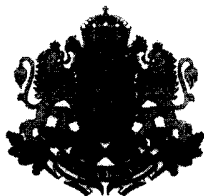


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) 108227A

(51) C07K 16/30
C07K 16/42
C12N 5/20
A61K 31/70
A61K 39/395

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 108227 (22) Заявено на 03.10.2003 (24) Начало на действие на патента от:				(71) Заявител(и): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR, ., 12100 CIUDAD DE LA HABANA, CALLE 216 ESQ. 15, ATABEY, PLAYA (CU); (72) Изобретател(и): FERNANDEZ MOLINA, Luis E ., 12100 Ciudad de la Habana (CU); VAZQUEZ LOPEZ , Ana M ., 10500 Ciudad de la Habana (CU); PEREZ RODRIGUEZ, Rolando ., 10500 Ciudad de la Habana (CU); PEREZ GONZALEZ, Alexis ., 13100 Ciudad de la Habana (CU); CARR PEREZ, Adriana ., 10500 Ciudad de la Habana (CU); DIAZ RODRIGUEZ, Yildian ., 10300 Ciudad de la Habana (CU); ALFONSO FERNANDEZ, Mauro A ., 10600 Ciudad de la Habana (CU); (74) Представител по индустриална собственост: Олга Русева Сиракова, 1113 София, ул."Ген. Щерю Атанасов" 5 (86) № на PCT заявка: PCT/ CU2002 / 000002, 08.04.2002 (87) № и дата на PCT публикация: WO2002 / 081661, 17.10.2002
Приоритетни данни				
(31) 842001	(32) 06.04.2001	(33)	CU	
(41) Публикувана заявка в бюлетин № 4 30.04.2005 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници: (62) Разделена заявка от рег. №				

**(54) ИМУНОТЕРАПЕВТИЧНИ КОМБИНИРАНИ СЪСТАВИ ЗА ЛЕЧЕНИЕ НА
ТУМОРИ, КОИТО СВРЪХПРОДУЦИРАТ ГАНГЛИОЗИДИ**

(57) Изобретението е свързано с областта на имунологията и по-специално се отнася до имунотерапевтични състави, предназначени за контролиране на растежа и/или клетъчна пролиферация на тумори. Съгласно наст оящото изобретение, терапевтичен ефект спрямо тумори се наблюдава при комбиниране на идиопатични ваксини, които по принцип действат като антиганглиозидно антитяло (Ab1), с идиопатични ваксини, които по принцип действат като антиидиотипно антитяло (Ab2), получено от антиганглиозидно антитяло, или ваксини, които по принцип действат като един или повече ганглиозида. Описано е, че комбинациите от тези ваксини причиняват синергичен терапевтичен ефект спрямо тумори. Споменатите

BG 108227A

комбинации могат да се прилагат върху пациенти в различно клинично състояние на тумори, които свръхпроизвеждат ганглиозиди.

8 претенции , 7

BG 108227A

ИМУНОТЕРАПЕВТИЧНИ КОМБИНИРАНИ СЪСТАВИ ЗА ЛЕЧЕНИЕ НА ТУМОРИ, КОИТО СВРЪХПРОДУЦИРАТ ГАНГЛИОЗИДИ

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до областта на хуманната медицина, по-специално, до терапевтични ваксини, които индуцират имунна реакция на тумори, които свръхпродуцират ганглиозиди.

Предшестващо състояние на техниката

Ганглиозидите са компоненти на плазматичните мембрани на повечето клетки на бозайници. Даже, когато тези гликофинголипиди се продуцират в нормални тъкани, те са много привлекателни мишени за имунотерапия, което се дължи на продуциране през време на злокачественото трансформиране на

клетките (Hakomori, S., Ann. Rev. Biochem. 50; 1981:733-764; Hakomori, Cancer Res. 45; 1985: 2405-2414; Irie, R. F. et al. In: Therapeutic monoclonal antibodies. Borrebaeck, C. A. K., Larrick, J. W. (Eds.) M Stockton Press, 1990, pp. 75-94).

Захаридната природа на ганглиозидите, заедно с фактът, че те самите са антигени, ги прави много слабо имуногенни молекули. Използват се няколко начина за повишаване на имуногенността на тези антигени. Те се базират на появяването на ганглиозиди в имунната система с различно молекулно обкръжение. При един от тези начини се използват конюгирани ваксини, в които захаридният антиген е ковалентно свързан с носещ протеин, като носителът е силно имуногенен за Т клетките. Така става възможно да се получи силна и дълготрайна имунна реакция на антигена. При използване на този метод става възможно повишаване на IgG антителата спрямо тези ганглиозиди, въпреки че титрите след реимунизациите са по-ниски в сравнение с тези, получени при класическата имунна реакция спрямо независими от тимуса антигени (Helling, F. et al. Cancer Res. 54; 1994: 197-203; Helling, F. et al. Cancer Res. 55; 1995: 2783-2788; Livingston P. O. et al. Cancer Immunol. Immunother. 45; 1997: 10-19).

Съобщава се за нови състави на ваксини, които предизвикват имунна реакция спрямо N- ацетилирани и N-гликолирани ганглиозиди. Тези ваксини се базират на хидрофобно свързване между ганглиозиди и протеолипозоми с много малък размер (VSSP), получени от асоциацията на Outer Membrane Protein Complex (OMPC) от *Neisseria meningitidis*, *Gram-negative bacteria*, с ганглиозиди (ганглиозиди/протеолипозоми с много малък размер (VSSP)) (Estevez F. et al. Vaccine 18; 1999: 190-197; Patents US 5,788,985; US 6,149,921). Ваксините, съставени от GM3 ганглиозид/протеолипозоми с много малък размер (VSSP) или (NeuGcGM3) ганглиозид/протеолипозоми с много малък размер (VSSP) повишават титрите на IgM и IgG антителата, специфично спрямо GM3 и NeuGcGM3.

Иначе, ваксинирането с GM3/протеолипозоми с много малък размер (VSSP) намалява смъртността на мишки с меланом B16 и също намалява обема на туморите и повишава скоростта на изхвърляне на подкожния трансплантат на тумора (Alonso et al. *Int. J. Oncology* 15; 1999: 59-66; Car A. et al., *Melanoma Research*, in press).

Теорията на идиотипната мрежа, предложена от Jerne 1974 г. (Jerne, N. K., *Ann. Immunol.* 125C; 1974: 373-389) представя имунната система като мрежа от антитела със сложно взаимодействие между тях и някои природни антигени, като взаимодействията възникват през различни региони или идиотип (Id) и посредством взаимодействието идиотип-антиидиотип се регулира имунната система. Теорията на Jerne подкрепя нови методи за активна имунотерапия (AI) на рак, на базата на прилагане на антиидиотипни ваксини. Ваксинирането се провежда с антитяло (Ab1), което разпознава свързания с тумор антиген, който индуцира антиидиотипни антитела (Ab2). Тези антиидиотипни антитела наподобяват номиналния антиген и, обратно, те генерират анти-антиидиотипни антитела (Ab3) по отношение на свързания с тумор антиген (Schmolling J. et al., *Hybridoma* 14; 1995: 183-186). От друга страна, индуцирането на имунна реакция, по отношение на свързаните с тумори антигени, се установява след ваксиниране с антиидиотипни антитела (Ab2) (Raychauri, S. et al., *J. Immunol.* 137; 1986: 1743-1749; Raychauri, S. et al., *J. Immunol.* 139; 1987: 3902-3910; Bhattacharya-Chatterjee, M. et al., *J. Immunol.* 139; 1987: 1354-1360; Bhattacharya-Chatterjee, M. et al., *J. Immunol.* 141; 1988: 1398-1403; Herlyn, D. et al., *Intern. Rev. Immunol.* 4; 1989: 347-357; Chen, Z.-J. et al., *Cell Imm. Immunother. Cancer*; 1990: 351-359; Herlyn, D. et al., *In Vivo* 5; 1991: 615-624; Furuya, A. et al., *Anticancer Res.* 12; 1992: 27-32; Mittelman, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89; 1992: 466-470; Durrant L. G. et al., *Cancer Res.* 54; 1994: 4837-4840; Mittelman, A. et al., *Cancer Res.* 54; 1994: 415-421; Schmitt, H. et al. *Hybridoma* 13; 1994: 389-396; Charkrobarty, M. et al. *J. Immunother.* 18; 1995: 95-103; Charkrobarty, M. et al. *Cancer Res.* 55; 1995: 1525-1530; Foon, K. A. et al., *Clin. Cancer Res.* 1; 1995: 1285-1294; Herlyn, D. et

al., Hybridoma 14; 1995: 159-166; Schebusch, H. et al. Hybridoma 14; 1995: 167-174; Herlyn, D. et al., Cancer Immunol. Immunother. 43; 1996: 65-76).

При друг случай, отнасящ се до използването на антиидиотипни антитела (Ab2) и за да се повиши имуногенността на захаридните остатъци, се включва възможността, такъв захариден епитоп да може да се представи от протеинов епитоп върху молекулата на антитялото. В действителност са получени много от тези антиидиотипни антитела; те напълно наподобяват ганглиозиди, които силно се продуцират в туморните клетки, като GM3, GD3 и GD2 (Yamamoto, S. et al., J. Natl. Cancer Inst. 82; 1990: 1757-1760; Chapman, P. B. et al., J. Clin. Invest. 88; 1991: 186-192; Cheung N.-K. V. et al., Int. J. Cancer 54; 1993: 499-505; Saleh M. N. et al., J. Immunol. 151; 1993: 3390-3398; Sen, G. et al., J. Immunotherapy 21; 1998: 75-83).

При клинични изследвания на пациенти, болни от рак, са получени обещаващи резултати, при прилагане на антиидиотипни антитела (Ab2), едновременно с BCG или QS21 като добавка (McCaffery M. et al., Clin Cancer Res. 2; 1996: 679-686; Foon, K. A. et al., Clin. Cancer Res. 4; 1998: 1117-1124).

Моноклоналното антитяло P3 (входящ номер ECACC 94113026) е познато на специалистите, че специфично разпознава сиаловата киселина в N-гликолилсъдържащи моносиало- и дисиалоганглиозиди. Това моноклонално антитяло Mab Ab1 разпознава антигени на тумори на гърда и меланоми при човека (Patent US 5,788,985; Vazquez A. M. et al., Hybridoma 14; 1995: 551-556; Moreno E. et al., Glycobiology 8; 1998: 695-705; Marquina G. et al., Cancer Res. 56; 1996: 5165-5171; Carr, A. et al., Hybridoma 19 (3); 2000: 241-247).

Антиидиотипното антитяло 1E10 (Ab2 Mab 1E10) (входящ номер ECACC 97112901), получено при имунизация с MAb P3 е антитяло от гама тип (без вътрешно отражение). Антиидиотипното антитяло 1E10 (Ab2 Mab 1E10) показва антитуморно действие върху растежа на тумори на гърдата и меланоми (Patent US 6,063,379; Vazquez A. M. et al., Hybridoma 14; 1995: 183-186; Vazquez A. M. et al., Oncology Reports 7; 2000: 751-756;).

В предишните изследвания няма доказателства за използване на комбинации от ваксини, включващи ганглиозиди и фармацевтични състави, включващи антиганглиозидни антитела (Ab1) и антиидиотипни антитела (Ab2), наречени идиотипни ваксини; нито за приложението на комбинации от идиотипна ваксина (Ab1) и идиотипна ваксина Ab2.

Настоящото изобретение се отнася до приложение на всички възможни описани комбинации от ваксини за засилване на ефекта, който те проявяват самостоятелно.

Техническа същност на изобретението

Настоящото изобретение се отнася до фармацевтичен състав или комбинация от фармацевтични състави, ефикасни при имунотерапия на рак, по-специално, на тумори, които свръхпродуцират ганглиозиди, които включват поне две от следните съединения:

(А) Идиотипна ваксина, включваща антиганглиозидно антитяло (Ab1);

(Б) Идиотипна ваксина, включваща антиидиотипно антитяло (Ab2) спрямо антиганглиозидно антитяло; и

(В) Ваксина, включваща ганглиозид.

Фармацевтичният състав или комбинацията от фармацевтични състави могат да включват А плюс Б, или А плюс В, или Б плюс В.

Предпочита се, фармацевтичният състав или комбинацията от фармацевтични състави, където А може да бъде идиотипна ваксина, включваща миши Mab P3 с входящ номер ECACC 94113026; и, където Б може да бъде идиотипна ваксина, включваща мишо антиидиотипно антитяло 1E10 с входящ номер ECACC 97112901 и, където В може да бъде ваксина, включваща N-гликолил GM3 (NeuGcGM3) или N-ацетил GM3 (NeuAcGM3) ганглиозиди.

В настоящото изобретение А плюс Б, или А плюс В, или Б плюс В могат да бъдат администрирани едновременно или да се редуват.

Съставите, съгласно настоящото изобретение, могат да бъдат ефикасни за лечение на рак, особено тези, които свръхпродуцират ганглиозиди, както и рак на гърдата, рак на белия дроб, рак на храносмилателната система, урогенитален рак, меланоми, саркоми и невроектодермални тумори.

Настоящото изобретение се отнася и до схема за администриране на фармацевтични състави за лечение на бозайници.

Настоящото изобретение се отнася и до метод, характеризиращ се с това, че включва администриране върху бозайници на фармацевтичен състав или комбинация от фармацевтични състави, описани по-горе за превенция или лечение на тумори на гърдата, белия дроб, храносмилателната система, урогениталната система, меланоми, саркоми и с невроектодермален произход.

1. Получаване на ваксина, включваща ганглиозиди:

Ваксините, включващи ганглиозиди, се получават, съгласно спецификацията на Estevez et al. (Vaccine 18, 1999: 190-197; Patents US 5,788,985; US 6,149,921). Протеолипозомите с много малък размер (VSSP), получени от асоциацията на Outer Membrane Protein Complex (OMPC) от щам на грам-негативната бактерия *Neisseria meningitidis*, със синтетични или природни ганглиозиди (VSSP-G). Ганглиозидите могат да бъдат (NeuGcGM3), GD3 или (NeuAcGM3).

2. Получаване на идиотипна ваксина:

Фармацевтичните състави се получават, съгласно спецификациите на патенти US 5,817,513 и US 6,063,379. Ваксината включва миши антиганглиозидни моноклонални антитела, като антиганглиозиди, като Mab P3 или миши антиидиотипни моноклонални антитела, като антиганглиозиди, като Mab 1E10, които разпознават антиганглиозидните моноклонални антитела.

3. Имунотерапевтични комбинации, които усилват имунната реакция и антитуморния ефект на ганглиозидните ваксини и идиотипните ваксини в животинските модели:

Горепосочените методи могат да бъдат използвани при мишки и други видове бозайници. Компонентите на комбинацията са ганглиозидната ваксина и идиотипната ваксина; те могат да се комбинират по различни начини.

При една комбинация, животните могат да се имунизират с 3 до 10 дози в границите от 25 μ g до 1 mg мишо антиганглиозидно моноклонално антитяло; интервалът между дозите може да бъде 7 или 14 дни. През периода, животните получават от трета до десета доза в границите от 60 до 1000 μ g ганглиозидна ваксина, като интервалът между дозите може да бъде 7 или 14 дни.

При друга комбинация, животните могат да се имунизират с 3 до 10 дози в границите от 25 μ g до 1 mg мишо антиидиотипно моноклонално антитяло; интервалът между дозите може да бъде 7 или 14 дни. През периода, когато животните получават от трета до десета доза в границите от 60 до 1000 μ g ганглиозидна ваксина, като интервалът между дозите може да бъде 7 или 14 дни.

Администрирането на двата вида ваксини може да бъде едновременно или последователно. Ваксините могат да се прилагат като отделни продукти или като ваксинен състав, когато се администрират едновременно. Когато ваксините се администрират последователно, интервалите между всеки вид ваксина могат да бъдат от 3 до 7 дни. Ваксините се администрират в добавка, която може да бъде алуминиев хидроксид (62.5 μ g – 2.5 μ g), Montanide ISA 51 (0.1 – 1.2 ml/доза) или друга подходяща добавка. Общият обем на всяка доза може да бъде 10 μ l – 2 ml.

Ваксините, включващи ганглиозиди, могат да бъдат администрирани интрадермално, подкожно, интрамускулно, интраперитонеално, интрамукозно или по смесен начин. По същия начин се администрират ваксините, включващи антитела.

Имунотерапевтичните комбинации повишават имунната реакция на анти тялото, както и клетъчната имунна реакция в третираните животни.

Времето за появяване на локални тумори, туморният обем и оцеляването на третираните субекти се сравняват със същите параметри за контролната група, за оценка на ефективността на имунотерапевтичните комбинации. Когато се сравняват тези параметри за третираната и контролната група, се наблюдават по-кратко време за появяване на локални тумори, понижаване на обема на тумора и понижаване на смъртността за групата, третирана с терапевтичните комбинации, съгласно настоящото изобретение. Контролните групи не са само тези животни, които са третирани с добавка, но също и тези групи, третирани само с една ваксина, вместо с комбинация от ваксини.

4. Имунотерапевтични комбинации, които усилват имунната реакция и антитуморния ефект на ганглиозидните ваксини и идиотипните ваксини:

Гореописаният метод може да се прилага и при пациенти, болни от рак на различно клинично ниво. По-специално, това са тумори, които свръхпродуцират ганглиозиди при тумори на гърдата, белия дроб, храносмилателната система, уrogenиталната система, меланоми, саркоми и с невроектодермален произход.

При една комбинация, пациентите могат да бъдат имунизирани с 3 до 10 дози в границите от 0.1 до 5 mg мишо антиганглиозидно моноклонално анти тяло; интервалът между дозите може да бъде 7 или 14 дни. През този период, пациентите получават от трета до десета доза в границите от 60 до 1000 µg ганглиозидна ваксина, като интервалът между дозите може да бъде 7 или 14 дни.

При втора комбинация, пациентите могат да бъдат имунизирани с 3 до 10 дози в границите от 0.1 до 5 mg мишо антиидиотипно моноклонално анти тяло, специфично спрямо антиганглиозидното анти тяло; интервалът между дозите

може да бъде 7 или 14 дни. През този период, пациентите получават от четвърта до шеста доза в границите от 60 до 1000 μg ганглиозидна ваксина, като интервалът между дозите може да бъде 7 или 14 дни.

При втора комбинация, пациентите могат да бъдат имунизирани с мишо антиганглиозидно моноклонално антитяло; дозите, честотата и интервалите на администриране са като описаните по-горе. През този период, пациентите получават от трета до десета доза в границите от 0.1 до 2 mg антиидиотипно моноклонално антитяло, специфично спрямо антиганглиозидното антитяло.

Администрирането на двата вида ваксини може да бъде едновременно или последователно. Ваксините могат да се прилагат като отделни продукти или като ваксинен състав, когато се администрират едновременно. Когато ваксините се администрират последователно, интервалите между всеки вид ваксина могат да бъдат от 3 до 7 дни. Ваксините се администрират в добавка, която може да бъде алуминиев хидроксид (1 - 5 mg/доза), Montanide ISA 51 (0.1 - 1.2 ml/доза) или друга подходяща добавка. Общият обем на всяка доза може да бъде 10 μl – 2 ml.

Ваксините, включващи ганглиозиди, могат да бъдат администрирани интрадермално, подкожно, интрамускулно, интраперитонеално, интрамукозно или по смесен начин. По същия начин се администрират ваксините, включващи антитела.

През време на ваксинирането се проследяват някои биохимични параметри и титри на антитела посредством кръвни изследвания. Честотата може да бъде от 1 седмица до 3 месеца. Клетъчният имунитет се изследва с лимфоцити на пациентите. Екстракцията се провежда при осцилиране в продължение на от 1 седмица до 3 месеца.

Накрая, пациентите се реимунизират с двете ваксини в по-горе споменатите концентрации; интервалите между дозите могат да бъдат от 1 до 6 месеца. Те могат да бъдат администрирани едновременно или не в продължение на 1 до 2 години.

При настоящата схема на ваксиниране в пациентите се индуцира антитяло и се повишава клетъчната имунна реакция, като, следователно, туморното бреме се понижава.

Примери за изпълнение на изобретението

ПРИМЕР 1: Активиране на антиидиотипни T2 и анти-антиидиотипни T3 клетки в сингенен модел, индуцирано от имунизирание с мишо MAb P3.

Женски Balb/c и голи мишки със същия генетичен произход на възраст 6-8 седмици се имунизират подкожно със 100 µg мишо антитяло MAb P3 (анти-N-гликолиран ганглиозид, входящ номер ECACC 94113026; Vazquez A. M. et al., Hybridoma 14; 1995: 551-558; Moreno E. et al., Glycobiology 8; 1998: 695-705) и пълна добавка на Freund (CFA). След седем дни мишките се реимунизират с 50 µg от антитялото в непълна добавка на Freund (IFA). На десетия ден, течността от лимфните възли се събира и се получават лимфоцити при пресоване в спринцовка. Клетъчната суспензия се използва в експериментите за клетъчна пролиферация, която се измерва посредством въвеждане на ³H-тимидин. *In vitro* лимфоцитната пролиферация се измерва посредством култивиране на лимфоцитната суспензия в присъствие на повишени концентрации (от 25 до 150 µg/ml) на мишо MAb P3 и неговото Ab2 MAb 1E10 (входящ номер ECACC 97112901). Изотипни миши MAb се използват като контроли. Индексите на стимулиране са равни на или по-високи от 3, когато се считат за позитивни. Получените след имунизирание на Balb/c мишките с MAb P3 лимфоцити специфично пролиферират в присъствие на този MAb и тази пролиферация не се наблюдава, когато клетките се култивират в присъствие на мишата контрола MAb A3 (IgM) (Alfonso M. et al. Hybridoma 14; 1995: 209-216). Тази пролиферация зависи от присъствието на T клетки; тъй като тя не се осъществява с лимфни голи клетки от P3 имунизирани атимични nu/nu мишки. Имунизирането с мишо

MAb P3 не само индуцира пролиферацията на Т клетки спрямо идиотипните на това Ab1 MAb (T2), но също и индуцира пролиферацията на анти-антиидиотипни Т клетки (T3), специфични за мишото Ab2 MAb 1E10 (IgG1), а не спрямо Mab C5 от същия изотип (IgG1) (Фигура 1).

ПРИМЕР 2: Активиране на антиидиотипни Т2 и анти-антиидиотипни Т3 клетки, индуцирано от имунизирание с химерното антитяло P3.

Химерното антитяло P3, чиито аминокиселинни последователности от неговите променливи региони на тежките (VH) и леките (VL) вериги, съответно са показани на Фигури 8 и 9, се използва за имунизирание на женски Balb/c мишки на възраст 6-8 седмици. За първата подкожна доза се използват 100 µg от антитялото, емулгирано в ACF. След седем дни животните се реимунизират с 50 µg от антитялото, емулгирано в AIF. На десетия ден, течността от лимфните възли (LN) се събира и лимфопролиферативният капацитет на клетките на лимфните възли се анализира при инкубиране в присъствие на мишото и химерни варианти на антителата P3 и Ab2 1E10, чиито последователности на променливите региони са показани на Фигури 13 (тежка верига) и 14 (лека верига). C5 мишият MAb и неговият химерен вариант се използват като изотипни контроли (Patent Application WO 97/33916 A1). Лимфоцитите от мишки, имунизирани с химерното антитяло P3, специфично пролиферират, когато се култивират в присъствие на това антитяло или на химерния 1E10 MAb, и също, когато се култивират в присъствие на муриновите варианти на тези антитела. Специфичността на пролиферацията е показана при използване на изотипния контрол MAb. Следователно, химерният P3 MAb поддържа способността на мишия вариант да индуцира специфична пролиферация на антиидиотипните Т2 и анти-антиидиотипни Т3 клетки (Фигура 2).

ПРИМЕР 3: Усилване на антитуморния ефект на GM3-VSSP/Montanide ISA 51 ваксината посредством комбиниране с ваксина, съставена от миши MAb 1E10, адсорбиран в алуминиев хидроксид.

Група от женски C57BL/6 мишки на възраст 6-8 седмици се имунизират подкожно на ден 0, 14, 28 и 42 с 50 μ g миши 1E10 MAb, адсорбиран в алуминиев хидроксид. На ден 7, 21, 35 и 49, мишките получават интрамускулни дози със 120 μ g GM3-VSSP/Montanide ISA 51. Друга група мишки се имунизират по същия начин, но се започва с имунизирание на състав на ваксина, съдържащ GM3 ганглиозид. Контролна група отделно се имунизира през същите интервали от време и в тези експерименти се използват същият брой дози от всяка ваксина или само буфериран с фосфат салинов разтвор. На ден 63, мишките от всички групи подкожно се инокулират с 10000 клетки от миши тумор B16. За всички групи се оценява туморният растеж.

Анализ на Mixed Lineal Pattern статистическите данни се използва за сравнение на туморния растеж между всички групи и контролната група, която приема само PBS. Ваксинирането само с 1E10 MAb не защитава мишките от поява на 10000 меланомни B16 клетки. VSSP-GM3 ваксината причинява задържане на растежа на тумора ($p < 0.05$). Комбинациите на GM3-VSSP и 1E10 MAb ваксините води до повишаване на защитния ефект, наблюдаван само с GM3-VSSP ваксината ($p < 0.05$) (Фигура 3).

ПРИМЕР 4: Имунизационен режим на пациенти, болни от рак, които се имунизират с NeuGc-GM3/VSSP ганглиозидна ваксина, при използване на Montanide ISA 51 като добавка.

С цел демонстриране на безопасността и имуногенността на имунизиранието с NeuGc-GM3/VSSP ганглиозидна ваксина, при използване на Montanide ISA 51 като добавка (Patent US 5,788,985 и US 6,149,921), се

провеждат клинични опити, при които 20 пациента с напреднала злокачествена меланома, която не е подходяща за каквото и да е друго онко-специфично лечение, се имунизират с ваксината.

Пациентите получават 9 дози от ваксината, съставът на която съдържа 200 µg GM3 ганглиозид. Дозите се администрат на ден 0, 14, 28, 42, 56, 84, 112, 140 и 168. Съгласно критериите на лекарите, пациентите получават допълнителни дози на всеки 28 дни след шестия месец до достигане на една година лечение.

Взимат се кръвни проби за рутинни биохимични изследвания и за оценяване на серумните титри на анти-NeuGcGM3 ганглиозидните антитела на ден 0, 14, 28, 56, 112, 168, 224, 280 и 332.

Титрите на антителата се измерват посредством ELISA. Серумните разреждания се считат позитивни, когато антиганглиозидните OD стойности са равни на или по-високи от 0.1 (в сравнение с анти-метанол OD).

Токсичността на NeuGcGM3-VSSP/Montanide ISA 51 ваксината се проявява в еритема, локална болка, втвърдяване в мястото на инжекцията и температура, като това позволява токсичността да бъде класифицирана като мека, от степен I/II, съгласно OMS критериите.

Титрите на специфичните антитела, развивани от пациентите, спрямо NeuGcGM3 са между 1:80 и 1:2560. Откритият изотип антитяло включва IgG и IgM (всички пациенти) и IgG (75% от пациентите; Таблица 1).

При пациент 01, който влиза в опитната програма с диагноза за напреднала злокачествена меланома (Evolutionary Metastatic Disease, EMD), регресия и стабилизация на някои кожни увреждания се наблюдават след лечение в продължение на 2 месеца, с неоцветени области около тези рани, в които е показано присъствие на възпалителен инфилтрат и некроза посредством анатомопатологични изследвания при биопсия (Фигура 4).

При пациент 02, който влиза в опитната програма с диагноза за напреднала злокачествена меланома, стабилизация на белодробни метастази

се наблюдават в десния връх 18-20 mm, през време на поне 4 месеца (Фигура 5).

ТАБЛИЦА 1

Титри на антитяло спрямо NeuGcGM3 при пациенти с напреднала злокачествена меланома, имунизирани с NeuGcGM3/VSSP/Montanid ISA 51 ваксина

Пациенти	Ден	IgM	IgG	IgA
01	0	0	0	0
	14	640	80	320
	28	320	160	320
	56	1280	160	320
02	0	160	160	160
	14	160	160	320
	28	160	160	320
	56	1280	320	320
03	0	80	320	0
	14	320	320	0
	28	640	320	0
	56	640	640	0
04	0	0	0	0
	14	160	80	160
	28	1280	80	160
	56	2560	640	2560

ПРИМЕР 5: Имунизационен режим на пациенти, болни от рак, които се имунизират с идиотипна ваксина, съдържаща 1E10 Ab2 Mab, утаена с алуминиев хидроксид.

С цел демонстриране на безопасността и имуногенността на имунизирането с идиотипна ваксина, съдържаща миши антиидиотипен МАb 1E10 (Patent US 5,817,513 и US 6,063,379) и алуминиев хидроксид като добавка, се провеждат клинични опити с 20 пациента с напреднала злокачествена

меланома, която не е подходяща за каквото и да е друго онко-специфично лечение.

Пациентите получават 4 дози от ваксината, съдържаща се в 2 mg 1E10 MAb. Взимат се кръвни проби преди лечението и 14 дни след всяко имунизиране за рутинни биохимични изследвания и за оценяване на серумните титри на антителата спрямо 1E10 MAb идиотипен и NeuGc-GM3 ганглиозид. Титрите на антителата се измерват посредством ELISA като стойностите се считат позитивни, когато са равни на или по-високи от 0.15.

Администрирането на ваксината върху пациентите предизвиква слаба токсичност, класифицирана от степен I/II, съгласно OMS.

В 16 от 17 пациента се проявява силна реакция на IgG Ab3 антитялото, която се открива след администриране на 2 или 3 дози от ваксината. Анализът на специфичността на този Ab3 показва преференциално разпознаване от пациентите на sera 1E10 MAb, в сравнение с други идиотипни контроли MAb, като се предполага индуциране на идиотип-специфичен компонент в реакцията на антитялото към 1E10 MAb. Това се потвърждава от силна sera реактивоспособност спрямо F(ab')₂ фрагментите на този MAb, със среден титър 1:15000 (титри от 1:10000 до повече от 1: 100000), със слабо или никакво разпознаване на F(ab')₂ фрагментите на контролните MAb, използвани като контроли (Фигура 6).

Антителата, получени спрямо NeuGcGM3 са, в повечето случаи, и IgM, и IgG, с титри, съответно, 1:4000 и 1:800 (Фигура 7).

Пациент с диагноза злокачествена меланома и чернодробни метастази се въвежда в опитната програма; след лечението е показана стабилизация на болестта в продължение на 8 месеца, а пациентът живее 15 месеца.

ПРИМЕР 6: Комбинирано имунизиране с антиидиотипна ваксина, включваща Ab2 MAb 1E10 и NeuGcGM3-VSSP ганглиозидна ваксина.

Пациент с меланома и метастази, подложен на месечна операция след поставяне на диагнозата, получава 6 дози идиотипна ваксина, съдържаща Ab2 MAб 1E10 и алуминиев хидроксид гел (2 mg MAб на доза) на ден 0, 14, 28, 42 и 56. През този период на пациента също е администрирана ганглиозидна ваксина, съдържаща 200 ug NeuGcGM3-VSSP ганглиозид и Montanid ISA 51 като добавка на ден 7, 21, 35, 49 и 63. След като пациентът получи тази имунизационна схема, то се реимунизира месечно едновременно с двете ваксини в продължение на 2 месеца. През периода на ваксинирането нови рани не се появяват и състоянието на пациента остава добро.

ПРИМЕР 7: Разпознаване на туморни тъкани посредством MAб 14F7

NeuGcGM3 ганглиозид се разпознава посредством MAб 14F7 (Patent Application WO 99/40119). Показано е разпознаването на туморни тъкани от анти тялото.

Фиксирана с формалин тъкан се поставя в парафин. Хистологията се оценява в разрезите, оцветени с хематоксилин-еозин.

Тези разрези имунно се маркират с комплекс биотин-естрептавидин-пероксидаза (Hsu, S. M., Reine, L., 1981, J. Histochem. Cytochem., 29: 1349-1353). Накратко, парафинът се отстранява и мокрите разрези се третира с водороден пероксид 3% (в метанолов разтвор) в продължение на 30 минути за понижаване на ендогенната активност на пероксидазата. След инкубиране с MAб 14F7 (чист) в продължение на 1 час при стайна температура, биотинилирани анти-миши имуноглобулини и стрептавидин-пероксидазен комплекс се прибавят (Dakopatts) при стайна температура; между инкубирането, разрезите се промиват с Tris-HCl буферен разтвор. Реакцията (POD) протича с 5 ml Tris-HCl, 0.005 ml буферен разтвор, съдържащ водороден пероксид до 30% и 3-3 диаминобенцидин 3 mg.

След промиване с хематоксилин-контрастна вода (Mayer), разрезите се покриват с балсам и се покриват. Ензимната реакция остава кафява на цвят.

Един час след оперативната намеса се взима биопсия от патологичните тъкани. Всички тъкани се промиват с разтвор на салин и веднага се замразяват в течен азот като се съхраняват замразени при -80°C .

Замразените сегменти се нарязват в криостат Leica при -25°C . Получават се серии от разрези с 5 μm , сушат се на въздух и веднага се използват или се съхраняват при -20°C обвити в алуминиево фолио; след това разрезите се фиксират с параформалдехид 4% в продължение на 20 минути.

В Таблица 2 е показано имуномаркирането с MAb 14F7 в няколко човешки тумора. Силно мембранно и цитоплазмено маркиране се установява в повече от 50% туморни клетки. Багрилото е много интензивно при карциноми на колона, на матката, на яйчниците, при саркоми, метастази на лимфни възли и мозък на рак на гърдата, както и метастази от меланома.

ТАБЛИЦА 2

Имуномаркиране на тумор с Mab 14F7

Тумор	Имуномаркиране (позитивни/общо)
Карциноми на дебелото черво	9/9*
Карциноми на матката	2/2*
Карциноми на яйчниците	2/2*
Саркоми	2/2*
Тумори на гърдата и метастази в лимфни възли	6/6*
Меланомни метастази	2/2*

*Повече от 50% от клетките показват силно мембранно и цитоплазмено имуномаркиране.

Описание на приложените фигури

ФИГУРА 1. Balb/c мишки и евтимни и атимни мишки се имунизират подкожно със 100 μg миши MAb P3 в пълна добавка на Freund (CFA),

последвано от реимунизирание с 50 μ g от антицялото MAb, емулгирано в непълна добавка на Freund (IFA). След три дни, клетките на лимфните възли се събират и се провежда анализ за пролиферация с различни концентрации на MAb P3, A3, 1E10 и C5.

ФИГУРА 2. Balb/c мишки се имунизират подкожно със 100 μ g химерно антицяло P3 в пълна добавка на Freund (CFA), последвано от реимунизирание с 50 μ g от антицялото MAb, емулгирано в непълна добавка на Freund (IFA). След три дни, клетките на лимфните възли се събират и се провежда анализ за пролиферация с различни концентрации при използване на миши и химерни антицела като контрол.

ФИГУРА 3. Кинетика на растежа на миши B16 тумор при мишки, имунизирани с имунотерапевтични комбинации, по-специално, идиотипна ваксина, включваща Ab2 MAb1E10 и GM3-VSSP ганглиозидна ваксина, описана подробно в Пример 3.

ФИГУРА 4. Еволюция на кожни метастази при пациент с меланом. Снимките са направени преди имунизирането с ваксина NeuGcGM3/VSSP/ISA 51, два и четири месеца след лечението. Наблюдава се неоцветено хало около някои рани, стабилизираните рани, наблюдавана беше една рана с намален размер и е открит инкремент в една рана.

ФИГУРА 5. Еволюция на белодробни метастази при пациент с меланом. Посредством компютърна аксиална томография се наблюдава десен белодробен вертекс, като размерът на раната е 18x20 mm преди имунизирането с ваксина NeuGcGM3/VSSP/ISA 51 и четири месеца след имунизирането се наблюдава стабилизиране на раната.

ФИГУРА 6. Разпознаване на F(ab')₂ фрагменти от Ab2 MAb1E10 и от други MAb със същия изотип от пациенти, имунизирани с идиотипната ваксина, съдържаща Ab2 MAb1E10 и алуминиев хидроксид като добавка.

ФИГУРА 7. Разпознаване на GM3(NeuGc) и GM3(NeuAc) ганглиозидни серуми от пациенти, имунизирани с идиотипната ваксина, съдържаща Ab2 MAб1E10 и алуминиев хидроксид като добавка.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Имунотерапевтична комбинация за имунотерапия на тумори, които свръхпродуцират ганглиозиди, характеризираща се с това, че включва поне две от следните компоненти:

(А) Идиотипна ваксина, включваща мишо антиганглиозидно моноклонално антитяло (Ab1);

(Б) Идиотипна ваксина, включваща специфично мишо антиидиотипно моноклонално антитяло (Ab2) спрямо антиганглиозидно моноклонално антитяло; и

(В) Ваксина, включваща ганглиозид.

2. Имунотерапевтична комбинация, съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че споменатата комбинация включва А плюс Б, или А плюс В, или Б плюс В.

3. Имунотерапевтична комбинация, съгласно претенции 1 и 2, характеризираща се с това, че споменатата ваксина А включва миши антиганглиозид MAb P3 (входящ номер ECACC 94113026).

4. Имунотерапевтична комбинация, съгласно претенции от 1 до 3, характеризираща се с това, че споменатата ваксина Б включва мишо антиидиотипно антитяло 1E10 (входящ номер ECACC 97112901).

5. Имунотерапевтична комбинация, съгласно претенции от 1 до 4, характеризираща се с това, че споменатата ваксина В включва NeuGcGM3 ганглиозид.

6. Имунотерапевтична комбинация, съгласно претенции от 1 до 4, характеризираща се с това, че споменатата ваксина В включва NeuAcGM3 ганглиозид.

7. Имунотерапевтична комбинация, съгласно претенции от 1 до 6, характеризираща се с това, че А плюс Б, или А плюс В, или Б плюс В се администрират едновременно или се редуват.

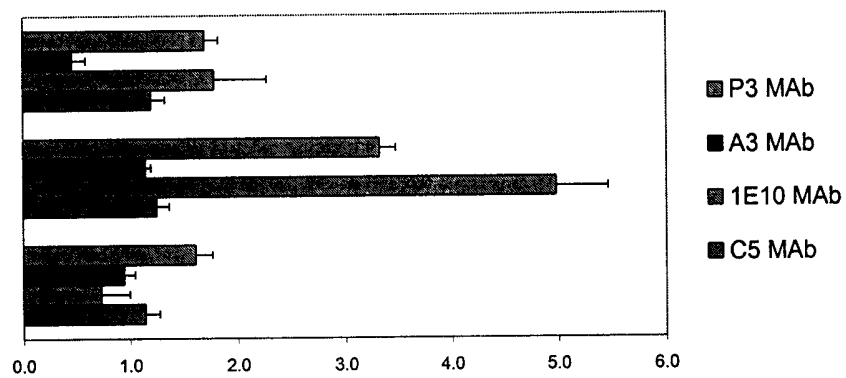
8. Приложение на имунотерапевтичните комбинации, съгласно претенции от 1 до 7, характеризиращо се с това, че е насочено за лечение на тумори, които свръхпродуцират ганглиозиди.

9. Приложение, съгласно претенция 8, характеризиращо се с това, че е насочено за лечение на рак на гърдата, рак на белия дроб, рак на храносмилателната система, урогенитален рак, меланоми, саркоми и невроектодермални тумори.

10. Метод за контролиране на растежа и/или клетъчната пролиферация на тумори, които свръхпродуцират ганглиозиди, характеризиращ се с това, че включва администриране върху бозайник на имунотерапевтична комбинация, съгласно коя да е от претенции от 1 до 7.

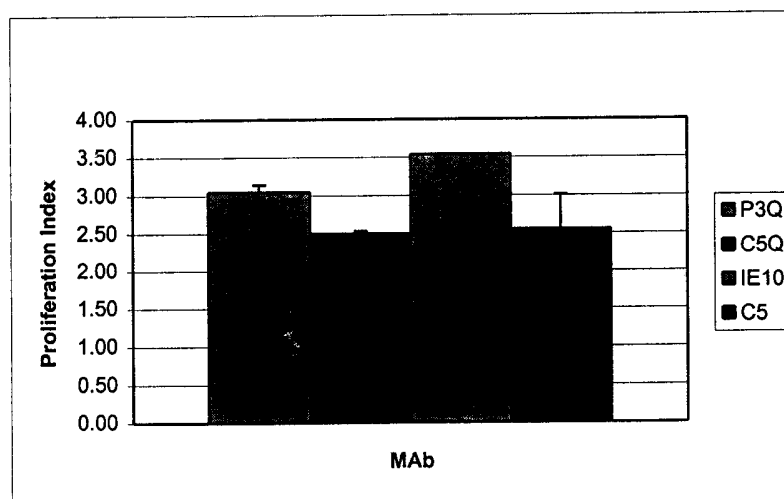
1/5

Фигура 1

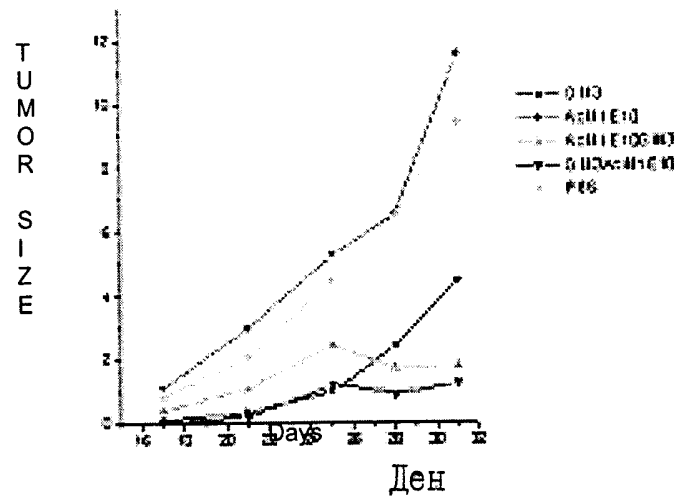


Индекс на стимулиране

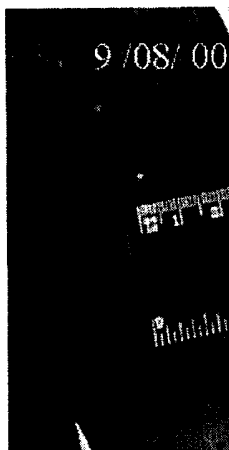
Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4



3/5

Фигура 5

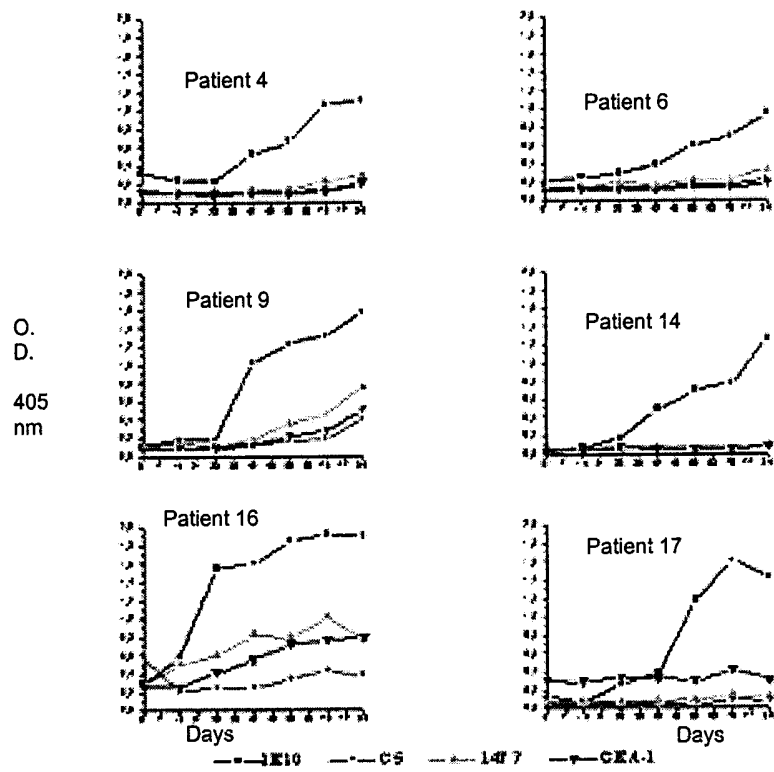


05/09/00



17/01/01

Фигура 6



Фигура 7

