

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

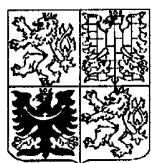
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2486-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04. 02. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.02.96, 24.12.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/9602617, 96/9626882**

(33) Země priority: **GB, GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 12. 97**
(Věstník č. 12/97)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/00520**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/28820**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 39/245
A 61 K 39/25
C 07 K 14/04

(71) Přihlášovatel:

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.
A., Rixensart, BE;
UNIVERSITY OF LIEGE, Liege, BE;

(72) Původce:

Rentier Bernard, Liege, BE;
Sadzot Catherine, Liege, BE;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Vakcíny proti produktu genu 63
viru Varicella Zoster

(57) Anotace:

Prostředky pro léčení nebo prevenci pásového oparu u osob infikovaných virem Varicella Zoster /VZV/ a pro prevenci nebo léčbu infekcí vyvolaných Varicellou. Prostředky obsahují protein kódovaný genem 63 viru VZV nebo jeho imunologicky aktivní derivát. Prostředky obsahující DNA nebo RNA odpovídající genu 63 viru VZV.

CZ 2486-98 A3

Vakcíny proti produktu genu 63 viru Varicella Zoster

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká prostředků k léčení nebo prevenci
 5 pásového oparu (Zoster) u osob infikovaných virem Varicella Zoster
 (VZV) a na prevenci nebo léčbu infekcí vyvolaných Varicellou.
 Prostředky podle vynálezu obsahují protein kódovaný genem 63 viru
 VZV nebo jeho imunologicky aktivní derivát. Vynález se dále týká
 prostředků obsahujících DNA nebo RNA odpovídající genu 63 viru
 10 VZV.

Dosavadní stav techniky

Virus Varicella je lidský alfa herpetický virus, který způsobuje
 dvě lidská onemocnění: při primární infekci způsobuje VZV dětské
 15 plané neštovice (Varicella), poté přechází virus do latence, z níž je
 často aktivován (mnohdy po desetiletích) a způsobuje pak pásový
 opar (Zoster). Při planých neštovicích virus proniká do periferního
 nervového systému, kde přetrvává v latentním stavu až do
 reaktivace za vzniku bolestivé Zoster formy. Zatímco virus je
 20 latentní, exprese většiny virových genů je reprimovaná. Má se zato,
 že buněčná imunita hraje rozhodující úlohu při kontrole latence,
 neboť reaktivace v podobě pásového oparu je častá u starších lidí
 nebo u osob s oslabenou imunitou.

VZV infekci charakterizuje minimální přítomnost volného viru.
 25 Během latence a při reaktivaci je virus převážně intracelulární. Z toho
 důvodu rekurentnímu onemocnění nezabrání ani vysoké hladiny
 neutralizujících protilátek a kontrola viru závisí na buněčné imunitě.
 K navození ochrany vakcínací je proto žádoucí indukovat nejen

protilátkovou odpověď, ale též CTL odpověď. Účinná vakcína by měla aktivovat CTL, schopné působit co možná nejdříve, jakmile se objeví známky reaktivace latentního viru.

Jelikož mechanismus rozpoznávání antigenu
5 cytotoxickými T lymfocyty (CTL) zahrnuje rozštěpení nativního antigenu na peptidy, vazbu těchto proteolytických fragmentů k molekulám MHC a export komplexu na buněčný povrch, potenciálním cílem T-buněčné odpovědi může být jakýkoli virem kódovaný polypeptid, nejenom integrální membránové proteiny jako
10 jsou glykoproteiny. Vzhledem k tomu, že VZV genom kóduje kromě vnějších glykoproteinů i několik nestrukturálních proteinů a vnitřních proteinů virionu, je potenciálních cílů CTL velký počet a není známo, který protein by mohl být nejrelevantnější.

Genom VZV viru obsahuje 71 otevřených čtecích rámců,
15 kódujících 68 bílkovin proteinů. Sekvence virové DNA je známá (J.Gen.Virol. 67, 1759-1816). Gen 63 viru VZV kóduje okamžitý časný protein o předpokládané molekulové hmotnosti 30,5 kDa (Debrus et al., 1995, J. Virol. 69(5), 3240). Gen začíná v pozici 110581 (startovací kodon) a pokračuje do pozice 111414 (stop kodon). Další
20 kopie genu v opačné orientaci se nachází mezi bázemi 119316 a 118483. U IE63 proteinu bylo prokázáno, že v krysím modelu je během latence exprimován, poněkud neobvykle, v neuronech. Bílkovina byla exprimovaná jako fúzovaná bílkovina v E.coli (Debrus et al.).

25 VZV IE63 protein byl nalezen výlučně v cytoplasmě neuronů latentně infikovaných lidských trigeminálních a torakálních ganglií. Toto je první případ identifikace bílkoviny alfa-herpes viru exprimované během latence v lidském nervovém systému.

Dále autoři vynálezu objevili, že tato bílkovina je důležitým
30 cílem zásahu imunitního systému, konkrétně pak cílem T buněčné odpovědi, a tak je užitečná pro prevenci a léčbu infekcí VZV.

Zejména pak pro prevenci pásového oparu u pacientů již infikovaných virem VZV.

Podstata vynálezu

5 Předkládaný vynález tedy poskytuje farmaceutický prostředek, který obsahuje bílkovinu IE63 viru Varicella Zoster nebo její imunologicky funkční ekvivalent a farmaceuticky přijatelný nosič.

Toto je první využití takového proteinu v medicíně a vynález tudíž poskytuje VZV IE63 protein nebo jeho imunologicky funkční,
10 ekvivalentní derivát pro použití v medicíně.

V dalším aspektu vynález poskytuje metodu léčby osob náchylných nebo trpících VZV infekcí, jež spočívá v podávání bezpečného a účinného množství prostředku podle vynálezu.

Množství bílkoviny v každé dávce vakcíny je vybráno jako
15 takové množství, které indukuje imunoprotektivní odezvu bez významných škodlivých vedlejších účinků. Toto množství se bude lišit v závislosti na tom, jaký specifický imunogen se použije a jak bude podáván. Obecně lze očekávat, že každá dávka bude obsahovat 1 - 1000 μ g bílkoviny, s výhodou 2 - 100 μ g, nejvýhodněji
20 4 - 40 μ g bílkoviny. Optimální množství pro konkrétní vakcínu může být určeno standardními studiemi, jež spočívají ve sledování příslušné imunitní odpovědi u testovaných subjektů. Po první dávce vakcíny mohou sledované osoby dostat, s přiměřeným časovým odstupem, jednu nebo několik dalších posilovacích („booster“) imunizačních dávek.
25

Vedle vakcinace osob náchylných k VZV infekci mohou být farmaceutické prostředky podle vynálezu použity k imunoterapeutické léčbě pacientů trpících VZV infekcemi tak, aby se zabránily či

významně omezily opakované návraty onemocnění a snížila se frekvence, síla a trvání episod pásového oparu.

Ve vakcíně podle vynálezu lze přímo použít vodného roztoku IE63 proteinu(ů) VZV. VZV IE63 protein(y) mohou být též,
5 po předchozí lyofilizaci nebo bez ní, smíchány navzájem nebo s jakýmkoli známým adjuvans. Takováto adjuvans zahrnují, ale nejsou na ně omezena, hydroxid hlinitý, muramyl dipeptid a saponiny jako jsou Quil A, zejména QS21 nebo 3 deacylovaný monofosforyl lipid A (3D-MPL). Preferovány jsou adjuvans nebo adjuvantové
10 systémy, které přednostně indukují TH1 odpověď. Adjuvans schopná přednostní stimulace TH1-buněčné odpovědi jsou popsána v mezinárodních patentových přihláškách No. WO 94/00153 a WO 95/17209.

Konkrétní výhodné adjuvans obsahuje QS21, tj. HPLC-
15 přečištěnou, netoxickou frakci získanou z kůry Quillaja Saponaria Molina, a 3 De-O-acylovaný monofosforyl lipid A (3 D-MPL), případně spolu s emulzí „olej ve vodě“.

3 De-O-acylovaný monofosforyl lipid A je znám z GB 2220211 (Ribi). Chemicky se jedná o směs 3 De-O-acylovaného monofosforyl
20 lipidu A s 4, 5, nebo 6 acylovanými řetězci; výrobcem je Ribi Immunochem Montana. Výhodná forma 3 De-O-acylovaného monofosforyl lipidu A je zveřejněná v mezinárodní patentové přihlášce No. 92/16556.

QS21 je HPLC-přečištěná, netoxická frakce saponinu z kůry
25 jihoamerického stromu Quillaja Saponaria Molina a metoda její produkce je zveřejněná (jako QA21) v US patentu No. 5,057,540.

Výhodná emulze „olej ve vodě“ obsahuje metabolizovatelný olej, jako je squalen, alfa tokoferol a tween 80. Emulze „olej ve vodě“ může navíc obsahovat span 80 nebo lecithin.

Poměr QS21 : 3D-MPL bývá typicky v řádu 1:10 až 10:1; s výhodou 1:5 až 5:1 a často v podstatě 1:1. Výhodný rozsah pro optimální synergismus je 2,5:1 až 1:1 3D MPL:QS21. Pro podávání lidským subjektům bývají QS21 a 3D MPL ve vakcíně typicky
5 přítomny v rozsahu 1 µg - 100 µg, s výhodou 10 µg - 50 µg na jednu dávku. Emulze „olej ve vodě“ typicky obsahuje 2 až 10% squalenu, 2 až 10% alfa tokoferolu a 0,3 až 3% tweenu 80. Poměr squalen: alfa tokoferol je s výhodou roven nebo menší než 1, což dává stabilnější emulsi. Span 85 může být též přítomen v 1% hladině. V některých
10 případech může být výhodné, aby vakcíny podle vynálezu dále obsahovaly stabilizátor.

Příkladem další možnosti může být enkapsulace proteinu do mikročástic, jako jsou liposomy. Jiným dalším možným příkladem je konjugace VZV IE63 proteinu(ů) s imunostimulující makromolekulou
15 jako je usmrčená *Bordetella* nebo tetanový toxoid.

Příprava vakcíny je v obecných rysech popsána v New Trends and Developments in Vaccines, Voller et al., (eds.), University Park Press, Baltimore, Maryland, 1978. Enkapsulaci v liposomech popisuje Fullerton, US patent 4,235,877. Konjugace bílkovin
20 k makromolekulám je zveřejněná např. v Likhite, US patent 4,372,954 a v Armor et al., US patent 4,474,757. Použití Quil A je zveřejněné v Dalsgaard et al., *Acta Vet. Scand.* 18: 349 (1977). 3D-MPL lze získat od Ribi Immunochem, USA a je zveřejněn v britské patentové přihlášce No. 2220211 a v US patentu 4912094. QS21 je zveřejněn
25 v US patentu No. 5057540.

Použití polynukleotidu podle vynálezu pro genetickou imunizaci s výhodou uplatní vhodnou metodu vnesení, jako je přímá injekce plasmidové DNA do svalů (Wolff et al., *Hum. Mol. Genet.* 1992, 1:363, Manthorpe et al., *Hum. Gene Ther.* 1993, 4: 419), vnesení DNA
30 v komplexu se specifickými bílkovinnými nosiči (Wu et al., *J Biol.Chem.* 1989, 264:1985), koprecipitace DNA s fosofrečnanem

vápenatým (Benvenisty and Reshef, PNAS, 1986: 83, 9551) nebo enkapsulace DNA v různých formách liposomů (Kaneda et al., Science 1989: 243,375), bombardování částicemi (Tang et al., Nature 1992, 356:152, Eisenbraun et al., DNA Cell Biol. 1993, 12:791), a in vivo infekce prostřednictvím klonovaných retrovirových vektorů (Seegar et al., PNAS 1984: 81,5849) nebo neinfekčních rekombinantních virových vektorů, jako je „Semliki Forest helper 2“ systém (Berglund et al., Bio/Technology 1993, 11:916-920). Promotory vhodné k transfekci svalů zahrnují CMV, RSV, Sra, aktin, MCK, alfa globin, adenovirus a dihydrofolátreduktasu. Výhodný způsob vnášení polynukleotidu podle vynálezu využívá zlatých mikročástic vstřelovaných pomocí „genového děla“ (US patenty 5100792, 5036006 a 4945050).

Polynukleotidové prostředky podle vynálezu mohou být aplikovány při použití dávek a způsobů aplikace popsaných ve WO 90/11092. Je však jasné, že přesné dávkování bude záviset na faktorech jako jsou váha, pohlaví, způsob aplikace, všeobecný zdravotní stav pacienta a onemocnění, jež má být léčeno. Nicméně, dávky pro nitrosvalové použití se typicky budou pohybovat v rozsahu 0,05 µg/kg až asi 50 mg/kg, typičtěji od asi 0,1 do 10 mg/kg. Vzhledem k schopnosti indukovat vysoké hladiny CTL, může být výhodná podkožní, epidermální, intradermální nebo mukosní aplikace.

Vakcína podle vynálezu může dále obsahovat i jiné antigenní složky VZV, jako jsou gpl, gpII, gpIII, gpIV nebo gpV nebo jejich deriváty, anebo jiné okamžité časné proteiny, jako je IE62 protein. Zejména to jsou zkrácené formy gpl, gpII nebo gpIII zveřejněné v Evropské patentové přihlášce publikované pod No. 0405867.

Výhodné provedení vynálezu poskytuje prostředek k vakcinaci, jenž obsahuje nezakotvený gpl v kombinaci s IE63 nebo s derivátem IE63.

Nezakotvený znamená, že jde o derivát glykoproteinu VZV, kterému chybí v podstatě celá C-koncová ukotvující oblast, čímž je umožněná jeho sekrece při expresi v savčích buňkách. Takovéto proteiny jsou popsány v EP-A-0405867.

5 Alternativní provedení poskytuje vakcínu obsahující fúzovaný protein sestávající z aminokyselinové sekvence představující IE63 nebo derivát a z aminokyselinové sekvence představující některý z glykoproteinů gpl, gpII, gpIII, gpIV nebo gpV či jejich derivátů nebo jiný okamžitý časný protein jako je IE62.

10 V alternativním provedení může být použit jako vakcína přímo polynukleotid, schopný exprimovat IE63 nebo jeho derivát. Polynukleotidem je s výhodou DNA. V takovýchto případech bude polynukleotid pod kontrolou vhodného promotoru.

K imunizaci může být též použita RNA. Pro tyto případy může
15 být RNA připravena pomocí metod uvedených v WO 92/10578.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Vakcínový prostředek obsahující VZV IE63 protein

Připraví se dva přípravky adjuvans, přičemž každý obsahuje
20 následující složku emulze „olej ve vodě“

SB 62: 5% squalen, 5% tokoferol, 2% tween 80; velikost částic byla 180 nm

1(a) Příprava emulze SB 62 (dvojnásobný koncentrát)

Tween 80 se rozpustí ve fosfátem pufovaném solném roztoku (PBS)
25 tak, aby dal 2% roztok v PBS. K získání 100 ml dvojnásobného koncentráту emulze se důkladně promíchá (na přístroji typu Vortex) 5g DL alfa tokoferolu a 5ml squalenu. Přidá se 90ml roztoku PBS/Tween a důkladně promíchá. Výsledná emulze se protlačí

injekční stříkačkou a nakonec mikrofluidizuje za použití mikrofluidizačního přístroje M110S. Výsledné olejové kapičky mají velikost přibližně 180nm.

5 1(b) Antigen je připraven podle metody, kterou uvádí Debrus et al (shora)

1(c) Příprava prostředku IE63 proteinu v emulsi „olej ve vodě“ QS21/3DMPL.

10 K emulsi podle 1 a) se přidá stejný objem dvakrát koncentrovaného antigenu (buď 20 μ g nebo 100 μ g) a promíchá se. Toto se spojí s 50 μ g/ml 3D-MPL a 20 μ g/ml QS21 za vzniku konečného přípravku. Pufr je podle koncentrace soli a pH.

Příklad 2: Imunologické vlastnosti IEP63

15 2.1. Materiály

Od jedenácti zdravých dárců, z nichž jeden byl očkovan, byla odebrána krev. Všichni tito dárce byli dospělí, s anamnézou planých neštovic v dětství. Ve všech případech bylo odebráno 30ml krve do heparinizovaných zkumavek a 5ml na sražení k získání séra.

20 2.2. Humorální imunitní odpověď

K detekci anti-VZV imunoglobulinů IgG ve vzorcích krve byly provedeny ELISA testy za použití celého VZV a kontrolních antigenů: všichni testovaní dárce (kromě jednoho) měli detegovatelnou hladinu anti-VZV protilátek, což představuje serologický důkaz prodělaných
25 planých neštovic v dětství.

Přítomnost anti-IE63 protilátek jsme zkoumali metodou westernového přenosu, přičemž byl použit IE63 protein, který byl klonovaný v pGEX5X, exprimovaný v E.coli jako fúzovaný protein

(GST-IE63) a purifikovaný afinitní chromatografií (Debrus et al., J Virol., 69, 3240-3245). GST protein exprimovaný a purifikovaný stejným způsobem sloužil jako negativní kontrola. Se všemi testovanými vzorky krve byl rozpoznán purifikovaný IE63 fúzovaný protein, což ukazuje na přítomnost anti-IE63 protilátek v séru. Kontrolní protein nebyl protilátkami nikdy rozpoznán.

2.3. Buněčná imunitní odpověď

Stimulace lymfocytů T byla měřena stimulací PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells, tj. mononukleárních buněk periferní krve) izolovaných centrifugací ve ficoll/hypaque gradientu.

Všechny testy byly prováděny trojmo, stimulací 3×10^5 PBMC fytohemaglutininem (PHA) ke stanovení nespecifického stimulačního indexu, a dále celým VZV a kontrolními antigeny (připravenými sonikací infikovaných nebo neinfikovaných melanomových buněk) a purifikovaným fúzovaným proteinem (GST-IE63 nebo samotným GST). Šestého dne byl k buňkám přidán značený ^3H -thymidin a po 16 hodinách byly buňky sklizeny. Stimulační index (S.I.) byl vypočten jako poměr cpm (impulsů za minutu) v jamkách s buňkami stimulovanými proteinem k jamkám s buňkami kontrolními; index byl považován za pozitivní, byl-li > 2 .

2.4. Výsledky testu proliferace buněk T

Doposud bylo provedeno 10 testů na proliferaci za podmínek stanovených dříve.

Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1.

Indexy S.I. získané po stimulaci celými VZ antigeny nebo IE63 proteinem byly vyneseny do grafu na Obr.1

Z těchto dat můžeme vyvodit:

Většina lidí (6/10) vykazuje odpověď paměťových buněk T vůči VZV IE63.

Dva dárce mají velmi nízký S.I. jak s celými antigeny, tak s purifikovaným fúzovaným proteinem a mohou být považováni za
5 negativní (S.I. < 2). Avšak jeden z nich měl velmi nízký titr protilátek, neměl v anamnéze jasný průkaz planých neštovic a mohl tedy být negativním dárce. Druhý, jehož titr protilátek byl vysoký, měl lepší hodnotu S.I. když byl test proveden s MBP-IE63 (S.I.=3,4), což naznačuje, že v některých případech je buňkami T jeden
10 z fúzovaných proteinů lépe rozpoznáván, a že srovnání obou proteinů by mohlo být užitečné v případech velmi nízkých hodnot S.I. s vysokou standardní odchylkou.

Dva další dárce vykazovali negativní odpověď na IE63, zatímco S.I. s celými antigeny byl vysoký, stimulace však byla provedena
15 pouze s GST fúzovaným proteinem.

Příklad 3: Buněčné odpovědi

V rozšíření výše uvedeného experimentu byly PBMC od 19 zdravých dospělých dárců testovány na proliferační odpověď buněk T
20 po stimulaci buď VZV antigeny nebo purifikovaným GST-IE63 proteinem. Střední hodnota S.I. s VZ antigeny byla $15,5 \pm 3,3$ s hodnotami od 2,1 do 52. Střední hodnota S.I. po stimulaci GST-IE63 proteinem byla $3,4 \pm 0,48$ s hodnotami mezi 1,8 a 8. Tyto hodnoty S.I. byly významně vyšší než hodnoty zjištěné u neimunních pacientů, kde
25 S.I. byl $1,95 \pm 0,48$ pro VZV antigeny a $1,3 \pm 0,1$ pro IE63. Při grafickém vynesení S.I. po stimulaci s VZV a srovnání s S.I. po stimulaci s GST-IE63 vycházejí dva neimunní pacienti jasně negativní (S.I. < 2,0) s oběma antigenovými preparáty (Obr. 2). Všechny 17 imunních dárců mělo S.I. k VZV antigenům vyšší než 2,0. Mezi těmito
30 pozitivními dárce, byli 3 (17%), z nichž jeden měl v anamnéze četné

erupce pásového oparu, kteří vykazovali velmi silnou odpověď k VZV antigenům, zatímco S.I. s GST-IE63 byl pod hodnotou 2,0. Čtyři dárce měli S.I. = 2,0 pro GST-IE63, přičemž S.I. pro VZ antigeny se pohyboval mezi 5,4 a 11. Avšak všichni tito dárce s S.I. ≤ 2 pro GST-IE63 měli velmi významnou odpověď k samotnému GST (data neuvedena), což činí interpretaci výsledků obtížnou. Všichni ostatní přirozeně imunní jednotlivci (59%) vykazovali silnou odpověď na GST-IE63, s hodnotami S.I. mezi 2,3 a 8. Avšak korelace mezi stimulací VZ antigeny a stimulací fúzaným proteinem nebyla prokázána.

Příklad 4: Testy na produkci cytokinů

Produkce cytokinů PBMC stimulovanými IE63 byla hodnocena u 7 subjektů: PBMC byly stimulovány buď GST nebo GST-IE63, a 2., 4. nebo 6. den byly ELISA testem sledovány IL-2, IL-4 a γ -IFN. Výsledky byly vyjádřeny jako rozdíl mezi koncentrací cytokinů zjištěných po stimulaci GST-IE63 nebo samotným GST. IL-2 a IL-4 nebyly nikdy nalezeny, zatímco γ -IFN byl produkován ve významném množství (175 až 1400 pg/ml) buňkami T stimulovanými IE63, přičemž maximum produkce bylo 4.den. Množství γ -IFN zjištěné v kultuře, v níž nebyla pozorována žádná stimulace bylo významně nižší:

Dárce	Proliferace T buněk po GST-IE63 (S.I.)	IFN- γ (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
1	2,9	750	0
2	2,2	1400	0
3	7,4	500	0
4	8,0	625	0
5	2,0	175	0
6	2,0	50	0

Příklad 5: Testy cytotoxicity

CTL odpovědi specifické na IE62 a IE63 byly zjišťovány testem limitního ředění buněk T získaných od 10 dárců imunních vůči VZV. Tyto testy byly prováděny s autologními cílovými buňkami buď neinfikovanými nebo infikovanými, a to buď samotnou vaccinií (kontrola), nebo vaccinií nesoucí IE62 (vaccinia-IE62) nebo vaccinií nesoucí IE63 (vaccinia-IE63). Pozadí představované kontrolními cílovými buňkami vykazovalo široký rozsah variací mezi dárci a výsledky byly považované za validní pouze tehdy, když lýza cílových buněk exprimujících virus byla nejméně o 10% vyšší než lýza kontrolních cílových buněk (neinfikovaných nebo infikovaných samotnou, kontrolní vaccinií).

Pokud byly populace buněk T získány pomocí systému T-Lymphokwik, lýza cílových buněk exprimujících VZV proteiny byla významně vyšší než v případě neinfikovaných nebo kontrolních cílových buněk, což je ukázáno pro jeden test na obr.3. Lýza pozorovaná u cílových buněk exprimujících IE62 a buněk exprimujících IE63 se významně nelišila. Podobné výsledky byly získány pro 4 testy provedené s celou populací buněk T: pro IE62

byla pozorována specifická lýza v rozmezí 25 až 48% a pro IE63 v rozmezí 27 až 43%. Průměrný výskyt prekursorů buněk T, které rozpoznávají IE62 byl 44500 ± 22500 a pro IE63 31000 ± 16000 , tyto rozdíly však nebyly statisticky významné ($p=0,8$).

5 Kultury v limitním ředění byly rovněž připraveny z purifikovaných populací CD4+ a CD8+ lymfocytů T, jakožto efektorů. Obě populace lýzovaly cílové buňky exprimující IE62 a IE63. Hodnota RCF CD8+ buněk rozpoznávajících IE62 byla 28500 ± 10100 a rozpoznávajících IE63 30500 ± 13700 , což není
10 statisticky rozdílné ($p=0,9$), a co tedy nasvědčuje, že oba virové proteiny byly rozpoznávány CD8+ buňkami se stejnou účinností (Obr.4). Počet buněk lýzujících cílové buňky, jež exprimují IE63, byl rovněž v obou populacích efektorových buněk stejný: střední hodnota CD4+ efektorových buněk byla 31450 ± 7500 a týž výskyt byl
15 v populaci CD8+ buněk ($p=0,97$). Výpočet výskytu CD4+ buněk rozpoznávajících IE62 byl však počítačovou analýzou zamítnut.

Příklad 6: Exprese VZV IE63 v průběhu latence

Pro analýzu VZV exprese v latentně infikovaných gangliích byly
20 z 9 dospělých a 3 kojenců získány během 24 hodin po smrti jeden trigeminální a mnohá torakální ganglia. Žádný ze subjektů netrpěl před smrtí oslabením imunity a při pitvě nebyly shledány žádné kožní známky nedávné infekce herpesvirem. Enzymové imunostanovení odhalilo protilátky proti VZV v sérech všech
25 dospělých subjektů. Sérum dostupné pouze od jednoho ze 3 kojenců neobsahovalo protilátky k VZV. PCR amplifikace provedená s DNA extrahované z malé části každého ganglia za použití VZV-specifických primerů (Mahalingham et al., Engl.J.Med. 323, 627-631) odhalila přítomnost VZV DNA ve všech dospělých gangliích, nikoli
30 však v gangliích kojenců. Zbývající části každého ganglia byly

analyzovány imunohistochemicky pomocí králičích protilátek získaných proti 30,5kD proteinu VZV IE63, jenž byl exprimován v E.coli jako protein fúzovaný s glutathion-S-transferasou a purifikovaný jak popisují Debrus et al. (shora). BSC-1 (African
5 monkey kidney, opičí ledvinné) buňky infikované a neinfikované VZV sloužily jako pozitivní a negativní kontrola.

Na VZV infikovaných BSC-1 buňkách byly patrné dvě oblasti fokusů s typickou VZV cytopatologií, jež obsahovaly VZV IE63 protein. Žádný signál nebyl detegován v neinfikovaných buňkách nebo v BSC-
10 1 buňkách infikovaných virem HSV. V gangliích získaných 17 hod po smrti od 46-letého muže, jenž zemřel na atherosklerosu, bylo pozorováno červené zabarvení (charakterizující VZV IE63 protein) výhradně v cytoplasmě 3 neuronů. Žádný signál nebyl detegován při použití normálního králičího séra na přilehlém řezu ze stejného
15 ganglia. Intensivní červené zabarvení bylo detegováno v cytoplasmě neuronu v přilehlých řezech z jiného torakálního ganglia téhož subjektu. Světlejší červené zabarvení bylo též často patrné v mnohých neuronech latentně infikovaných ganglií, což naznačuje difúznější, možná slabší infekci. Červené barvení, specifické pro VZV
20 IE63 protein, nebylo nikdy vidět u satelitních (kapsulárních) buněk, kapilár, pojivové tkáně, nervových svazků uvnitř ganglií, nebo nervových kořínků vstupujících do ganglií. Žádný signál nebyl detegován po aplikaci antiséra proti VZV IE63 proteinu na ganglia 2-měsíčního kojence, který zemřel na sepsi komplikující vrozenou
25 omfalokélu a plicní hypoplazii. Celkem byl VZV IE63 protein nalezen v 5 gangliích (4 torakálních a 1 trigeminálním) ze 2 dospělých subjektů. U jednoho z těchto dospělých byl VZV IE63 protein detegován ve všech 10 řezech ze 4 z 5 torakálních ganglií. U druhého dospělého byl VZV IE63 protein detegován ve všech 4 řezech
30 z trigeminálního ganglia. Na pozitivních řezech byl VZV IE63 protein detegován v cytoplasmě 2-4 neuronů. VZV IE63 protein nebyl nalezen

v žádném ze 4 řezů připravených z každého ze 16 ganglií od 7 zbývajících dospělých, ani v žádném ze 4 řezů z každého z 9 ganglií pocházejících od 3 kojenců.

Skutečnost, že VZV DNA byla detegována téměř ve všech gangliích, avšak VZV IE63 protein pouze v některých latentně infikovaných gangliích by mohla být vysvětlena výběrem vzorků tzn. že analýza na přítomnost VZV IE63 proteinu ve všech řezech z každého ganglia, jež obsahuje VZV DNA, by mohla odhalit další pozitivní ganglia. Jiná možnost je, že exprese viru se může v různých gangliích lišit; např. v gangliích latentně infikovaných virem HSV je počet neuronů obsahujících HSV DNA mnohem vyšší než počet neuronů, ve kterých je patrná přítomnost transkriptů souvisejících s latencí.

Konečně, mohla i nastat reaktivace viru, ačkoliv toto se nezdá pravděpodobné u subjektů, jejichž ganglia obsahovala VZV IE63 protein, neboť u nich nebyly před smrtí pozorovány klinické známky exantému pásového oparu, a nebyly u nich zaznamenány ani déle trvající neuralgické bolesti, jež mohou předcházet exantému (preherpetická neuralgie), ani bolest lokalizovaná do kožních inervačních zón bez exantému (Zoster sine herpete), ani postherpetická neuralgie, jež by naznačovala mírnou ganglionitidu. Navíc, histologické vyšetření ganglií neukázalo žádnou neuronofagii, inkluzní tělíska nebo zánětlivou reakci.

Závěry:

Z těchto pokusů lze vyvodit, že VZV IE63 vyvolává úplnou imunitní odpověď:

- anti-IE63 protilátky mohou být detegovány metodou westernového přenosu v séru většiny dárců s anamnézou planých neštovic;

- T buňky mohou proliferovat po in vitro stimulaci IE63 proteinem (purifikovaným jako GST-fúzovaný protein), avšak omezený počet testovaných dárců nedovolil nalézt přímou korelaci mezi stimulačním indexem (S.I.) pro VZV a pro IE63. Buňky T, které prolifерují jako odpověď na stimulaci IE63 proteinem jsou většinou Th1, jak patrně z exprese velkého množství γ -IFN do supernatantu;
- byla prokázána T buněčná cytotoxická aktivita v kontextu rozpoznání IE63. Na procesu lýzy se účastní CD4+ jakož i CD8+ buňky, což bylo prokázáno pomocí purifikovaných efektorových buněk. Počet prekursorových buněk rozeznávajících IE63 je podobný počtu buněk odpovídajících na IE62.

15 Toto je první popsáný případ identifikace proteinu herpetického viru exprimovaného během latence v lidském nervovém systému. Tato skutečnost spolu s jeho imunologickými vlastnostmi z něj činí výborný antigen pro zahrnutí do vakcíny proti Varicella Zoster.

Tabulka 1: PROLIFERACE BUNĚK T

CS:	Ab status EIA: >1024		S.I. s celým Ag		S.I. s GST-IE63
		:4	4,1	5μg	1,9
		:16	6,4	2,5μg	1,5
		:64	5,7	1,25μg	3,2
		PHA	11,5	0,6μg	11,6

MS:	Ab status EIA: >1024		S.I.		S.I.
		:4	7,5	5μg	1,1
		:16	11,9	2,5μg	2,7
		:64	5,9	,25μg	3,2
		PHA	8,1	0,6μg	2,5

VD:	Ab status EIA: >1024		S.I.		S.I.
		:4	4,3	5μg	2,9
		:16	4,5	2,5μg	1,3
		:64	5,5	,25μg	1,5
		PHA	12,6	0,6μg	1,1

JM:	Ab status EIA: >1024		S.I.		S.I.
		:4	1,5	5μg	1,7
		:16	2,1	2,5μg	1,4
		:64	2,0	,25μg	2,2
		PHA	7,1	0,6μg	0,9

CD: Ab status
 EIA: >1024

	S.I.
:4	4,0
:16	20,1
:64	8,6
PHA	25,8

	S.I.
5µg	4,3
2,5µg	2,8
,25µg	7,4
0,6µg	4,4

CL: Ab status
 EIA: 256

	S.I.
:4	7,0
:16	7,0
:64	9,0
PHA	22,0

	S.I.
5µg	1,0
2,5µg	2,0
,25µg	2,0
0,6µg	2,0

J: Ab status
 EIA: 256

	S.I.
:4	7,0
:16	7,0
:64	9,0
PHA	22,0

	S.I.
5µg	1,0
2,5µg	2,0
,25µg	2,0
0,6µg	2,0

5

DJ: Ab status
 EIA: >1024

	S.I.
:4	6,5
:16	2,1
:64	5,1
PHA	24,0

	S.I.
5µg	nd
2,5µg	nd
,25µg	nd
0,6µg	nd

SH:			S.I.			S.I.
	Ab status	:4	1,4	5µg	0,8	
	EIA: 16	:16	2,1	2,5µg	1,2	
	WB: ?	:64	0,4	,25µg	1,5	
		PHA	23,4	0,6µg	1,9	

LZ:	Ab status EIA: >1024		S.I.		S.I.
		:4	15,0	5µg	4,0
		:16	14,0	2,5µg	8,0
		:64	11,0	,25µg	8,0
		PHA	38,0	0,6µg	8,0

R:			S.I.		S.I.
	Ab status	:4	13,0	5µg	3,6
	není dostupné	:16	23,4	2,5µg	3,4
	není dostupné	:64	5,2	,25µg	2,6
		PHA	30,9	0,6µg	3,8

V:			S.I.			S.I.
	Ab status	:4	0,9	5μg	0,6	
	není dostupné	:16	1,1	2,5μg	1,1	
	není dostupné	:64	0,7	,25μg	???	
		PHA	23,5	0,6μg	0,7	

E: Ab status
EIA: >1024

	S.I.
:4	28,2
:16	9,1
:64	52,6
PHA	46,7

	S.I.
5µg	0,7
2,5µg	1,8
,25µg	1,2
0,6µg	0,6

G: Ab status
EIA: <16

	S.I.
:4	2,4
:16	2,3
:64	1,3
PHA	70,9

	S.I.
5µg	1,2
2,5µg	0,9
,25µg	1,4
0,6µg	1,4

M: Ab status
EIA: >1024

	S.I.
:4	6,1
:16	23,4
:64	29,6
PHA	79,5

	S.I.
5µg	2,7
2,5µg	3,2
,25µg	2,3
0,6µg	4,6

C: Ab status
EIA: <16

	S.I.
:4	0,8
:16	1,6
:64	1,4
PHA	113,6

	S.I.
5µg	0,5
2,5µg	0,9
,25µg	1,0
0,6µg	1,2

Z: Ab status
 EIA: <16

	S.I.
:4	1,5
:16	0,7
:64	0,7
PHA	9,3

	S.I.
5µg	0,9
2,5µg	1,2
,25µg	0,6
0,6µg	???

5 Tabulka 1: Humorální a buněčná imunitní odpověď na VZV.

S.I. byl měřen po stimulaci celými antigeny (sonikované melanomové buňky infikované nebo s napodobením infekce, ředěné 4x, 16x nebo 64x) nebo po stimulaci IE63 fúzovaným proteinem (GST nebo GST-IE63).

10 Status humorální imunity byl hodnocen ELISA testem s celým antigenem (vyjádřen jako ředění, pro které je O D. > 0,250) nebo metodou westernového přenosu s IE63.

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e
obsahuje IE63 protein viru Varicella Zoster nebo imunologicky
5 funkční derivát a farmaceuticky přijatelný excipient.

2. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e
obsahuje nukleovou kyselinu kódující IE63 nebo jeho imunologicky
funkční derivát.

10

3. Protein genu IE63 nebo jeho imunologicky funkční derivát pro
použití v medicíně.

15

4. Použití IE63 proteinu nebo jeho imunologicky funkčního derivátu
pro výrobu léku pro prevenci nebo zmírnění planých neštovic nebo
pásového oparu.

5. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í
s e t í m , ž e dále obsahuje další VZV antigeny.

20

6. Farmaceutický prostředek podle nároku 5, v y z n a č u j í c í
s e t í m , ž e druhý protein viru Varicella Zoster je vybrán ze
skupiny gpl, gpII, gpIII, gpIV, gpV nebo IE62 nebo jejich
imunologicky funkčních derivátů.

25

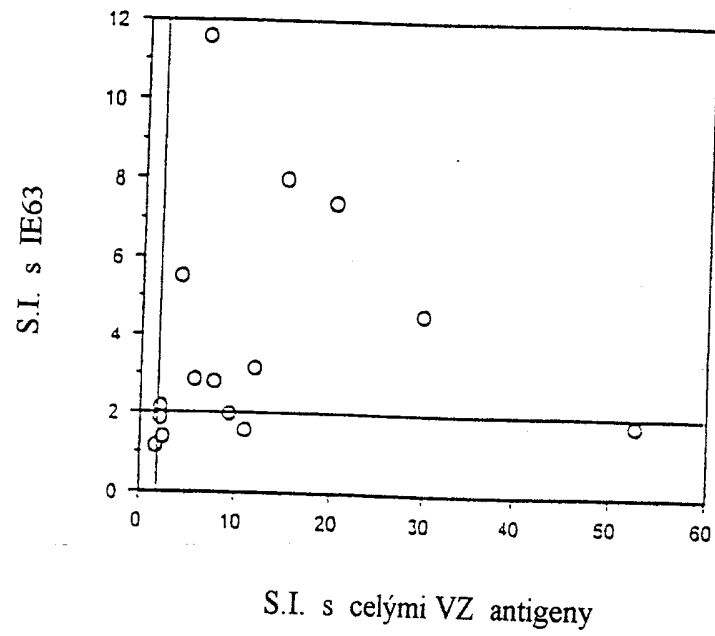
7. Farmaceutický prostředek podle nároků 1, 2, 5 nebo 6,
v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e dále obsahuje adjuvans.

8. Farmaceutický prostředek podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e adjuvans přednostně indukuje TH1 odpověď.
- 5 9. Farmaceutický prostředek podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e antigen je přítomen spolu s QS21 a 3D-MPL ve formě emulze „olej ve vodě“.
- 10 10. Způsob léčení pacienta trpícího nebo náchylného k infekci virem Varicella Zoster, spočívající v podávání bezpečného a účinného množství farmaceutického prostředku podle kteréhokoli z nároků 1, 2, 5, 6, 7, 8 nebo 9 pacientovi.
- 15 11. Způsob výroby farmaceutického prostředku obsahujícího virový protein IE63 Varicella Zoster, nukleovou kyselinu nebo jejich imunologicky funkční derivát, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e se mísí uvedený protein, nukleová kyselina nebo derivát s farmaceuticky přijatelným excipientem.
- 20 12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e excipient obsahuje adjuvans.

Zastupuje:

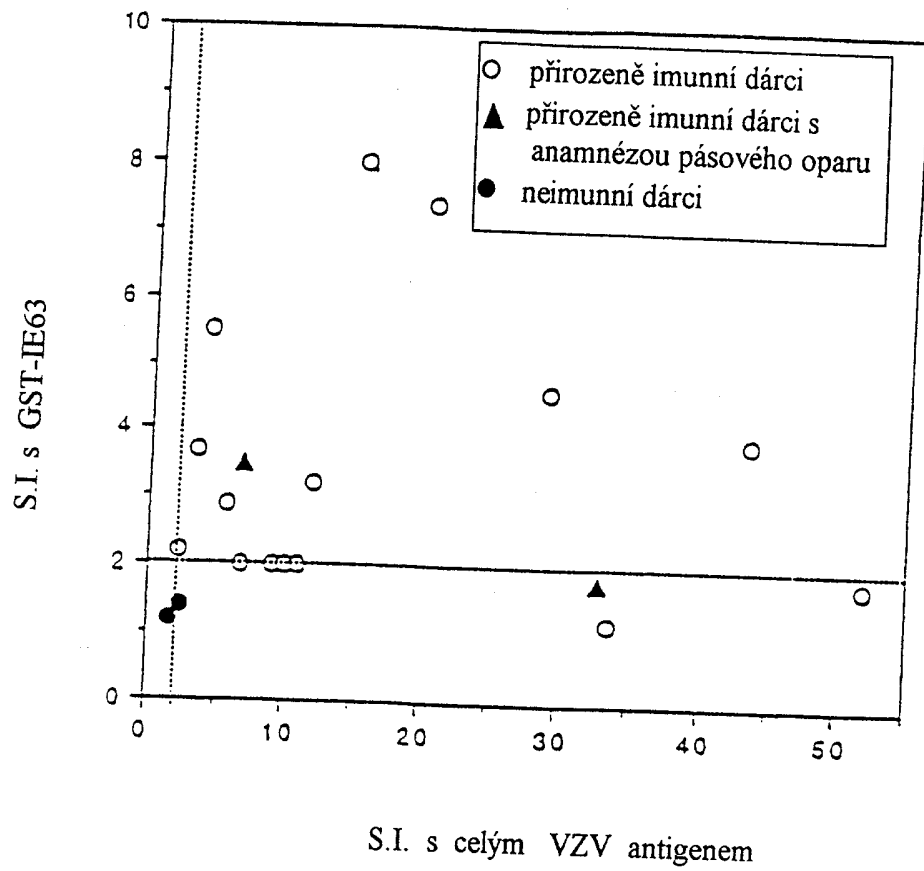
PV 2486-98
13.10.98

Obrázek 1

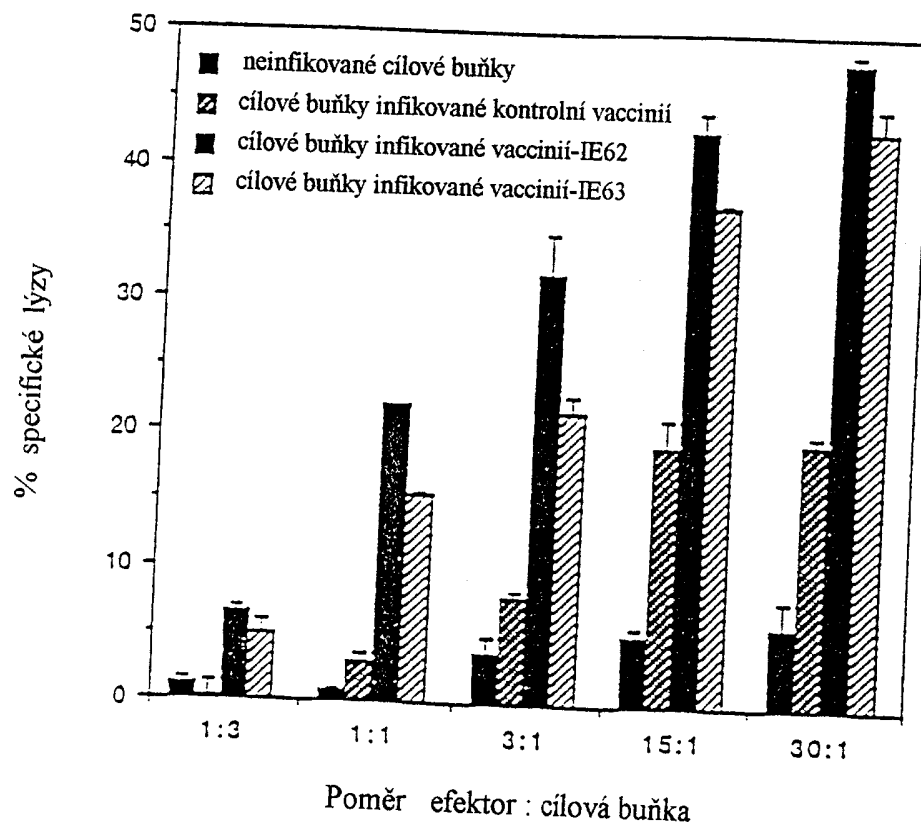


PV 2486 - 98
13.10.98

Obrázek 2



Obrázek 3



PV 2486-98
13.10.98

Obrázek 4

