 de-O-acylovaného monofosforylového lipidu A je opísaná v medzinárodnej patentovej prihláške č. 92/116556.

QS21 je Hplc čistená netoxická frakcia saponínu z kôry juhoamerického stromu Quillaja Saponaria Molina a metóda jej prípravy je opísaná (ako QA21) v US patente č. 5 057 540.

Výhodná emulzia olej vo vode obsahuje metabolizovateľný olej, ako sú skvalén, alfa tokoferol a tween 80. Navyše môže olej vo vodnej emulzii obsahovať span 85 a/alebo lecitín.

Pomer QS21 : 3D-MPL bude typicky poriadku 1 : 10 až 10 : 1; výhodne 1 : 5 až 5 : 1 a často v podstate 1 : 1. Výhodný rozsah na optimálnu synergiu je 2,5 : 1 až 1 : 1 3D-MPL : QS21. Na podanie ľuďom budú QS21 a 3D-MPL typicky prítomné vo vakcíne v rozsahu 1 µg až 200 µg, ako je 1 až 100 µg, výhodne 10 µg až 50 µg na dávku. Typicky bude olej vo vode obsahovať od 2 do 10 % skvalénu, od 2 do 10 % alfa tokoferolu a od 0,3 do 3 % tween 80. Pomer skvalén : alfa tokoferol sa výhodne rovná alebo je menší než 1, keďže toto poskytuje stabilnejšiu emulziu. Span 85 môže byť tiež prítomný na úrovni 1 %. V niektorých prípadoch môže byť výhodné, keď vakcíny podľa tohto vynálezu budú ďalej obsahovať stabilizátor.

Príprava vakcíny je vo všeobecnosti opísaná v New Trends and Developments in Vaccines, editor Voller a kol., University Park Press, Baltimore, Maryland, USA, 1978. Uzavretie do lipozómov opísal napríklad Fullerton, US patent 4 235 877. Konjugáciu proteínov na makromolekuly opísali napríklad Likhite, US patent 4 372 945, a Armor a kol., US patent 4 474 757.

Pri malárii vytvorené antigény, užitočné v tomto vynáleze, možno vybrať z nasledujúceho:

1. Hybridný proteín, ako bol definovaný, ako je RTS, výhodnejšie vo forme zmiešaných častíc, ako boli definované, ako je RTS, S.

2. TRAP klonovaného izolátu z *P. falciparum* z Thajska, známeho ako T/9/96, a proteíny, ktoré majú najmenej 80 % homológie k nemu, a imunogénne deriváty, vrátane ich fragmentov (opísané v medzinárodných patentových prihláškach č. WO 90/01496 a WO 91/11516 (3i Exploitation Limited) a vo WO 92/11868 (US Navy)).

3. 16kD proteín, opísaný v medzinárodnej patentovej prihláške č. WO 91/18922, a proteíny s najmenej 80 %-nou homológiou k nemu, a imunogénne deriváty vrátane ich fragmentov.

4. Vrcholový membránový antigén-1 (AMA-1) z *P. falciparum* alebo *P. vivax* a proteíny s najmenej 80 %-nou homológiou k nemu, a imunogénne deriváty vrátane ich fragmentov.

5. Cirkumsporozoálny proteín (csp) z *P. falciparum* alebo *P. vivax* a proteíny s najmenej 80 %-nou homológiou k nemu, a imunogénne deriváty vrátane ich fragmentov.

6. MSP-1 z *P. falciparum* alebo *P. vivax* (US patent č. 4 837 016) a proteíny s najmenej 80 %-nou homológiou k nemu, a imunogénne deriváty vrátane ich fragmentov.

7. Iné proteíny exoerytrocytového štádia a imunogénne deriváty vrátane ich fragmentov.

8. Voliteľne proteíny krvného štádia a imunogénne deriváty vrátane ich fragmentov.

Výraz „imunogénne deriváty“ zahŕňa akúkoľvek molekulu, ako je odrezaný alebo iný derivát proteínu, ktorý si zachová schopnosť vyvolať imunitnú odpoveď na tento proteín po vnútornom podaní človeku. Takéto iné deriváty sa dajú pripraviť adíciou, vypustením, substitúciou alebo preusporiadaním aminokyselín alebo ich chemickou modifikáciou.

Imunogénne fragmenty proteínu, ktoré môžu byť užitočné pri príprave podjednotkových vakcín, sa môžu pripraviť expresiou príslušných génových fragmentov alebo peptidovou syntézou, napríklad s použitím Merrifieldovej syntézy (The Peptides, zv. 2, Academic Press, NY, str. 3).

Imunogénnym derivátom môže byť hybrid, to jest fúzny polypeptid, obsahujúci ďalšie sekvencie, ktoré môžu niesť jeden alebo viaceré epitopy pre iné plazmódiové imunogény alebo iné neplazmódiové imunogény. Alternatívne môže imunogénny derivát podľa tohto vynálezu sfúzovať na nosný polypeptid, ako je povrchový alebo jadrový antigén hepatitídy B, alebo na iný nosič, ktorý má imunostimulačné vlastnosti, ako je to v prípade adjuvans, alebo ktorý ináč zosilňuje imunitnú odpoveď na proteín alebo jeho derivát, alebo ktorý je užitočný pri expresii, čistení alebo formulovaní proteínu alebo jeho derivátu.

Proteíny alebo ich imunogénne deriváty, ktoré sú užitočné podľa tohto vynálezu, môžu chemicky konjugovať na makromolekulu s použitím bežného spojovacieho činidla, ako je glutaraldehyd (Geerlings a kol., J. Immunol. Methods 106, 239 až 244, 1988).

Nasledujúci príklad ilustruje tento vynález:

Príklady uskutočnenia vynálezu

Konštrukcia a expresia rekombinantného TRAP

Tento sa pripravil, ako je opísané vo WO 90/01496.

Konštrukcia a expresia RTS, S.

Tento sa pripravil, ako je opísané vo WO 93/10152.

Adjuvantácia

Pripravili sa dve adjuvantné formulácie, z ktorých každá obsahovala nasledujúcu zložku emulzie oleja vo vode.

SB26: 5 % skvalénu, 5 % tokoferolu, 0,4 % tween 80; veľkosť častíc bola 500 nm.

SB62: 5 % skvalénu, 5 % tokoferolu, 2,0 % tween 80; veľkosť častíc bola 180 nm.

Príprava emulzie SB62 (2-násobný koncentrát)

Tween 80 sa rozpustí vo fosfátom pufrovanom fyziologickom roztoku (PBS), aby vznikol 2 %-ný roztok v PBS. Aby vzniklo 100 ml dvojnásobne koncentrovanej emulzie, 5 g DL alfa tokoferolu a 5 ml skvalénu sa viera, aby sa dokonale zmiešali. Pridá sa 90 ml roztoku PBS/Tween a starostlivo sa premiešajú. Výsledná emulzia sa potom nechá prejsť injekčnou striekačkou a nakoniec sa mikrofluidizuje s použitím mikrofluidizačného prístroja M110S. Výsledné kvapôčky oleja majú veľkosť približne 180 nm.

Príprava emulzie SB26

Táto emulzia sa pripravila analogickým spôsobom s použitím 0,4 % tween 80.

Ďalšie emulzie, ako je uvedené v tabuľke, sa pripravili analogickým spôsobom.

Ku každým 100 ml emulzie sa pridali dva antigény (10 mg každého antigénu, ekvivalentných 50 µg na dávku) a miešali. Toto sa skombinovalo so 100 µg/ml 3D-MPL a 100 µg/ml QS21, aby vznikla konečná formulácia. Pufer sa nastavil podľa obsahu soli a pH.

Tabuľka

Dvojnásobne koncentrované vehikula

Emulzie SB	Tokoferol %	Skvalén %	Tween 80 %	Span 85 %	Lecitin %	Veľkosť
26	5	5	0,4	0	0	500 nm
						90-100 %
						800 nm
						10-0 %
26,1	5	5	0,4	0	0,1	500 nm
63	5	5	0,6	0	0	500 nm
64	5	5	0,8	0	0	500 nm
61	5	5	1	0	0	250-300 nm
62	5	5	2	0	0	180 nm
40	5	5	0,4	1	0	500 nm
						80-100 %
						800 nm
						20-0 %
40,1	5	5	0,4	1	0,1	500 nm
60	5	5	1	1	0	300 nm
65	5	5	0,4	1,5	0	500 nm
66	5	5	0,4	2	0	500 nm

Referenčný príklad: Rôzne formulácie RTS, S

RTS, S je opísaná v medzinárodnej patentovej prihláške č. WO 93/10152 a formulovala sa na vakcináciu balb/c myši. V každej skupine bolo 5 zvierat. 7 skupín zvierat dostalo nasledujúce formulácie

Skupina 1 RTS, S SB62

Skupina 2 RTS, S QS21 3D-MPL

Skupina 3 RTS, S QS21 3D-MPL SB62

Skupina 4 RTS, S 3D-MPL Al(OH)₃

Skupina 5 RTS, S Al(OH)₃

Skupina 6 normálna

Skupina 7 negatívna kontrola

(RTS, S - 5 µg/dávku, 3D-MPL - 5 µg/dávku, QS21 - 5 µg/dávku)

Zvieratá sa naočkovali a odobrala sa im krv po 15 dňoch po prvej imunizácii a na 7. a 15. deň po druhej imunizácii a testovala sa na anti-HBSAg protilátkový podtyp.

Emulzia SB62, keď sa formulovala s QS21 a 3D-MPL, zosilňovala prednostne a synergickým spôsobom IgG2 a protilátkovú odpoveď v porovnaní s SB 62 samotným.

Zosilnená IgG2 a protilátková odpoveď u myši je mierou schopnosti adjuvantného systému stimulovať odpoveď TH1 typu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Vakcínový prostriedok, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje najmenej dva pri malárii tvorené antigény v kombinácii s adjuvans, ktoré je výhodným stimulátorom TH1 bunkovej odpovede, a kde najmenej dva antigény malárie sú vybrané zo skupiny:

a) hybridný proteín, zahŕňajúci celú C-koncovú časť cirkumsporozoitového proteínu, štyri alebo viac tandemových opakujúcich sa sekvencií imunodominantnej oblasti a povrchový antigén (HBsAg) z vírusu hepatitídy B;

b) TRAP z klonovaného izolátu z *P. falciparum* z Thajska, známeho ako T/9/96, a proteíny s najmenej 80 %-nou homológiou k nemu a imunogénne deriváty vrátane ich funkčných fragmentov;

c) MSP-1 z *P. falciparum* alebo *P. vivax* (US patent č. 4 837 016) a proteíny s najmenej 80 %-nou homológiou k nemu a imunogénne deriváty vrátane ich funkčných fragmentov.

2. Vakcínový prostriedok podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že adjuvans obsahuje MPL.

3. Vakcínový prostriedok podľa nároku 1 alebo 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že adjuvans obsahuje QS21.

4. Vakcínový prostriedok podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že adjuvans obsahuje emulziu olej vo vode.

5. Použitie vakcínového prostriedku podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4 na výrobu liečiva na liečenie alebo profylaxiu malárie.

Koniec dokumentu