

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.04.2002**  
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.04.2001**  
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/84**  
(33) Země priority: **CU**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:  
**(Věstník č. 7/2004)**  
(86) PCT číslo: **PCT/CU2002/000002**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/081661**

(21) Číslo dokumentu:

**2003-2641**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> :  
**C 12 N 5/00**

(71) Přihlašovatel:  
CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR, Ciudad  
Habana, CU

(72) Původce:  
Fernández Molina Luis Enrique, Ciudad de la Habana,  
CU  
Vázquez López Ana Maria, Ciudad de la Habana, CU  
Pérez Rodríguez Rolando, Ciudad de la Habana, CU  
Pérez González Alexis, Ciudad de la Habana, CU  
Carr Pérez Adriana, Ciudad de la Habana, CU  
Díaz Rodríguez Yildian, Ciudad de la Habana, CU  
Alfonso Fernández Mauro A., Ciudad de la Habana, CU

(74) Zástupce:  
Čermák Karel jr., JUDr. Ph.D., Národní 32, Praha 1,  
11000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Imunoterapeutické kombinace pro léčbu  
nádorů, nadměrně exprimujících gangliosidy**

(57) Anotace:

Řešení souvisí s oborem imunologie a zejména s imunoterapeutickými kombinacemi, používanými pro kontrolu růstu a/nebo buněčné proliferace u nádorů. Pomocí předkládaného řešení je pozorován terapeutický účinek proti nádorům, kombinací idiotypových vakcín, jejichž základ aktivity je antigangliosidová protilátka (Ab1), s idiotypovými vakcínami, jejichž základ aktivity je antiidiotypová protilátka (Ab2), získaná proti antigangliosidové protilátce nebo vakcíně, jejichž základ aktivity je jeden nebo více gangliosidů. Jsou popsány kombinace těchto vakcín, které způsobují synergický terapeutický účinek proti nádorům. Zmiňované kombinace mohou být aplikovány pacientům, kteří jsou v různých klinických stavech nádorů, které exprimují gangliosidy.

**CZ 2003 - 2641 A3**

19.12.03

Přív. 2641

IMUNOTERAPEUTICKÉ KOMBINACE PRO LÉČBU NÁDORŮ, NADMĚRNĚ  
EXPRIMUJÍCÍCH GANGLIOSIDY.

Přív. 2641

**Oblast techniky**

Tento vynález souvisí s lidskou medicínou a zejména s terapeutickými vakcínami, které indukují imunitní odpověď k nádorům, které nadměrně exprimují gangliosidy.

**Přednostní obor**

Gangliosidy jsou složky plasmatických membrán většiny savčích buněk. I když jsou tyto glykosfingolipidy exprimovány v normálních tkáních, jsou velmi atraktivními cíly pro imunoterapii, díky expresním profilům během maligní transformace buněk (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., and Larrick, J.W. (Eds.). M Stockton Press, 1990, pp. 75-94). Charakter sacharidů gangliosidů, společně se skutečností, že jsou vlastní antigeny, z nich vytváří velmi málo imunogenní molekuly. Pro zvýšení imunogenity těchto antigenů bylo použito několik strategií. Jsou založeny na prezentaci gangliosidů imunitnímu systému v různém molekulovém prostředí. Jednou z těchto strategií bylo použití konjugovaných vakcín, ve kterých je sacharidový antigen kovalentně připojen k proteinovému nosiči, kde nosič je velmi imunogenní pro T buňky. Toto umožňuje získat silnou a dlouho trvající protilátkovou imunitní odpověď. Použitím tohoto postupu je možné zvýšit IgG protilátky proti takovým gangliosidům, ačkoliv titry proti re-imunizacím byly menší ve srovnání s těmi, získanými klasickou imunitní odezvou proti antigenům, nezávislým na thymu (Helling, F et al. Cancer Res. 54; 1994:197-203; Helling, F et al. Cancer Res. 55; 1995:2783-2788; Livingston PO et al. Cancer Immunol Immunother 45; 1997:10-19).

Bylo publikováno, že nové složení vakcín indukuje imunitní odezvu proti N-acetylovaným a N-glykolylovaným gangliosidům. Tyto vakcíny jsou založeny na hydrofobním spojení mezi gangliosidy a proteoliposomy velmi malé velikosti (very small size proteoliposomes - VSSP), získaných ze seskupení

proteinového komplexu vnější membrány (Outer Membrane Protein Complex - OMPC) z *Neisseria meningitidis*, Gram-negativní bakterie, s gangliosidy (gangliosidy / VSSP) (Estévez F. et al. Vaccine 18; 1999:190-197; US Patenty 5,788,985 a US 6,149,921). Vakcíny složené z GM3 gangliosidu / VSSP nebo (NeuGcGM3) gangliosidu / VSSP zvýšily vysoký titr IgM a IgG protilátek specifických proti GM3 a NeuGcGM3.

Jinak řečeno, vakcinace GM3 / VSSP zvýšila přežívání myši, nesoucích melanom B16, snížila také objemy nádoru a zvýšila míru nepřijetí subkutánní transplantace nádoru (Alonso et al. Int. J Oncology 15; 1999: 59-66; Car, A. et al. Melanoma Research, v tisku).

Teorie idiotypové sítě navržená Jerne 1974 (Jerne, N.K. Ann. Immunol. 125C; 1974:373-389), ukázala imunitní systém jako síť protilátek s komplexním interakčním vzorem mezi jimi a několika přirozenými antigeny, jejichž interakce se uskutečňují přes variabilní oblasti nebo idiotypy (Id) a propojením idiotyp-antiidiotyp, čímž je regulován imunitní systém. Jerneho teorie podporuje nové strategie pro aktivní imunoterapii rakoviny (AI - active immunotherapy), založenou na použití antiidiotypových vakcín. Vakcinace je provedena protilátkou (Ab1), která rozpoznává s nádorem spojený antigen, což indukuje anti-idiotypové protilátky (Ab2). Tyto anti-idiotypové protilátky napodobují nominální antigen a následně vytváří anti-anti-idiotypové protilátky (Ab3) proti antigenu spojeného s nádorem (Schmolling J, et al. Hybridoma 14; 1995:183-186). Na druhé straně, byla publikována indukce imunitní odezvy proti antigenům spojených s nádorem po vakcinaci anti-Id protilátek (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, LG. 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; Chakrobarty, M. et al. *J. Immunother.* 18; 1995:95-103; Chakrobarty, M. et al. *Cancer Res.* 55; 1995:1525-1530; Foon, KA. et al. *Clin. Cancer Res.* 1; 1995:1285-1294; Herlyn, D. et al. *Hybridoma* 14; 1995:159-166; Sclebusch, H. et al. *Hybridoma* 14; 1995:167-174; Herlyn, D. et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 43; 1996:65-76).

Další možnost, týkající se použití Ab2 protilátek a zvýšení imunogenity sacharidových zbytků, zahrnuje možnost, že takové sacharidové epitopy mohou být reprezentovány proteinovými epitopy na molekule protilátky. Ve skutečnosti bylo mnoho z těchto anti-Id protilátek získáno; napodobují gangliosidy, vysoce exprimované v nádorových buňkách jako GM3, GD3 a 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-KV, et al. *Int J Cancer* 54; 1993:499-505; Saleh MN. et al. *J Immunol* 151; 1993:3390-3398; Sen G. et al. *J Immunotherapy* 21; 1998: 75-83).

Slibných výsledků bylo dosaženo z klinických pokusů u pacientů s rakovinou, použitím Ab2 protilátek současně s BCG nebo QS21, jako adjuvans (McCaffery M. et al. *Clin Cancer Res* 2; 1996: 679-686.; Foon KA. et al. *Clin Cancer Res.* 4; 1998:1117-1124).

V oboru je známa monoklonální protilátka P3 (depoziční číslo ECACC 94113026), která specificky rozpoznává kyselinu sialovou v monosialo- a disialogangliosidech, obsahujících N-glykolyly. Tato Mab Ab1 rozpoznává antigeny na lidských nádorech a melanomech prsu (Patent US 5,788,985; Vázquez AM. 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).

Anti-idiotypová protilátka 1E10 (Ab2 MAb 1E10) (depoziční číslo ECACC 97112901), získaná imunizací MAb P3 je protilátka

typu gama (bez vnitřního obrazu). Ab2MAb 1E10 ukázala protinádorový účinek na rostoucí nádory prsu a melanomy (Patent US 6,063,379; Vázquez et al. Hybridoma 14; 1995:183-186; Vázquez et al. Oncology Reports 7; 2000:751-756).

V oboru neexistují důkazy o použití kombinace mezi vakcínami, zahrnujícími gangliosidy a farmaceutickými směsmi, zahrnujícími protilátky, proti gangliosidům (Ab1) nebo anti-idiotypové protilátky (Ab2), jmenovitě idiotypové vakcíny; ani použití kombinací idiotypové vakcíny Ab1 s idiotypovou vakcínou Ab2.

Předkládaný vynález popisuje použití všech možných popsanych kombinací vakcín, za účelem zesílit účinek, který každá z nich odděleně vytváří.

#### **Detailní popis vynálezu**

Předkládaný vynález popisuje farmaceutickou směs nebo kombinace farmaceutických směsí, užitečných pro imunoterapii rakoviny, zejména pro nádory, které nadměrně exprimují gangliosidy a která zahrnuje alespoň dvě z následujících sloučenin:

- (A) Idiotypová vakcína zahrnující protilátku proti gangliosidu (Ab1);
- (B) Idiotypová vakcína zahrnující antiidiotypovou protilátku (Ab2) proti protilátce proti gangliosidu; a
- (C) Vakcína zahrnující gangliosid.

Farmaceutická směs nebo kombinace farmaceutických směsí mohou mít A plus B nebo A plus C nebo B plus C.

Výhodné je farmaceutická směs nebo kombinace farmaceutických směsí, kde A může být idiotypová vakcína zahrnující myší MAb P3 s depozičním číslem ECACC 94113026; a kde B může být idiotypová vakcína zahrnující myší antiidiotypovou protilátku 1E10 s depozičním číslem ECACC 97112901 a kde C může být vakcína zahrnující N-glykolyd GM3 (NeuGcGM3) nebo N-acetyl GM3 (NeuAcGM3) gangliosidy.

V předkládaném vynálezu mohou být A plus B nebo A plus C nebo B plus C podávány současně nebo alternativním způsobem. Směsi vynálezu mohou být užitečné při léčbě rakoviny, zejména

takové, při které dochází k nadměrné expresi gangliosidů, stejně jako rakoviny plic, prsu, trávicího systému, urogenitálního systému, melanomů, sarkomů a těch, které jsou odvozeny z neuroektodermní tkáně.

Předkládaný vynález také popisuje schéma pro podávání farmaceutických směsí nebo kombinace farmaceutických směsí léčenému živočichu.

V předkládaném vynálezu je také popsán způsob, který zahrnuje podávání farmaceutické směsi nebo kombinace farmaceutických směsí živočichu, popsány dříve pro prevenci nebo léčbu nádorů prsu, plic, trávicího systému, urogenitálního systému, melanomů, sarkomů a těch, které jsou neuroektodermního původu.

### **1. Příprava vakcíny zahrnující gangliosidy:**

Vakcíny zahrnující gangliosidy jsou získány podle přesného popisu v Estevez a kol ve Vaccine 18, 1999: 190-197 a v US Patentech 5,788,985 a US 6,149,921). Proteoliposomy s velmi malou velikostí (VSSP) jsou získány ze seskupení s proteinovým komplexem vnější membrány (OMPC) z Gram-negativní bakterie, kmene *Neisseria meningitidis*, se syntetickými nebo přírodními gangliosidy v nich inkorporovaných (VSSP-G). Gangliosidy mohou být (NeuGcGM3), GD3 nebo (NeuAcGM3).

### **2. Příprava idiotypových vakcín:**

Farmaceutické směsi jsou získány podle specifikací US Patentů 5,817,513 a 6,063,379. Vakcína zahrnuje myší monoklonální protilátky proti gangliosidům, takové jako MAb P3 nebo myší anti-idiotypové monoklonální protilátky, takové jako Mab 1E10, které rozpoznávají monoklonální protilátky proti gangliosidům.

### **3. Imunoterapeutické kombinace, které zesilují imunitní odezvu a protinádorový účinek gangliosidových vakcín a idiotypových vakcín ve zvířecích modelech:**

Zmiňované postupy mohou být použity v myších nebo v jakýchkoliv jiných druzích savců. Složkami kombinace jsou gangliosidová vakcína a idiotypová vakcína; tyto mohou být kombinovány různými způsoby.

V jedné kombinaci, mohou být zvířata imunizována 3 až 10 dávkami

v rozmezí od 25  $\mu\text{g}$  do 1 mg myší monoklonální protilátky proti gangliosidům; interval mezi dávkami může být 7 až 14 dní. Během této periody dostanou zvířata mezi 3 až 10 dávkami v rozmezí mezi 60 až 1000  $\mu\text{g}$  gangliosidové vakcíny, interval mezi dávkami může být 7 až 14 dní.

V jiné kombinaci, mohou být zvířata imunizována 3 až 10 dávkami v rozmezí od 25  $\mu\text{g}$  do 1 mg myší anti-idiotypové protilátky specifické proti protilátce proti gangliosidům; interval mezi dávkami může být 7 až 14 dní. Během této periody dostanou zvířata mezi 3 až 10 dávkami v rozmezí mezi 60 až 1000  $\mu\text{g}$  gangliosidové vakcíny, interval mezi dávkami může být 7 až 14 dní.

Oba typy vakcín se mohou podávat současně nebo střídavě. Vakcíny mohou být vytvořeny jako oddělené produkty nebo jako vakcínová směs, kdy jsou podávány současně. Jsou-li vakcíny podávány střídavě, intervaly mezi každým typem vakcíny mohou být 3-7 dní. Vakcíny jsou podávány v adjuvans, které může být hydroxid hlinitý (62,5  $\mu\text{g}$  - 2,5 mg), Montanide ISA 51 (0,1-1,2 ml/dávky), nebo jakékoliv jiné vhodné adjuvans. Celkový objem každé dávky může být 10  $\mu\text{l}$  - 2 ml.

Vakcíny zahrnující gangliosidy mohou být podávány intradermálně, subkutánně, intramuskulárně, intraperitoneálně, intramukosně, nebo jejich kombinacemi. Stejně podávací způsoby mohou být použity pro vakcíny zahrnující protilátky.

Imunoterapeutické kombinace zvyšují protilátkovou imunitní odezvu stejně jako buněčnou imunitní odezvu v léčených zvířatech.

Čas objevení se lokálních nádorů, objemu nádoru a přežívání léčených subjektů je porovnáván se stejnými parametry pro kontrolní skupinu, za účelem vyhodnotit účinnost imunoterapeutických kombinací. Porovnáním těchto parametrů mezi léčenými a kontrolními skupinami lze pozorovat kratší čas objevení se lokálních nádorů, zmenšení objemu nádoru a zvýšení přežívání ve skupině, která je léčena terapeutickými kombinacemi předkládaného vynálezu. Kontrolní skupiny nejsou pouze ta zvířata, která byla léčena adjuvans, ale také ty skupiny, které

byly léčeny pouze jednou vakcínou, místo jejich kombinacemi.

**4. Imunoterapeutické kombinace, které zesilují imunitní odezvu a protinádorový účinek gangliosidových vakcín a idiotypových vakcín u lidských pacientů:**

Dříve zmíněný postup může být také aplikován pacientům s rakovinou v různých klinických stádiích. Zejména těch nádorů, které nadměrně exprimují gangliosidy, stejně jako nádory plic, prsu, trávicího systému, urogenitálního systému, melanomů, sarkomů a těch, které jsou odvozeny z neuroektodermní tkáně.

V jedné kombinaci, mohou být pacienti imunizováni 3 až 10 dávkami v rozmezí od 0,1 mg do 5 mg myší monoklonální protilátky proti gangliosidu; interval mezi dávkami může být 7 až 14 dní. Během této periody dostanou pacienti mezi 3 až 10 dávkami v rozmezí mezi 60 až 1000  $\mu$ g gangliosidové vakcíny, interval mezi dávkami může být 7 až 14 dní.

V druhé kombinaci, mohou být pacienti imunizováni 3 až 10 dávkami v rozmezí od 0,1 mg do 5 mg myší anti-idiotypové protilátky specifické proti protilátce proti gangliosidům; interval mezi dávkami může být 7 až 14 dní. Během této periody dostanou pacienti mezi 4 až 6 dávkami v rozmezí mezi 60 až 1000  $\mu$ g gangliosidové vakcíny, interval mezi dávkami může být 7 až 14 dní.

V třetí kombinaci mohou být pacienti imunizováni myší monoklonální protilátkou proti gangliosidu; dávky, frekvence a intervaly mohou být jako ty, popsané dříve. Během této periody dostanou pacienti mezi 3 až 10 dávkami v rozmezí mezi 0,1 až 2 mg myší anti-idiotypové protilátky specifické proti protilátce proti gangliosidům.

Oba typy vakcín se mohou podávat současně nebo střídavě. Vakcíny mohou být vytvořeny jako oddělené produkty nebo jako vakcínová směs, kdy jsou podávány současně. Jsou-li vakcíny podávány střídavě, intervaly mezi každým typem vakcíny mohou být 3-7 dní. Vakcíny jsou podávány v adjuvans, které může být hydroxid hlinitý (1-5 mg/dávky), Montanide ISA 51 (0,6-1,2 ml/dávky), nebo

jakékoliv jiné vhodné adjuvans. Celkový objem každé dávky může být 10  $\mu$ l - 2 ml.

Vakcíny zahrnující gangliosidy mohou být podávány intradermálně, subkutánně, intramuskulárně, intraperitoneálně, intramukosně, nebo jejich kombinacemi. Stejně podávací způsoby mohou být použity pro vakcíny zahrnující protilátky.

Během vakcinace jsou monitorovány některé biochemické parametry a titer protilátek, měřením v krvi. Frekvence může být 1 týden až 3 měsíce. Buněčná imunita je studována použitím lymfocytů z pacientů. Extrakce jsou prováděny s frekvencí, která se pohybuje od jednoho týdne do tří měsíců.

Nakonec jsou pacienti re-imunizováni oběma vakcínami o dříve zmíněných koncentracích; intervaly mezi dávkami mohou být 1-6 měsíců. Mohou být podávány současně nebo ne a během 1 až 2 let.

Předkládané vakcinační schéma indukuje v pacientech zvýšenou protilátkovou a buněčnou imunitní odezvu a proto snižuje nádorovou zátěž.

#### **PŘÍKLADY**

**Příklad 1: Aktivace anti-idiotypových T2 a anti-anti-idiotypových T3 buněk v syngenním modelu, indukované imunizací myši MAB P3.**

Samičí Balb/c nahé myši stejného genetického základu, 6-8 týdnů staré, byly subkutánně imunizovány 100  $\mu$ g myši MAb P3 (anti-N-glykolylovaný gangliosidu, depositní číslo ECACC 94113026; Vázquez et al., Hybridoma 14; 1995: 551-558; Moreno et al. Glycobiology 8; 1998: 695-705) a kompletním Freundovým adjuvans (CFA). Za sedm dní byly myši re-imunizovány 50  $\mu$ g protilátky v nekompletním Freundově adjuvans (IFA). V 10 dní byly odebrány drénující lymfatické uzliny a protlačením přes injekční stříkačku byly získány lymfocyty. Buněčná suspenze byla použita v experimentech buněčné proliferace, která byla měřena inkorporací <sup>3</sup>H-thymidinu. Proliferace lymfocytů in vitro byla měřena kultivací suspenze lymfocytů v přítomnosti zvyšujících se koncentrací (25 až 150  $\mu$ g/ml) myši MAb P3 a její Ab2 MAb 1E10

(Depoziční číslo ECACC 97112901). Jako kontrol bylo použito isotypově shodných myších MAb. Stimulační indexy rovné nebo vyšší než 3 byly pokládány jako pozitivní. Lymfocyty získané po imunizaci Balb/c myši P3 MAb specificky proliferovaly v přítomnosti MAb a proliferace nebyla pozorována, byly-li buňky kultivovány v přítomnosti myši kontrolní MAb A3 (IgM) (Alfonso M. a kol.: Hybridoma 14; 1995: 209-216). Tato proliferace byla závislá na přítomnosti T buněk; protože nebyla získána z buněk lymfatických uzlin z P3 imunizovaných athymických nu/nu myši. Imunizace myši MAb P3 nejenže indukovala proliferaci T buněk proti idiotypu této Ab1 MAb (T2), ale také indukovala proliferaci anti-antiidiotypových T buněk (T3) specifických pro myši Ab2 MAb 1E10 (IgG1), a ne proti Mab C5 stejného isotypu (IgG1) (Obrázek 1).

**Příklad 2: Aktivace anti-idiotypové (T2) a anti-anti-idiotypové (T3) indukované imunizací chimerní protilátkou P3.**

Chimerní protilátka P3, jejíž aminokyselinová sekvence jejích variabilních oblastí těžkého řetězce (VH) je ukázána Obrázku 8 a aminokyselinová sekvence jejích variabilních oblastí lehkého řetězce (VL) je ukázána na Obrázku 9, byla použita pro imunizaci samičích Balb/c myši, 6-8 týdnů starých. Pro první subkutánní dávku bylo použito 100 µg protilátky, emulgované v ACF. O sedm dnů později byla zvířata re-imunizována 50 µg protilátky emulgované v AIF. V 10 den byly odebrány drénující lymfatické uzliny (LN) a schopnost lymfoproliferace u LN buněk byla analyzována inkubací v přítomnosti myších a chimerních variant protilátek P3 a Ab2 1E10, jejichž sekvence variabilních oblastí jsou ukázány na Obrázcích 13 (těžký řetězec) a 14 (lehký řetězec). C5 myši MAb a její chimerní varianta byly použity jako isotypově shodné kontroly (Patentová žádost WO 97/33916 A1). Lymfocyty z myši, imunizovaných chimerní protilátkou P3, se specificky proliferovaly, když byly kultivovány v přítomnosti této protilátky nebo této chiméry 1E10 MAb, a také, když byly kultivovány v přítomnosti myších variant těchto protilátek. Specifita proliferace byla demonstrována

použitím isotypově shodných kontrolních MAbs. Chimerní P3 MAb tedy udržuje schopnost myši varianty indukovat specifickou proliferaci antiidiotypových a anti-antiidiotypových T buněk (Obrázek 2).

**Příklad 3: Zesílení protinádorového účinku GM3-VSSP/Montanid ISA 51 vakcíny pomocí její kombinace s vakcínou tvořenou myší MAb 1E10 adsorbovanou v hydroxidu hlinitém.**

Skupina 6-8 týdnů starých C57BL/6 samičích myši byla subkutánně imunizována ve dnech 0, 14, 28 a 42 50 µg of myši 1E10 MAb, adsorbované v hydroxidu hlinitém. Ve dnech 7, 21, 35 a 49 dostaly myši intramuskulární dávky 120 µg GM3-VSSP/Montanid ISA 51. Další skupina myši byla imunizována podobným způsobem, ale imunizace začínaly vakcínovým preparátem, obsahujícím GM3 gangliosid. Kontrolní skupiny byly odděleně imunizovány ve stejných časových intervalech a se stejným počtem dávek každé vakcíny nebo byl v těchto experimentech použit pouze fyziologický roztok pufrovaný fosfátem. V den 63, byly myši ve všech skupinách subkutánně naočkovány 10 000 buňkami myšího nádoru B16. Růst nádoru byl vyhodnocen ve všech skupinách.

Pro porovnání růstu nádoru byla použita statistická analýza dat „Smíšený přímkový vzorek“ (Mixed Lineal Pattern) mezi všemi skupinami a tou kontrolní skupinou, která dostala pouze PBS. Vakcinace samotnou 1E10 MAb neochránila myši před vyvoláním odezvy na 10 000 melanomových B16 buněk. Vakcína VSSP-GM3 způsobila zpomalení nádorového růstu ( $p < 0,05$ ). Kombinace vakcín GM3-VSSP a 1E10 MAb vedla ke zvýšení chránícího účinku, který byl pozorován u samotné vakcíny GM3-VSSP ( $p < 0,05$ ) (Obrázek 3).

**Příklad 4: Imunizační rozpis pacientů s rakovinou pro gangliosidovou vakcínu NeuGc-GM3/VSSP použitím Montanid ISA 51 jako adjuvans.**

S cílem prokázat bezpečnost a imunogenitu imunizace vakcínou NeuGc-GM3 / VSSP použitím Montanide ISA 51 jako adjuvans (US Patent 5,788,985 a US 6,149,921), byla provedena klinická zkouška, ve které bylo touto vakcínou imunizováno 20 pacientů, s pokročilými zhoubnými melanomy, které nebyly vhodné pro žádnou jinou onkologickou specifickou léčbu.

Pacienti obdrželi 9 dávek vakcínového preparátu, obsahujícího 200 µg GM3 gangliosidu. Dávky byly podávány ve dnech 0, 14, 28, 42, 56, 84, 112, 140, a 168. Podle kritéria ošetřujícího lékaře, dostávali pacienti další dávky každý 28 den po šest měsíců, dokud nebyl dokončen jeden rok léčby.

Byly získány vzorky krve pro běžné biochemické testy a pro vyhodnocení titrů anti-NeuGcGM3 gangliosidových protilátek ve dnech 0, 14, 28, 56, 112, 168, 224, 280, a 332.

Titry protilátek byly měřeny pomocí ELISA. Ředění séra bylo bylo pokládáno za pozitivní, když OD hodnoty anti-gangliosidů byly rovny nebo vyšší než 0,1 (vztaženo k anti-methanol OD).

Toxicita vakcína NeuGcGM3-VSSP/Montanid ISA 51 byla sestavena z erytému, lokální bolesti, indurace v místě vpichu a horečky a toto dovolovalo klasifikaci toxicity jako slabou, stupně I/II, podle kritérií OMS.

U pacientů došlo k vyvolání titrů specifických protilátek proti NeuGcGMS (mezi 1:80 a 1:2560).

Detekovaný protilátkový izotyp zahrnoval IgG a IgM (u všech pacientů) a IgG (75 % pacientů; Tabulka I).

U pacienta 01, který vstoupil do testu s diagnózou pokročilého zhoubného melanomu (Evolutionary Metastatic Disease, EMD), byla po dvou měsících léčby pozorována regrese a stabilizace některých kožních lézí, s bezbarvými kruhovými okraji (halo) okolo těchto lézí, ve kterých byla prokázána přítomnost zánětlivého infiltrátu a nekrózy pomocí anatomopatologickými studii v biopsiích (Obrázek 4).

U pacienta 02, s diagnózou pokročilého zhoubného melanomu byla pozorována stabilizace plicní metastázové leze v pravém temeni hlavy 18-20 mm, během alespoň 4 měsíců (Obrázek 5).

**Tabulka I:**

**Titry protilátek proti NeuGcGMS u pacientů s pokročilým zhoubným melanomem imunizovaných NeuGcGM3/ VSSP/ Montanid ISA 51 vakcínou.**

Pacienti	Den	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

**Příklad 5: Imunizační schéma u pacientů s rakovinou idiotypovou vakcínou obsahující 1E10 Ab2 Mab precipitát v hydroxidu hlinitém.**

S cílem prokázat bezpečnost idiotypové vakcíny obsahující myši antiidiotypou MAb 1E10 (US Patent 5,817,513 a US 6,063,379) a hydroxid hlinitý jako adjuvans, byla provedena klinická zkouška s 20 pacienty s pokročilými zhoubnými melanomy, které nebyly vhodné pro žádnou jinou onkologickou specifickou léčbu.

Pacienti obdrželi 4 dávky vakcíny, sestávající z 2 mg 1E10 MAb. Byly získány vzorky krve před léčbou a 14 dní po každé imunizaci pro běžné biochemické testy a pro vyhodnocení titrů protilátek proti 1E10 MAb idiotypu a NeuGc-GM3 gangliosidu. Titry protilátek byly měřeny pomocí ELISA testu, vyhodnocující jako pozitivní hodnoty ty, které jsou rovny nebo vyšší než 0,15. Podávání vakcíny pacientům vyvolalo slabou toxicitu, klasifikovanou, podle OMS, jako stupeň I a II.

U 16 ze 17 vyhodnocovaných pacientů byly vyvolány silné IgG Ab3

protilátkové odezvy, detekovatelné po obdržení 2 nebo 3 dávek vakcíny. Analýza specifity této Ab3 ukázala přednostní rozpoznání 1E10 MAb pacientovým sérem, v porovnání s jinými isotypově shodnými kontrolními MAb, což naznačovalo indukci idiotypově-specifické složky v protilátkové odezvě k 1E10 MAb. Toto bylo potvrzeno silnou reaktivitou séra proti F(ab')<sub>2</sub> fragmentům MAb, s průměrným titrem 1:15000 (titry od 1:10000 do více než 1:100000), s malým nebo žádným rozpoznáním F(ab')<sub>2</sub> fragmentů kontrolních MAb, použitých jako kontroly (Obrázek 6). Protilátky vytvořené proti NeuGcGMS byly, ve většině případů, jak IgM, tak IgG, s titry 1:4000 pro IgM a 1:800 pro IgG (Obrázek 7).

V klinickém testu byl zahrnut pacient s diagnózou zhoubného melanomu a jaterních metastáz; po léčbě byla ukázána stabilizace onemocnění po 8 měsících a pacient přežíval 15 měsíců.

**Příklad 6: Kombinovaná imunizace antiidiotypovou vakcínou zahrnující Ab2 MAb1E10 a NeuGcGM3-VSSP gangliosidovou vakcínu.**

Pacient s melanomem a metastázemi, který byl jednou měsíčně podrobován operaci, obdržel po diagnóze 6 dávek idiotypové vakcíny obsahující Ab2 MAb1E10 a gel hydroxidu hlinitého (2 mg MAb na dávku), dny 0,14,28,42,56. Během této periody byla pacientu také podávána gangliosidová vakcína, obsahující 200ug NeuGcGM3-VSSP gangliosid a Montanid ISA 51, jako adjuvans, dny 7, 21, 35, 49, 63. Poté, co pacient obdržel toto imunizační schéma, byl znovu imunizován jednou za měsíc oběmi vakcínami současně po dva měsíce. Během periody vakcinace se neobjevily nové léze a pacientův stav byl dobrý.

**Příklad 7: Rozpoznání nádorových tkání MAb 14F7.**

NeuGcGM3 gangliosid je rozpoznáván MAb 14F7 (patentová žádost WO 99/40119). Je ukázáno rozpoznání nádorových tkání protilátkou.

Formalínem fixované tkáně byly umístěny do parafinu. Histologie byla vyhodnocena v řezech barvených hematoxilin-eosinem. Tyto řezy byly barveny pomocí imunochemických technik, použitím komplexu biotin-estreptavidin-peroxidasa (Hsu, S. M. y Raine,

L. 1981, J. Histochem Cytochem., 29:1349-1353 ). Stručně, parafin byl odstraněn a na vlhké řezy byl působeno 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v roztoku methanolu) po 30 minut, pro snížení endogenní peroxidasevé aktivity. Po inkubaci s MAb 14F7 (čistou) po 1 hodinu při laboratorní teplotě, byly přidány biotinylované proti myší imunoglobuliny a streptavidin-peroxidasevý komplex (Dakopatts) při laboratorní teplotě; mezi inkubačními časy byly řezy promyty roztokem, pufovaným Tris-HCl. Reakce (POD) byla vyvolána 5 ml Tris-HCl, 0,005 ml roztoku pufru obsahujícího až 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3 mg 3-3 diaminobencidinu.

Po promytí hematoxylin-kontrastní vodou (Mayer), byly řezy pokryty balzámem a zakryty. Enzymová reakce poskytla hnědou barvu.

Čerstvé biopsie z patologických tkání byly získány jednu hodinu před operací. Všechny tkáně byly promyty fyziologickým roztokem a ihned zamrazeny v kapalném dusíku a byly konzervovány mrazem při -80°C.

Zmrzlé fragmenty byly nařezány v kryostatu Leica při -25°C. Byla získána řada následujících 5 um řezů, které byly vysušeny vzduchem a ihned použity nebo byly konzervovány při -20°C, zabalené v hliníkovém papíru; poté byly řezy fixovány 4% paraformaldehydem po 20 minut.

V Tabulce II je ukázáno imunobarvení MAb 14F7 v několika lidských nádorech. Silné obarvení membrány a cytoplasmy je uspokojivé u více než 50% nádorových buněk. Barva byla velmi intenzivní u rakovin tlustého střeva, dělohy, vaječníků, sarkomů, lymfatických uzlin a mozkových metastáz rakoviny prsu, stejně jako melanomových metastáz.

**TABULKA II:**

**Nádor imunobarvený MAb 14F7.**

Nádor	Imuno- barvení (Pozitivní /Celkem)
Rakoviny tlustého střeva	9/9*
Rakoviny dělohy	2/2*
Rakoviny vaječníků	2/2*
Sarkomy	2/2*
Nádory prsu a metastázi lymfatických uzlin	6/6*
Melanomové metastázy	2/2*

\* Více než 50% buněk vykazalo intenzivně imunobarvenou membránu a cytoplasmu.

**Stručný popi obrázků:**

**Obrázek 1.** Myši Balb/c euthymické a athymické myši byly subkutánně imunizovány 100 µg myši MAb P3 v CFA, s následnou re-imunizací 50 µg MAb, emulgované v IFA. Po třech dnech, byly odebrány buňky lymfatických žláz a byl proveden test proliferace s různými koncentracemi MAb P3, A3, 1E10 a C5.

**Obrázek 2.** Myši Balb/c byly subkutánně imunizovány 100 µg chimerní protilátky P3 v CFA, s následnou re-imunizací 50 µg protilátky, emulgované v IFA. Po třech dnech, byly odebrány buňky lymfatických žláz a byl proveden test proliferace s různými koncentracemi, použitím myších a chimerních protilátek, jako kontroly.

**Obrázek 3.** Kinetiky růstu myšního B16 nádor u myši, imunizovaných imunoterapeutickými kombinacemi, zejména idiotypovou vakcínou zahrnující Ab2 MAb1E10 a GM3-VSSP gangliosidovou vakcínou, jak je detailně popsáno v Příkladu 3.

**Obrázek 4:** Vývoj kožních metastáz u pacienta s melanomem. Obrázky byly pořízeny před imunizací vakcínou NeuGcGMS / VSSP / ISA 51, 2 a 4 měsíce po léčbě. Jsou pozorovány bezbarvé zóny kolem některých lézí, stabilizace lézí, u jedné léze bylo pozorováno zmenšení velikosti a u jedné léze bylo detekováno zvětšení.

**Obrázek 5:** Vývoj plicních metastáz u pacienta s melanomem.

Plicní pravý vertex pozorovaný počítačem řízenou axiální tomografií, velikost léze byla 18x20 mm před imunizací vakcínou NeuGcGMS / VSSP / ISA 51 a 4 měsíce po imunizaci byla pozorována stabilizace léze.

**Obrázek 6:** Rozpoznání F(ab')<sub>2</sub> fragmentů z Ab2 MAb1E10 a dalších MAb se stejným izotypem sérem z pacientů, imunizovaných idiotypovou vakcínou, obsahující Ab2 MAb1E10 a gel hydroxidu hlinitého, jako adjuvans.

**Obrázek 7:** Rozpoznání GM3(NeuGc) a GMS(NeuAc) gangliosidů sérem z pacientů, imunizovaných idiotypovou vakcínou, obsahující Ab2 MAb1E10 a gel hydroxidu hlinitého, jako adjuvans.

19.12.03

7V 4003-2641

~~89708~~

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Imunoterapeutická kombinace pro imunoterapii nádorů, které nadměrně exprimují gangliosidy, zahrnující alespoň dvě z následujících složek:
  - (A) Idiotypová vakcína zahrnující protilátku proti gangliosidu (Ab1);
  - (B) Idiotypová vakcína zahrnující specifickou myší antiidiotypovou monoklonální protilátku (Ab2) proti protilátce proti gangliosidu; a
  - (C) Gangliosidová vakcína.
2. Imunoterapeutická kombinace podle patentového nároku 1, kde řečená kombinace zahrnuje A plus B nebo A plus C nebo B plus C.
3. Imunoterapeutická kombinace podle patentových nároků 1 - 2, kde řečená vakcína A zahrnuje myší anti-gangliosidovou MAb P3 (Depozitní číslo ECACC 94113026).
4. Imunoterapeutická kombinace podle patentových nároků 1 - 3, kde řečená vakcína B zahrnuje myší antiidiotypovou protilátku 1E10 (Depozitní číslo ECACC 97112901).
5. Imunoterapeutická kombinace podle patentových nároků 1 - 4, kde řečená vakcína C zahrnuje NeuGcGM3 gangliosid.
6. Imunoterapeutická kombinace podle patentových nároků 1 - 4, kde řečená vakcína C zahrnuje NeuAcGM3 gangliosid.
7. Imunoterapeutická kombinace podle patentového nároku 1 až 6, kde A a B nebo A a C nebo B a C jsou podávány současně nebo střídavě.
8. Použití jakýchkoliv imunoterapeutických kombinací patentových nároků 1 až 7 pro léčbu nádorů, které nadměrně

exprimují gangliosidy.

9. Použití podle patentového nároku 8, pro léčbu nádorů prsu, plic, trávicího systému, urogenitálního systému, melanomů, sarkomů a těch, které jsou z neuroektodermních tkání.
10. Způsob pro kontrolování růstu anebo buněčné proliferace nádorů, které nadměrně exprimují gangliosidy, zahrnující podávání savci imunoterapeutickou kombinací, jakéhokoliv z patentových nároků 1 až 7.
11. Způsob podle patentového nároku 10, kde řečení savci jsou lidé.

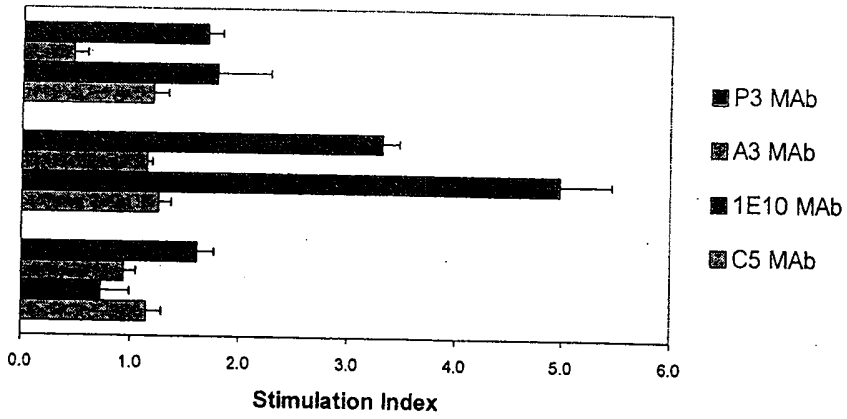
03-03-04

FU 2103-2641

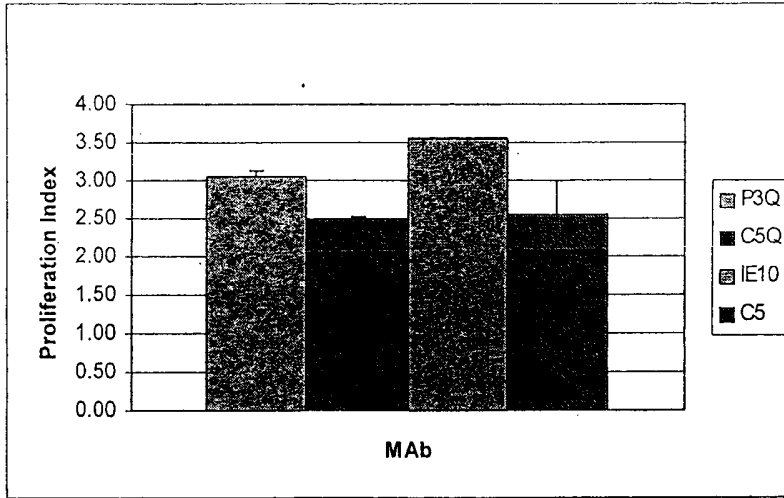
~~14637~~

1/5

OBR. 1



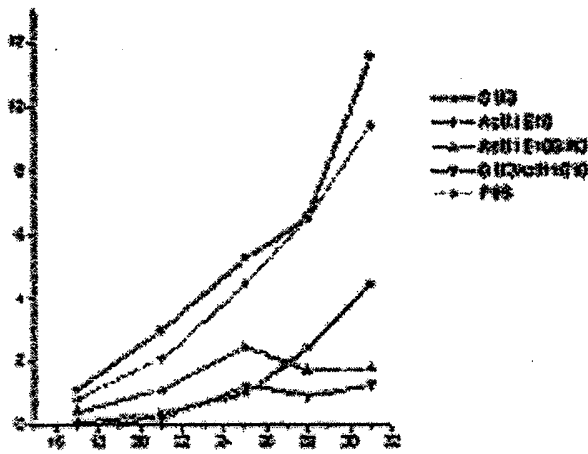
08.03.04



2/5

OBR. 2

Days



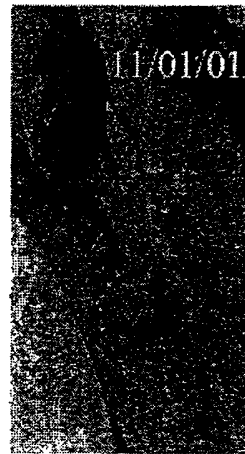
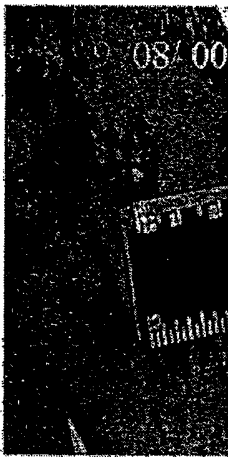
TUMOR SIZE

OBR. 3

03-03-04

3/5

OBR. 4

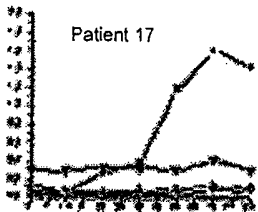
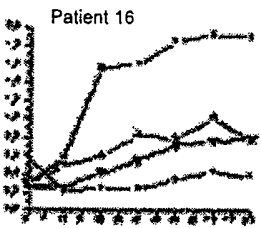
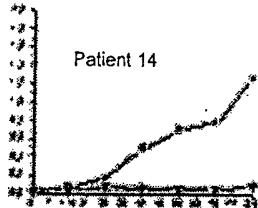
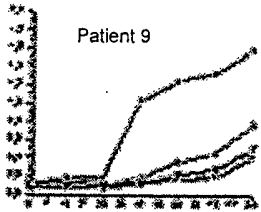
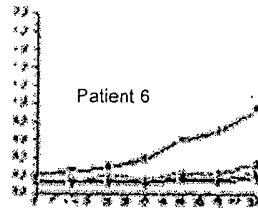
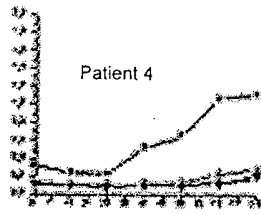


OBR. 5



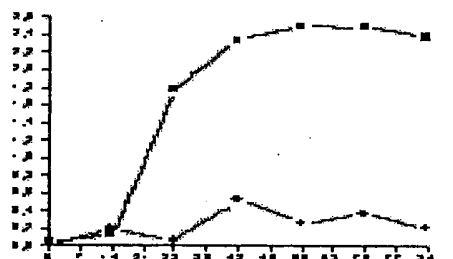
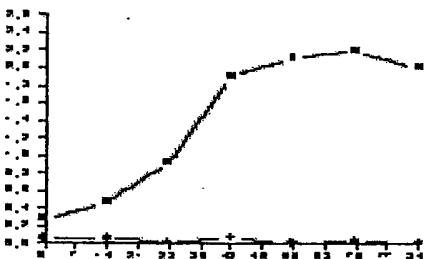
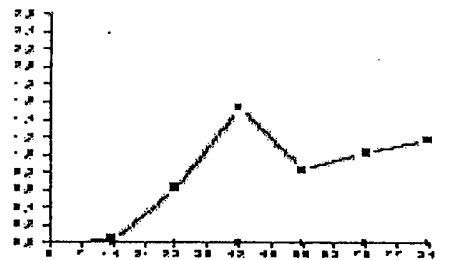
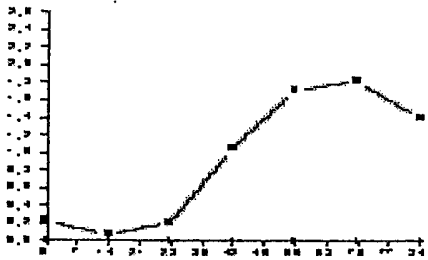
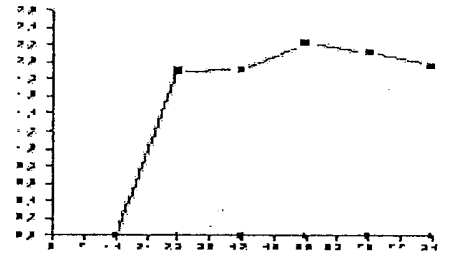
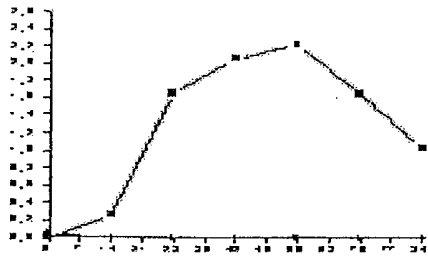
05/09/00

□○



— 930 — 05 — 147 — CE.1

08.03.04



—■— M3

—●— M3

5/5

OBR. 7