

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

295 396

(13) Druh dokumentu:

B6

(51) Int. Cl. 7

A 61 K 38/02

A 61 K 38/19

A 61 K 39/39

A 61 K 47/00

A 61 P 35/00

A 61 P 37/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1998-2689**

(22) Přihlášeno: **21.02.1997**

(30) Právo přednosti: **24.02.1996 DE 1996/19607044**
19.09.1996 DE 1996/19638313
25.11.1996 DE 1996/19648687

(40) Zveřejněno: **14.07.1999**
(Věstník č. 07/1999)

(47) Uděleno: **02.06.05**

(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **17.08.2005**
(Věstník č. 8/2005)

(86) PCT číslo: **PCT/EP1997/000828**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1997/030721**

(73) Majitel patentu:

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH, Ingelheim am Rhein, DE

(72) Původce:

Schmidt Walter, Wien, AT
Birnstiel Max, Wien, AT
Steinlein Peter, Wien, AT
Buschle Michael, Brunn/Gebirge, AT
Schweighoffer Tamás, Wien, AT

(74) Zástupce:

JUDr. Zdeňka Korejzová, Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

Farmaceutický prostředek

(57) Anotace:

Farmaceutický prostředek, obsahující nejméně jeden peptid, bílkovinu nebo fragment bílkoviny s imunomodulačním účinkem spolu s pomocným prostředkem, přičemž jako pomocný prostředek obsahuje prostředek se schopností zvýšit vazbu peptidu, bílkoviny nebo jejího fragmentu na buňky organismu příjemce, nebo vstup těchto materiálů do uvedených buněk a se schopností zvýšit imunomodulační účinnost peptidu, bílkoviny nebo jejího fragmentu. Prostředek může být určen zejména pro parenterální nebo místní podání.

CZ 295396 B6

Farmaceutický prostředekOblast techniky

5

Vynález se týká farmaceutického prostředku, který obsahuje nejméně jeden imunomodulační peptid, bílkovinu nebo její fragment spolu s pomocným prostředkem.

10

Dosavadní stav techniky

15

Existují kvalitativní a kvantitativní rozdíly mezi nádorovými buňkami a normálními buňkami. Imunitní systém má v zásadě schopnost rozeznat tyto rozdíly a může být aktivní specifickou imunizací vakcínami stimulován k tomu, aby rozpoznával nádorové buňky na základě uvedených rozdílu a vyvolal jejich zničení.

20

25

Aby bylo možno vyvolat protinádorovou reakci uvedeného typu, musí být splněny nejméně dvě podmínky. Především musí u nádorových buněk docházet k expresi antigenu, k jehož expresi u normálních buněk nedochází nebo k ní dochází jen tak omezeně, že je možné kvalitativní rozlišení mezi normální a nádorovou tkání imunitním systémem. Druhou z podmínek je, že imunitní systém musí být odpovídajícím způsobem aktivován, aby mohl reagovat na tyto antigeny. Podstatnou brzdou imunitního léčení nádorů je jejich malá imunogenita, především u lidí. V časném stadiu je možno prokázat antigeny, spojené s nádorem nebo specifické pro nádory, které vytvářejí tak zvané neoepitopy a měly by tedy být potenciálním cílem pro zásah imunitního systému. Skutečnost, že imunitní systém není schopen nádory zničit nespochívá zřejmě v tom, že by chyběly neoepitopy, nýbrž v tom, že imunologická odpověď na tyto neoantigeny je nedostatečná.

30

35

Pro imunitní léčení zhoubných nádorů na buněčné bázi byly vyvinuty dva obecné postupy. Jeden z těchto postupů spočívá v tom, že se při tak zvané adoptivní imunoterapii pomnoží in vitro T-lymfocyty, reagující na nádor a pak se znovu vrátí do oběhu nemocného. Druhou možností je aktivní imunoterapie, při níž se užívají nádorové buňky v očekávání, že bude vyvolána zesílená odpověď imunitního systému proti nádorovému antigenu, která povede k systemické reakci. Vakcíny pro aktivní imunoterapii již byly připraveny různým způsobem. Jedním z příkladů mohou být ozářené nádorové buňky podávané ve směsi s materiálem, stimulujícím imunitní systém, jako je *Corynebacterium parvum* nebo *Bacillus Calmette Guerin*, GCG tak, aby byla vyvolána imunitní reakce proti nádorovému antigenu, jak bylo popsáno v publikaci Oettgen H. F. a Old L. J., 1991, *Biologic Therapy of Cancer*, Ed. DeVita, V. T. Jr., Hellman S., Rosenberg S. A., Verlag J. B. Lippincott Company, Philadelphia, New York, Londýn, Hagerstown, 87 až 119.

40

45

50

55

V posledních letech byly užity pro aktivní imunoterapii proti nádorům především geneticky modifikované nádorové buňky. Přehled postupů, při nichž byly nádorové buňky učiněny cizorodými k zesílení imunogenity, je možno nalézt v publikaci Zatloukal a další, 1993, *Gene*, 135, 199 až 220. Podle jednoho z použitých postupů produkovaly geneticky modifikované nádorové buňky cytokiny.

Identifikace a izolace nádorových antigenů a antigenů, spojených s nádory, TA a také od nich odvozených peptidů, tak, jak byly popsány například v publikacích Wölfel T. a další 1994a), *Int. J. Cancer*, 57, 413 až 418 a Wölfel T. a další, 1994b), *Eur. J. Immunol.*, 24, 759 až 764, Carrel S. a Johnson J. P., 1993, *Current Opinion in Oncology*, 5, 383 až 389, Lehmann J. M. a další, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86, 9891 až 9895, Tibbets L. M. a další, 1993, *Cancer*, leden 15, sv. 71, 2, 315 až 321, a ve zveřejněných mezinárodních patentových přihláškách WO 92/20366, WO 94/05304, WO 94/23031, WO 95/00159, vedla k navržení dalšího postupu, při němž byly nádorové antigeny použity jako imunogeny pro přípravu vakcín proti nádorům, a to jak ve formě bílkovin, tak ve formě peptidů. Z publikací Boon T., 1992, *Adv. Cancer Res.*, 58, 177 až 210, Boon T. a další, 1994, *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 337 až 365, Boon T. a van der Bruggen O.,

1996, J. Exp. Med., 183, 725 až 729, Van Pel A. a další, 1995, Immunological Reviews, 145, 229 až 250, Van der Eynde B. a Brichard V. G., 1995, Current Opinion Immunol., 7, 674 až 681, je známo, že maligní melanomy vylučují peptidy, odvozené od nádorového antigenu v kontextu MHC-I. Protinádorovou vakcínou ve formě nádorového antigenu jako takového nebylo až dosud
 5 dosaženo dostatečné imunogenity k vyvolání buněčné imunitní odpovědi, již by bylo zapotřebí ke zničení nádorových buněk, nesoucích nádorové antigeny, jak je uvedeno v Marchand M. a další, 1995, Int. J. of Cancer, 63, 883 až 885. Aby bylo dosaženo toho, aby buňky, prezentující antigen, APC, měly na svém povrchu definované peptidové antigeny, bylo navrhováno, vyvolat zmnožení těchto peptidů, což však vedlo k neúčinnému zatížení buněk peptidy podle Tykocinski M. L.
 10 a další, 1996, Am. J. Pathol., 148, 1 až 16. Mimoto bylo také prokázáno, že současné aplikace pomocných prostředků zvýšila imunitní odpověď jen velmi omezeně, jak bylo rovněž uvedeno ve svrchu zmíněné publikaci Oettgen H. F. a Old L. J., 1991.

Třetí postup pro aktivní imunoterapii ke zvýšení účinnosti protinádorových vakcín je založen na
 15 xenogenizaci autologních nádorových buněk, které pak vlastní imunitní systém vnímá jako cizorodé. Imunitní systém totiž reaguje na nádorové buňky, u nichž dochází k expresi cizorodých bílkovin, čímž se vyvolá imunitní reakce.

Ústřední úlohu při řízení specifické imunitní odpovědi hraje komplex, tvořený třemi molekulami,
 20 a to složky receptorů T-buněk pro antigen, molekulou hlavního komplexu pro histokompatibilitu, MHC a ligandy, kterými jsou peptidové fragmenty, odvozené od bílkovin.

Molekula MHC (popřípadě odpovídající lidská molekula HLA) je peptidový receptor, který
 25 dovoluje při omezené specifitě vazbu různých ligandů. Předpoklad pro tuto vazbu tvoří peptidové sekvence, specifické pro allele, které mohou splnit následující kriteria specifity: peptidy mají v závislosti na halotypu MHC definovanou délku, při haplotypu MHC-I jde zpravidla o 8 až 10 zbytků aminokyselin. V typických případech představují zbytky aminokyselin ve dvou polohách tak zvanou „kotvu“, na níž mohou být vázány pouze určité zbytky aminokyselin s omezenými postranními řetězci. Přesná poloha těchto zakotvujících aminokyselin v peptidech a
 30 požadavky na vlastnosti těchto zbytků se v závislosti na haplotypu MHC mění. C-zakončením peptidových ligandů je často alifatický zbytek nebo zbytek, nesoucí náboj. Takové ligandy pro peptidy MHC-I jsou až dosud známy například pro haplotypy H-2K^d, K^b, K^k, K^{km1}, D^b, HLA-A*0201, A*0205 a B*2705.

V rámci metabolismu bílkovin v buňkách se rozkládají normální, cizorodé a umělé produkty
 35 genů, například virové bílkoviny nebo nádorové antigeny na malé peptidy. Některé z těchto malých peptidů představují potenciální ligandy pro molekuly MHC. Z tohoto důvodu je vyvolání buněčné imunitní odpovědi zapotřebí prezentace molekulou HMC, přičemž dosud není zcela vysvětleno, jak dochází v buňkách k produkci peptidů jako ligandů pro MHC.

Cizorodé bílkoviny a bílkoviny, modifikované tak, aby byly vnímány jako cizorodé a také frag-
 40 menty těchto bílkovin mohou být rozpoznány, vázány a odstraněny také imunoglobuliny, které představují humorální imunitní reakci. To platí také pro nádorové antigeny. Například v případě antigenů MUC1, CEA a HER2/neu, spojených s nádory bylo prokázáno, že imunoglobuliny, které jsou pro tyto bílkoviny specifické, jsou schopné rozpoznat buňky, produkující tuto bílko-
 45 vinu a zničit ji. K vyvolání humorální imunitní odpovědi, specifické pro určitý nádorový antigen byly z tohoto důvodu zkoušeny různé formy MUC1 a CEA jako imunogenní látky, například v rekombinantních vektorech na zvířecím modelu i při klinických předběžných zkouškách, jak bylo popsáno v publikaci Bronte a další, 1995, J. Immunol., 154, 5282.

V rámci vynálezu byly sledovány předpoklady, které by bylo možno využít při vývoji buněčné
 50 vakcíny proti nádorům. Jde o to, že v normálním organismu jsou normální buňky imunitním systémem tolerovány, avšak v případě virové infekce, kdy dochází v těchto buňkách k produkci cizorodých bílkovin, imunitní systém na tyto buňky reaguje a zničí je. Molekuly MHC v těchto případech totiž prezentují cizorodé peptidy, odvozené od cizorodých bílkovin. V důsledku toho
 55

registruje imunitní systém uvedenou buňku jako nežádoucí. Dochází k aktivaci systému APC (do tohoto systému náleží makrofágy, dendritické buňky, Langerhansovy buňky, B-buňky a patrně také nedávno objevené bifenotypické buňky, které v sobě spojují vlastnosti B-buněk a makrofágů podle svrchu uvedené publikace Tykocinski a další, 1996), dojde k tvorbě specifické imunitní reakce a ke zničení buňky.

Nádorové buňky vytvářejí antigeny, specifické pro určité nádory, avšak tyto antigeny jsou vzhledem ke své malé imunogenitě imunitním systémem ignorovány. Avšak v případě, že se do nádorové buňky zavede nikoliv cizorodá bílkovina, nýbrž cizorodý peptid, budou kromě tohoto cizorodého peptidu vnímány jako cizorodé také vlastní nádorové antigeny takové buňky. Tímto způsobem je možno dosáhnout vyvolání buněčné imunitní odpovědi proti nádorovému antigenu.

Malá imunogenita nádorových buněk nemusí být pouze kvalitativním, nýbrž také kvantitativním problémem. Pro peptid z nádorového antigenu, který je presentován molekulami MHC může být koncentrace při presentaci příliš nízká k vyvolání buněčné imunitní odpovědi, specifické pro nádor. Zvýšení počtu peptidů, specifických pro nádor. Zvýšení počtu peptidů, specifických pro nádor na povrchu nádorové buňky by tedy mělo způsobit, že buňka bude vnímána jako cizorodá a mělo by to vést k vyvolání buněčné imunitní odpovědi. Bylo navrhováno, aby nádorový antigen nebo peptid, odvozený od tohoto antigenu byl presentován přímo na povrchu buněk, předem podrobených transfekci kódovou DNA pro tuto bílkovinu nebo peptid, jak je popsáno ve zveřejněných mezinárodních patentových přihláškách WO 92/20356, WO 94/05304, WO 94/23031, WO 95/00159.

V SRN patentové přihlášce P 195 43 649.0 se popisuje buněčná vakcína, která jako svou účinnou složku obsahuje nádorové buňky, obsahující jeden nebo větší počet peptidů v takovém množství, že jsou imunitním systémem nemocného vnímány jako cizorodé a vyvolávají buněčnou imunitní odpověď. Podstatným znakem použitých peptidů je skutečnost, že běží o ligandy pro MHC-haplotyp nemocného. Peptidy jsou tedy rozpoznávány imunitním systémem nemocného jako cizorodé, i když jsou odlišné od peptidů, odvozených od bílkovin, k jejichž expresi dochází v nádorových buňkách nemocného. Další kategorie peptidů může být odvozena od nádorových antigenů, k jejichž expresi dochází v buňkách nemocného. Tyto peptidy vedou ke zvýšení imunogenity tím způsobem, že jsou na povrchu buněk vakcíny k dispozici v takové koncentraci, která je vyšší než koncentrace téhož peptidu na nádorových buňkách nemocného.

Vynález si klade za úkol navrhnout nový farmaceutický prostředek s imunomodulačním účinkem, zvláště vakcínu.

Koncepce, uvedená v SRN patentové přihlášce P 195 43 649.0 je, pokud jde o vakcínu, rozvinuta tak, že se navrhuje farmaceutický prostředek, který obsahuje imunomodulačně účinné peptidy nikoliv v souvislosti s buněčným materiálem, nýbrž spolu s pomocným prostředkem s cílem vyvolat buněčnou a/nebo humorální, s výhodou systemickou odpověď imunitního systému proti původci onemocnění nebo proti nádoru, popřípadě takovou odpověď zesílit. Prostředek je popřípadě možno využít také k vyvolání tolerance proti autoimunitně účinným bílkovinám.

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že imunogenitu peptidů mohou zvýšit některé pomocné prostředky, například polykationty, u nichž bylo poprvé již v r. 1965 prokázáno, že mohou zvýšit transport bílkovin do buněk podle publikací Ryser H. J. a Hancock R., 1965, Science, 150, 501 až 503, Ryser H. J. a Shen W. C., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, 3867 až 3870, a Shen W. C. a Ryser H. J., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 7589 až 7593.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří farmaceutický prostředek, který obsahuje jeden nebo větší počet imunomodulačně účinných peptidů, bílkovin nebo fragmentů bílkovin spolu s pomocným prostředkem.

Použitý pomocný prostředek má schopnost zvýšit vazbu bílkovin, peptidů nebo bílkovinných fragmentů na buňky nemocného nebo zvýšit vstup těchto materiálů do buněk a tím zesílit imunomodulační účinek peptidů, bílkovin nebo fragmentů bílkovin.

- 5 V následujícím popisu přihlášky budou peptidy, bílkoviny nebo fragmenty bílkovin, vyvolávající imunomodulační účinek, označovány pouze jako „peptidy“. Tento výraz, pokud se nevztahuje výslovně na ligandy, může zahrnovat také větší fragmenty bílkovin nebo bílkoviny, z nichž je peptid odvozen nebo také produkty odbourávání buněčných bílkovin.

- 10 Pod pojmem „imunomodulační účinnost“ se rozumí vyvolání nebo zesílení buněčné a/nebo humorální, s výhodou systemické reakce imunitního systému. V tomto provedení účinkuje farmaceutický prostředek podle vynálezu jako vakcína.

- 15 V jednom z výhodných provedení jsou uvedené peptidy ligandy pro nejméně jednu molekulu MHC, k jejíž expresi dochází v organismu nemocného.

Lidské molekuly MHC budou dále podle mezinárodní úmluvy uváděny také jako HLA (antigen lidských leukocytů).

- 20 „Buněčná imunitní odpověď“ je především cytotoxická imunita T–buněk, která v důsledku vzniku cytotoxických CD8–pozitivních T–buněk a CD4–pozitivních pomocných T–buněk vyvolá rozrušení nádorových buněk nebo buněk, napadených původcem onemocnění.

- 25 Pod pojmem „humorální imunitní odpověď“ se rozumí produkce imunoglobulinu, které selektivně rozpoznávají nádorové buňky nebo struktury odvozené od původce onemocnění a v důsledku toho spolu s dalšími systémy, například s komplementem, ADCC (cytotoxicita, závislá na protilátkách) nebo fagocytózou zajistí rozrušení nádorových buněk nebo původce onemocnění nebo jím napadených buněk.

- 30 Peptid, obsažený ve vakcíně je odvozen od antigenu nebo v případě bílkovin představuje antigen, proti němuž má být vyvolána buněčná a/nebo humorální imunitní odpověď. Působením vakcíny dochází k tomu, že T–buňky nebo jiné cytotoxické efektorové buňky, rozpoznávající původce onemocnění nebo nádorové buňky, produkující antigen jsou vytvářeny nebo zmnoženy nebo dochází k produkci protilátek.

- 35 Pro imunizaci proti různým původcům onemocnění, jako jsou bakterie, viry, paraziti a podobně, se užívají bílkoviny nebo peptidy těchto organismů nebo bílkoviny nebo peptidy od těchto organismů odvozené. Výhodné jsou především bílkoviny, které nejsou ovlivněny obecně vysokými mutacemi těchto mikroorganismů. Ze zveřejněných příkladů je možno uvést například lidský virus papillomu HPV16/17 podle publikace Feltkamp M. C. a další, 1995, Eur. J. Immunol., 25(9), 2638 až 2642, antigen jádra viru hepatitidy B podle Vitiello A. a další, 1995, J. Clin. Inv., 95, 1, 341 až 349, Plasmodium Berghei podle Widmann C. a další, 1992, J. Immunol. Methods, 155 (1), 95 až 99, bílkoviny jádra chřipkového viru a virus hepatitidy C.

- 45 V jednom z možných provedení vynálezu je bílkovina při vyvolávání odpovědi proti nádorům nádorový antigen nebo peptid, odvozený od nádorového antigenu a farmaceutický prostředek se užívá jako vakcína proti nádorům. V tomto případě je při léčeném použití vakcíny peptid odvozen od nádorového antigenu, k jehož expresi dochází v nádorových buňkách nemocného. Může jít například o antigeny, které jsou v organismu nemocného produkovány v koncentraci, která je
50 příliš malá k tomu, aby nádorové buňky byly vnímány jako cizorodé.

- Nádorové antigeny nemocného mohou být v průběhu diagnózy a stanovení léčení určeny běžnými postupy. Mohou být prokazovány jednoduchým způsobem imunohistochemicky pomocí protilátek. V případě, že nádorovými antigeny jsou enzymy, například tyrosinázy, je možno je
55 prokazovat enzymatickými reakcemi. V případě nádorového antigenu se známou sekvencí je

- možno použít postupu RT-PCR podle publikací Boon T. a další 1994 svrchu, Coulie P. G. A další, 1994, *Int. J. Exp. Med.*, 180, 35 až 42 a Weynants P. a další, 1994, *Int. J. Cancer*, 56, 826 až 829. Dalšími vhodnými postupy jsou postupy na bázi CTL se specifícností pro stanovené nádorové antigeny. Zkoušky tohoto typu byly popsány například v publikacích Hérin M. a další, 1987, *Int. J. Cancer*, 39, 390, Coulie P. G. a další, 1992, *Int. J. Cancer*, 50, 290 až 296, Cox A. L. a další, 1994, *Science*, 264, 5159, 716 až 719, Rivoltini L. a další, 1995, *The Journal of Immunology*, 154, 5, 2257 až 2265, Kawakami a další, 1995, *The Journal of Immunol.*, 154, 3961 až 3968, a ve WO 94/14459. V uvedených literárních citacích jsou uvedeny některé nádorové antigeny a od nich odvozené peptidové epitopy, vhodné pro použití ve farmaceutickém prostředku podle vynálezu. Příklady vhodných nádorových antigenů je také možno nalézt v souhrnných publikacích Rosenberg S. A., 1996, *Annual Reviews of Medicine*, 47, 481 až 491 a Genderson R. A. a Finn O. J., 1996, *Advances in Immunology*, 62, 217 až 256. Vynález není omezen na použití určitých nádorových antigenů.
- Vakcína proti nádorům, která obsahuje nádorové antigeny nebo od nich odvozené peptidy může být použita nejen k léčebným účelům, nýbrž také k prevenci. Při tomto použití se s výhodou užívá směs peptidů, odvozených od často se vyskytujících nádorových antigenů. Při léčebném použití vakcíny podle vynálezu proti nádorům se užívá jednoho nebo většího množství peptidů, při jejichž použití je možno očekávat, že jsou obsaženy v nádorových antigenech nemocného.
- Vakcína proti nádorům podle vynálezu má proti buněčné vakcíně na bázi autologních nádorových buněk tu výhodu, že může být využita k léčebným účelům také v poměrně časném stadiu, stadiu I a II onemocnění, v nichž není k dispozici dostatečné množství nádorových buněk pro výrobu autologní buněčné vakcíny.
- V jednom z výhodných provedení vynálezu se peptid, který je užit k vyvolání buněčné imunitní odpovědi, shoduje s podtypem MHC-I nebo MHC-II jednotlivce, kterému má být vakcína podávána. Peptid má tedy sekvenci nebo obsahuje sekvenci, která zajistí jeho vazbu na molekulu MHC.
- V dalším možném provedení obsahuje farmaceutický prostředek, který má být použit jako vakcína proti nádorům kromě imunostimulačně účinného polypeptidu ještě další obdobný polypeptid, zvláště cytokin. Ve výhodném provedení je tímto cytokinem interleukin 2, IL-2 nebo GM-CSF, například v dávce přibližně 1000 jednotek. Jako příklady dalších cytokinů je možno uvést IL-4, IL-12, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-omega, TNF-alfa, použít je možno také kombinace těchto látek, například IL-2, + IFN-gamma, IL-2 + IL-4, IL-2 + TNF-alfa nebo TNF-alfa + IFN-gamma.
- V jednom z provedení vynálezu může sloužit farmaceutický prostředek k vyvolání tolerance proti bílkovinám nebo jejich fragmentům, vyvolávajícím autoimunitní onemocnění, to znamená klíčování těchto onemocnění. Peptidy, užit v tomto případě, jsou odvozeny od bílkovin, které vyvolávají autoimunitní onemocnění.
- Na rozdíl od použití peptidů ve vakcíně proti nádorům, nebo proti původcům onemocnění, při němž jsou peptidy shodné s úsekem původní bílkoviny, to znamená nádorového antigenu nebo bílkoviny patogenního organismu, takže peptid je rozpoznáván jako „originální antigen“, dochází při použití k léčení autoimunitních onemocnění k použití takových peptidů, které mají kritické rozdíly v sekvenci aminokyselin ve srovnání s původními bílkovinami. Tyto peptidy jsou vzhledem ke svým zakotvujícím polohám schopné se vázat na molekulu MHC, avšak ve své sekvenci obsahují mutace, které způsobují, že uvedené peptidy mají antagonistický účinek a potlačují již aktivované specifické T-buňky, jak je uvedeno v publikaci Kersh G. J. a další, 1996, *Nature*, 380, 6574, 496 až 498.
- Jako antagonistující peptidy jsou vhodné peptidy tak s „přirozeným“ antagonismem, které byly zjištěny u některých virů podle Bertoletti A. a další, 1994, *Nature*, 369, 407 až 410 a také látky,

kteřé byly nalezeny systemickým sledováním například v peptidových bankách. Jako příklady antagonistických peptidů je možno uvést peptidy, schopné potlačit činnost T–buněk, specifických pro základní bílkovinu meylinu, tyto peptidy již byly podrobeny zkouškám na svou účinnost na pokusných zvířatech podle Brocke S. a další, 1996, Nature, 379, 6563, 343 až 346.

5

Peptid, který má vyvolat buněčnou imunitní odpověď, se musí vázat na molekulu MHC. Aby došlo k vyvolání imunitní odpovědi u nemocného, musí tedy mít tento nemocný v sestavě svých bílkovin odpovídající molekulu HLA. Stanovení podtypu HLA u nemocného je tedy podstatným předpokladem pro možnost vyvolání buněčné imunitní odpovědi a tedy i pro účinné použití peptidů u tohoto nemocného.

10

Podtyp HLA nemocného je možno stanovit běžnými postupy na toxicitu lymfocytů, například podle Practical Immunology, Ed. Leslie Hudson a Frank C. Hay, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne. Tato zkouška je založena na izolaci lymfocytů z krve nemocného, tyto lymfocyty se nejprve uvádějí do styku s antisérem nebo s monoklonální protilátkou proti určité molekule HLA v přítomnosti králičího komplementu C. Pozitivní buňky se rozruší a barví se indikátorem, zatímco nepoškozené buňky se nebarví.

15

K stanovení haplotypu HLA–I nebo HLA–II u nemocného je možno využít také RT–PCR podle publikace Current Protocol in Molecular Biology, 1995, vyd. Ausubel F. M. a další, John Wiley and Sons, Inc., Kapitola 2 a 15. K tomuto účelu se odebere nemocnému krev a z ní se izoluje RNA. Tato RNA se nejprve podrobí reverzní transkripci, čímž se získá cDNA nemocného, která se pak užije jako matrice pro PCR–reakci při použití párů primerů, specifických pro amplifikaci fragmentů DNA pro určitý haplotyp HLA. Při elektroforéze na agarózovém gelu se pak prokazuje pás DNA, k jehož expresi dochází u nemocného v případě, že obsahuje jeho organismus určitou molekulu HLA. V případě nepřítomnosti takového pásu je nemocný negativní.

20

25

Definice peptidu, použitého podle vynálezu pomocí molekuly HLA určuje tento peptid, pokud jde o jeho zakotvující aminokyseliny a jeho délku. Pomocí těchto dvou prvků je možno zajistit, aby peptid odpovídal příslušné molekule HLA v organismu nemocného. V důsledku toho pak dochází je stimulaci imunitního systému a k vyvolání buněčné imunitní reakce, namířené v případě použití peptidu, odvozeného od nádorového antigenu, proti nádorovým buňkám nemocného.

30

Peptidy, které jsou vhodné pro použití v rámci vynálezu mohou být vybrány ze široké škály látek. Mohou být odvozeny od přírodně se vyskytujících imunogenních bílkovin nebo produktů jejich odbourávání v buňkách, například od virových nebo bakteriálních peptidů, od nádorových antigenů nebo může jít o antagonisty proti peptidům, odvozeným od bílkovin, které vyvolávají autoimunitní onemocnění.

35

40

Vhodné peptidy je možno vybírat například na základě peptidových sekvencí, známých z literatury.

Z hlediska vyvolání buněčné imunitní odpovědi je možno peptidy definovat například podle publikací Rammensee H. G. a další, 1993, Current Opinion in Immunology, 5, 35 až 44, Rammensee H. G. a další, 1995, Current Biology, 7, 85 až 96 a Falk K. a další, 1991, Nature, 351, 290 až 296, v těchto publikacích jsou popsány peptidy pro odlišné motivy HLA, odvozené od bílkovin s imunogenním účinkem různého původu, tyto peptidy jsou schopné se vázat na příslušné podtypy HLA.

45

50

Pro peptidy, které obsahují část sekvence bílkoviny s imunogenním účinkem je možno na základě již známých polypeptidových sekvencí srovnáváním sekvence s ohledem na HLA–specifické požadavky stanovit, které z peptidů budou vhodné pro použití. Příklady vhodných peptidů je možno nalézt například ve svrchu uvedených publikacích Rammensee a další, 1993, Falk a další, 1991 a Rammensee, 1995 a také v případě peptidů HIV v WO 91/09869. Z peptidů, odvozených

55

od nádorových antigenů jsou některé látky popsány ve zveřejněných mezinárodních patentových přihláškách WO 95/00159, WO 94/05304. K velmi vhodným látkám náleží peptidy, jejichž imunogenita již byla prokázána, to znamená zejména peptidy, odvozené od virových nebo bakteriálních bílkovin.

5 Místo původních peptidů, které mají schopnost vazby na příslušné místo molekuly MHC-I nebo MHC-II, to znamená peptidů, které jsou beze změn odvozeny od přírodních bílkovin, je možno použít peptidy, které více odpovídají požadavkům na zakotvující polohy a na délku než původní peptidová sekvence a je tedy možno uskutečnit variace, pokud tyto variace neovlivní účinnou
10 imunogenitu peptidu, která je tvořena kombinací vazné afinity na molekulu MHC a schopnosti stimulovat receptory T-buněk, nebo pokud tyto variace imunogenitu peptidu naopak zesílí. K tomuto účelu je podle vynálezu možno použít také uměle syntetizované peptidy, které odpovídají požadavku na schopnost vazby na molekulu MHC. Je tedy například možno vycházet z H2-K^d-ligandu Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile (LFEAIEGFI) a pozměnit aminokyseliny, odlišné od zakotvujících aminokyselin za vzniku peptidu se sekvencí Phe Phe Ile Gly Ala Leu
15 Glu Glu Ile (FFIGALEEI), mimoto je možno zakotvující aminokyselinu Ile v poloze 9 nahradit Leu. Určování epitopů ligandů MHC-I a MHC-II a jejich variací je možno uskutečnit například podle publikace Rammensee H. G., 1995, *Current Opinion in Immunology*, 7, 85 až 96. Délka peptidu odpovídá při jeho úpravě pro molekulu MHC-I s výhodou minimální sekvenci 8 až
20 10 zbytků aminokyselin s požadovanými zakotvujícími aminokyselinami. Vazná skupina MHC-II, zasahující přes nové zbytky aminokyselin má vysoký stupeň degenerace v zakotvujících polohách. V poslední době byly na základě analýzy struktury pomocí rtg-paprsků vyvinuty pro molekuly MHC-II postupy, které dovolují přesnou analýzu vazných motivů MHC-II a na základě této analýzy i variace peptidové sekvence podle Rammensee a další, 1995, *Immunogenetics*, 41, 178 až 228.

25 Peptid může být popřípadě na C- a/nebo na N-konci prodloužen, pokud toto prodloužení nepříznivě neovlivní schopnost vazby na molekulu MHC a pokud je možno prodloužený peptid v buněčném materiálu zpracovat na minimální sekvenci.

30 V jednom z provedení vynálezu může peptid nést negativní náboj. V tomto provedení může být peptid prodloužen aminokyselinami s negativním nábojem nebo je možno negativně nabitě aminokyseliny do peptidu zabudovat, s výhodou v polohách, které nejsou nezbytné pro rozpoznávání specifickými CTL nebo pokud nejde o zakotvující aminokyseliny tak, aby bylo možno dosáhnout
35 elektrostatické vazby peptidu na polykationtový pomocný prostředek, například na polylysin.

V dalším provedení vynálezu není antigen použit ve formě peptidu, nýbrž ve formě bílkoviny nebo jejího fragmentu nebo ve formě bílkoviny ve směsi s bílkovinnými fragmenty. V rámci
40 vynálezu jsou pro použití vhodné větší fragmenty bílkovin nebo úplné bílkoviny, které jsou po aplikaci zpracovány pomocí APC nemocného na peptidy, schopné vazby na molekulu MHC.

Bílkovina představuje antigen nebo nádorový antigen, od něhož je možno odvodit fragmenty, získané zpracováním. V tomto provedení slouží pomocný prostředek k tomu zvýšit množství
45 tohoto materiálu, to znamená nádorového antigenu nebo jeho fragmentů v buňkách, zvláště APC, jako jsou dendritické buňky nebo makrofágy nebo alespoň přítomnost tohoto materiálu umožnit. Bílkoviny nebo jejich fragmenty, přijaté do buněk pak podléhají uvnitř buněk zpracování a mohou být presentovány efektorovým buňkám imunitního systému v rámci MHC a tak vyvolat nebo zesílit odpověď imunitního systému, jak bylo popsáno v publikacích Braciale T. J. a Braciale V. L., 1991, *Immunol. Today*, 12, 124 až 129, Kovacsovic Bamkowski M. a Rock K.
50 L., 1995, *Science*, 267, 243 až 246, York I. A. a Rock K. L., 1996, *Ann. Rev. Immunol.*, 14, 369 až 396.

Při provedení vynálezu, v němž jsou jako antigeny užity bílkoviny nebo větší fragmenty bílkoviny, je možno pozorovat výhodu v tom, že vzniká menší závislost na typu HLA nemocného

vzhledem k tomu, že bílkovina je zpracována ve formě většího počtu různých fragmentů a tak je k dispozici vyšší variabilita peptidových forem.

5 V případě podávání bílkovin nebo bílkovinných fragmentů je možno identifikovat konečné produkty zpracování chemickou analýzou, jako Edmanovým odbouráním nebo hmotovou spektrometrií zpracovaných fragmentů podle svrchu uvedené souhrnné publikace Rammensee a další, 1995 nebo podle biologických zkoušek, to znamená na základě schopnosti APC stimulovat T–

10 Vybírání peptidů, které jsou schopné vyvolat buněčnou imunitní odpověď probíhá zásadně v několika stupních. Obecně jsou tyto peptidy, obvykle v sériových zkouškách nejprve zkoumány na svou schopnost se vázat na molekuly MHC.

Vhodný postup spočívá ve [schopnosti peptidů stabilizovat neobsazené molekuly MHC], jak bylo
15 popsáno například v publikacích Stuber G. a další, 1994, Eur. J. Immunol., 24, 765 až 768, McIntyre C. A. a další, 1996, Cancer Immunol. Immunother., 42, 246 až 250. K tomuto účelu se peptid nanese na buňky, u nichž dochází k expresi příslušné molekuly MHC, avšak vzhledem ke genetickému defektu se v této souvislosti nevytváří žádný endogenní peptid. Vhodnou buněčnou
20 linií tohoto typu je například RMA–S (myš) a T2 (člověk) a varianty těchto linií po transfekci. Pak již zbývá pouze prokázat přítomnost molekuly MHC, stabilizované peptidem, s výhodou průtokovou cytometrií, založenou na analýze FACS podle publikací Flow Cytometry, Acad. Press, Methods in Cell Biology, 1989, sv. 33, vyd.: Darzynkiewicz T. Crissman H. A., FACS Vantage TM User's Guide, 1994, CELL Quest™ User's Guide, 1994. Stabilitní molekuly MHC je
25 možno prokázat pomocí příslušné protilátky proti MHC a fluorescenčního barviva, například FITC (fluoresceinisothiocyanát) tak, že se tímto fluorescenčním barvivem značí druhá, například polyklonální protilátka. Při průtoku buněk se pak jednotlivé buňky zasáhnou laserem určité vlnové délky. Pak se měří emitovaná fluorescence, která závisí na množství peptidu, vázaného na buňce.

30 Další metodou pro stanovení množství vázaného peptidu je postup, uvedený v publikaci Sette A. a další, 1994, Mol. Immunol., 31(11, 813 až 822. K tomuto účelu se snižuje peptid, značený například ^{125}I , který se inkubuje přes noc s izolovanými nebo rekombinantním způsobem získanými molekulami MHC při teplotě 4 °C za přítomnosti různých definovaných koncentrací tohoto peptidu. Ke stanovení nespecifické výměny tohoto peptidu se k některým vzorkům, přidá přebytek
35 neznačeného peptidu, který potlačí nespecifickou interakci značeného peptidu. Pak se nespecificky vázaný peptid odstraní například chromatografií na gelu. Množství vázaného peptidu se pak stanoví na základě radioaktivity pomocí scintilačního počítáče a výsledky se vyhodnotí běžným způsobem.

40 Přehled postupů pro charakterizaci interakce mezi MHC a peptidy, analýzy ligandů MHC a vazby peptidu je možno nalézt ve svrchu uvedené publikaci Rammensee a další, 1995.

V následujícím stupni se zkoumají jednotlivé peptidy s dobrou schopností vazby na svou imuno-

45 Vyvolání buněčné imunitní odpovědi je možno ověřit sledováním CTL se specifitostí pro peptid, například podle svrchu uvedené publikace Current Protocols in immunology, Kap. 3, nebo podle publikace Blomberg K. a Ulfstedt A. C., 1993, J. Immunol. Methods, 160, 27 až 34. Další sledování buněčné imunitní odpovědi může probíhat tak, že se prokazuje, že v nepřítomnosti T–
50 buněk u pokusného zvířete (které bylo předem zpracováno tak, že mu byly podány protilátky, vyvolávající vymizení buněk CD4 nebo CD8) nedochází k žádné imunitní odpovědi, jak je rovněž popsáno ve svrchu uvedené publikaci Current Protocols in Immunology, kap. 3.

Buněčná imunitní odpověď se může prokazovat také sledováním reakce typu „opožděných projevů přecitlivosti“, DHT u imunizovaných zvířat. K tomuto účelu je například možno vstříknout
55

definované množství peptidu do tlapek myši a pak měřit vzniklý otok, jak bylo popsáno v publikacích Grohmann U. a další, 1995, Eur. J. Immunol., 25, 2797 až 2802 a Puccetti P. a další, 1995, Eur. J. Immunol., 24, 1446 až 1452.

- 5 Indukce humorální imunitní odpovědi peptidy, které jsou pro organismus cizorodými antigeny nebo antigeny, k jejichž expresi dochází v organismu jen v malé koncentraci, může být prokázána sledováním specifických protilátek v krevním séru. Vhodným postupem pro stanovení titru protilátek v séru je imunologická zkouška na bázi vázaného enzymu, ELISA. Postup spočívá v tom, že se specifické protilátky po vazbě na peptid, použitý k imunizaci, prokazují pomocí barevné reakce. Alternativním postupem je Western blot. V tomto případě se specifické protilátky v séru navazují na peptid, imobilizovaný na membráně. Vázaná protilátka se pak prokazuje opět barevnou reakcí, jak je také popsáno ve svrhu uvedené publikaci Current Protocols in Immunology, 1991.
- 15 Především po vakcinaci cizorodým antigenem, například virového původu, je možno očekávat tvorbu protilátek. Není však možno vyloučit, že specifické protilátky budou vytvořeny také proti mutovaným peptidům, odvozeným od antigenu nádorových buněk. Rozrušení nádoru těmito protilátkami může probíhat tak, že protilátky jsou schopné se vázat na nádorové buňky přes další složky imunitního systému, například přes komplement, v důsledku cytotoxicity protilátky, ADCC nebo fagocytózou pomocí makrofágu podle publikace Roit I. M., Brostoff J., Male D. K., Immunology, Churchill Livingstone.
- 20

- 25 Vyvolání buněčné odpovědi působením peptidů, odvozených od bílkovin, jejichž imunogenní účinnost není známa, je možno sledovat například způsobem podle publikace Kawakami Y. a další, 1994a, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 9, 3515 až 3619 a podle svrhu uvedené publikace Rivoltini a další, 1995. K tomuto účelu se užijí T-buňky, které mohou rozpoznat požadovaný peptid v případě, že je prezentován molekulami MHC. V případě peptidů, pocházejících z nádorových buněk se odpovídající T-buňky získávají z lymfocytů, infiltrujících nádor, TIL, jak bylo popsáno v publikaci Kawakami Y. a další, 1994b, J. Exp. Med., 180, 1, 347 až 352.
- 30 V případě cizorodých peptidů se T-buňky získávají analogicky z periferní krve. Tyto T-buňky byly uvedeny do styku s buněčnými liniemi, například T2 podle publikace Alexander J. a další, 1989, Immunogenetics, 29, 380 nebo RMA-S podle publikace Kärre K. a další, 1986, Nature, 319, 20. února, 675, po inkubaci a rozrušení buněk, k němuž dochází v případě imunogenního peptidu.

- 35 Další možností pro sledování peptidů, schopných se vázat na MHC, na jejich imunogenitu je sledování vazby peptidů na buňky T2. Zkouška je založena na přítomnosti defektu buněk T2 nebo RMA-S v mechanismu transportu TAP-peptidu, tyto buňky mohou prezentovat stabilní molekuly MHC teprve po nanesení peptidů, které mohou být v této souvislosti prezentovány. Pro tuto zkoušku je možno použít například buňky T2 nebo RMA-S po stabilní transfekci genem HLA, například HLA-A1 a/nebo HLA-A2. V případě, že se buňky smísí s peptidy, které jsou dobrými ligandy HLA a jsou tedy prezentovány v kontextu HLA tak, že jsou vnímány imunitním systémem jako cizorodé, způsobí tyto peptidy výstup molekul HLA ve významném množství na povrch buněk. Průkaz HLA na povrchu buněk, například pomocí monoklonální protilátky pak dovoluje identifikaci takových peptidů podle publikace Malnati M. S. a další, 1995, Science, 267, 1016 až 1018 nebo Sykulev Y. a další, 1994, Immunity 1, 15 až 22. Také v tomto případě se účelně použije peptid s dobrou schopností vazby na HLA.
- 40
- 45

- 50 S ohledem na možnost širokého použití farmaceutického prostředku podle vynálezu se účelně používá směs většího množství peptidů, z nichž má každý z těchto peptidů schopnost vázat se na jinou molekulu MHC, a to s výhodou také na jeden ze dvou nebo tří nejčastěji se vyskytujících podtypů MHC. Vakcína na bázi směsi peptidů, schopných se vázat na uvedené haplotypy může být vhodná pro širokou škálu nemocných.

Podle jednoho provedení vynálezu může vakcína obsahovat peptidy s různými sekvencemi. Použité peptidy se mohou na jedné straně odlišovat tím, že jsou schopné se vázat na odlišné podtypy HLA. Tím je možno dosáhnout ovlivnění většího počtu podtypů HLA u jednoho nemocného nebo je možno ovlivnit větší skupinu nemocných.

Další variabilita použitých peptidů může spočívat v tom, že se peptidy, schopné vazby na určitý podtyp HLA liší sekvencí, která není podstatná pro vazbu na HLA. Může jít například o rozdílné bílkoviny téhož původce infekce nebo různých mikroorganismů. V důsledku takové variability je možno dosáhnout zesílení nebo stimulace odpovědi imunitního systému nebo imunizace proti různým patogenům.

Množství účinného peptidu se ve farmaceutickém prostředku podle vynálezu může měnit v širokém rozmezí. Použité množství závisí na způsobu podání a použitém typu prostředku. Množství peptidu pro jednotlivou dávku se může pohybovat například v rozmezí 1,0 až 5000, s výhodou 1,0 až 1000 a zvláště 10 až 500 mikrogramů. Tuto dávku je možno podávat jednou nebo vícekrát denně, v případě opakovaného podávání účelně nejméně třikrát. Zvláště při léčebném podání může dojít také k aplikaci v různých intervalech, například 1x týdně až 1x měsíčně po libovolně dlouhou dobu tak, aby bylo možno ovlivnit stav imunitního systému nemocného a tím také průběh jeho choroby.

Farmaceutický prostředek podle vynálezu může být použit také ex vivo. Princip tohoto použití spočívá v tom, že se pěstují ex vivo elementy APC, například dendritické buňky v buněčné kultuře spolu s prostředkem podle vynálezu a elementy APC, které nyní prezentují použitý peptid v MHC se podávají nemocným. Pro toto použití již byly popsány v literatuře různé postupy, například v publikaci Porgador A., Gilboa E., 1995, J. Exp. Med., 182, 255 až 260, a Young J. W., Inaba K., 1996, J. Exp. Med., 183, 7 až 11.

Pomocný prostředek obsažený ve farmaceutickém prostředku podle vynálezu má usnadnit vstup peptidů do buněk nebo vazbu peptidů na buňky nemocného a tím zesílit imunogenitu peptidu. Pomocný prostředek může například učinit alespoň na krátkou dobu propustnými membrány buněk, do nichž má být peptid uložen tak, aby se peptid snáze dostal do buněk. K tomuto účelu může být výhodné vázat peptid na pomocný prostředek, například vazbou elektronegativního peptidu na polykationtový pomocný prostředek. Přenos peptidů do buněk je možno uskutečnit také tak, aby byl peptid k dispozici v blízkosti buněčné membrány, jakmile pomocný prostředek ovlivní její propustnost. Účinek pomocného prostředku může spočívat také v tom, že dojde ke zvýšení kritické koncentrace peptidů na povrchu buněk nebo dojde k fagocytóze nebo pinocytoze peptidů do buněk.

Je překvapující, že pomocný prostředek nejen zesiluje pronikání peptidu do buněk, nýbrž zesiluje také imunomodulační účinnost peptidů, pravděpodobně správnou prezentací peptidů molekulami MHC.

V jednom z možných provedení je možno použít jako pomocné prostředky obecně všechny látky, zvyšující propustnost membrán, tak jak jsou užívány pro transport nukleových kyselin do buněk. Postup je popsán například v WO 93/19768.

Podle jednoho z výhodných provedení vynálezu se jako pomocný prostředek užije bazická polyaminokyselina nebo směs bazických polyaminokyselin.

Stupeň polymerace polyaminokyselin se může měnit v širokém rozmezí 5 až 1000, s výhodou 15 až 500.

Dalším výhodným pomocným prostředkem pro použití v prostředku podle vynálezu je polyarginin.

Výhodným pomocným prostředkem, užitým v prostředku podle vynálezu je také polylysin.

Jako příklady dalších vhodných, zvláště polykationtových organických sloučenin ze skupiny bazických aminokyselin je možno uvést polyornizhin, histon, protamin, polyethylenimin nebo směsi těchto látek.

Pomocný prostředek je popřípadě konjugován s některým z buněčných ligandů, například s transferinem, gp 120, LDL (lipoprotein s nízkou hustotou), alfa-fetuinem, EGF (epidermální růstový faktor) nebo s jiným buněčným ligandem, tak, jak jsou tyto látky popsány pro transport DNA při použití endocytózy, zprostředkované receptory, v mezinárodní patentové přihlášce WO 93/07283. Použít je možno také zbytky sacharidů, jako manózy nebo fukózy, které jsou ligandy pro makrofágy nebo také protilátky a jejich fragmenty proti bílkovinám na povrchu buněk.

Polykationtové pomocné prostředky, například polyarginin nebo polylysin, popřípadě konjugované s buněčnými ligandy mohou také mít formu části komplexu s DNA, například plazmidové DNA.

Kódová DNA může obsahovat kódové sekvence pro imunomodulační bílkoviny, zejména cytokiny, například IL-2, interferon nebo GM-CSF.

DNA však může být také prostá kódových sekvencí pro funkční bílkoviny, v tomto případě jde o prázdný plazmid.

Aby bylo možno sledovat mechanismus transportu peptidu, zprostředkovaný bazickými polyaminokyselinami, bylo měřeno uvolňování laktátdehydrogenázy LDH. Ve vzorcích, zpracovaných polyargininem téměř nebylo možno uvolněnou LDG prokázat, zatímco při inkubaci s polylysinem bylo možno v supernatantech buněk prokázat vysoké koncentrace uvedeného enzymu. Z těchto výsledků je možno uzavřít, že polylysin patrně zvyšuje permeabilitu buněčných membrán.

Aniž by bylo nutno se vázat na jakékoliv teoretické úvahy, mohla by účinnost farmaceutického prostředku podle vynálezu spočívat v tom, že peptid pronikne s pomocí pomocného prostředku do cílových buněk nebo dochází k jeho vazbě na tyto buňky, uložené v endodermální oblasti pokožky. Cílovými buňkami jsou mimo jiné buňky, prezentující antigen, jimiž je prezentován také přiváděný peptid, po případném zpracování buňkami B a/nebo T. Jako příklad cílových buněk je možno uvést makrofágy, fibroblasty, keratinocyty, Langerhansovy buňky, dendritické buňky nebo B-buňky.

V rámci vynálezu bylo sledováno, zda mohou být malé peptidy v přítomnosti bazických polyaminokyselin nebo v přítomnosti glykosylovaných forem polykationtu ve větší míře přijímány buňkami, prezentujícími antigen, APC typu makrofágů. Je známo, že zbytky cukrů jsou makrofágy přijímány endocytózou, zprostředkovanou přes receptory. O APC je současně známo, že in vivo představují typ buněk, které přijímají peptidy a prezentují je dalším buňkám imunitního systému. Výsledky pokusu in vitro prokazují, že APC v přítomnosti sledovaných pomocných prostředků přijímají endocytózou vyšší množství antigenních peptidů. Důsledkem je patrně skutečnost, že pomocné prostředky také in vivo zvyšují prezentaci peptidů cytotoxickým efektorovým buňkám a aktivaci těchto buněk, což vede k celkově zesílené imunitní odpovědi proti antigenu, přiváděnému vakcínou.

Jako pomocné prostředky je možno použít některé složky i v částečné formě, popřípadě kromě svrchu uvedených pomocných prostředků. Pro tyto částice jsou zásadně vhodné takové materiály, které se užívají také při syntéze peptidů, například jde o silikagel nebo umělé pryskyřice, pokud jdou tyto materiály přijatelné z fyziologického hlediska a pokud z nich je možno vytvořit částice, které jsou dostatečně malé k tomu, aby mohly proniknout do buněk. Při použití pomocných pro-

středků v částicové formě je možno dosáhnout vysokých místních koncentrací peptidu, což opět může usnadnit příjem peptidu do buněk.

5 Povahu použitého pomocného prostředku, účelnost jeho modifikace buněčnými ligandy nebo vazbou na DNA a potřebné množství pomocného prostředku vzhledem k peptidu je možno určit předběžnými pokusy, například titrací. Obvykle se může množství použitého pomocného prostředku pohybovat ve velmi širokém rozmezí.

10 Zkoušky s pomocnými prostředky mohou být zásadně prováděny stejnými postupy jako zkoušky s peptidy, popřípadě v několika stupních.

15 Schopnost pomocného prostředku zvýšit příjem peptidu nebo jeho vazbu na APC je možno v prvním stupni měřit například tak, že se APC inkubují s fluorescenčně značenými peptidy a pomocným prostředkem. Vyšší příjem peptidu nebo vazbu působením pomocného prostředku je možno prokázat srovnáním s buňkami, které byly inkubovány pouze s peptidem, obvykle se užije průtoková cytometrie.

20 Ve druhém stupni mohou být pomocné prostředky sledovány in vitro na presentaci peptidu elementy APC v přítomnosti pomocného prostředku, přičemž je možno použít postupů, které byly uvedeny svrchu pro peptidy.

25 Další možností sledování účinnosti pomocného prostředku je použití modelového systému in vitro. V tomto případě se elementy APC inkubují spolu s pomocným prostředkem a peptidem a měří se relativní aktivace klonu T–buněk, specificky rozpoznávajícího použitý peptid, postup byl popsán v publikaci Cooligan J. E. a další, 1991, Nature, 351, 290 až 296 a Lopez J. A. a další, 1993, Eur. J. Immunol., 23, 217 až 223.

30 Účinnost prostředku podle vynálezu je možno prokázat také přes buněčnou imunitní reakci sledováním tak zvané opožděné přecitlivělosti DTH u imunizovaných zvířat.

35 Konečně je možno imunomodulační účinek měřit také v pokusech na zvířatech. užívá se například standardních modelů pro nádory, při nichž se používá známých peptidových sekvencí, rozpoznávaných buňkami imunitního systému. Vakcína, která obsahuje peptid a pomocný prostředek se podává v různých poměrech peptidu a pomocného prostředku a v různém celkovém množství. Ochrana před růstem nádoru je pak mírou účinnosti vakcíny.

40 Farmaceutický prostředek podle vynálezu je možno podávat parenterálně, perorálně nebo místně. S výhodou se podává parenterálně, například podkožně, intradermálně nebo nitrosvaleově, výhodné je zejména podkožní nebo intradermální podání, jímž je možno zasáhnout jako cílové buňky především buňky pokožky, jako keratinocyty a fibroblasty, dendritické buňky, Langerhansovy buňky nebo makrofágy. V rámci léčení nádorů může být vakcína proti nádorům podávána také přímo do místa, v němž se nádor nachází.

45 Pro parenterální podání padá v úvahu především roztok nebo suspenze peptidu a pomocného prostředku ve farmaceutickém nosiči, s výhodou s nosiči vodné povahy. Může jít například o vodu, vodu s přísadou pufru, 0,4% roztok chloridu sodného, 0,3% roztok glycinu, roztok kyseliny hyaluronové a podobné známé nosiče. Kromě vodných nosičů je možno použít také rozpouštědla, jako jsou dimethylsulfoxid, propylenglykol, dimethylformamid a směsi těchto látek. Farmaceutický prostředek může mimoto obsahovat běžně užívané pomocné látky, například
50 pufrů nebo anorganické soli pro vyrovnání osmotického tlaku a/nebo k dosažení účinné lyofilizace. Jako příklad je možno uvést sodné a draselné soli, jako chloridy a fosfáty, sacharózu, glukózu, hydrolyzáty bílkovin, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo polyethylenglykol. Farmaceutický prostředek je možno sterilizovat běžnými postupy, například filtrací. Pak je prostředek možno plnit do ampulí nebo také lyofilizovat a dodávat ve formě prášku, určeného ke smísení se
55 sterilním roztokem těsně před použitím.

Podle jednoho z možných provedení je farmaceutický prostředek podle vynálezu prostředek pro místní podání, například pro dermální nebo transdermální aplikaci. Může jít například o hydrogel na bázi polyakrylové kyseliny nebo polyakrylamidu, například Dolobene^K (Merckle), dále může jít o mast, například s obsahem polyethylenglykolu PEG jako nosného prostředí, může jít o standardní mast DAB 8, obsahující 50 % PEG 300 a 50 % PEG 1500, nebo může mít prostředek formu emulze, především mikroemulze typu voda v oleji nebo olej ve vodě, popřípadě s přidáním liposomů. Jako pomocné látky, zvyšující průnik, může prostředek obsahovat sulfoxidové deriváty, jako jsou dimethylsulfoxid DMSO nebo decylmethylsulfoxid decyl-MSO nebo také diethylenglykolmonoethylether, Transcutol nebo také cyklodextriny, další pyrrolidony, jako 2-pyrrolidon, N-methyl-2-pyrrolidon, kyselinu 2-pyrrolidon-5-karboxylovou nebo biologicky odbouratelný N-(2-hydroxyethyl)-2-pyrrolidon a estery těchto látek s mastnými kyselinami, deriváty močoviny, jako jsou dodecylmočovina, 1,3-didodecylmočovina a 1,3-difenyločovina, terpeny, jako D-limonen, menthon, alfa-terpinol, carvol, limonenoxid nebo 1,8-cineol.

Dalším možným způsobem podávání je podávání ve formě aerosolu, například na nosní sliznici nebo inhalací.

Prostředek podle vynálezu může být podáván také ve formě liposomů, které mohou mít formu emulze, pěny, micel, nerozpustných souvislých vrstev, disperzí fosfolipidů, lamelárních vrstev a podobně. Tyto struktury jsou nosným prostředím pro cílený přívod peptidu k určité tkáni, například lymfoidní tkáň nebo nádorové tkáň nebo mohou sloužit k prodloužení poločasu peptidu v organismu.

V případě, že je prostředek určen pro místní podání, může obsahovat také látky, absorbující UV záření například při preventivním použití proti melanomu.

Vhodné pomocné prostředky jsou podrobně popsány v souhrnné publikaci Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. vydání, 1990, Mack Publishing Company, Easton, Penn.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je znázorněn průběh vakcinace myši DBA/2 proti mastocyтому P815 při použití peptidu KYQAVTTTL.

Na obr. 2 je znázorněn průběh vakcinace myši DBA/2 proti mastocyтому P815 při použití peptidu SYFPEITHI.

Na obr. 3 je znázorněn průběh vakcinace myši DBA/2 proti mastocyтому P815 při použití peptidu SYFPEITHI.

Na obr. 4 je znázorněn průběh vakcinace myši DBA/2 proti melanomu M-3 při použití směsi peptidů.

Na obr. 5 je znázorněn průběh vakcinace myši DBA/2 proti melanomu M-3 při místním podání vakcíny.

Na obr. 6 je znázorněn průběh vakcinace myši DBA/2 proti metastázám melanomu M-3.

Na obr. 7 je znázorněna vakcinace myši s mikrometastázami melanomu M-3 při použití směsi peptidů.

Na obr. 8 je znázorněn příjem tyrosinázy buňkami, zprostředkovaný polylysinem.

Na obr. 9 je znázorněna aktivace T–buněk po vakcinaci na modelu (uvolňování IFN–gamma ze sleziných buněk očkovaných zvířat jako reakce na přítomnost buněk M–3).

5 Na obr. 10 je znázorněna indukce protivirové imunity při použití kapsidového peptidu jádra chřipkového viru ASNENMETM a fukózylovaného polylysinu jako pomocného prostředku (aktivace CPL).

Na obr. 11 je znázorněno zesílení vazby peptidů na APC bazickými polyaminokyselinami.

10 Na obr. 12 je znázorněno zvýšení permeability buněčné membrány bazickými polyaminokyselinami (uvolnění LDH po zpracování buněk polylysinem nebo polyargininem).

Na obr. 13 je znázorněna internalizace peptidu působením polyargininu.

15 Na obr. 14 je znázorněn transport peptidů do buněk, prezentujících antigen, z kostní dřeně.

Na obr. 15 je znázorněno zvýšení transportu peptidů do buněk, prezentujících antigen působením polykationtových polyaminokyselin a histonů.

20 Na obr. 16 je znázorněna účinnost transportu v závislosti na stupni polymerace bazických aminokyselin.

Na obr. 17 je znázorněn transport peptidů prostřednictvím polyargininu s nízkou molekulovou hmotností.

25 Na obr. 18 je znázorněno ovlivnění účinnosti transportu v závislosti na náboji peptidu.

30 Vynález bude osvětlen následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení rozsahu vynálezu. Nejprve budou popsány materiály a postupy, použité v průběhu příkladové části přihlášky.

A) Buňky

a) Buněčné linie

35 Buněčná linie myšího melanomu Cloudman S91 (klon M–3, ATCC č. CCL 53.1), buněčná linie mastocyty P815 (ATCC č. TIB 64) a buněčná linie monocytů–makrofágů P388D1 (ATCC č. TIB 63) byly odebrány ze sbírky ATCC. Buňky byly pěstovány v prostředí DMEM s vysokým obsahem glykosy (Life Technologies), doplněném 10 % FCS, 2 mM L–glutaminu a 20 mikrogramů/ml gentamycinu. Buněčný materiál byl běžným způsobem sledován na nepřítomnost kontaminace mycoplazmaty (PCR–Mycoplasma Detection Kit, Stratagene).

40 Buněčná linie myšího lymfomu RMA/S byla popsána ve svrchu uvedené publikaci Kärre K. a další, 1986 a v publikaci Ljunggren H. G. a další, 1990, Nature, 346, 476 až 480.

45 b) Buňky kostní dřeně, prezentující antigen

50 Nejprve byly vypláchnuty stehenní kosti myši DBA/2 k získání kostní dřeně. Buňky kostní dřeně pak byly pěstovány v prostředí DMEM s vysokým obsahem glukózy, obsahujícím 10 % FCS, 5 % koňského séra, 2 mM L–glutaminu a 20 mikrogramů/ml gentamycinu v přítomnosti 200 jednotek/ml GM–CSF myši, podle Li H. a další, 1989, J. Exp. Med., 169, 973 až 986. V průběhu prvních pěti dnů byly každých 24 hodin vyměněny dvě třetiny živného prostředí za účelem odstranění neadherujících granulocytů a B–buněk podle Inaba K. a další, 1992, J. Exp. Med., 176, 1693 až 1702. Jak adheující, tak volně inoucí buňky byly mezi 8 až 10 dnem izolovány inkubací s PBS/5 mM EDTA a nanášeny při hustotě 3×10^4 buněk na jedno vyhloubení na

nosič objektu pro mikroskop s 8 vyhloubeními (Nunc, Roskilde, Dánsko). U více než 90 % buněk bylo možno pozorovat pozitivní reakci s protilátkou F4/80 (Endogen, Cambridge, MA, USA).

B) Syntéza peptidu

5

Peptidy byly syntetizovány při použití syntetizátoru peptidů, model 433 A s monitorem se zpětnou vazbou (Applied Biosystems, Foster City, Kanada) při použití prostředku TentaGel S PHB (Rapp, Tübingen) jako pevné fáze metodou Fmoc s aktivací HBTU, FastmocTM, 0 : 25 mmol). Peptidy byly rozpuštěny v 1 M TEAA při pH 7,3 a byly čištěny chromatografií v reverzní fázi při použití sloupce Vydac C 18. Sekvence byly ověřeny hmotovou spektrometrií při použití zařízení MAT Lasermat (Finnigan, San Jose, Kanada).

10

C) Seznam použitých peptidů

Peptid označení	sekvence	příslušný antigen	číslování aminokys. v bílkovině	MHC-Haplotyp
kpep117	SYFPEITHI	Tyrosin-kináza JAK1	355-363	H2-K ^d
kpep118	KYQAVTTTL	Tum-P198	14-22	H2-K ^d
Kpep162	GPPHSNNFGY	Tum-P35B	4-13	H2-D ^d
Kpep163	ISTQNHRL	P91A	12-20	H2-L ^d
Kpep164	LPYLGWLVF	P815	35-43	H2-L ^d
kpep143	RYAEDYEEL	trp-1		H2-K ^d
kpep145	PYLEQASRI	tyrosináza		H2-K ^d
kpep146	YYVSRDTLL	tyrosináza		H2-K ^d
kpep150	YYSVKKTFL	trp-1		H2-K ^d
	ASNENMETM	Influenzanukleokapsid-Peptid		H2-K ^b

15

Směsi peptidů:

Směs peptidů pro vakcínu proti melanomu M-3; kpep143, kpep145, kpep146 a kpep150 (směs I).

20

Směs peptidů pro vakcínu proti mastocyтому P815: kpep117, kpep118, Kpep162, Kpep163 a Kpep164 (směs III).

D) Výroba vakcín

25

D1) vakcíny, obsahující jediný peptid:

a) vakcíny s obsahem jediného peptidu bez pomocného prostředku je možno připravit tak, že se peptid v koncentraci 1 mg/ml smísí s PBS. Doba inkubace do podání injekce je 4 hodiny při teplotě místnosti.

30

b) Vakcína s obsahem peptidu a polylysinu se připraví tak, že se smísí peptid a polylysin jako pomocný prostředek v uvedeném množství v HBS. Pokud není uvedeno jinak, užije se polylysin s délkou řetězce 200. Doba inkubace do podání injekce je 4 hodiny při teplotě místnosti.

35

i) Při přípravě vakcíny s obsahem 16 mikrogramů účinného peptidu se smísí 11,8 mikrogramů polylysinu a 160 mikrogramů peptidu kpep117 v celkovém objemu 1 ml HBS.

40

ii) Při přípravě vakcíny s obsahem 100 mikrogramů účinného peptidu se smísí 74 mikrogramů polylysinu s 1 mg peptidu kpep117 v celkovém objemu 1 ml HBS.

45

c) Vakcína s obsahem peptidu a neúplného Freundova pomocného prostředku, IFA se připraví tak, že se peptid a IFA emulgují v uvedeném množství nosného prostředí. Doba inkubace do podání injekce je 30 minut při teplotě místnosti.

i) Při přípravě vakcíny s obsahem 16 mikrogramů účinného peptidu se emulguje 192 mikrogramů peptidu kpep117 a 600 mikrolitrů IFA v 600 mikrolitrech HBS.

ii) Při přípravě vakcíny s obsahem 100 mikrogramů účinného peptidu se emulguje 1,2 mg peptidu kpep117 a 600 mikrolitrů IFA v 600 mikrolitrech HBS.

D2) Vakcína s obsahem směsi peptidů

- a) Směs peptidů I jako vakcíny bez pomocného prostředku obsahuje 250 mikrogramů každého z peptidů kpep143, kpep145, kpep146 a kpep150 v celkovém objemu 1 ml PBS.
- b) Směs peptidů III jako vakcíny bez pomocného prostředku obsahuje 250 mikrogramů každého z peptidů kpep117, kpep118, Kpep162, Kpep163 a Kpep164 v celkovém objemu 1 ml PBS.
- c) Směs peptidů I jako vakcíny s polylysinem jako pomocným prostředkem se připraví tak, že se 1 mg směsi peptidů s obsahem 250 mikrogramů každého peptidu smísí se 74 mikrogramů polylysinu v HBS. Doba inkubace do podání injekce je 4 hodiny při teplotě místnosti.
- d) Směs peptidů III jako vakcíny s polylysinem jako pomocným prostředkem se připraví tak, že se 1,25 mg směsi peptidů III s obsahem 250 mikrogramů každého peptidu smísí s 93 mikrogramy polylysinu v HBS. Doba inkubace do podání injekce je 4 hodiny při teplotě místnosti.
- e) Směs peptidů I jako vakcíny s neúplným Freundovým pomocným prostředkem se získá tak, že se 1,2 mg směsi peptidů I v 600 mikrolitrech HBS s obsahem 300 mikrogramů každého peptidu emulguje se 600 mikrolitry IFA. Doba inkubace do podání injekce je 30 minut při teplotě místnosti.
- f) Směs peptidů III jako vakcíny s neúplným Freundovým pomocným prostředkem se připraví tak, že se emulguje 1,5 mg směsi peptidů III v 600 mikrolitrech HBS s obsahem 300 mikrogramů každého peptidu se 600 mikrolitry IFA. Doba inkubace do podání injekce je 30 minut při teplotě místnosti.
- g) Pro místní podání při použití polylysinu jako pomocného prostředku se inkubuje 1 mg směsi peptidů I s obsahem 250 mikrogramů každého peptidu se 74 mikrogramy polylysinu 4 hodiny v celkovém objemu 400 mikrolitrů HBS. Takto získaná směs se vmíchá do 1,6 g hydrogelu Dolobene (Merckle).
- h) Pro místní podání vakcíny bez pomocného prostředku se vmíchá 1 mg směsi peptidů I s obsahem 250 mikrogramů každého peptidu do celkového objemu 200 mikrolitrů HBS v 1,8 g hydrogelu Dolobene (Merckle).
- i) Přípravu polylysinu, konjugovaného s fukózou při délce řetězce polylysinu 240 nebo 200 je možno uskutečnit způsobem podle publikace MacBroom C. R., a další, 1992, Meth. Enzymol., 28, 212 až 219. Bylo dosaženo substituce přibližně 40 %, výchozími látkami byly beta-L-fukopyranosylfenylisothiokyanát a polylysin (Sigma).
- j) Při použití konjugátu transferrinu a polylysinu, připraveného podle WO 93/07283 se množství upravuje tak, aby absolutní množství polylysinu bylo 75 mikrogramů na mg peptidu. V případě, že se do komplexu integruje plazmidová DNA, například ve formě prázdného plazmidu pSP65 bez LPS (Boehringer Mannheim) je příslušný poměr 37,5 mikrogramů DNA/75 mikrogramů polylysinu/1 mg peptidu. V případě použití

160 mikrogramů místo 1 ml peptidu se množství ostatních složek sníží při použití stejného faktoru (6,25).

E) Injekce vakcíny

5

Před podkožní injekcí byly myši anestetizovány po skupinách až 8 zvířat v izolované komoře. Po 3,5 minutách působení Halothanu (4 % v kyslíku, rychlost průtoku 4) jsou myši přibližně na 1 minutu omámeny. V tomto okamžiku se podkožně podá vakcína.

10

Intraperitoneální injekce byly prováděny bez předchozí anestezie. injekční objem byl pro každou vakcínu 100 mikrolitrů pro jedno zvíře, což odpovídá 100 mikrogramů jednotlivých peptidů nebo peptidové směsi I pro zvíře. V případě použití směsi peptidů III bylo podáno celkové množství peptidů 125 mikrogramů na jednu myš.

15

F) Místní podávání vakcíny

Na jednu myš bylo užito 200 mg masti s obsahem 100 mikrogramů peptidu nebo směsi peptidů I nebo 125 mikrogramů směsi peptidů III, mast se vetře do oholeného místa na pokožce myši, obvykle na zádech a v oblasti uší. Správné množství se ověří zvážením.

20

G) Použití vakcíny proti nádorům na myším modelu

25

Sledování účinnosti vakcíny proti nádorům k prevenci nebo léčení nádorů na myším modelu bylo prováděno, v případě, že není uvedeno jinak, podle mezinárodní patentové přihlášky WO 94/21808, přičemž jako myší model byly použity myši DBA/2.

Příklady provedení vynálezu

30

Příklad 1

Vakcinace myši DBA/2 proti mastocyтому P815

35

160 mikrogramů peptidu se sekvencí KYQAVTTTL (kpep118), odvozeného od nádorového antigenu P815, popsaného v publikaci Lethe B. a další, 1992, Eur. J. Immunol., 22, 2283 až 2288 a známého jako ligand pro H2-K^d se smísí s 11,8 mikrogramy polylysinu 300 v 500 mikrolitrech HBS a směs se inkubuje 4 hodiny při teplotě místnosti. Pak se přidá 500 mikrolitrů Earlova roztoku solí s obsahem pufru, EBSS. Vždy 100 mikrolitrů vzniklé směsi se podává osmi myším podkožně v týdenních intervalech. Po této předběžné imunizaci se po dalším týdnu naočkují nádory, každé myši se naočkuje kontralaterálně 5×10^4 buněk buněčné linie mastocyтому P815 ve 100 mikrolitrech EBSS. Buněčná linie je také označována ATCC č. TIB 64, u těchto buněk dochází k expresi nádorového antigenu, od něž je odvozen peptid P815. Výsledek těchto pokusů je znázorněn na obr. 1 (plné čtverce).

45

V paralelním pokusu bylo smíseno 200 mikrogramů peptidu s 500 mikrolitry HBS a po přidání 500 mikrolitrů Freundova pomocného činidla byla vytvořena emulze. Vždy 100 ml získané emulze bylo předběžně imunizováno osm myši a nakonec byly naočkovány nádory z buněk P815 stejným způsobem jako svrchu. Výsledky jsou rovněž znázorněny na obr. 1 (plné kruhy).

50

Pro další souběžný pokus byla vyrobena buněčná vakcína proti nádoru následujícím způsobem:

55

160 mikrogramů peptidu kpep118 bylo smíseno se 3 mikrogramy konjugátu transferrin-polylysin, TfpL, 10 mikrogramů polylysinu a 6 mikrogramů plazmidu psp65, prostého LPS v 500 mikrolitrech HBS, obsahujícího pufr. Po 30 minutách při teplotě místnosti byl svrchu zís-

kaný roztok přidán do lahve pro pěstování buněčné kultury T75 s obsahem $1,5 \times 10^6$ buněk allogenní buněčné linie fibroblastů NIH3T3, ATCC č. CRL 1658, ve 20 ml prostředí DMEM s obsahem 10 % FCS a 20 mM glukózy a pak se láhev inkubuje při 37 °C. Po 30 hodinách bylo prostředí zaměněno za 15 ml čerstvého prostředí a buněčný materiál byl inkubován přes noc při teplotě 37 °C v přítomnosti 5 % oxidu uhličitého. 4 hodiny před aplikací byl buněčný materiál ozářen 20 Gy. Vakcína byla zpracována způsobem, popsaným ve WO 94/21808. Vakcína byla užita k předběžné imunizaci v týdenním odstupu při použití 10^5 buněk. Po dalším týdnu byly naočkovány nádorové buňky stejným způsobem jako svrchu. Výsledky jsou znázorněny na obr. 1 (plné trojúhelníky). Je zřejmé, že vakcína, obsahující peptid s polylysinem nejlépe chránila myši před tvorbou nádoru.

Příklad 2

Vakcinace myši DBA/2 proti mastocyтому P815 podáváním vakcíny s obsahem jediného peptidu

a) Na svoji ochrannou účinnosti proti tvorbě nádoru P815 byly sledovány tři vakcíny s obsahem jediného peptidu, které obsahovaly pouze peptid kpep117 v PBS (obr. 2a), peptid kpep117, emulgovaný v IFA (obr. 2b), nebo peptid kpep117 s polylysinem s délkou řetězce 240 jako pomocným činidlem (obr. 2c). vakcíny byly připraveny způsobem, uvedeným svrchu v odstavci D. Objem injekce byl vždy 100 mikrolitrů. Injekce byly podávány podkožně (sc) nebo intraperitoneálně (ip). Neošetřené myši sloužily jako negativní kontroly, jako pozitivní kontroly byly použity myši, jimž byla vstříknuta vakcína z celých buněk P815, vylučujících GM-CSF, bylo použito 10^5 buněk podkožně ve 100 mikrolitrech injekčního objemu na jedno zvíře. Každá pokusná skupina byla tvořena osmi zvířaty, byly provedeny tři podkožní vakcinace vždy v odstupu 7 dnů. Týden po poslední vakcinaci byla zvířatům naočkována nádorová buněčná linie P815 kontralaterálně v množství 5×10^4 buněk. Zvířata byla denně kontrolována a vznik nádorů byl hodnocen v časovém odstupu vždy jeden týden.

Nejllepší protinádorové účinnosti bylo dosaženo při použití peptidu kpep117 s polylysinem jako pomocným prostředkem v případě podkožního podání 100 mikrogramů každému zvířeti, v tomto případě byla chráněna tři zvířata z osmi. Tento účinek je srovnatelný s účinkem vakcíny z celých buněk, která chrání čtyři zvířata z osmi. Podání 16 mikrogramů peptidu s polylysinem na jedno zvíře již bylo méně účinné a chránilo pouze dvě zvířata, přesto však byl výsledek podstatně lepší než při použití 100 mikrogramů peptidu v PBS, po podání tohoto materiálu nebylo chráněno žádné zvíře, jak je zřejmé z obr. 2a. Po emulgaci v IFA nebylo dosaženo účinku, srovnatelného s podáním peptidu s polylysinem, jak je zřejmé z obr. 2c.

b) V dalším pokusu na modelu pro mastocytom P815 byly srovnávány účinnosti dvou nemodifikovaných polylysinů s různou délkou řetězce. Šlo o krátký řetězec, obsahující pouze 16 zbytků lysinu, pL16 a o dlouhý řetězec, obsahující 240 zbytků, pL240. Zvířatům kontrolní skupiny bylo injekčně podáno 100 mikrogramů peptidu kpep117, rozpuštěného v PBS nebo emulgovaného v IFA. Jako pozitivní kontroly byly použity dvě buněčné vakcíny buněk, vylučujících GM-CSF, přičemž jedna z těchto vakcín byla připravena ze stabilních buněk P815 po transfekci a druhá vakcína byla připravena při použití buněk po přechodné transfekci způsobem podle publikace Wagner E. a další, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 6099 až 6103 (metoda AVET). Obě buněčné vakcíny chránily celkem 4 nebo 5 zvířat z osmi. Vakcíny na bázi samotného peptidu nebo peptidu, emulgovaného v IFA neměly žádnou ochrannou účinnost a u všech zvířat se brzy po naočkování vytvořily nádory. Avšak v případě, že byl peptid podán společně s polylysinem, měla vakcína ochranný účinek proti tvorbě nádorů. Dvě zvířata z osmi byla chráněna při použití polylysinu s dlouhým řetězcem, pL240 a čtyři z osmi zvířat byla chráněna při použití polylysinu s krátkým řetězcem. Tyto výsledky, které jsou také znázorněny na obr. 3 prokazují, že jediný peptid, podaný s polylysinem jako pomocným prostředkem může mít ochrannou účinnost proti nádoru, srovnatelnou s účinností vakcíny z celých buněk, vylučujících cytokiny, která je považována v literatuře za standard pro vakcinaci proti nádorům, například podle publi-

kace Dranoff G. a další, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 3539 až 3543, a také Schmidt W. a další, 1995, květen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4711 až 4714.

5 Příklad 3

Vakcinace myši DBA/2 proti mastocyтому P815 vakcínou, obsahující jediný peptid P815 nebo směs těchto peptidů

10 Pro výrobu vakcíny byly použity následující peptidy:

- kpep118, 100 mikrogramů na injekci,“
- směs peptidů III (kpep117, kpep118, Kpep162, Kpep163, Kpep164), která obsahuje všechny dosud známé peptidy P815. Na jednu injekci bylo použito 25 mikrogramů každého peptidu.

15

Jako pozitivní kontrola byly použity buňky P815, vylučující GM-CSF.

20 V předběžných pokusech se jevil kpep 117 jako peptid s nejlepší ochrannou účinností proti nádoru P815 v případě, že bylo podáno 100 mikrogramů peptidu spolu se 7,5 mikrogramů polylysinu na 100 mikrogramů peptidu při délce řetězce polylysinu 200. Menší množství 16 mikrogramů kpep117 bylo méně účinné. V tomto příkladu bylo také injekčně podáno 100 mikrogramů kpep118 na jedno pokusné zvíře, a to pouze s polylysinem ve skupině B, s transferinem a polylysinem ve skupině C a s transferinem a konjugátem polylysinu DNA ve skupině D. Kontrolním

25 zvířatům byl podán kpep118 spolu s IFA. Bylo prokázáno, že samotný peptid kpep118 nemá žádnou ochrannou účinnost proti tvorbě nádoru.

30 V pokusech, provedených v příkladu 4 bylo prokázáno, že vakcína s obsahem směsi peptidů z melanomu má ochrannou účinnost proti vzniku melanomu. Bylo proto sledováno, zda by směs peptidů mohla být účinná také v případě P815.

Směs peptidů III byla podána pouze s polylysinem ve skupině E, se směsí transferinu a polylysinu ve skupině F a spolu s transferinem a konjugátem polylysinu a DNA ve skupině G. Kontrolní skupině byla podána směs peptidů III v IFA. Negativní kontrolou byly myši, jimž nebyl podán žádný peptid, jako pozitivní kontrola byly užity myši, jimž byly podány buňky P815 po transfekci GM-CSF (10^5 buněk/myš).

40 Pokusy, prováděné v tomto příkladu se vyvíjely ve srovnání s jinými pokusy poněkud netypicky. U pozitivní kontrolní skupiny, již byly podány buňky, vylučující GM-CSF se u všech zvířat brzy vyvinuly nádory, přičemž většina těchto nádorů vymizela tak rychle, jak se vytvořily. Možné vysvětlení by mohlo spočívat v tom, že nádor rostl určitou dobu před svým zničením. Další možné vysvětlení spočívá v tom, že otok, diagnostikovaný jako nádor, nebyl ve skutečnosti nádor, nýbrž infiltrát imunitních buněk, to znamená granulom. Vzhledem k tomu, že zvířata nebyla usmrcena, nebylo možno příčinu definitivně určit. Další zajímavý výsledek byl získán ve skupině G. U všech zvířat se vyvinuly nádory, avšak u dvou z těchto zvířat byla velikost nádoru nebo otoku poměrně malá, nádor rostl velmi pomalu a myši se nechovaly jako nemocná zvířata. Tato dvě zvířata nebyla usmrcena, nýbrž byla dále pozorována. Nádory se počaly zmenšovat a zcela neočekávaně po 9 týdnech již nebylo možno nádory pozorovat, což až dosud nebylo nikdy možno dokázat. Rozrušení nádorů mohlo být vyvoláno přítomností kpep117 v podané směsi peptidů, analogicky jako v příkladu 2, v němž dvě zvířata z osmi při podání 16 mikrogramů kpep117 a tři zvířata z osmi při podání 100 mikrogramů kpep117 byla chráněna. Ochranná účinnost však mohla být vyvolána také více než jedním peptidem ve směsi.

50

Příklad 4

Ochrana myši DBA/2 proti melanomu M-3 předběžnou imunizací vakcínou s obsahem směsi peptidů

5

Byla užita profylaktická vakcína, která obsahovala směs peptidů z melanomu (směs peptidů I, odstavec D2).

10

15

Postup předběžné imunizace vakcínou a naočkování nádoru odpovídalo postupu z příkladu 2 s tím rozdílem, že k naočkování nádoru byly užity buňky MS v množství 10^5 buněk na jedno zvíře. Jako kontrolní vakcína byla užita vakcína z celých buněk M3, vylučující optimální množství IL-2, to znamená 1000 až 2000 jednotek na 10^5 buněk a vyrobená způsobem podle svrchu uvedené publikace Schmidt a další, 1995. Podle prokázaných výsledků je za uvedených pokusných podmínek možno dosáhnout 100% ochrany, jak je zřejmé z obr. 4. Čtyřem skupinám pokusných zvířat byly podány vakcíny, obsahující směs peptidů. Dvěma skupinám byly tyto peptidy podány podkožně nebo intraperitoneálně ve formě emulze v IFA. Druhé dvě skupiny obdržely podkožně nebo intraperitoneálně peptidy spolu s polylysinem pL240.

20

25

30

Na obr. 4 je znázorněn ochranný účinek vakcíny s obsahem peptidů a polylysineu pL240 jako pomocného prostředku. 50 % ošetřených myši bylo ochráněno proti vzniku nádoru M3, zatímco u neošetřených zvířat se rychle vyvinuly pevné nádory. Tohoto účinku mohlo být dosaženo v případě, že vakcína byla vstříknuta podkožně nebo nanesena ve formě gelu na pokožku, jak je zřejmé z obr. 5. V dalších třech kontrolních skupinách, jimž byla podána vakcína s obsahem peptidu a polylysinu intraperitoneálně nebo vakcína s obsahem peptidů a IFA, bylo očkování v podstatě neúčinné. Vyvinuly se nádory, které pouze ve srovnání s neošetřenými kontrolami rostly poněkud pomaleji. Tyto výsledky ukazují, že při použití vakcíny s obsahem směsi peptidů je možno dosáhnout při doplnění vakcíny polylysinem ochranného účinku proti nádorům. Při zvolených pokusných podmínkách měla uvedená vakcína s obsahem peptidů přibližně 50 % účinnost buněčné IL-2-vakcíny, která chrání až 100 % zvířat proti vzniku nádoru při naočkování 10^5 živých buněk M3, jak je uvedeno v publikaci Zatloukal K. a další, 1995, J. Immun., 154, 3406 až 3419.

35

Příklad 5

Ochrana myši DBA/2 proti metastázám M-3

40

a) Byla použita léčebná vakcína, obsahující směs peptidů melanomu, šlo o směs peptidů I, odstavec D2. Byla provedena trojí vakcinace vždy podkožně v týdenních odstupech. První vakcinace byla provedena 5 dnů po vzniku metastáz. K vyvolání metastáz bylo injekčně podáno $1,2 \times 10^4$ buněk M-3 podle mezinárodní přihlášky WO 94/31808 a podle publikace Schmidt W. a další, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 9759-63.

45

50

Jako vakcína byla užita směs peptidů I bez pomocného prostředku (pepmix 1 PBS), s IFA jako pomocným prostředkem (IFA pepmix1) nebo s polylysinem, modifikovaným fukózou (fpL pepmix1). Kontrolním skupinám nebyla podána žádná vakcína nebo byla podána vakcína z celých buněk M-3, produkujících IL-2 podle příkladu 4. Z obr. 6 je zřejmé, že nejlepšího ochranného účinku bylo dosaženo ve skupině, již byla podána směs peptidů I s polylysinem, modifikovaným fukózou jako pomocným prostředkem (obr. 6a). U 50 % myši, to znamená u čtyř myši z osmi, byly potlačeny metastázy. Toto ošetření bylo dokonce účinnější než použití vakcíny z celých buněk, která chránila pouze třetinu myši, to znamená tři myši z devíti. Při podání vakcíny se směsí peptidů spolu s IFA nebo bez pomocného prostředku došlo je zhoršení stavu a sčvětšení metastáz na pevné nádory, jak je zřejmé z obr. 6b.

b) V dalším pokusu byla zkoumána ochranná účinnost vakcíny, obsahující směs peptidů I, vakcína byla podána podkožně. Kontrolní skupině byla podána směs peptidů v PBS bez pomocného prostředku nebo směs peptidů s IFA. Jako pomocný prostředek byl použit nemodifikovaný polylysin 240 nebo polylysin 200, modifikovaný fukózou, fpL200. Kontrolní skupinou byla skupina zvířat, očkovaná vakcínou z buněk, u nichž dochází k expresi IL-2. Jak je zřejmé z obr. 7a, byla vakcína s obsahem peptidu a polylysinu při ošetření metastáz M-3 účinná. Významného výsledku bylo dosaženo zejména při použití polylysinu, modifikovaného fukózou. Při tomto ošetření došlo 50 % zvířat k potlačení všech metastáz, což je ve srovnání s vakcínou IL-2, která v tomto případě potlačila metastázy u 70 % zvířat, dobrý výsledek.

c) V dalším pokusu byl sledován vliv změn a modifikací polykationtů na protinádorovou účinnost. Za tímto účelem byl sledován účinek nemodifikovaného polylysinu 200, dále polylysinu 200, modifikovaného fukózou a mimoto účinek krátkého, nemodifikovaného polylysinu pL16, polylysinu s dlouhým řetězcem pL450 a dalšího polykationtu, polyargininu pArg720. Jako pozitivní kontrola byla použita buněčná vakcína s optimálním počtem buněk M3, vylučujících GM-CSF (nejméně 10 ng na 10^5 buněk), jak je popsáno ve svrchu uvedené publikaci Schmidt, 1995. Také v tomto pokusu byla kontrolním skupinám podána směs peptidů v IFA nebo bez pomocného prostředku. Stejně jako v příkladu 5b) bylo dosaženo nejlepšího účinku v případě, že byl jako pomocný prostředek užit polylysin, modifikovaný fukózou. Výsledky jsou zřejmé z obr. 7b. U 40 % zvířat došlo k vymizení metastáz ve srovnání s 30 % v případě skupiny, v níž byl užit polylysin pL16 s krátkým řetězcem. Kromě skupiny, již byly podány peptidy spolu s argininem, došlo u zvířat v ostatních skupinách pouze ke krátkodobému zpomalení vzniku nádorů. Nemodifikovaný polyarginin byl v tomto pokusu stejně účinný jako polylysin, modifikovaný fukózou, po jeho podání došlo k vymizení metastáz z čtyř z deseti zvířat.

Na obr. 7c je znázorněno opakování pokusu s polyargininem v nezávislosti pokusu. Také v tomto případě došlo po vakcinaci směsí peptidu s polyargininem k protinádorovému účinku u čtyř z osmi zvířat.

Příklad 6

Zavedení tyrosinázy do buněk při použití polylysinu jako pomocného prostředku

V tomto příkladu byl proveden pokus s cílem prokázat, zda je polylysin vhodný jako pomocný prostředek pro zavedení velkých fragmentů bílkovin nebo úplných bílkovin do buněk, k tomuto účelu byly užity buňky M-3.

K zavedení do buněk bylo nejprve smíseno 160 mikrogramů tyrosinázy, značené FITC (EC 1.14.18.1, Sigma) s 3 mikrogramy polylysinu pL240 a směs byla inkubována 3 hodiny při teplotě místnosti. Pak byl roztok přidán do lahve T75 pro pěstování tkáňové kultury s obsahem 2×10^6 buněk M-3 a láhev byla inkubována při teplotě 37 °C. Pak byl buněčný materiál dvakrát promyt PBS, rozrušen přidáním PBS/2 mM EDTA a rozpuštěn v 1 ml PBS/5 % FCS pro analýzu FACS. Na obr. 8 je znázorněno zavedení tyrosinázy do buněk M-3, levá křivka je znázorněno zavedení tyrosinázy do buněk M-3, levá křivka je kontrolní, pravá znamená zavedení tyrosinázy do buněk.

Příklad 7

Stanovení aktivace T-buněk po imunizaci na myším modelu

Vzhledem k tomu, že podle příkladu 5 má vakcína s obsahem peptidu a polykationu na myším modelu zcela zřejmě ochrannou účinnost, bylo sledováno, zda po podání vakcíny dochází také k aktivaci T-buněk. K tomuto účelu byla sledována sekrece cytokinů po inkubaci slezinových

buněk očkovaných zvířat s buňkami M-3 způsobem podle publikace Kawakami Y. a další, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 6458-62.

Byla připravena suspenze jednotlivých slezinných buněk z očkovaných a neočkovaných zvířat a červené krvinky byly rozrušeny pomocí hypotonického pufru s obsahem 0,15 mM NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 a 0,1 mM EDTA pH 7,4. Adherující buňky byly odstraněny a 3×10^6 slezinných buněk/ml prostředí DMEM s 10 % FCS bylo inkubováno v Petriho miskách 90 minut při 37 °C. Neadherující buňky byly po opatrném přenesení pipetou pěstovány společně s 1×10^3 parenterálních buněk v různých poměrech. Buňky byly pěstovány ve 200 mikrolitrech prostředí DMEM s 10 % FCS, 2 mM L-glutaminu a 20 mikrogramů/ml gentamycinu na plotnách pro pěstování tkáňových kultur s 96 vyhloubeními. Devátého dne bylo odebráno 100 mikrolitrů supernatantu a byl měřen obsah IFN-gamma při použití běžně dodávaného kitu ELISA (Endogen, Cambridge, MA, USA) podle návodu výrobce. Bylo prokázáno, že po 9 dnech inkubace vylučovaly do prostředí IFN-gamma ve větším množství pouze slezinné buňky očkovaných zvířat, zatímco ve společných kulturách slezinných buněk z neočkovaných zvířat a v kulturách buněk M-3 nebylo možno prokázat téměř žádný IFN-gamma. Výsledky těchto pokusů jsou graficky znázorněny na obr. 9.

Příklad 8

Indukce imunity proti virům při použití peptidu ASNENMETM z nukleokapsidu chřipkového viru při použití fukózylovaného polylysinu jako pomocného prostředku

Byla použita vakcína, obsahující na 1 mg peptidu ASNENMETM 75 mikrogramů fpLys. Vakcína byla podána jednorázovou injekcí svrchu uvedeným způsobem, přičemž pro jedno zvíře bylo užito 100 mikrogramů peptidu a 7,5 mikrogramů fpLys. Kontrolní skupině bylo podáno pouze 100 mikrogramů samotného peptidu v PBS nebo nebyl zvířatům podán žádný peptid.

Buňky myšího lymfomu RMA-S byly inkubovány přes noc v prostředí, prostém séra při teplotě 26 °C spolu s 10 mikrogramy/ml peptidu ASNENMETM.

Deset dnů po vakcinaci byly z očkovaných zvířat izolovány slezinné buňky, tyto buňky byly smíseny v poměru 5 : 1 s buňkami RMA-Sm do nichž byl zaveden peptid a směs byla pět dnů dále pěstována podle publikace Stuber G. a další, 1994 svrchu. Byl stanoven počet přežívajících efektorových slezinných buněk v různých kulturách, načež byly buňky pro stanovení CTL-aktivity pomocí standardu pro uvolnění Europolia podle svrchu uvedené publikace Blomberg a další, 1993 smíseny v různých poměrech s buňkami RMA-S, předem smísenými s peptidem ASNENMETM a s chelátem Europolia. Jak je zřejmé z obr. 10, bylo v tomto pokusu dosaženo specifické imunity pouze při vakcinaci peptidem spolu s fpLys, avšak nikoliv v případě, že byl podán pouze peptid.

Příklad 9

Zkoušky s různými bazickými polyaminokyselinami na jejich schopnost zesílit internalizaci a/nebo vazbu peptidů na APC

Při tomto pokusu byla použita fluorescenční zkouška. Modelový peptidový antigen se sekvencí LFEAIEGFI (MNH po restrikci Kd) se označí fluorescenčním barvivem, fluoresceinisothio- kyanátem FITC podle návodu výrobce (Molecular Probes). Příjem nebo vazba samotného peptidu, značeného FITC nebo peptidu spolu s různými koncentracemi bazických aminokyselin, a to polylysinu s délkou řetězce 16 až 490, polyargininu s délkou řetězce 15 až 720 byl měřen průtokovou cytometrií při použití buněčné linie P388D1 monocytů a makrofágů po restrikci MHC Kd. K tomuto účelu bylo inkubováno 1×10^6 buněk P388D1 v konečném objemu 1 ml prostředí DMEM s 10 % FCS ve zkumavkách pro odstředivku spolu s 5 mikrogramy peptidu,

značeného FITC nebo se směsí peptidu a polyaminokyseliny 30 minut při teplotě 37 °C, pak byl buněčný materiál důkladně promyt k odstranění volného peptidu. Polyaminokyseliny byly přidávány v množství 50, 25, 12, 6 a 3 mikrogramy/ml prostředí, obsahujícího 5 mikrogramů peptidu, značeného FITC. Relativní intenzita fluorescence různých vzorků byla srovnávána ke stanovení účinnosti příjmu a/nebo vazby peptidu. Výsledky tohoto pokusu jsou shrnuty na obr. 11. Všechny pokusy byly provedeny s 25 mikrogramy pL450 nebo pArg450. Za uvedených podmínek byl polyarginin přibližně 5x účinnější než polylysin.

10 Příklad 10

Sledování mechanismu jímž jsou peptidy přijímány APC

Peptidy mohou být přijímány APC specifickými mechanismy, jako jsou makropinocytóza nebo endocytóza, zprostředkovaná přes receptory podle publikace Lanzavecchia A., 1996, Curr. Opin. Immunol., 8, 348 až 354. Alternativní mechanismus může spočívat v tom, že polyaminokyseliny učiní buněčnou membránu propustnou a tím umožní difuzi peptidů z prostředí do cytoplazmy.

a) Sledování, zda došlo ke zvýšení permeability buněčné membrány, bylo provedeno tak, že bylo měřeno uvolnění cytoplazmatického enzymu laktátdehydrogenázy LDH po inkubaci buněk P388D1 s polyaminokyselinami polylysinem nebo polyargininem v isotonickém prostředí při použití běžně dodávaného zkušebního balíčku Cytotox 96, (Promega, Madison, Wisconsin, USA) podle návodu výrobce. Z výsledků, znázorněných na obr. 12a je zřejmé, že účinek pLys spočívá v tom, že se buněčná membrána stává propustnou, což se projevuje vysokými koncentracemi cytoplazmatického enzymu, uvolněného v isotonickém prostředí. Naproti tomu nebylo po použití pArg možno prokázat prakticky žádnou LDH, jak je zřejmé z obr. 12b. Při srovnávání vzorků, zpracovaných pouze působením aminokyselin nebylo možno pozorovat ve srovnání s působením polylysinu nebo polyargininu spolu s peptidem žádný rozdíl v uvolnění LDH. Po inkubaci se samotným peptidem nebylo možno prokázat žádnou měřitelnou účinnost LDH.

b) Způsobem podle publikace Midoux P. a další, 1993, NATO ASI Series H67, 49 až 64, bylo sledováno, zda v přítomnosti nebo nepřítomnosti bazických polyaminokyselin dochází k internalizaci peptidů, značených FITC. Částice, internalizované buňkami byly transportovány do endosomů. Na rozdíl od cytoplazmy nebo buněčného prostředí s neutrálním pH mají tyto organelly kyselé pH 5. Fluorescence, vysílaná FITC je velmi závislá na pH. Při podmínkách pH v endosomech je fluorescence potlačena. Z tohoto důvodu vykazují peptidy, značené FITC po transportu do endosomů sníženou fluorescenci. Přidáním monensinu je nízká hodnota pH v endosomech neutralizována, což vede k měřitelnému zesílení fluorescence internalizovaného peptidu značeného FITC.

Buňky byly inkubovány se směsí polyargininu s průměrnou molekulovou hmotností 100 000 a délkou řetězce 490 a peptidu, značeného fluorescencí při teplotě 4 °C nebo 37 °C. Podíl vzorku, inkubovaného při 37 °C byl uchován a před analýzou průtokovou cytometrií byl při teplotě 4 °C smísen s 50 mikroM monensinu.

Bylo možno prokázat, že inkubace APC s některými bazickými polyaminokyselinami, jako polylysinem pLys a polyargininem pArg zesiluje příjem nebo vazbu peptidů na APC.

Jak je zřejmé z obr. 13, bylo možno pozorovat v buňkách, zpracovaných pouze pomocí peptidů nebo monensinu jen malý vzestup fluorescence. Naproti tomu došlo k zesílení fluorescenčních signálů ve vzorcích, které byly zpracovány působením monensinu a směsí polyargininu a peptidu. Žádný příjem peptidu nebylo možno pozorovat při inkubaci vzorků při teplotě 4 °C. Podstatný vzestup fluorescence po působení monensinu ukazuje na to, že se po působení pArg peptidy hromadí ve vesikulách uvnitř buněk, jak je zřejmé z obr. 13 a jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Midoux a další, 1993. Jak bylo možno očekávat, došlo po zpracování vzorků

s polylysinem působením monensinu jen k malému vzestupu fluorescence. Při zavedení polylysinu při teplotě 4 °C došlo k měřitelnému vzestupu fluorescence, což je dalším důkazem toho, že polylysin působí zvýšením propustnosti buněčné membrány, jak je zřejmé také z obr. 12b.

5

Příklad 11

Pokusy se zavedením krátkých peptidů do buněk APC

- 10 Buňky APC z kostní dřeně, získané tak, že u nich dochází k sekreci GM-CSF byly sledovány při použití kombinace fluorescenčně značeného peptidu s polylysinem pL200 (Sigma) nebo při použití samotného peptidu pomocí fluorescenční mikroskopie. Pro mikroskopické sledování příjmu peptidu byly buňky APC nanесeny na podložní misku a inkubovány se 40 mikrogramy peptidu LFESIEGFI, značeného fluoresceinem nebo s 50 mikrogramy/ml polylysinu pL200 a 40 mikrogramy/ml peptidu LFEAIEGFI 30 minut při teplotě 37 °C. Po důkladném promytí byl buněčný
- 15 materiál fixován 4% p-formaldehydem, překryt prostředkem anti-Fadent (Dako, Glostrup, Dánsko) a pak byl buněčný materiál sledován pomocí fluorescenčního mikroskopu (Zeiss). Jádra byla kontrastně zbarvena 4,4-diaminodino-2-fenylindolem, DAPI (Sigma). Jak je zřejmé z fluorescenčních mikrofotografií na obr. 14, dochází u buněk, které byly inkubovány s peptidem
- 20 a polylysinem, to znamená u buněk A, ve srovnání s buňkami B, které byly inkubovány pouze s peptidem, k podstatně vyššímu příjmu peptidu. Fluorescence je pozorovatelná u buněk, inkubovaných pouze s peptidem jen částečně a jen u některých buněk, zatímco v případě buněk, inkubovaných s peptidem v přítomnosti polylysinu je možno pozorovat intenzivní fluorescenci, která se
- 25 rovnoměrně projevuje u všech buněk.

25

Příklad 12

Kvantitativní stanovení příjmu peptidu do buněk pomocí průtokové cytometrie

30

- a) Na základě pokusů z příkladu 11 bylo prokázáno, že buňky APC jsou vhodnými cílovými buňkami pro příjem malých peptidů. Pak byly in vitro provedeny pokusy FACS k identifikaci vhodných pomocných prostředků pro vakcíny s obsahem peptidu. Tyto zkoušky dovolují rychlé kvantitativní stanovení fluorescenčně značených peptidů. Jako modelový peptid byl použit peptid
- 35 se sekvencí LFEAIEGFI. V těchto pokusech byla jako buňky ATC použita myší buněčná linie P388D1. 1×10^6 buněk bylo inkubováno ve výsledném objemu 1 ml prostředí DMEM s vysokým obsahem glukózy a 10 % FCS 30 minut při 37 °C s 5 mikrogramy peptidu při konečné koncentraci fluoresceinu 5 nmol/ml. Buněčný materiál byl zpracován samotným peptidem nebo kombinací peptidu a polykationtů nebo kombinací peptidu a histonů při stoupající koncentraci 3 až
- 40 50 mikrogramů/ml, jak je uvedeno na obr. 15. Byly použity následující sloučeniny: A: polyornithin se střední molekulovou hmotností 110 000 a délkou řetězce 580, B: histon, bohatý na arginin, C: histon, bohatý na lysin, D: polyarginin se střední molekulovou hmotností 100 000 a délkou řetězce 490 a E: polylysin se střední molekulovou hmotností 94 000 a délkou řetězce 450. V předběžných pokusech bylo zjištěno, že k maximálnímu příjmu peptidu dochází
- 45 při době inkubace 30 minut. Při delším působení 4 až 8 hodin již nedochází k žádnému podstatnému zvýšení fluorescenčního signálu. Před analýzou byl buněčný materiál 5x promyt velkým objem PBS s obsahem 0,2 % BSA. Pak byl buněčný materiál přenesen do 1 ml PBS s 0,2 % BSA po zchlazení ledem, měření bylo prováděno průtokovou cytometrií při použití přístroje FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

50

Bylo prokázáno, že nejúčinnějšími pomocnými prostředky jsou polyarginin a polylysin. Polyornithin měl za zvolených podmínek cytotoxický účinek. Zesílení příjmu peptidu působením polyargininu a polylysinu je v korelaci s koncentrací, jak je zřejmé z obr. 15d a 15e, příjem také stoupá s délkou řetězce, jak je zřejmé z obr. 16.

55

Bylo pozorováno, že polyarginin má širší vhodnou oblast koncentrace pro zvýšení až o 3 desetinásobky oproti polylysinu, u něž bylo možno dosáhnout maximálního zvýšení o méně než dvacetinásobek. Mimoto bylo pozorováno, že polyarginin je při všech použitých délkách řetězce pro transport bílkovin účinnější než polylysin, jak je zřejmé z obr. 16. Polyarginin umožní účinný transport i při velmi nízkých koncentracích, jako 3 mikrogramy/ml, zatímco v případě polylysinu je nutno použít koncentraci vyšší než 25 mikrogramů/ml k dosažení podstatného zvýšení fluorescence, jak je možno pozorovat na obr. 15d a 15e.

b) Aby bylo možno stanovit, zda existuje pro transport peptidů spodní hranice délky řetězce, byly syntetizovány polyargininy s různou délkou řetězce 10 až 30 zbytků a tyto látky pak byly podrobeny zkouškám na schopnost zvýšit transport peptidů při vysokých koncentracích polykationtů, jak je znázorněno na obr. 17. Pro tyto pokusy byl použit peptid se sekvencí LFEAIEGFI, zkoumané polymery polyargininu byly použity v koncentraci 100 mikrogramů/ml.

Zesílení transportu peptidů bylo možno pozorovat již při použití nejkratšího sledovaného polyargininu, i když toto zvýšení bylo poměrně malé.

c) Bazické aminokyseliny jsou molekuly s kladným nábojem. Je tedy možno předpokládat, že se negativně nabitě peptidy mohou na tyto polykationty vázat elektrostaticky, což může vést ke zvýšenému příjmu peptidů. Aby bylo možno tento předpoklad potvrdit, byla srovnávána schopnost kationtových polyaminokyselin, zesílit příjem krátkých peptidů buňkami P388D1 v závislosti na jejich náboji. V následující tabulce jsou shrnuty použité peptidy s negativním nábojem, které jinak splňují všechny podmínky pro vazbu MHC-I podle svrchu uvedené publikace Rammensee a další, 1995. Peptid 1 je odvozen od myší bílkoviny, příbuzné tyrosináze, TRP. Peptid 2 je odvozen od hemagglutininu chřipkového viru podle svrchu uvedené publikace Schmidt a další, 1996. Peptid 3 je odvozen od myší tyrosinázy, peptid 4 od nádorového antigenu P198 a peptid 5 od beta-galaktosidázy (Gavin a další, 1993). „Mr“ znamená rozsah molekulové hmotnosti, „fluor“ znamená fluorescein.

Tabulka

sekvence	Mr	Mr fluor	náboj	náboj + fluor
YAEDYEEL	1031	1389	4x negativní	6x negativní
LFEAIEGFI	1038	1396	2x negativní	4x negativní
IFMNGTMSQV	1127	1485	neutrální	2x negativní
KYQAVTTTL	1024	1382	1x pozitivní	1x negativní
TPHPARIGL	961	1319	2x pozitivní	neutrální

Při značení peptidu fluoresceinem dochází k zavedení dvou negativních nábojů. Ukázalo se, že po inkubaci s polyargininem byly peptidy v množství 5 nmol na vzorek transportovány v nejvyšší míře do buněk P388D1, což ukazuje na iontovou výměnu mezi peptidem a polykationtem a na jejich další zvýšení v průběhu transportu peptidu do buněk, jak je zřejmé z obr. 18. Ve srovnání s buňkami, které byly uvedeny do styku pouze s peptidem, došlo však v případě neutrálních peptidů v přítomnosti polykationtů rovněž k příjmu vyššího množství. Působení samotného peptidu poskytuje u všech zkoumaných peptidů přibližně identické fluorescenční signály. Z tohoto důvodu je na obr. 18 pod názvem „samotný peptid“ uveden výsledek, to znamená fluorescenční signál, který byl získán při použití peptidu se sekvencí LFEAIEGFI.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Farmaceutický prostředek, obsahující nejméně jeden peptid, bílkovinu nebo fragment bílkoviny s imunomodulačním účinkem spolu s pomocným prostředkem, **vyznačující se tím**, že jako pomocný prostředek obsahuje prostředek se schopností zvýšit vazbu peptidu, proteinu nebo jeho fragmentu na buňky organismu příjemce nebo vstup těchto materiálů do uvedených buněk a se schopností zvýšit imunomodulační účinnost peptidu, proteinu nebo jeho fragmentu.
- 10 2. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že jako peptid obsahuje produkt buněčného odbourávání bílkoviny nebo bílkovinného fragmentu jako ligand pro nejméně 1 molekulu MHC, k jejíž expresi dochází v organismu příjemce.
- 15 3. Farmaceutický prostředek podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že peptid nebo produkt buněčného odbourávání bílkovin nebo jejich fragmentů je ligandem pro molekulu MHC-I.
- 20 4. Farmaceutický prostředek podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že peptid nebo produkt buněčného odbourávání bílkovin nebo jejich fragmentů je ligandem pro molekulu MHC-II.
- 25 5. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že obsahuje peptid odvozený od bílkoviny patogenního organismu.
- 30 6. Farmaceutický prostředek podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že obsahuje peptid, odvozený od bílkoviny bakterií.
- 35 7. Farmaceutický prostředek podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že obsahuje peptid, odvozený od virové bílkoviny.
- 40 8. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 1 až 4, pro použití jako vakcína proti nádorům, **vyznačující se tím**, že jako bílkovinu obsahuje nádorový antigen nebo bílkovinný fragment, peptid nebo peptidy, odvozené od nádorových antigenů.
- 45 9. Farmaceutický prostředek podle nároku 8, určený pro léčebné použití, **vyznačující se tím**, že nádorový antigen nebo antigeny jsou odvozeny od nádorových antigenů, k jejichž expresi dochází v organismu příjemce.
- 50 10. Farmaceutický prostředek podle nároku 8, pro preventivní použití, **vyznačující se tím**, že obsahuje nádorové antigeny, které jsou odvozeny od často se vyskytujících nádorových antigenů.
- 55 11. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 8 až 10, **vyznačující se tím**, že jako nádorový antigen nebo nádorové antigeny obsahuje antigeny melanomu.
12. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 8 až 11, **vyznačující se tím**, že navíc obsahuje cytokin.
13. Farmaceutický prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že se obsažený cytokin volí ze skupiny IL-2, IL-4, IL-12, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-omega, TFN-alfa, GM-CSF nebo ze směsi těchto látek.

14. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 2 až 11, **vyznačující se tím**, že obsahuje větší množství peptidů, které se od sebe liší tím, že jsou schopné se vázat na různé podtypy MHC příjemce.
- 5 15. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 2 až 14, **vyznačující se tím**, že obsahuje jeden nebo větší množství peptidů, odvozených od přírodně se vyskytujících imunogenních bílkovin nebo nádorových antigenů nebo od produktu buněčného odbourávání těchto látek.
- 10 16. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 2 až 14, **vyznačující se tím**, že obsahuje jeden nebo větší počet peptidů, které jsou odlišné od peptidů, odvozených od přírodně se vyskytujících imunogenních bílkovin nebo nádorových antigenů nebo od produktu buněčného odbourávání těchto látek.
- 15 17. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje peptid, antagonistující peptid, odvozený od bílkoviny, vyvolávající autoimunitní onemocnění.
18. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 1 až 17, **vyznačující se tím**, že jako pomocný prostředek obsahuje organický polykation nebo směs organických polykationů.
- 20 19. Farmaceutický prostředek podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že obsahuje peptid, nesoucí negativní náboj.
- 25 20. Farmaceutický prostředek podle nároku 18 nebo 19, **vyznačující se tím**, že jako pomocný prostředek obsahuje bazickou polyaminokyselinu nebo směs bazických polyaminokyselin.
21. Farmaceutický prostředek podle nároku 20, **vyznačující se tím**, že jako pomocný prostředek obsahuje polyarginin.
- 30 22. Farmaceutický prostředek podle nároku 20, **vyznačující se tím**, že jako pomocný prostředek obsahuje polylysin.
23. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 18 až 21, **vyznačující se tím**, že pomocný prostředek je konjugován s buněčným ligandem.
- 35 24. Farmaceutický prostředek podle nároku 23, **vyznačující se tím**, že uvedeným ligandem je zbytek sacharidu.
- 40 25. Farmaceutický prostředek podle nároku 24, **vyznačující se tím**, že uvedeným ligandem je zbytek fukózy.
26. Farmaceutický prostředek podle nároku 23, **vyznačující se tím**, že uvedeným ligandem je transferrin.
- 45 27. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 18 až 26, **vyznačující se tím**, že navíc obsahuje DNA, prostou kódových sekvencí pro funkční bílkovinu.
28. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 18 až 26, **vyznačující se tím**, že navíc obsahuje DNA s kódovou sekvencí pro imunomodulační bílkovinu.
- 50 29. Farmaceutický prostředek podle nároku 28, **vyznačující se tím**, že obsahuje DNA s kódovou sekvencí pro cytokin ze skupiny IL-2, IL-4, IL-12, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, IFN-omega, TNF-alfa, GM-CSF.
- 55

30. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 1 až 29, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je upraven pro parenterální podání.
- 5 31. Farmaceutický prostředek podle nároku 30, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje roztok nebo suspenzi peptidu a pomocného prostředku ve farmaceuticky přijatelném nosiči.
32. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 1 až 29, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je upraven pro místní podání.
- 10 33. Farmaceutický prostředek podle nároku 32, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že má formu hydrogelu.

15

25 výkresů

Fig. 1

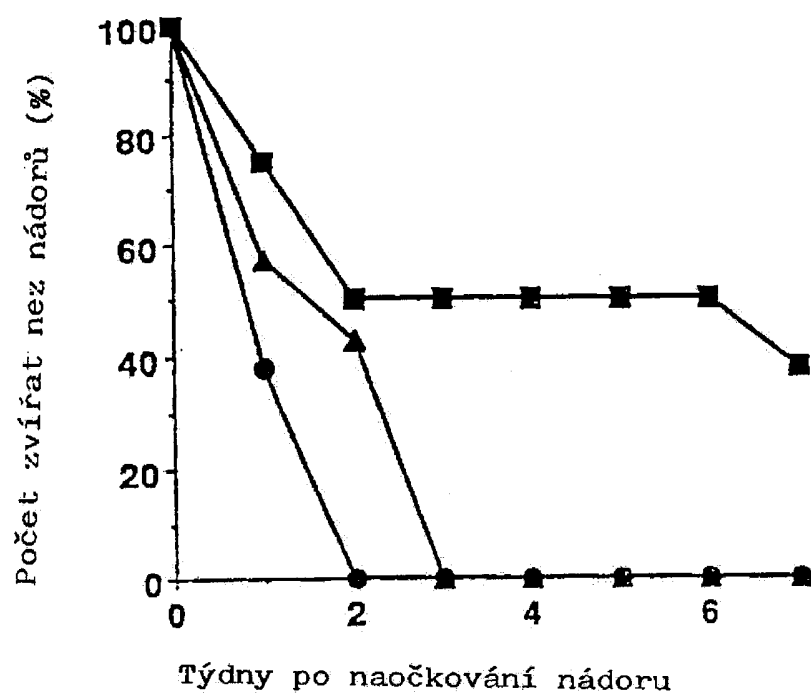


Fig. 2a

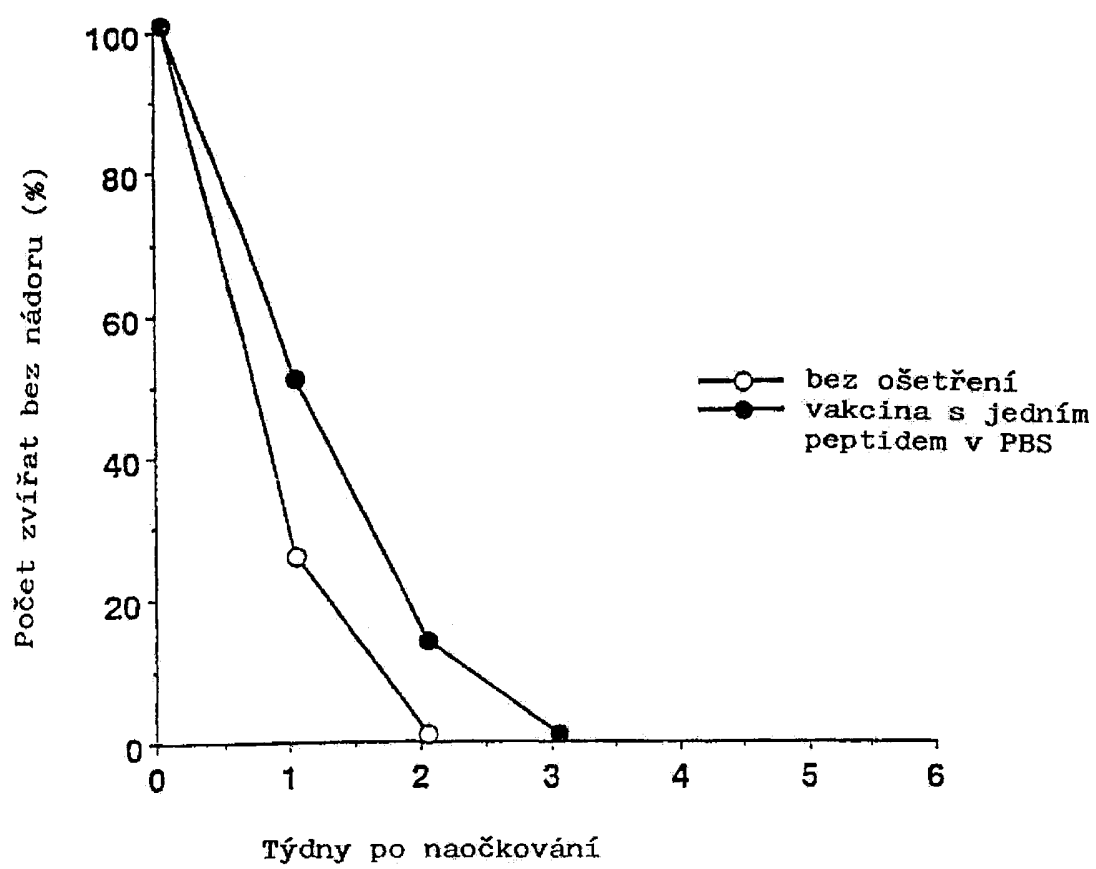


Fig. 2b

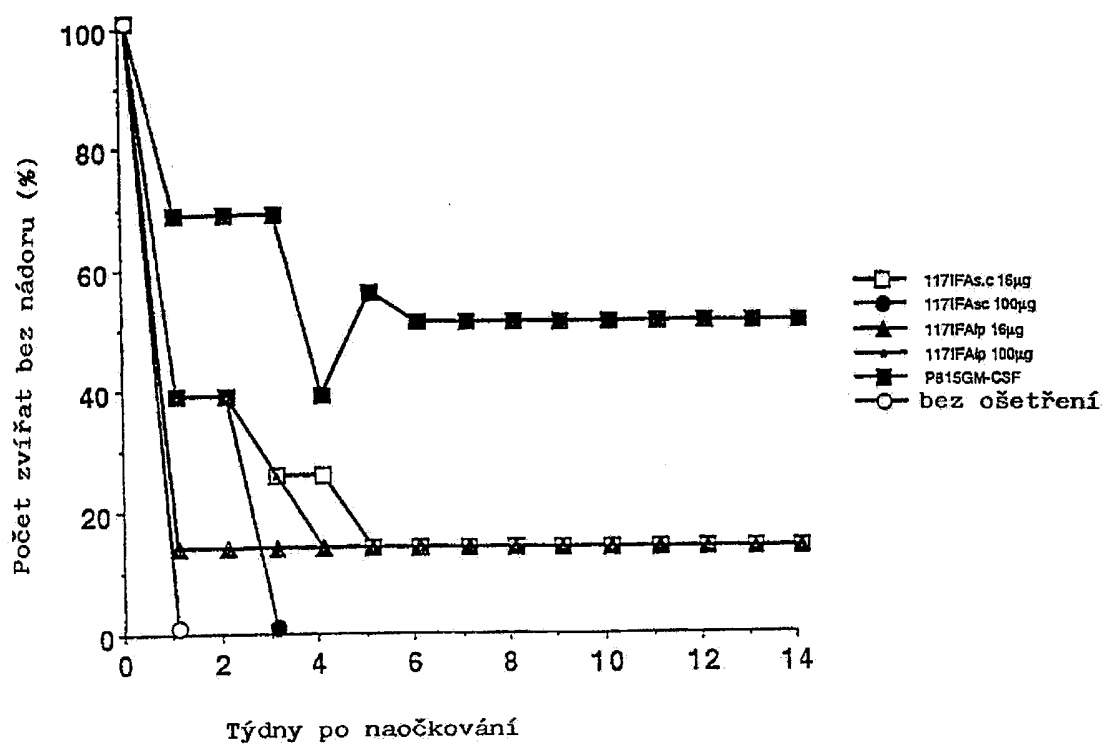


Fig. 2c

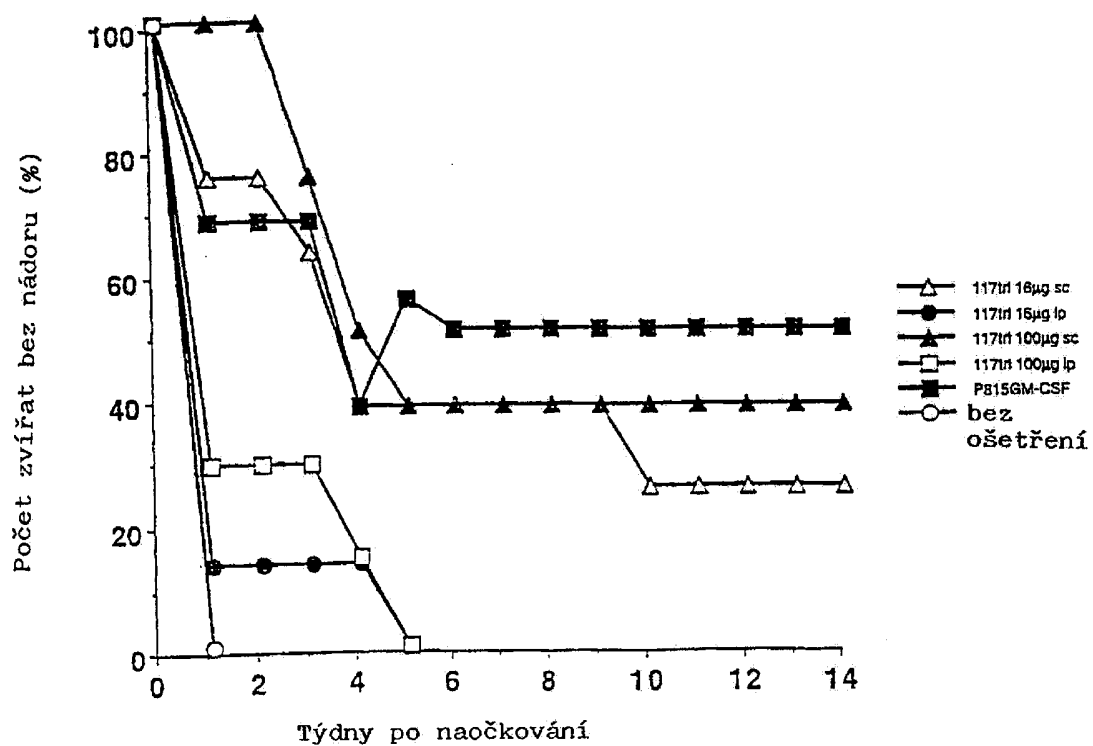


Fig. 3

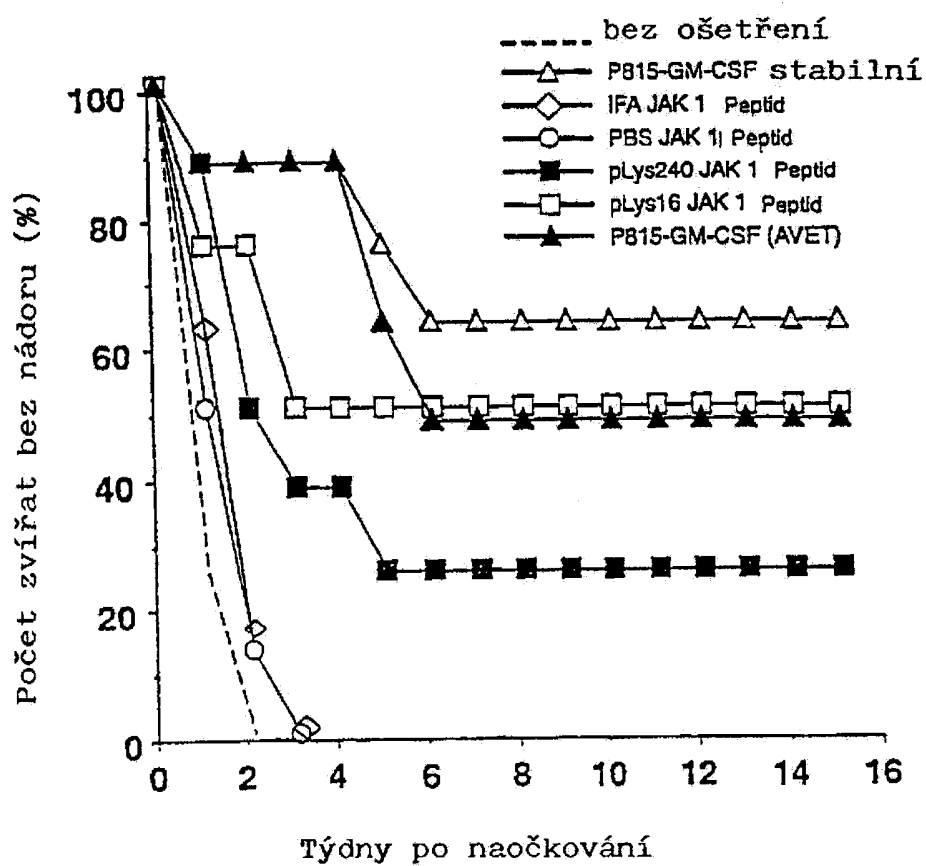


Fig. 4

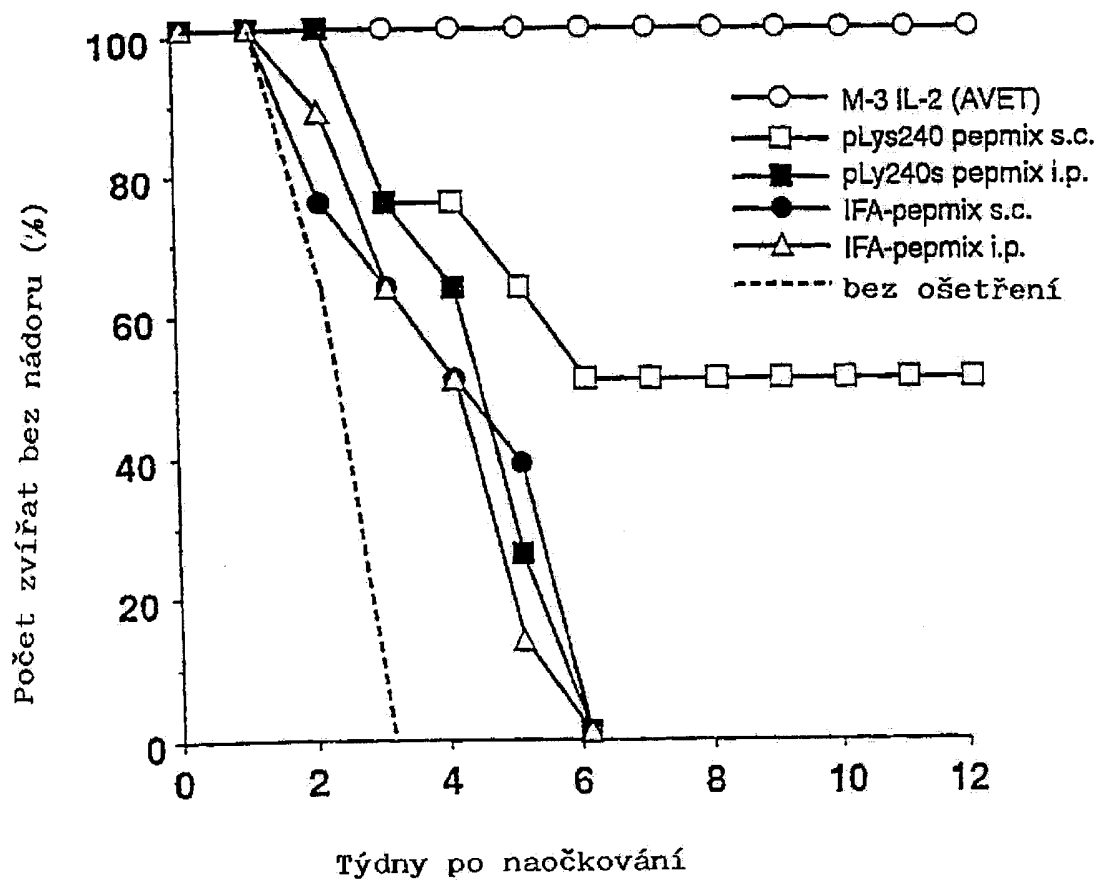


Fig. 5

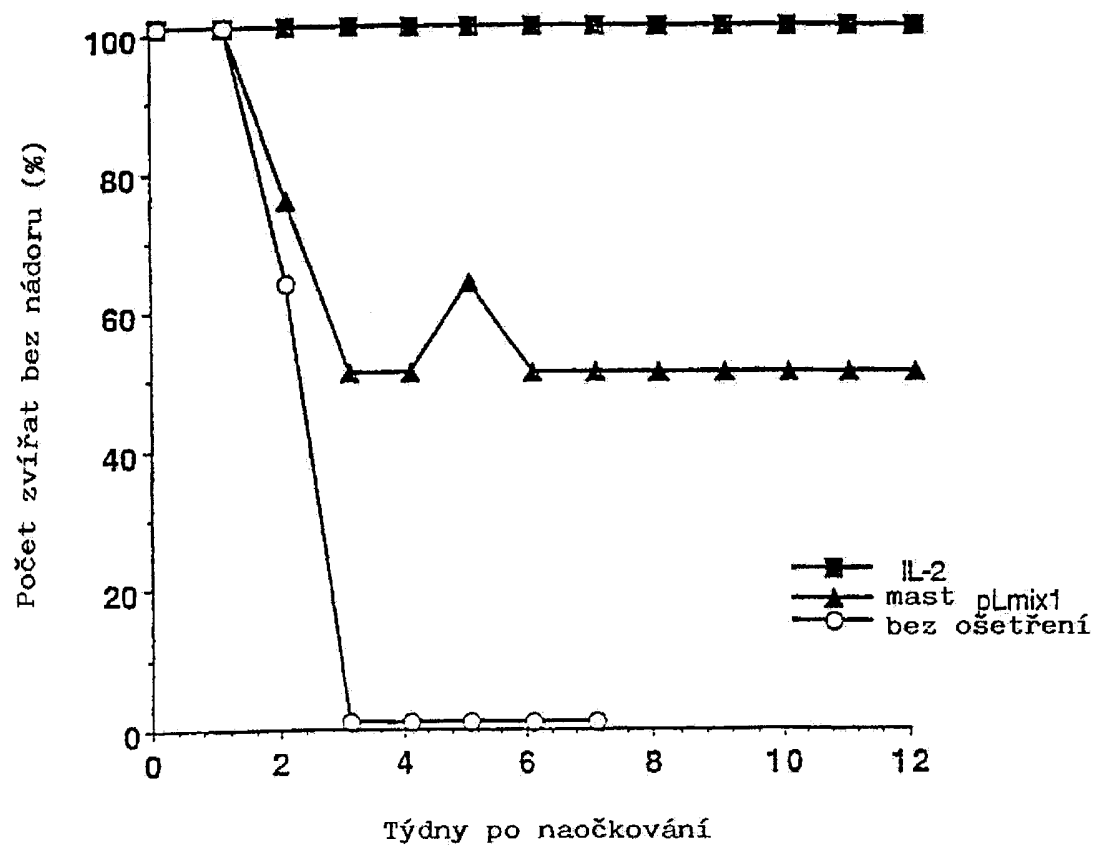


Fig. 6a

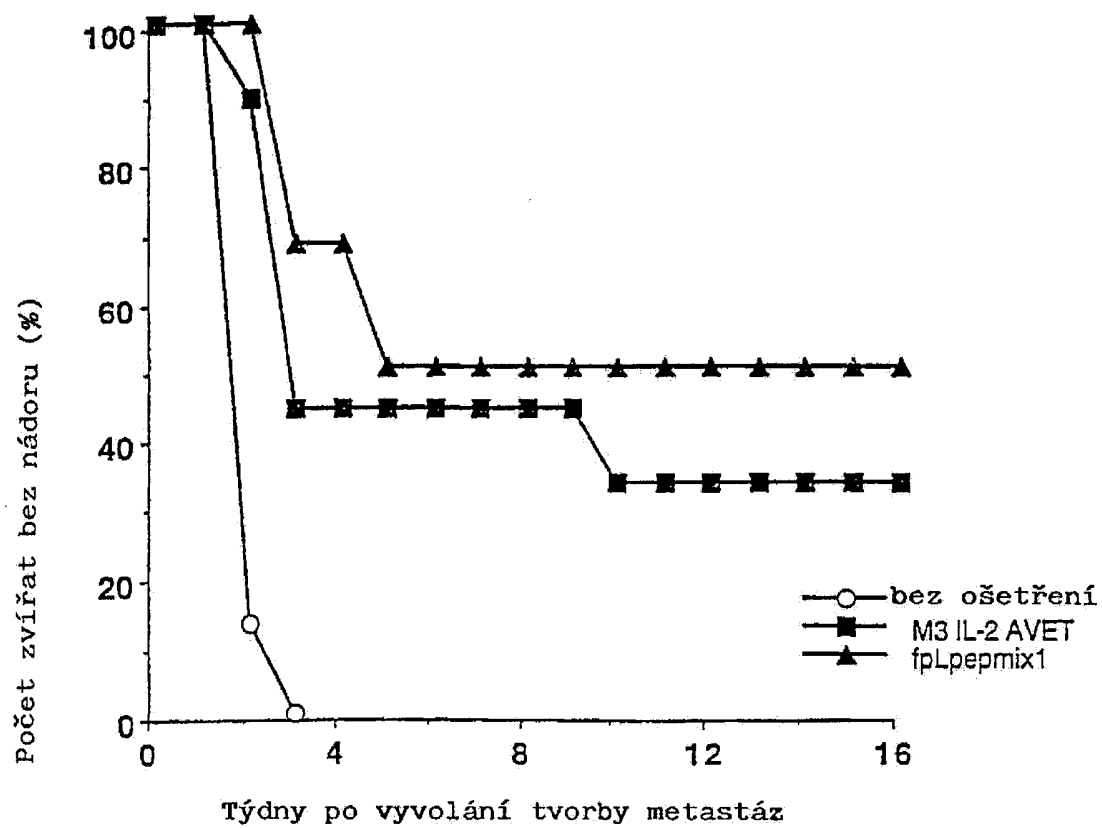


Fig. 6b

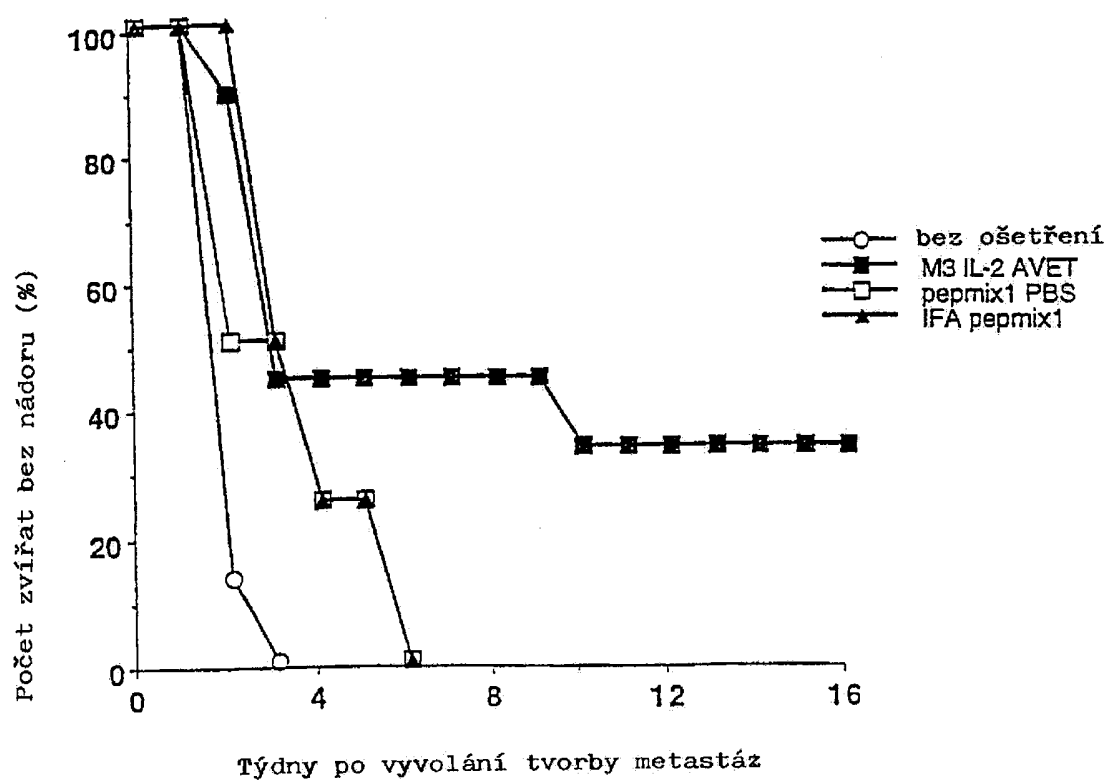


Fig. 7a

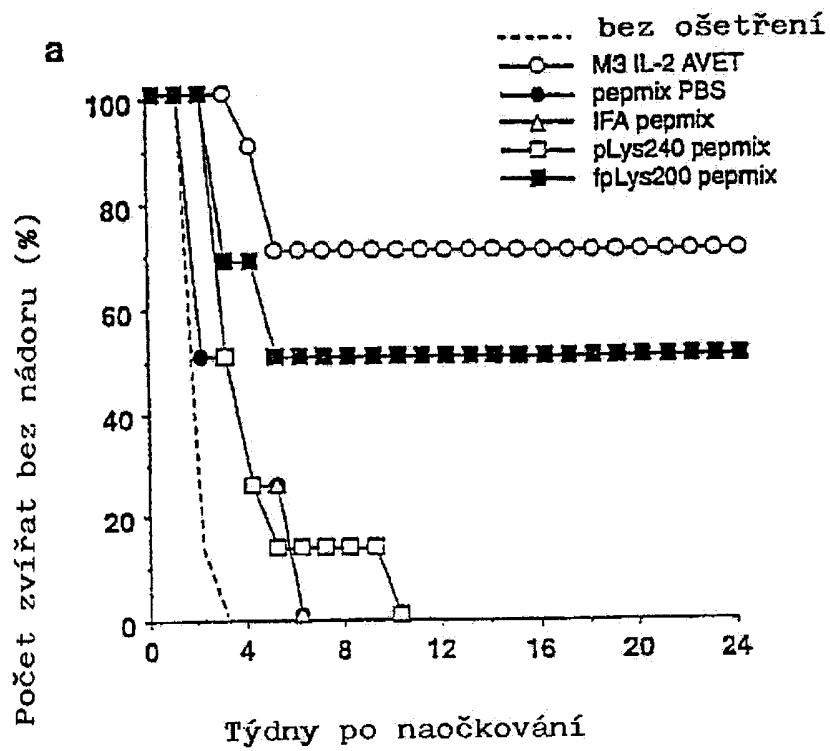


Fig. 7b

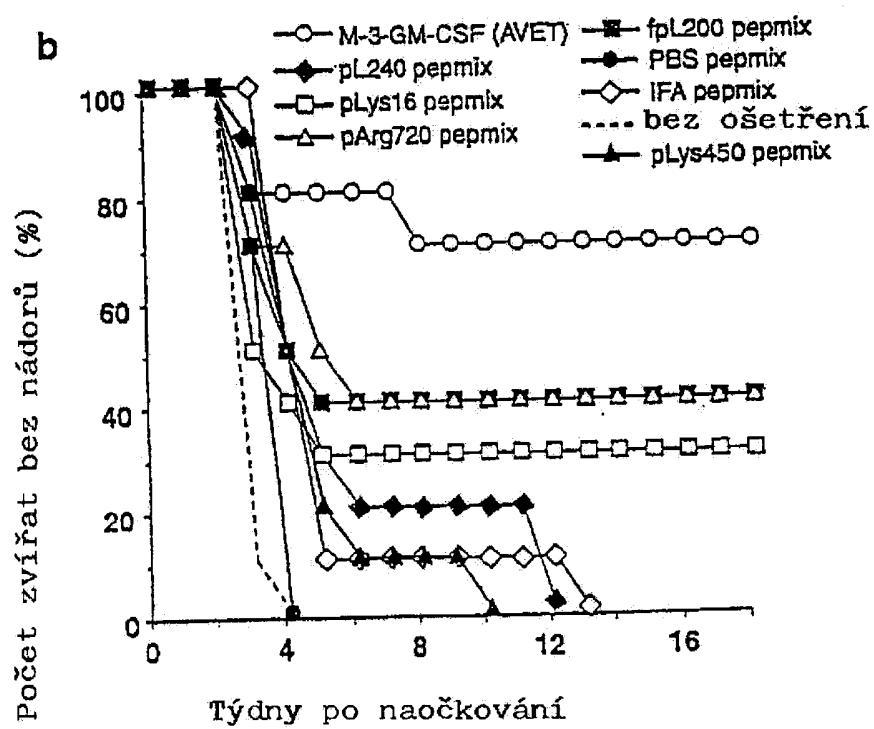


Fig. 7c

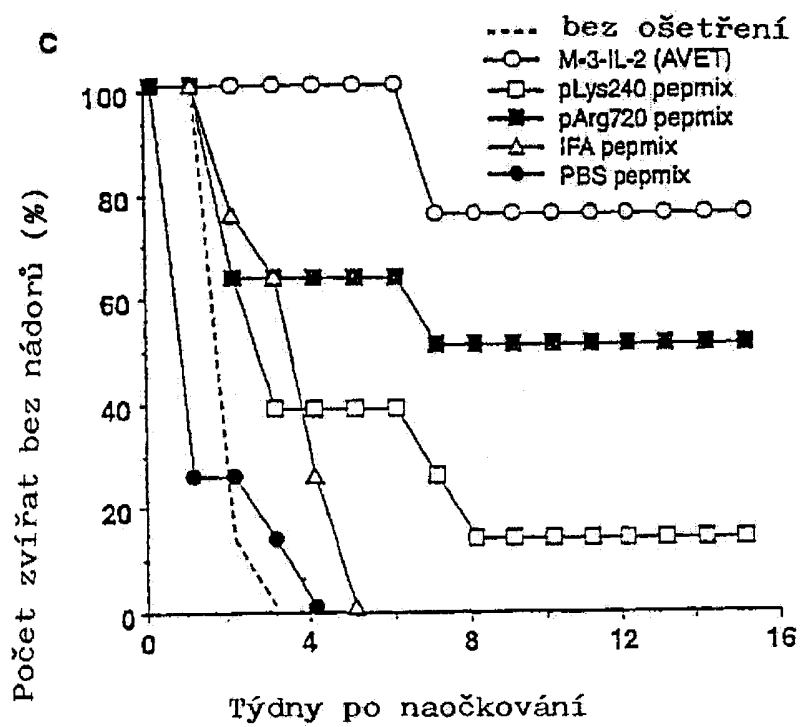


Fig. 8

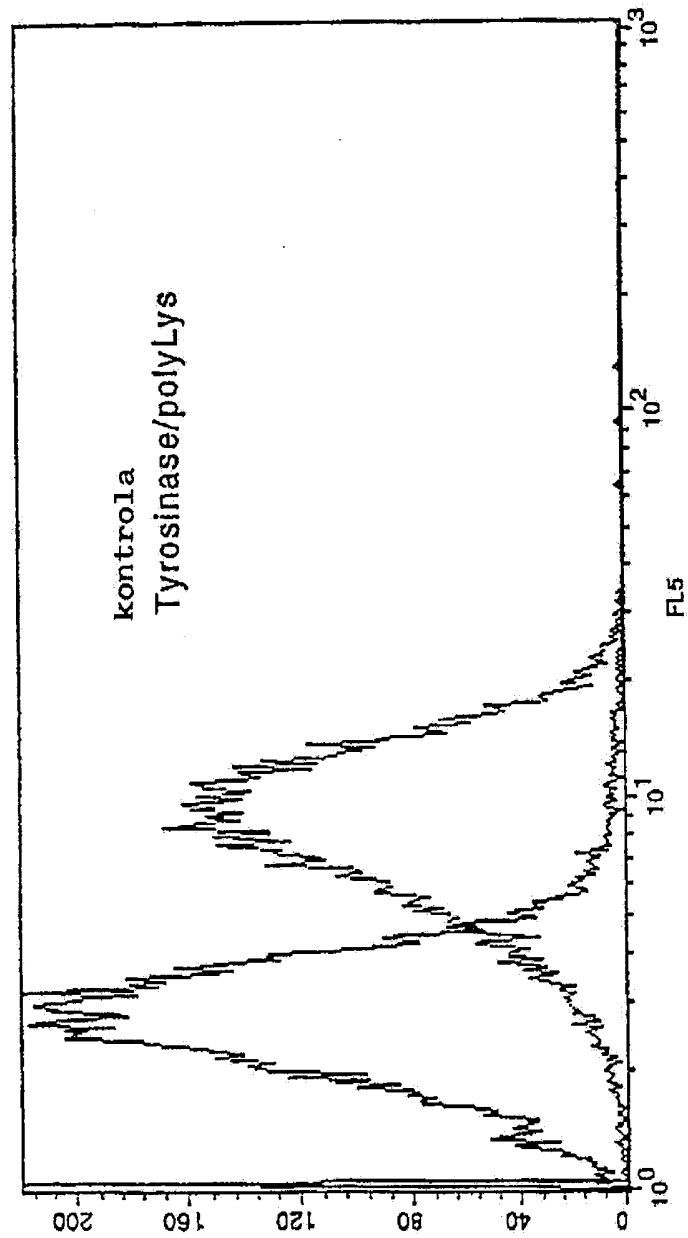


Fig. 9

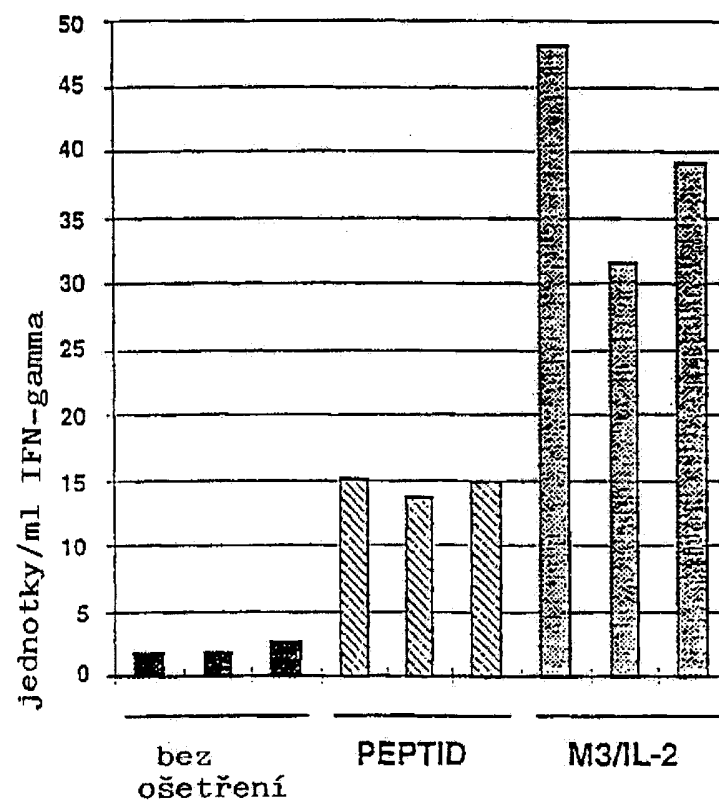


Fig. 10

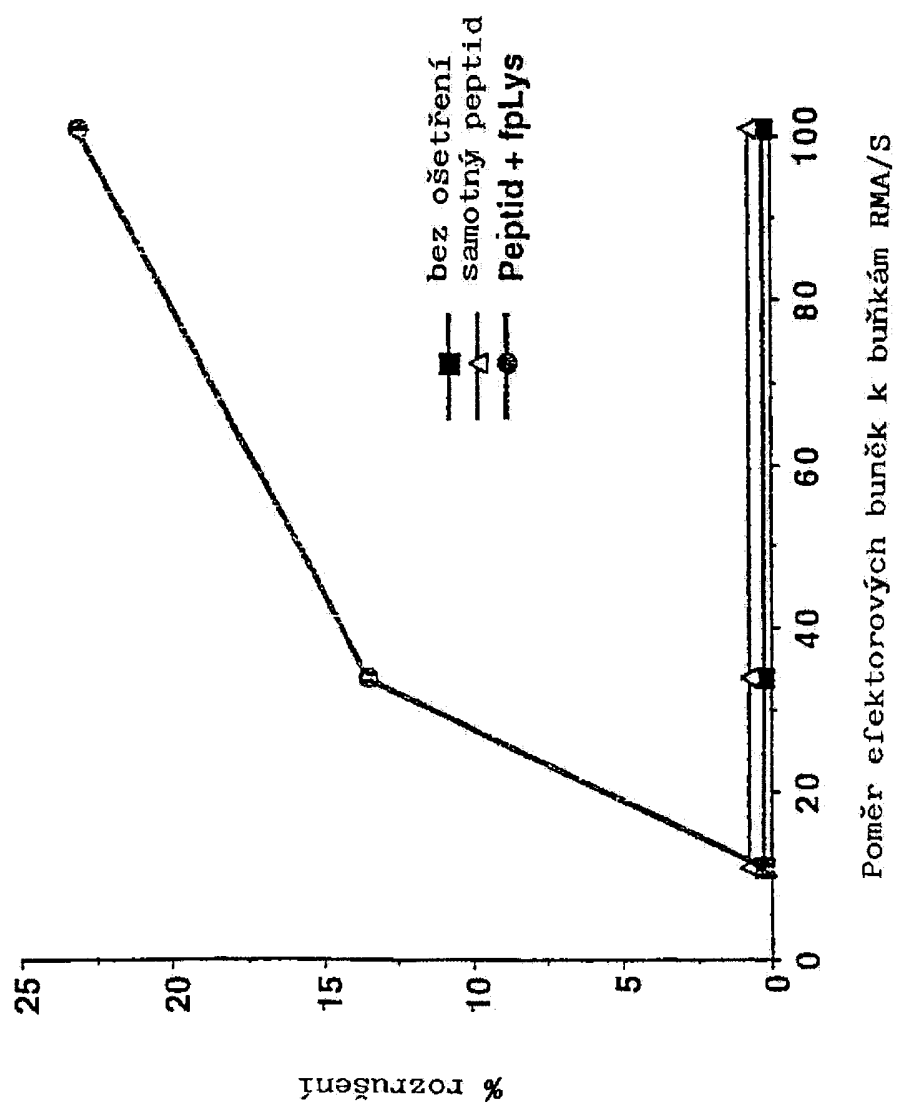


Fig. 11

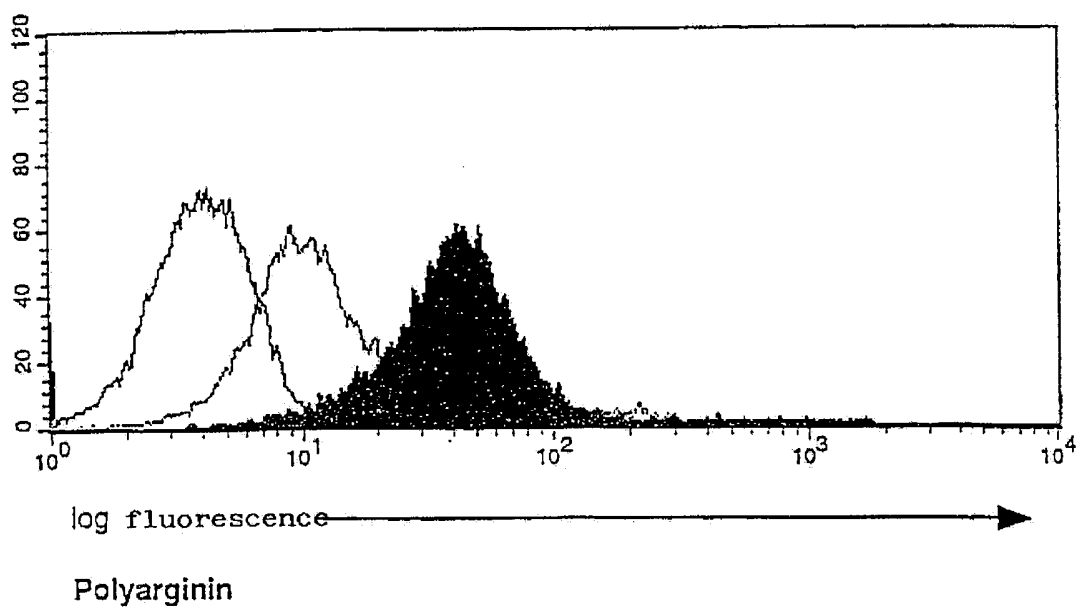
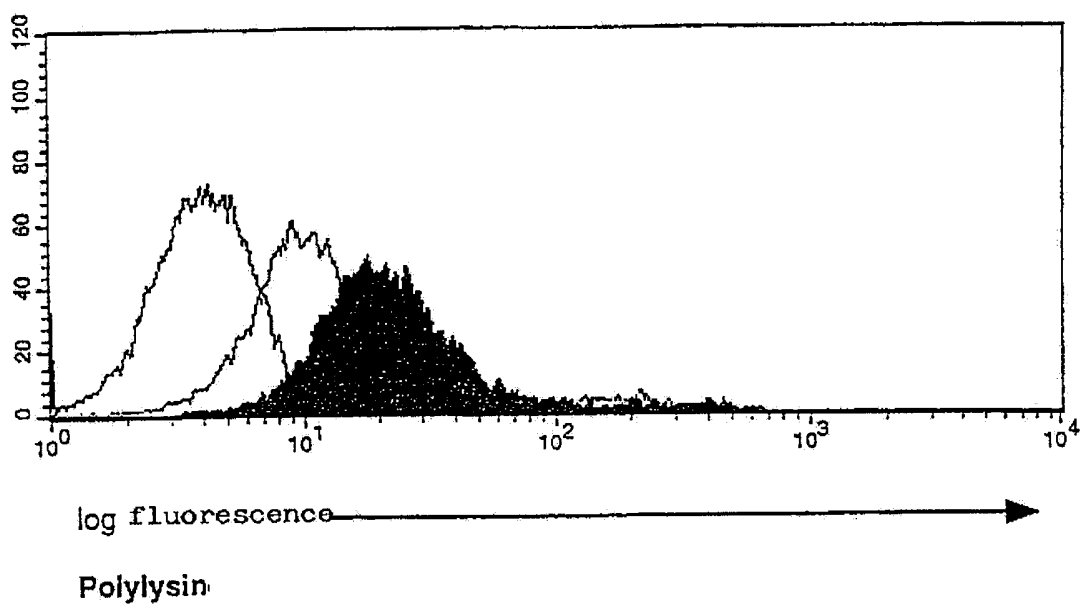


Fig. 12

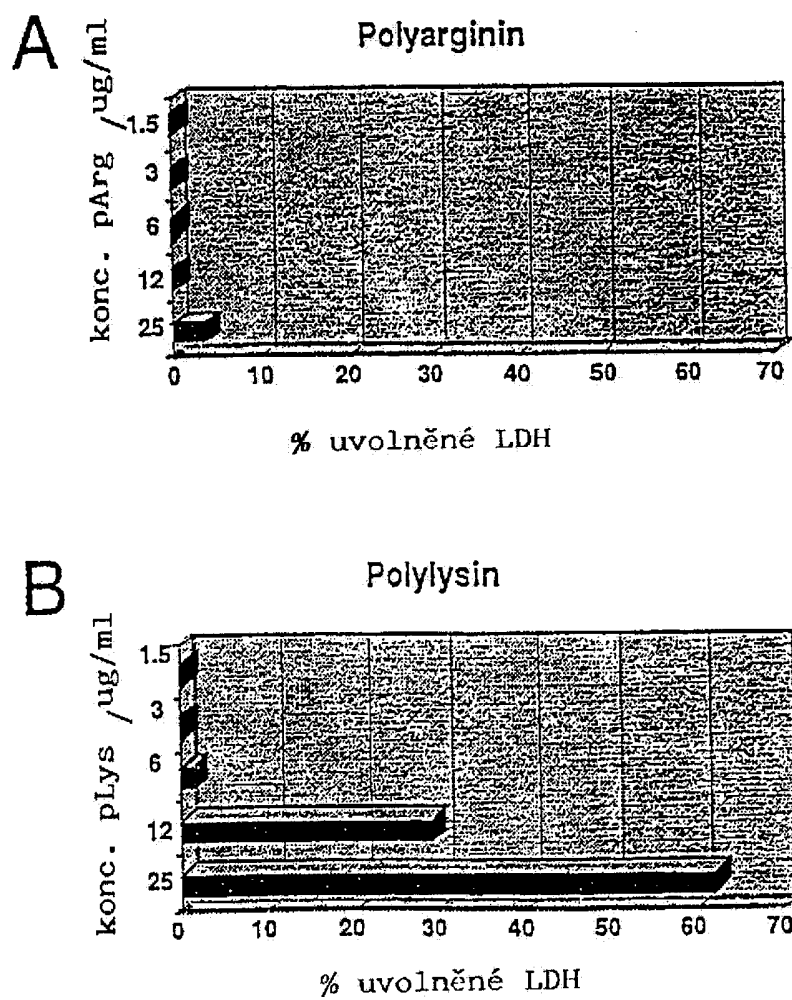


Fig. 13

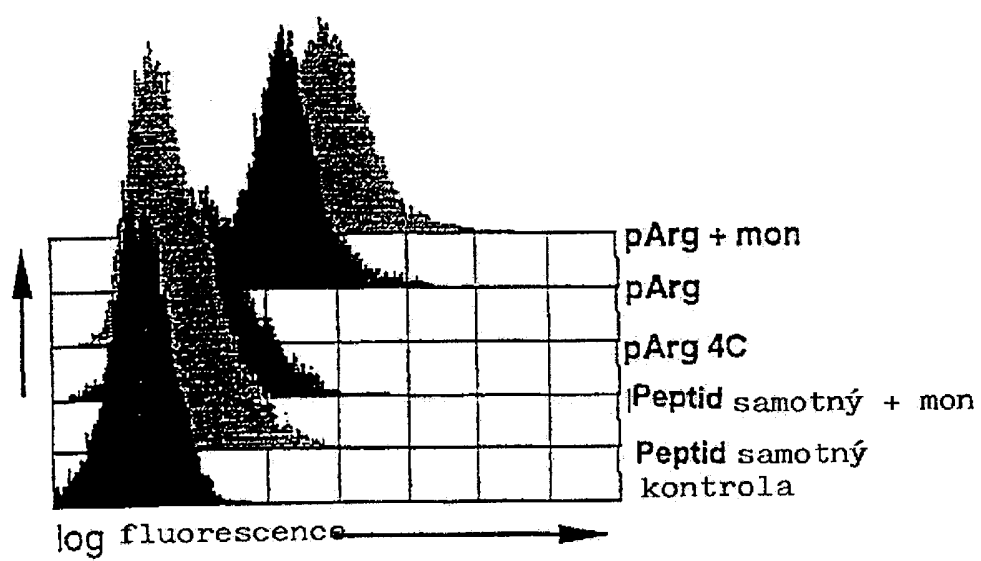


Fig. 14

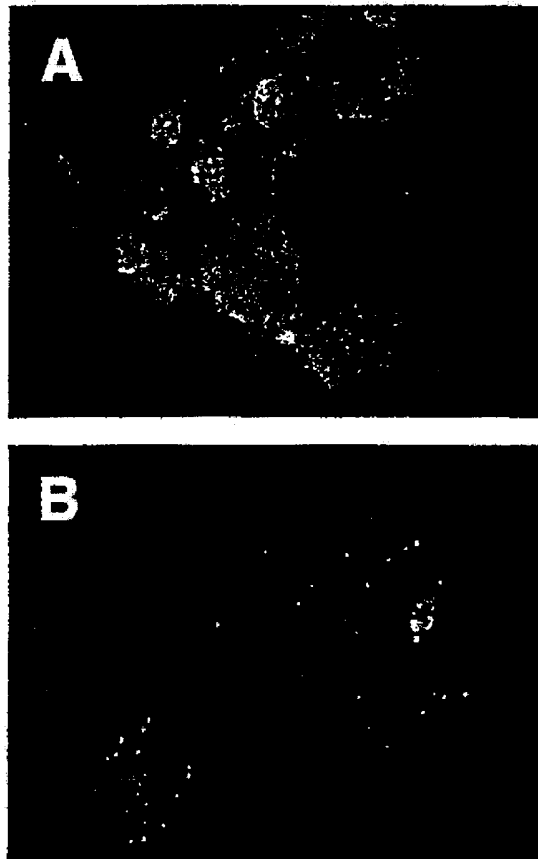


Fig. 15a

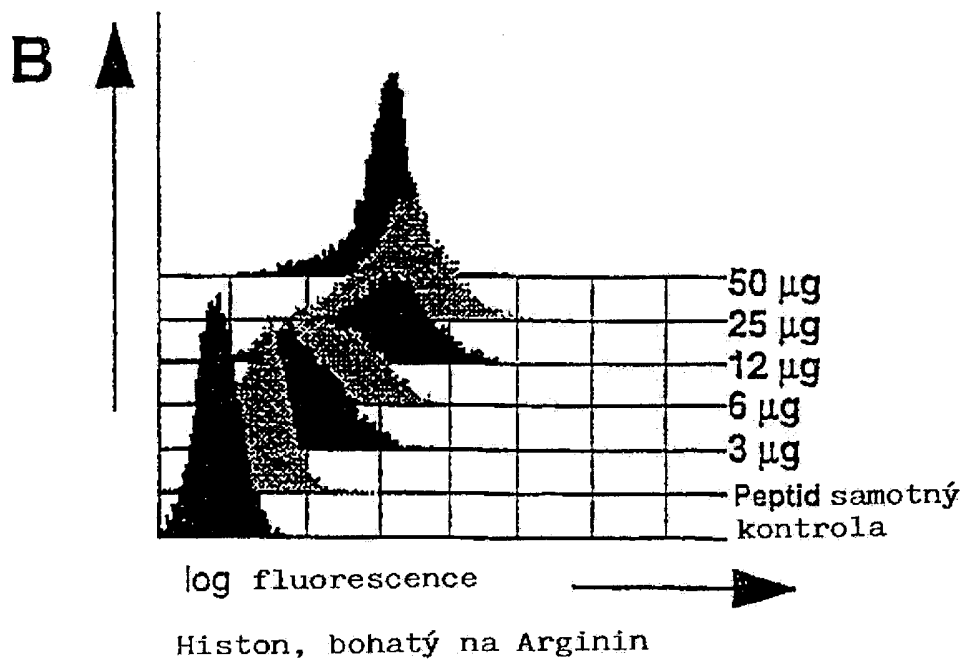
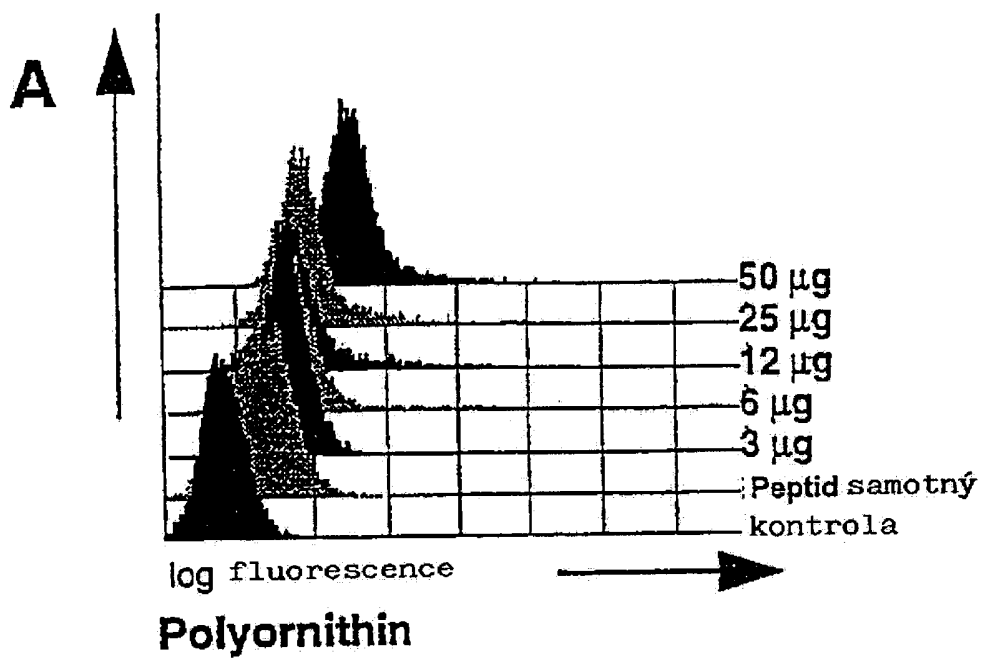


Fig. 15b

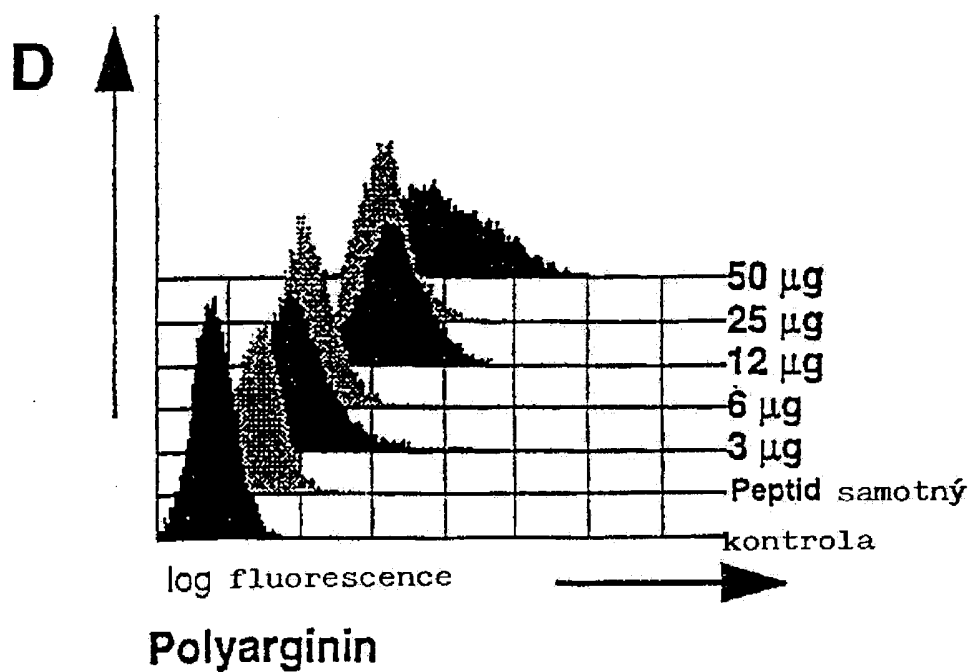
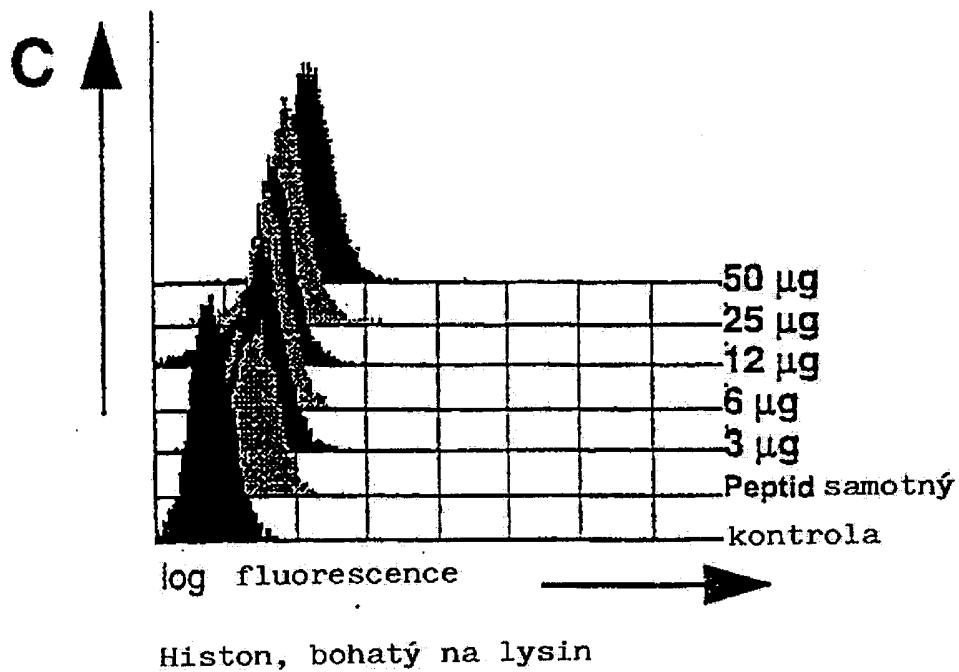


Fig. 15c

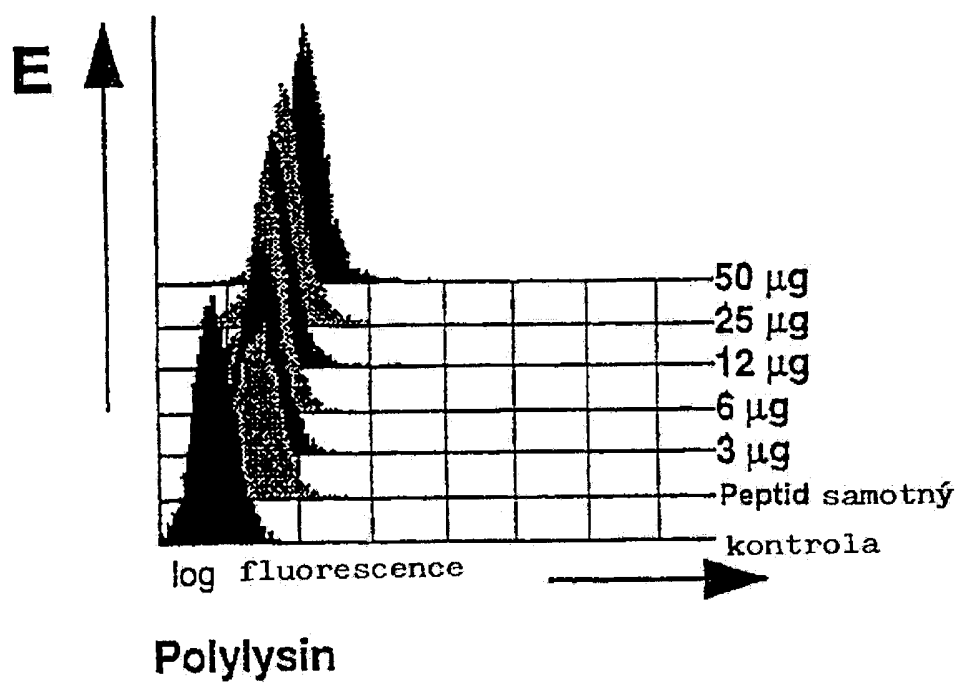


Fig. 16

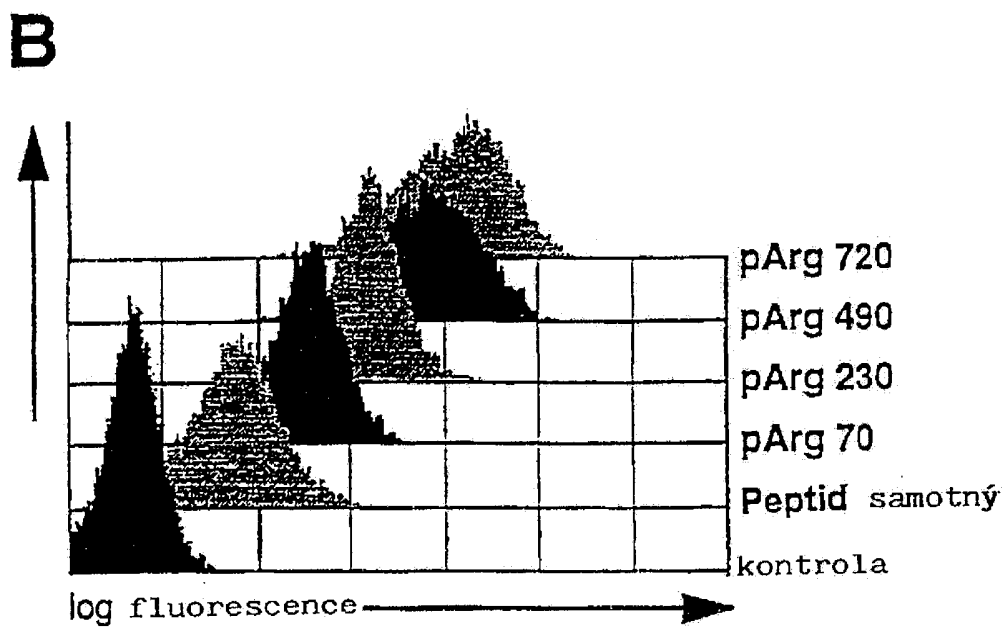
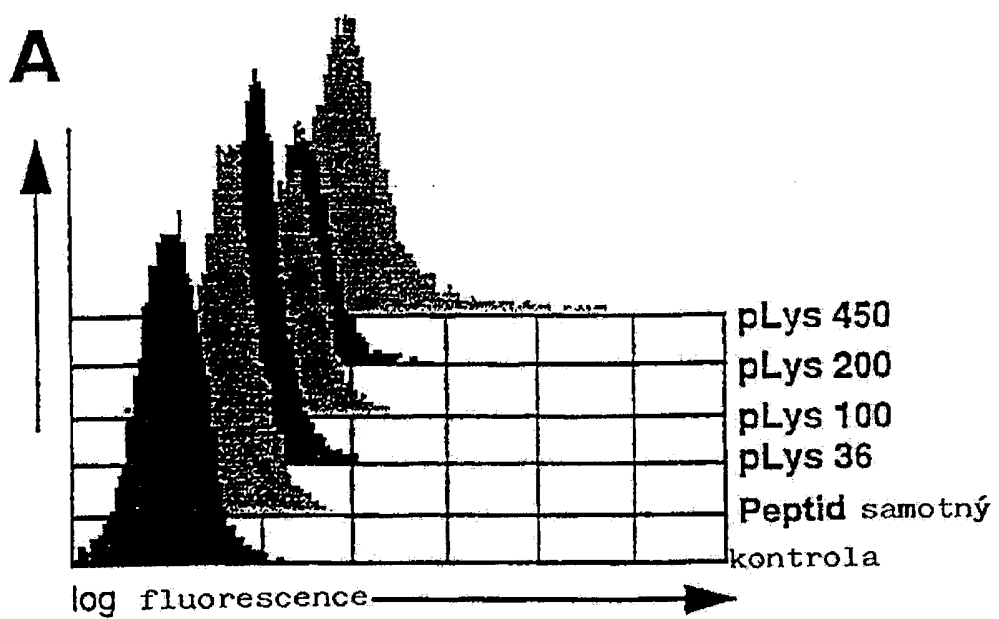


Fig. 17

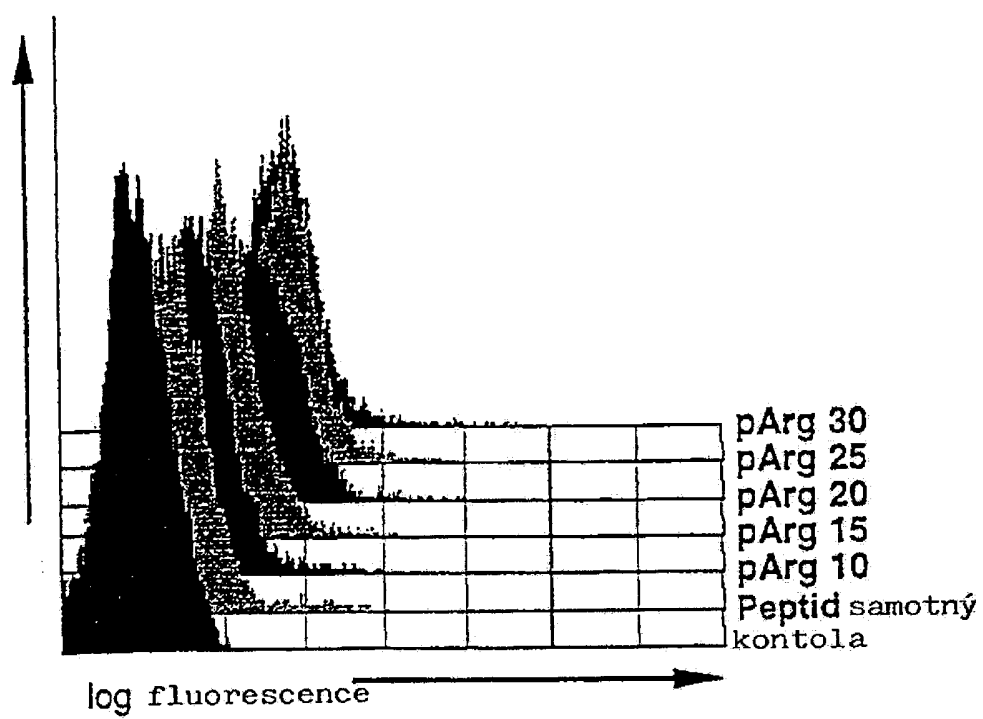
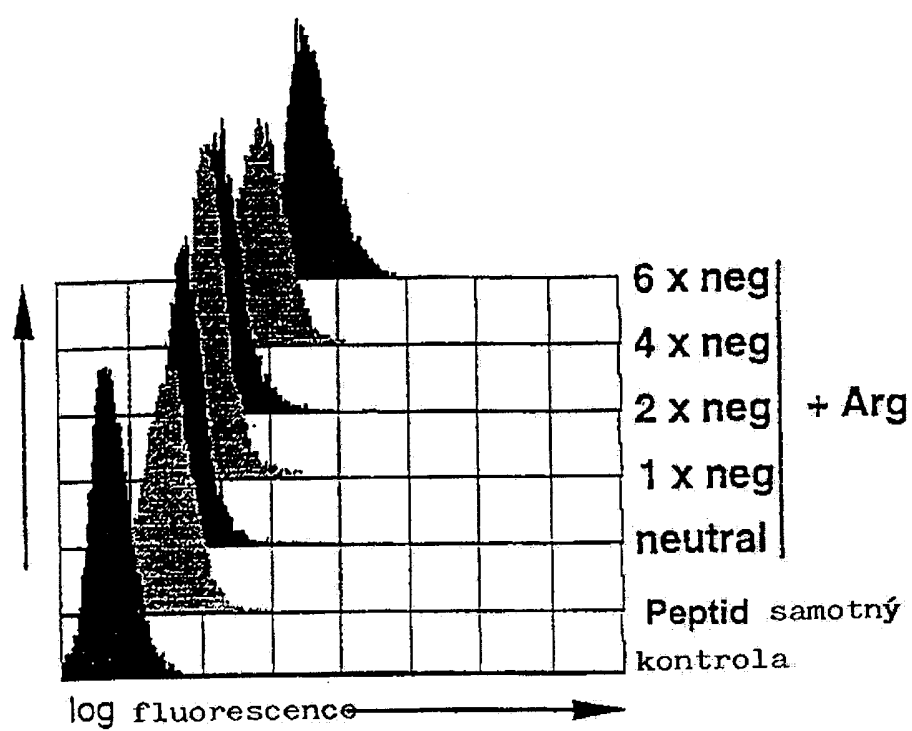


Fig. 18



Konec dokumentu
