

P02 03646

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

39888

A2

KIVONAT

Gyengített mikroorganizmusok alkalmazása
fertőzések ellen

A találmány tárgyát gyengített mikroorganizmusok képezik, amelyek vakcina készítményekben alkalmazhatók baktériumok vagy vírusok által okozott fertőzések megelőzésére vagy megszüntetésére.

A gyengítő mutáción átment Salmonella mikroorganizmus károsítja egy, az Spi2 patogenicitási szigeten elhelyezkedő gén kifejeződését és egy további mutáció folytán károsítja a clpP, sifA, sseC vagy az ssaB gén kifejeződését.

A találmány tárgyát képezi a mikroorganizmus terápiás alkalmazása szisztémás bakteriális fertőzés ellen ható gyógyszerkészítmény előállítására pl. tifusz fertőzés ellen, valamint egy vakcina készítmény, amely a mikroorganizmust, egy adjuvánst és egy fiziológiai szempontból elfogadható hígítót tartalmaz.

Fedei.

P 0 2 0 3 6 4 6

Gyengített mikroorganizmusok alkalmazása
fertőzések ellen

A találmány tárgyát gyengített mikroorganizmusok képezik, amelyek vakcina készítményekben alkalmazhatók baktériumok vagy vírusok által okozott fertőzések megelőzésére vagy megszüntetésére.

Jól ismert, hogy a gyengített mikroorganizmusok nagyon hatásosak vakcinaként és hogy az ilyen vakcinák olyan immunválaszokat eredményezhetnek, amelyek gyakran nagyobb nagyságrendűek és hosszabb ideig fennállnak, mint a nem replikálódó immunogén anyagok hatása. Ennek egyik magyarázata lehet az, hogy az élő gyengített törzsek korlátozott fertőzést váltanak ki a gazdaszervezetben és ez a természetes fertőzés korai fázisaira hasonlít. Ezenkívül az előlt mikroorganizmusokat tartalmazó készítményektől eltérően az élő vakcinák erőteljes, a sejtek által közvetített válaszokat képesek indukálni, ami azzal függhet össze, hogy képesek reprodukálódni antigéneket tartalmazó sejtekben, így makrofágokban is. Az élő gyengített Salmonella vakcinák alkalmazása hosszú múltra tekinthet vissza; ezek biztonságos és hatékony vakcinákat szolgáltatnak a szalmonellózis emberben és állatokban való megelőzésére. Az orálisan adható gyengített tifoid vakcina /Ty21a (Vivotif), gyártja a Swiss Serum Vaccine Institute/ nagyon sikeres vakcinának bizonyult a tífusz-szerű láz megelőzésére és számos országban alkalmazzák ezt Európában és az Amerikai Egyesült Államokban.



Ennek a törzsnek a gyengítését azonban kémiai eszközök /mutagenézis/ alkalmazásával érték el és nem teljesen tisztázott a gyengítés háttere. Ennek következtében a vakcina nem ideális eszköz a dózisok száma /ez jelenleg 4/ és az egyes dózisokban bevenni szükséges mikroorganizmusok mennyisége miatt.

A modern molekuláris biológiai technikák és a Salmonella patogenezisének mélyebb megismerése több olyan gén azonosításához vezetett, amelyek lényegesek az organizmusok in vivo növekedése és túlélése szempontjából. Így a gyengítéshez új cél-géneket sikerült találni, ami ahhoz a megfontoláshoz vezetett, hogy a jövőbeni vakcina törzsek „ésszerűen” gyengíthetők meghatározott irreverzibilis mutációknak a kiválasztott génekben való létrehozásával, amelyekről ismert, hogy szerepet játszanak a virulenciában. Ez megkönnyíti javított vakcinák kifejlesztését, különösen az immunogenicitás és így az alkalmazandó dózisok száma tekintetében.

Bár jelenleg számos gyengített Salmonella törzset ismerünk, kevés látszik alkalmasnak emberben használható vakcina potenciális komponenseként. Ez részben azzal függhet össze, hogy meg kell találni az egyensúlyt a vakcina immunogenitása és a Salmonella mikroorganizmus reaktiválódásának lehetősége között.

Nyilvánvaló, hogy a megfelelő gyengítési célpontok kiválasztása - ami a vakcina megfelelő hatóanyagának azonosításához vezet - nem egyszerű eljárás és az eredmény nem látható előre. Számos tényező befolyásolhatja a gyengített törzs mint megfelelő vakcina alapanyag alkalmasságát és intenzív kutatómunka folyik a megfelelő törzsek kiválasztására. Több gyengített törzs pl.,



amelyet a vakcina céljaira vizsgáltak, a betegben vakcinémiához vagy tályogok képződéséhez vezetett.

Szükség van tehát olyan vakcina előállítására, amely magas immunogenitással rendelkezik és csökkentett mértékben teszi lehetővé a mikroorganizmus törzs aktív alakba való visszafejlődését.

A találmány alapja tehát az a felismerés, hogy egy *Salmonella* mikroorganizmusban létrehozott gyengítő mutációk többféle kombinációja olyan vakcinát eredményezhet, amely magas immunogenitással rendelkezik, és alacsony a kockázata annak, hogy a mikroorganizmus visszatér az aktív alakba. A kapott vakcina törzsek kedvező mellékhatás profilt mutatnak.

A találmány egyik tárgya tehát olyan *Salmonella* mikroorganizmus, amelyben a gyengítő mutáció folytán károsodik az *Spi2* patogenicitási szigeten elhelyezkedő egyik gén expressziója és egy további mutáció folytán megszűnik a *clpP*, *clpR*, *sifA*, *sseC* vagy az *ssaB* gén kifejeződése.

A találmány egy további tárgya olyan *Salmonella* mikroorganizmus, amelyben a gyengítő mutáció folytán károsodik egy *aro* gén expressziója és egy további mutáció folytán megszűnik a *clpP* vagy *sifA* gén expressziója.

A *Salmonella* mikroorganizmus felhasználható egy i.v. vagy orálisan bevihető gyógyszer előállítására, amely bakteriális vagy vírus-fertőzés /pl. a tífusz/ ellen használható fel.

A találmány szerinti mikroorganizmusok és vakcina készítmények ismert módon állíthatók elő.



A szakember minden további kísérletezés nélkül ki tudja választani a konkrét *Salmonella* mikroorganizmust és a megfelelő mutációt. Kitüntetett mikroorganizmus a *Salmonella typhimurium*.

Egy első mutáns sorozat egy első mutációt tartalmaz egy, a *Salmonella* Spi2 patogenicitási szigete régiójában elhelyezkedő génben; ezt a régiót a WO-A-96/17951 ismerteti.

Az Spi2 egyike a *Salmonella* kromoszómán elhelyezkedő patogenicitási szigeteknek. Az Spi2 több gént tartalmaz, amelyek egy III. típusú szekréción rendszer kódolnak, amely az Spi2 által kódolt, a virulenciával összefüggő fehérjék /effektor proteinek/ átvitelében játszik szerepet a *Salmonella* baktériumokon kívül és potenciálisan közvetlenül a gazda célszervezetekbe, pl. makrofágokba. Az Spi2 egy része /az apparátus gének/ a III. típusú szekréción rendszer kiválasztási apparátusát kódolja. Az Spi2-re egérben feltétlenül szükség van a *Salmonella* patogeneziséhez és virulenciájához; ezt a megfigyelést több különböző kutatócsoport igazolta a világ különböző országaiban. A *S. typhimurium* Spi2 mutánsok egérben jelentősen gyengíthetők orális, i.v. és i.p. bevitel mellett.

Egy kitüntetett kiviteli alak szerint az Spi2 régióban elhelyezkedő gén egy apparátus gén. Az Spi2-n belül elhelyezkedő apparátus gének jól ismertek /Hensel et al.: *Molecular Microbiology* 24(1), 155-167, 1997/. A találmány keretében használható gének a következők:

ssaV, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaO, ssaP, ssaQ, ssaR, ssaS, ssaT, ssaU és ssaH.



Az Spi2 tartományban a mutációnak nem kell szükségszerűen egy génben végbemennie annak érdekében, hogy a funkcióképesség megszűnjön. Egy upstream regulátor tartományban végbemenő mutáció pl. ugyancsak károsíthatja a gén kifejeződését, ami gyengítéshez vezet. A gének közötti tartományokban végbemenő mutációk szintén elégségesek lehetnek a gén funkciójának károsításához.

A találmány egy kitüntetett kiviteli alakjában az Spi2 gén az ssaV-vel azonos és a további mutáció a clpP-t, ompR-t, sifA-t vagy sseC-t roncsolhatja. Egy másik kitüntetett kiviteli alak esetében a mutáció az ssaT-t és a következő mutáció az ssaB-t károsítja.

A clpP gént Gifford et al. /Gen.Microbiol. 139, 913-920, 1993/ írja le. A kódolt protein a stresszreakció proteáz.

Az ompR gént Chatfield et al. írja le /Immunity 59(1), 449-452, 1991/. A kódolt protein egy kétkomponensű rendszer /OmpR-EnvZ/ egyik komponense, globális regulátor funkciót lát el és egyben regulátora az ssrA-ssrB kétkomponensű rendszernek /Lee et al.: J.Bact. 182(3), 771-781, 2000/.

Az sseC gént Medina et al. írja le /Infection and Immunity 67(3), 1093-1099, 1999/. A kódolt termék funkciója nem ismert.

Az ssaB gént Hensel et al. írja le /Molecular Microbiology 36(5), 1015-1023, 2000/. A kódolt fehérje az Spi2 egyik ismert szubsztrát proteinje és szerepet játszik a normális endoszomális forgalom keretében a makrofágokban.

Egy második elkülöníthető mutáns sorozat olyan első mutációt tartalmaz, amely egy aro gént károsít. Ez a mutáció „auxotróf mutációnak” nevezhető, mivel az aro gén esszenciális a Salmonella

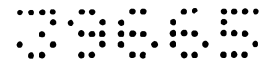


bioszintézis rendszerében, de nincs jelen az emlősökben. Ezért a mutáns a mutáció hatásának elkerülésére nem függhet az emberben található metabolitoktól. Az auxotróf mutáció céljára megfelelő gének közé tartozik az *aroA*, *aroC*, *aroD* és *aroE*. A kitüntetett kiviteli alak esetében az *aroC* károsodik.

A második mutáció a *clpP* vagy *sifA* gént károsítja. A *clpP*-t az előbbiekben írtuk le. A *sifA* gén ugyancsak ismert /Stein et al.: Mol. Microbiol. 20(1), 151-164, 1996; Beuzon et al.: EMBO J. 19(13), 3235-3249, 2000/. A *sifA* gén terméke a lizoszóma glikoproteint tartalmazó szerkezeteinek termelődésében játszik szerepet az epitélium sejtjeiben.

A mutációk a mikroorganizmusokban bármely ismert megoldás szerint előidézhethők. A mutáció előnyösen deléciós mutáció, amelynek keretében a gén károsodását nukleinsavak kimetszése okozza. Egy másik megoldás szerint a mutáció nukleinsavak beiktatásával vagy pontmutációkkal idézhető elő. A meghatározott régiókban végrehajtott mutációs eljárások a szakember számára nyilvánvalók.

A gén-deléció pl. úgy hajtható végre, hogy a PCR technika és egy „hifi” polimeráz alkalmazásával először amplifikáljuk a célgént és a határos DNS-t. Az amplifikált termék ezután egy megfelelő klónozó vektorba klónozható be. A PCR primerek a gén kihasználatának megfelelően tervezhetők meg inverz PCR esetében egy kiindulási konstrukció létrehozásához. A PCR primerek egy *Xba*I helyet tartalmazhatnak egy új restrikciós hely bevezetéséhez és így egy markert biztosítanak a gén-delécióhoz. A deléció terméke ezután átvihető egy öngyilkos vektorba a *Salmonella* kromoszómába



történő bevitelhez. Ez a termék elektroporációval vagy konjugációval a kívánt törzsbe vihető be és a rekombinánsokat, amelyek a kromoszómába a homológ helyen /merodiploidok/ integrálódva tartalmazzák a plazmidot, a plazmid által hordozott antibiotikum rezisztencia marker alkalmazásával szelektáljuk. Az öngyilkos gén tartalmazhatja a *sacB* gént is, amely a leván-szacharáz enzimet kódolja; ez szacharóz jelenlétében a legtöbb Gram-negatív baktériumra toxikus. A szacharóz alapon történő szelekció ezért alkalmazható olyan telepek elkülönítésére, amelyekben egy második rekombinációs esemény ment végbe és ez ahhoz vezet, hogy a plazmid leválik a kromoszómáról. Ez a második rekombinációs esemény kétféle eredménnyel járhat: a vad típusú allél regenerálódásához vagy egy deléciós mutáns létrejöttéhez vezethet. A deléciós mutációt tartalmazó telepek ezután telep-PCR-ral azonosíthatók és a deléció Southern blot elemzéssel igazolható.

A két mutáción kívül a *Salmonella* mikroorganizmus heterológ antigéneket is tartalmazhat. A gyengített mikroorganizmusok ezért szállító eszközként képesek működni más bakteriális vagy vírus fertőzés elleni antigének irányításában. A szakember számára nyilvánvaló, hogy melyek az ilyen felhasználásra alkalmas antigének; ezek közé sorolhatók a

- patogén *E. coli* antigének, pl. az ETEC
- hepatitisz A, B és C antigének
- Lyme kór antigének
- Vibrio cholera* antigének
- Helicobacter* antigének
- Herpes simplex vírus antigének



emberi papilloma vírus antigének.

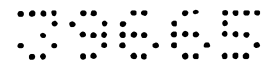
A rendszernek van arra is kapacitása, hogy terápiás fehérjéket, peptideket vagy nukleinsavakat vigyen be a szervezetbe, pl. hepatitisz fertőzés esetén. A mutáns mikroorganizmusok által beviteli megfelelő terápiás proteinek közé tartoznak pl. a citokinek. A heterológ antigének vagy terápiás proteinek vakcina készítmények alkalmazásával történő bevitele a szakember által ismert módon történik.

A találmány szerinti mikroorganizmusok alkalmazásával előállított vakcinák humán és állati fertőzések esetében egyaránt felhasználhatók.

A kettős mutáció hatékony eszközt jelent a mikroorganizmusok gyengítésére, biztonságos vakcinák előállítására érdekében.

A vakcina készítmények hatásos védelmet biztosítanak még immunbeteg egyénekben is és különösen fontos, hogy alacsony kockázattal járó megoldást képviseljenek a lép tályogok kialakulása tekintetében is. A lép tályogokat egyszeri mutáción alapuló vakcinák alkalmazásával azonosítottuk, ezért a találmány szerinti készítmények lényeges előnyöket jelenthetnek az érintetteknek.

A vakcina készítmények kikészítéséhez a mutáns mikroorganizmus valamely megfelelő, gyógyászatiilag elfogadható adjuvánssal, hígítóval vagy segédanyaggal alkotott keverékben lehet jelen. A szakember számára nyilvánvaló, hogy melyek a megfelelő készítmények. A készítmények kikészítése bármely alkalmas beviteli mód igényei szerint történhet. Kitüntetett az orális vagy i.v. beviteli mód és a vakcinák élő, gyengített Salmonella mikroorganizmusokat tartalmaznak. A készítményekben jelenlevő mikroorganiz-



musok szükséges számát a szakember meg tudja határozni és optimalizálni. Általában azonban az egyénbe kb. 10^7 - 10^{10} , előnyösen kb. 10^8 - 10^9 telepképző egység /CFU/ mikroorganizmus vihető be egyszeri dózisban.



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Gyengítő mutáción átment *Salmonella* mikroorganizmus, amely károsítja egy, az Spi2 patogenicitási szigeten elhelyezkedő gén kifejeződését és egy további mutáció folytán károsítja a clpP, sifA, sseC vagy az ssaB gén kifejeződését.

2. Gyengítő mutáción átment *Salmonella* mikroorganizmus, amely károsítja egy aro gén kifejeződését és egy további mutáció folytán károsítja a clpP vagy az sifA gén kifejeződését.

3. A 2. igénypont szerinti mikroorganizmus, amelyben az aro gén az aroC-vel azonos.

4. Az 1. igénypont szerinti mikroorganizmus, amelyben az Spi2 gén az ssaV és a további mutáció a clpP, ompR, sifA vagy az sseC kifejeződését károsítja.

5. Az 1. igénypont szerinti mikroorganizmus, amelyben az Spi2 gén az ssaT és a további mutáció az ssaB-t károsítja.

6. Az előző igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmus, amely egy heterológ antigént vagy egy terápiás proteint is tartalmaz.

7. A 6. igénypont szerinti mikroorganizmus, amelyben az antigén a hepatitisz A, B vagy C antigén.

8. Az előző igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmus, a *Salmonella typhi* Tyi2.

9. Az előző igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmus terápiás alkalmazása.



10. Vakcina készítmény, amely az 1.-8. igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmust, egy adjuvánst és egy fiziológiai szempontból elfogadható hígítót tartalmaz.

11. A 10. igénypont szerinti készítmény, amely adagolási egységenként 10^7 - 10^{10} mikroorganizmust tartalmaz.

12. A 11. igénypont szerinti készítmény, amely 10^8 - 10^9 telepkepző egység mikroorganizmust tartalmaz.

13. Az 1.-8. igénypontok bármelyike szerinti mikroorganizmus alkalmazása szisztémás bakteriális fertőzés ellen ható gyógyszerkészítmény előállítására.

14. A 13. igénypont szerinti alkalmazás tífusz fertőzés ellen.

A meghatalmazott: