PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
2000 - 4147

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
A 61 K 39/12
A 61 K 39/245
A 61 K 39/385
A 61 K 39/39
A 61 P 31/00

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10.05.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.05.1998 03.06.1998 08.06.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/9809958 1998/9811954 1998/9812316**

(33) Země priority: **GB GB GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.05.2001**
(Věstník č. 5/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/GB99/01461**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/58145**

(71) Přihlašovatel:
UNIVERSITY OF BRISTOL, Bristol, GB;

(72) Původce:
Hirst Timothy Raymond, Clevedon, GB;
Williams Neil Andrew, Axbridge, GB;
Morgan Andrew, Henleaze, GB;
Wilson Andrew Douglas, Winscombe, GB;
Bird Lucy Amber, Chichester, GB;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Vakcína

(57) Anotace:

Popisuje se použití i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu, ii) činidla, které je jiné než EtxB nebo CtxB a kterévykazuje GM1-vazebnou aktivitu, nebo činidla, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo iii) činidla, které vykazuje účinek na nitrobuněčnou signalizaci zprostředkovaný navázáním na GM1 nebo Gb3, jako imunomodulátoru vhodného pro vakcínu proti infekčnímu onemocnění.

CZ 2000 - 4147 A3

16.01.01
2000-4147

Vakcína

Oblast techniky

Vynález se týká imunomodulátoru, který je možné použít ve vakcíně, jenž je určena pro použití proti řadě infekčních činidel. Dále se vynález vztahuje k vakcinačnímu prostředku, který obsahuje imunomodulátor, přednostně v kombinaci s antigenem a způsobu vakcinace za použití vakcinačního prostředku.

Dosavadní stav techniky

Toxin cholery (Ctx) a jeho blízce příbuzný tepelně labilní enterotoxin mikroorganizmu *E. coli* (Etx) jsou silné imunogeny a slizniční adjuvans. Jejich inherentní toxicita je činí nevhodným pro použití u lidí. Ačkoli například Ctx je nejběžněji používané slizniční adjuvans u experimentálních zvířat, není vhodné pro použití u lidí, protože má vlastnosti vyvolávající průjem. Je snaha oddělit toxicitu od aktivity adjuvans, například použitím komponentů Ctx a Etx jako náhrady za samotné holotoxiny. Verotoxin mikroorganizmu E. coli (Vtx) je další známý bakteriální toxin.

Ctx a Etx jsou heterohexamerní proteiny, které vykazují enzymaticky aktivní podjednotku A a pentamerní podjednotku B. Ctx a Etx jsou známy, že váží GM1-gangliozid (GM1), což je glykosfingolipid, který se nachází na povrchu savčích buněk. Vtx se váže na Gb3, který je podobný typ receptoru pro GM1.

V případě vývoje vakcíny se musí řešit problém toxicity, přičemž se už dříve zkoumala adjuvantní aktivita netoxických podjednotek B. Řada zpráv popisuje experimenty, ve kterých se používají komerční přípravky CtxB nebo EtxB. Tyto prostředky jsou nevyhnutelně kontaminovány malým, ale biologicky podstatným množstvím aktivního toxinu. Tak adjuvantní

18.01.01

aktivita, která pochází z podjednotky B není oddělitelná od adjuvantní aktivity celého toxinu (Wu and Russell (1993) Infection and Immunity 61: 314-322, US-5182109). Následná studie používající rekombinantní CtxB (rCtxB) naznačuje, že CtxB je slabé slizniční adjuvans a pouze přidání přirozeného holotoxinu může vyvolat silnou odezvu (Tamura et al., (1994) Vaccine 12: 419-426). Jiné studie naznačují, že rCtxB postrádá ADP-ribosylující a cAMP stimulující aktivity holotoxinu a že jak adjuvanční mechanizmus je spojen s těmito vlastnostmi, CtxB není vhodný v případě použití jako adjuvans (Vajdy and Lycke (1992) Immunology 75: 488-492, Lycke et al (1992) Eur. J. Immunol. 22: 2277-2281, Douce et al., (1997) Infection and Immunity 65: 2821-2828).

V jiné studii intranazální aplikace ovalbuminu za použití rCtxB jako adjuvans vede k slabé protilátkové odezvě. Netoxický derivát Ctx s mutací v podjednotce A také vede ke slabé odezvě na antigeny, zatímco přítomnost aktivní podjednotky A dramaticky zvyšuje adjuvanční aktivitu, což naznačuje, že aktivní podjednotka A je podstatná (Douce et al., (1997) Infection and Immunity 65: 2821-2828).

Také se ukázalo, že rCtxB a rEtxB se může použít k podpoře tolerance na heterogenní antigeny (Sun et al (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 4610-4614, Sun et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 7196-7201, Bergerot et al (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 4610-4614, Williams et al (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 5290-5295), což naznačuje, že tyto molekuly jsou vhodné pro použití jako adjuvans.

Podstata vynálezu

Navzdory poznatkům v oboru, že CtxB a EtxB vykazuje slabý zesilující účinek adjuvans a může ve skutečnosti působit jako tolerogen, se zkoumalo použití rEtxB (který neobsahuje žádné

16.01.01

zbytkový holotoxin nebo podjednotku A) v intranazální vakcíně vhodné pro HSV v myším modelu a překvapivě se zjistilo, že tento toxin je schopen stimulovat ochrannou imunitní odezvu na virovou vakcínu. Specificky se zjistilo, že:

i) činidla, jako je EtxB a CtxB stimulují vysoký stupeň místní (slizniční) produkce protilátek (ačkoli imunizace za použití rEtxB stimulovala nižší stupeň celkové produkce sérových protilátek ve srovnání s kombinací Ctx/CtxB),

ii) produkce protilátek je nesymetricky rozdělena směrem k protilátkám, které nefixují komplement, zvláště na S-IgA a IgG1,

iii) činidla, jako je EtxB a CtxB také stimulují místní a systémovou proliferativní odezvu T buněk,

iv) činidla taková jako je CtxB a EtxB mají tendenci posunout imunitní odezvu z odezvy spojené s Th1 k odezvě spojené s Th2.

v) v případě, že činidla, jako je CtxB a EtxB se používají jako imunomodulátory, je možné předejít některým z vážných účinků odezvy spojené s Th2, jako je vytvoření IgE,

vi) rEtxB je více účinný imunomodulátor ve srovnání s rCtxB,

vii) činidla, jako je EtxB a CtxB jsou schopny změnit způsob, při kterém buňky prezentující antigen pohlcují a zpracovávají antigen, čímž se zvyšuje perzistence antigenu,

viii) v případě, že činidlo, jako je EtxB a CtxB je spojeno s antigenem, je možné změnit dráhu zpracování antigenu změnou vazby na imunomodulátor a

ix) VtxB vykazuje podobné imunomodulační účinky na populaci leukocytů in vitro s těmi, které vykazují EtxB a CtxB.

Tyto důležité objevy jsou základem různých aspektů vynálezu a umožňují vynálezcům předpovědět, že čistý EtxB, CtxB a VtxB, stejně jako jiná činidla jsou schopny vázat se na GM1 nebo Gb3 nebo napodobovat účinky navázání. Tato činidla je možné použít ve vakcíně jako imunomodulátory při profylaktické a terapeutické vakcinaci proti infekci HSV-1, stejně jako jiných infekcí, jejichž prevence nebo léčba vyplývá z imunomodulace typů uvedených shora v textu.

Stimulace imunitní odezvy

EtxB, CtxB, VtxB a jiná činidla schopná vázat se nebo napodobit účinky navázání na GM1 nebo Gb3 jsou schopny působit jako imunomodulátory a stimulovat specifické imunitní odezvy na imunizaci antigenem.

Vzhledem k prvnímu aspektu vynálezu, vynález popisuje použití:

(i) EtxB, CtxB bez celého toxinu,

(ii) činidla, které je jiné než EtxB nebo CtxB a vykazuje GM1 vazebnou aktivitu, nebo činidla, které je jiné než VtxB a vykazuje Gb3 vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidla vykazujícího účinek na nitrobuněčný signalizační jevy zprostředkované GM1 navázáním nebo Gb3 navázáním,

jako imunomodulátoru vhodného pro vakcínu proti infekčnímu onemocnění.

Vzhledem k druhému aspektu vynálezu, vynález popisuje vakcinační přípravek vhodný pro použití proti infekčnímu onemocnění, kdy infekční onemocnění je způsobeno infekčním činidlem, kde vakcinační prostředek obsahuje antigenní determinantu a imunomodulátor vybraný ze skupiny zahrnující:

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, kterým není EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu nebo činidlo,

16.01.01

kterým není VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo vykazující účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3,

kde uvedená antigenní determinanta je antigenní determinanta uvedeného infekčního činidla.

Antigen a imunomodulátor se mohou vázat. Mohou být například spojeny kovalentně nebo geneticky za vzniku jediného účinného činidla. Ve specifickém provedení vynálezu antigen a imunomodulátor se může chemicky kombinovat. Antigen a imunomodulátor se může spojit chemicky za použití heterobifunkčního síťovadla. Ve většině aplikací uvedeného aspektu podle vynálezu se preferuje oddělená aplikace (při které antigen a imunomodulátor není spojen), protože to umožňuje oddělenou aplikaci různých částí.

Vynález dále popisuje sadu vhodnou pro vakcinaci savce, jako je člověk nebo zvíře, proti infekčnímu onemocnění, která zahrnuje:

a) jedno z následujících činidel:

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo jiné než EtxB nebo CtxB, které má GM1 vazebnou aktivitu nebo činidlo jiné než je VtxB, které vykazuje Gb3 vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo vykazující účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3 a

b) antigenní determinantu, která je antigenní determinantou infekčního onemocnění, která je vhodná pro společnou aplikaci s uvedeným vakcinačním imunomodulátorem.

Vakcinační prostředek a sada podle vynálezu se může použít při profylaktické a terapeutické vakcinační metodě, kde „profylaktická vakcína" se aplikuje zdravým jedincům, aby došlo k prevenci vývoje onemocnění a „terapeutická vakcína" se aplikuje jednotlivcům s existující infekcí, aby se omezila nebo minimalizovala infekce nebo se odstranily imunopatologické jevy onemocnění.

Činidla jako je EtxB vykazují kapacitu změnit podstatu imunitní odezvy po té, co se objeví infekce. Terapeutická vakcína (to je vakcína, kde není nutné, aby obsahovala antigen) obsahující takové činidlo může najít uplatnění zvláště v okolnostech, kdy imunitní odezva selhala při boji s infekcí. Tato vakcína se může zvláště použít při léčbě chronického onemocnění, například onemocnění, kdy kauzativní agens se vybralo ze skupiny zahrnující virus herpes, virus hepatitidy, HIV, TB a parazity.

Dále vynález popisuje způsob prevence nebo léčby onemocnění hostitele, přičemž uvedený způsob zahrnuje inokulaci uvedeného hostitele vakcínou, která obsahuje alespoň jednu antigenní determinantu a imunomodulátor, kde imunomodulátor je

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo jiné než EtxB nebo CtxB, které vykazuje GM1 vazebnou kapacitu nebo činidlo jiné než je VtxB a vykazuje Gb3 vazebnou kapacitu nebo

(iii) činidlo, které vykazuje účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 a Gb3.

Vakcína se může balit tak, aby byla vhodná pro ko-aplikaci a může se aplikovat řadou různých způsobů, jako je intranazální, orální, intravaginální, uretrální nebo oční aplikace. V současné době se preferuje intranazální imunizace.

V případě, že vakcína se aplikuje intranazálně, může se aplikovat jako aerosol nebo v kapalné formě.

Antigenní determinanta a imunomodulátor se může aplikovat subjektu jako jediná dávka nebo více dávek.

Imunomodulátor, vakcína, sada a způsob podle vynálezu se mohou použít proti onemocnění, kde infekční agens je členem rodiny viru herpes. Infekční činidlo se může vybrat ze skupiny zahrnující HSV-1, HSV-2, EBV, VZV, CMV, HHV-6, HHV-7 a HHV-8. Tímto infekčním činidlem je HSV-1, HSV-2, CMV nebo EBV.

V tomto provedení vynálezu antigenní determinanta produktu středně časného, časného nebo pozdního genu (například povrchového glykoproteinu) viru herpes. Jestliže infekční činidlo je HSV-1 nebo HSV-2, pak antigenní determinanta může být antigenní determinantou genového produktu vybraného z následující skupiny: gD, gB, gC nebo transkriptu spojeného s latencí (LAT).

Jestliže infekční činidlo je EBV, pak antigenní determinanta může být antigenní determinanta gp340 nebo gp350 nebo latentní protein (například EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C a -LP, LMP-1, -2A a 2B nebo EBER).

V jiném provedení vynálezu se vakcína, sada a způsob používají proti onemocnění, kde infekčním agens je virus chřipky.

V tomto provedení vynálezu antigenní determinantou je virový obalový protein (například hemaglutinin a neuraminidáza) nebo vnitřní protein (například jaderný protein).

V tomto provedení vynálezu imunomodulátor, vakcína, sada a způsob se používají proti onemocnění, kde infekční agens je virus parainfluenza.

16.01.01

V dalším provedení vynálezu imunomodulátor, vakcína, sada a způsob se použily v případě onemocnění, kde infekčním agens je respirační syncytiální virus.

V dalším provedení vynálezu se imunomodulátor, vakcína, sada a způsob použily při onemocnění, kde infekční agens je virus hepatitidy. Infekční agens se vybralo například ze skupiny zahrnující hepatitidu A, B, C a D. Infekční agens může být zvláště hepatitida A nebo C.

V dalším provedení vynálezu se imunomodulátor, vakcína, sada a způsob použily v případě meningitidy, kde infekční činidlo se vybralo ze skupiny zahrnující *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae type B and Streptococcus pneumoniae.*

V dalším provedení vynálezu se imunomodulátor, vakcína, sada a způsob použily proti onemocnění pneumonia nebo infekce dýchacích cest, kde infekční agens se vybralo ze skupiny zahrnující mikroorganizmy *Streptococcus pneumoniae, Legonella pneumophila and Mycobacterium tuberculosis.*

V dalším provedení vynálezu se imunomodulátor, vakcína, sada a způsob použily proti pohlavním nemocím, kde infekční agens se vybralo ze skupiny zahrnující *Neisseria gonnorheae,* HIV-1, HIV-2 and *Chlamydia trachomatis.*

V dalším provedení vynálezu se imunomodulátor, vakcína, sada a způsob použily při onemocnění trávicího traktu, kde infekční agens se vybralo ze skupiny zahrnující enteropatogenní, enterotoxické a enteroinvazivní *E. coli,* rotavirus, *Salmonella enteritidis, Salmonella typhi, Helicobacter pylori, Bacillus cereus, Campylobacter jejuni and Vibrio cholerae.*

Jestliže se infekční agens vybralo ze skupiny zahrnující enteropatogenní, enterotoxické, enteroinvazivní, enterohemoragické a enteroagregační E. coli, pak antigenní determinantou může být antigenní determinanta bakteriálního toxinu nebo adhezivního faktoru.

V dalším provedení vynálezu se imunomodulátor, vakcína, sada a způsob použily při superficiální infekci, kde infekční agens se vybralo ze skupiny zahrnující *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes a Streptococcus mutans.*

V dalším provedení vynálezu se imunomodulátor, vakcína, sada a způsob použily při onemocnění způsobené parazity, kde infekční agens se vybralo ze skupiny zahrnující malárii, *Trypanasoma spp., Toxoplasma gondii, Leishmania donovani a Oncocerca spp..*

Stimulace slizniční imunitní odezvy

EtxB, CtxB, VtxB a jiná agens schopná vázat se nebo napodobovat účinky navázání na GM1 nebo Gb3 jsou schopny specificky pozitivně regulovat produkci slizničních protilátek.

Vakcinační imunomodulátor, vakcinační prostředek a sada podle vynálezu jsou zvláště účinné při onemocnění, kde ochrana proti onemocnění nebo léčbě je ovlivněna in vivo slizniční imunitní odezvou. Například při onemocnění, při kterém během infekce se infekční agens váže na sliznici nebo ji kolonizuje. Příklady takového onemocnění je onemocnění způsobené viry (HIV, HSV, EBV, CMV, virus chřipky, spalničkový virus, virus příušnic, rotavirus atd.) nebo bakteriemi (jako je E. coli, Salmonella, Shigella, Chlamydia, N. gonnorhoea, T. pallidium, druh Streptococcus, které zahrnují ty, jenž způsobují zubní kazy) nebo jsou způsobené parazity.

V preferovaném provedení vynálezu se použije vakcína proti infekci HSV-1 obsahující alespoň jednu HSV-1 antigenní determinantu a imunomodulátor, kde imunomodulátorem je:

(i) EtxB, CtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, které je jiné než EtxB nebo CtxB a vykazuje GM1 vazebnou aktivitu, nebo činidlo, které je jiné než VtxB a vykazuje Gb-3 vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo vykazujícího účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované GM1 navázáním nebo Gb3 navázáním.

Upřednostňuje se, aby imunomodulátor byl EtxB.

V preferovaném provedení vynálezu se používá sada vhodná pro vakcinaci savců proti HSV-1, která obsahuje:

a) vakcinační imunomodulátor, kterým je:

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlO, které je jiné než EtxB nebo CtxB a vykazuje GM1 vazebnou aktivitu, nebo činidlo, které je jiné než VtxB a vykazuje Gb-3 vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo vykazujícího účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované GM1 navázáním nebo Gb3 navázáním a

(b) alespoň jednu antigenní determinantu HSV-1 vhodnou pro společnou aplikaci s uvedeným vakcinačním imunomodulátorem.

Vynález dále popisuje použití

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidla, které je jiné než EtxB nebo CtxB a vykazuje GM1 vazebnou aktivitu, nebo činidla, které je jiné než VtxB a vykazuje Gb-3 vazebnou aktivitu nebo

16.01.01

(iii) činidla vykazujícího účinek na nitrobuněčný signalizační jevy zprostředkované GM1 navázáním nebo Gb3 navázáním

při pozitivní regulaci produkce protilátek na povrchu sliznic. Produkce sérových protilátek, které nefixují komplement se mohou také regulovat negativním způsobem. Upřednostňuje se, když se S-IgA produkuje v souladu se způsobem podle vynálezu.

Imunomodulátor, vakcína, sada a způsob podle vynálezu se mohou použít ve spojení s jednou nebo více antigenních determinant.

Negativní regulace patologických komponentů imunitní odezvy.

Také se zjistilo, že, když se použil čistý EtxB jako imunomodulátor popsaným způsobem, tak se zabránilo ničivým účinkům odezvy spojené s Th2, jako je tvorba velkého množství potencionálně patologických IgE. Navzdory tomu imunitní odezva vyvolaná použitím EtxB (nebo CtxB nebo VtxB) jako imunomodulátoru se jeví vhodná pro vyvolání cytokinů spojených s Th2. Jinými slovy EtxB (nebo CtxB) vyvolává posun z odezvy typu Th1 na typ Th2. To umožňuje předpovídat, že čisté EtxB, CtxB nebo VtxB stejně jako jiná činidla schopná vázat se nebo napodobovat účinky navázání na GM1 nebo Gb3 budou schopná negativně regulovat patologické komponenty imunitní odezvy spojené s aktivací Th1 a Th2.

Vynález dále popisuje použití

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidla, které je jiné než EtxB nebo CtxB a vykazuje GM1 vazebnou aktivitu, nebo činidla, které je jiné než VtxB a vykazuje Gb-3 vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidla vykazujícího účinek na nitrobuněčný signalizační jevy zprostředkované GM1 navázáním nebo Gb3 navázáním a

při negativní regulaci patologických komponentů imunitní odezvy spojené s Th2. Patologické komponenty imunitní odezvy spojené s Th1 se mohou také negativně regulovat.

Je známo, že EtxB a CtxB se váže na GM1 a vyvolává diferenciální účinky na populaci lymfocytů, které zahrnují specifickou depleci CD8+T buněk a spojenou aktivaci buněk B (WO 97/0204). Protože se uvažuje, že EtxB a CtxB mění rovnováhu imunitní odezvy tak, že reakce spojené se zánětlivým Th1 se negativně regulují zatímco odezvy spojené s Th2 se regulují pozitivně. Odezva Th1 zahrnuje vylučování γIFN aktivovanými buňkami, což vede k aktivaci makrofágů a oddálení reakcí hypersenzitivního typu. Takové odezvy mohou být důležitým patologickým jevem během infekcí řadou patogenů. Odezvy Th2 zahrnují aktivaci T buněk, aby došlo k produkci cytokinů, jako je IL-4, Il-5, Il-10 a jsou známy tím, že podporují vylučování velkého množství protilátek, zvláště IgA.

Pak se překvapivě zjistilo, že když se jako imunomodulátor používá EtxB popsaným způsobem, předchází se škodlivým účinkům odezvy spojené s Th2, jako je vytvoření velkého množství potencionálně patologického IgE. Proto EtxB a CtxB jsou schopny negativně regulovat patologické komponenty spojené s aktivací Th1 a Th2. Takové odezvy se mění, aby se dosáhlo vysoké produkce sérových protilátek, které nefixují komplement, a produkce IgA na povrchu sliznic.

Použití činidla v souladu s předměty vynálezu je zvláště použitelné při terapeutické vakcinaci onemocnění, kde jsou zahrnuty imunopatoligické mechanizmy. Příklady takových onemocnění jsou HSV-1, HSV-2, TB a HIV.

Činidla, jako je EtxB, se mohou použít současně jako imunomodulátor a terapeutické činidlo. Například při onemocnění, kde jsou zahrnuty imunopatoligické mechanizmy,

použití činidel, které jsou zahrnuty ve vakcíně, jako je EtxB nebo CtxB mohou způsobovat ne pouze omezení infekce, ale také odstraňují patologické procesy onemocnění. Imunomodulační činidlo tak působí jak profylakticky tak terapeuticky. Příklady infekcí, kde vakcinace tímto způsobem je proto pravděpodobně zvláště významná, zahrnuje onemocnění způsobené virem herpes simplex, patogeny trávicích a dýchacích cest.

Imunomodulace způsobu zpracování antigenu

a) prodloužená prezentace

Také se zjistilo, že když se EtxB (nebo CtxB nebo VtxB) použije jako imunomodulátor, změní se pohlcení antigenu a způsob jeho zpracování. Přítomnost podjednotky B způsobuje prodlouženou prezentaci, pravděpodobně změnou dráhy uvnitř buněk, které prezentují antigen tak, že rozklad antigenu je oddálen a proto přetrvává po delší časový úsek. Tento rys prezentace podjednotky B spojené s antigenem znamená, že vakcíny obsahující činidlo podle vynálezu zvýší odolnost antigenu a to vede k trvalé imunologické paměti.

Vynález dále popisuje použití:

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidla, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu nebo činidla, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidla vykazující účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3,

jako imunomodulátoru ve vakcíně, aby se prodloužila prezentace antigenu a u savce vznikla trvalá imunologická paměť.

Vynález popisuje vakcinační prostředek, který je vhodný pro použití proti infekčnímu onemocnění, které obsahuje antigenní determinantu a imunomodulátor vybraný z

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu nebo činidlo, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo vykazující účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3,

kde uvedená antigenní determinanta je antigenní determinantou uvedeného infekčního onemocnění a kde imunomodulátor prodlužuje přítomnost antigenní determinanty a dává vzniku trvalé imunologické paměti.

b) nitrobuněčné cílení antigenu do dráhy spojené s MHC-I nebo MHC-II

Jak se uvádí shora v textu, imunomodulátor a antigen může být v terapeutické nebo profylaktické vakcíně geneticky nebo kovalentně vázán za vzniku jediného účinného činidla. Zjistilo se, že je možné řídit antigen do různých částí buněk a proto je možné dosáhnout různých drah prezentace antigenu změnou vazby antigenu na imunomodulátor.

Spojením antigenu nebo antigenní determinanty s imunomodulátorem v jisté dráze, je možné dosáhnout translokací antigenu přes endozomální membránu do cytozolu. Předpovědělo se, že to bude zvyšovat nanesení antigenních peptidů na molekuly MHC třídy I. Použití konjugátu antigen-imunomodulátor se může proto použít, aby se specificky zvýšila aktivace cytotoxických C buněk (CTL). Indukce CTL je výhodné při prevenci a léčbě řady onemocnění zvláště těch, které jsou způsobeny viry, nitrobuněčnými bakteriemi a parazity.

Spojení konjugátu antigen-imunomodulátor je možné také vybrat tak, že antigen je zaveden do jádra.

Vynález dále popisuje konjugát, který obsahuje antigen nebo antigenní determinantu a imunomodulátor vybraný z

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, které je jiné EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu nebo činidlo, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo vykazující účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3.

Vynález dále popisuje vakcinační prostředek, který je vhodný při použití proti infekčnímu onemocnění, kde infekční onemocnění je způsobeno infekčním činidlem. Vakcinační prostředek obsahuje konjugát antigenu nebo antigenní determinanty a imunomodulátoru vybraného z

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu nebo činidlo, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo vykazující účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3,

kde uvedený antigen nebo antigenní determinanta je antigen nebo antigenní determinanta uvedeného infekčního činidla.

Antigen nebo antigenní determinanta je spojena s imunomodulátorem různými způsoby, které zahrnují genetické spojení nebo chemickou konjugaci. V preferovaném provedení vynálezu je konjugát fúzní protein připravený genetickou vazbou antigenu nebo antigenní determinanty

s imunomodulátorem. Upřednostňuje se, aby se antigen nebo antigenní determinanta geneticky spojila s C-koncem imunomodulátoru. Ve druhém preferovaném provedení vynálezu antigen nebo antigenní determinanta je chemicky spojená s imunomodulátorem. Upřednostňuje se, aby antigen nebo antigenní determinta se spojila s imunomodulátorem za použití zesíťovacího činidla se dvěmi funkcemi, jako je heterobifunkční síťovadlo. Více se preferuje, aby síťovadlo byl ester N-γ(-maleimido-butyroxyl)-sukcinimidu (GMBS) nebo N-sukcinimidyl-(3-pyridyl-dithio)-propionát (SPDP). Vakcinační prostředek se může aplikovat řadou různých cest, jako je intranazální, orální, intravaginální, uretální nebo oční. Preferuje se intranazální imunizace.

Vynález dále popisuje použití

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu nebo činidlo, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo vykazující účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3,

v konjugátu s antigenem nebo s antigenní determinantou za účelem zavedení uvedeného antigenu nebo antigenní determinanty do cytozolu nebo jádra buňky, která prezentuje antigen.

Vynález popisuje použití

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu nebo činidlo, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

16.01.01

(iii) činidlo vykazující účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3,

v konjugátu s antigenem nebo antigenní determinantou za účelem zesílení prezentace uvedené antigenní determinanty nebo antigenní determinanty získané z uvedeného antigenu molekulami MHC třídy I.

Preferované použití konjugátu podle vynálezu je použití v kombinaci s použitím činidla podle vynálezu za účelem stimulace silné odezvy CTL a pozitivní regulace produkce slizničních protilátek. Tato aktivita je zvláště použitelná při prevenci a léčbě virových infekcí, jako je například chřipka.

EtxB je preferovaný imunomodulátor

Uvažuje se, že EtxB a CtxB vykazují podobné vlastnosti. Zjistilo se však, že rEtxB je silnějším a účinným modulátorem ve srovnání s rCtxB. Protože preferovaným imunomodulátorem je EtxB nebo činidlo, které napodobuje účinky EtxB.

EBV

EBV je jeden z osmi známých lidských herpesových virů. Infekce se obvykle objevuje v raném dětství, ale klinické symptomy jsou v tomto stádiu obvykle slabé nebo nejsou detekovatelné. Primární infekce EBV je později v životě spojena s infekční mononukleózou (IM), která je druhým nejvíce častým onemocněním v USA v době dospívání. EBV vykazuje také onkogenní potenciál. Existuje silná vazba mezi EBV a endemickým Burkitovým lymfomem (BL) a nediferenciovaným nazofaryngeálním karcinomem (NPC). Také velká část lymfomů, které se objevují u imunokompromitovaných pacientů jsou způsobeny EBV a existuje vztah mezi jistými Hodgkinovými lymfomy a EBV.

16.01.01

Buňky latentně infikované EBV exprimují malé množství tzv. „latentních" proteinů. Uvedené latentní proteiny zahrnují šest jaderných proteinů (EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C a-LP), tři integrované membránové proteiny (LMP-1, 2A a 2B) a RNA získanou z nepolyadenylovaného viru (EBER) s určitou rolí při sestřihu RNA.

EBV latentní membránový protein 1 (LMP-1) je přítomen v plazmatické membráně infikovaných buněk. Také se exprimuje v nazofaryngeálních karcinomech (NPC) a Hodgkinových lymfomech, které jsou EBV pozitivní (HD), což indikuje úlohu LMP-1 při vývoji těchto nádorů. Gen LMP-1 může změnit fenotyp neinfikovaných buněk, což způsobuje pozitivní regulaci aktivačních markerů na povrchu buňky, což podporuje proliferaci buněk. LPM-1 může také změnit signalizační dráhy a má antiapoptické účinky. Buněčná imunitní odezva řízená proti tomuto virovému antigenu se nespojuje s žádným zdravým nosičem nebo s pacienty s nádory.

Řada zvířecích virů zahrnuje mechanizmy, které umožňují zabránit jejich odhalení imunitním systémem hostitele. V běžném případě tento mechanizmus zahrnuje interferenci peptidovým translokačním systémem spojeným s TAP. Uvažuje se, že EBV vykazuje podobné mechanizmy, jak předejít detekci imunitním systémem, což umožňuje jeho přetrvávání v hostiteli. To vysvětluje, proč jisté buněčné imunitní odezvy nejsou detekovatelné EBV latentním proteinem EBNA1 a zjevnou absenci takové imunitní odezvy proti LMP1.

Vynález dále popisuje vakcinační prostředek, který dále obsahuje

a) jedno z následujících činidel:

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu nebo činidlo, které

16.01.01

je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo vykazující účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3,

b) antigen EBV vhodný pro použití při léčbě a/nebo prevenci onemocnění spojené s EBV.

V určitém vakcinačním prostředku podle vynálezu jsou zahrnuty EtxB, CtxB nebo činidlo, které je jiné než EtxB nebo CtxB, které vykazuje GM1 vazebnou aktivitu.

Vynález dále popisuje terapeutický prostředek, který obsahuje:

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu nebo činidlo, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo vykazující účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3,

přičemž uvedený terapeutický prostředek se použije při léčbě onemocnění spojeného s EBV.

Vynález dále popisuje terapeutickou kompozici podle vynálezu, která obsahuje EtxB, CtxB nebo činidlo, které se liší od EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu.

Na základě znalostí, že EtxB se spojuje s LMP1 a že EtxB podporuje fragmentaci LMP-1 se vyslovila teorie, že EtxB (a jiná činidla podobná CtxB vykazující vazebnou aktivitu GM1) je použitelný při stimulaci anti-EBV imunitní odezvy. Tato aktivita nachází uplatnění ve vakcinách, kde brání onemocnění spojené s EBV a zajišťuje léčbu v případě, že dojde k onemocnění.

16.01.01

Věří se, že v případě, že EtxB se spojuje s LMP-1, antigen se zpracovává odlišným nitrobuněčným způsobem, který umožňuje antigenu projít normálním způsobem zpracování, který je blokován virem. Antigen se tak účinně prezentuje na povrchu buňky. Působení EtxB tak mohou způsobovat různé epitopy antigenu, které jsou přítomny na povrchu buňky. Tyto epitopy se mohou lišit od epitopů, které jsou přítomny na povrchu buňky v případě, že se zpracovávají běžnou cestou.

Vakcína podle vynálezu se může použít při prevenci infekce způsobené EBV nebo vývojem onemocnění spojeném s EBV u jedinců infikovaných EBV. Vakcína může také obsahovat oddělené adjuvans nebo činidlo (jako je EtxB nebo CtxB), které může působit jako adjuvans.

Činidla podle vynálezu se mohou podle vynálezu použít samotná (to znamená bez antigenu) při léčbě onemocnění spojené s EBV v případě, že subjekt už onemocněl.

Preferovaným činidlem vhodným pro použití podle vynálezu je EtxB.

EBV antigen je antigen odvozený od samotného EBV nebo antigen, který exprimují hostitelské buňky infikované EBV působením EBV. Upřednostňuje se, aby antigen byl latentní membránový protein EBV. Zvláště se preferují antigeny LMP-1, LPM-2A, LPM-2B a EBNA-1, stejně jako jejich antigenní fragmenty. Antigen se může izolovat přímo z buněk infikovaných EBV nebo se mohou připravit syntetickým nebo rekombinantním způsobem.

Dále vynález popisuje léčbu a/nebo prevenci následujících onemocnění: infekční mononukleózu, Burkittův lymfom, nazofaryngeální karcinomy a Hodgkinovy lymfomy. Věří se, že

16.01.01

vynález je vhodný pro léčbu a/nebo prevenci nazofaryngeálních karcinomů a Hodgkinových lymfomů.

Vakcína nebo terapeutická kompozice podle vynálezu se může použít při prevenci vývoje nebo léčby onemocnění spojené s EBV u savce, aplikací imunologicky účinného množství subjektu.

Savec může být například zdravý jedinec infikovaný nebo neinfikovaný EBV, imunodeficitní jedinec nebo jedinec s onemocněním spojeným s EBV.

Vakcína se může aplikovat libovolným vhodným způsobem. Činidlo a antigen se mohou aplikovat savci společně nebo odděleně. Činidlo a antigen se mohou vyskytovat odděleně nebo mohou být vázány například kovalentně nebo geneticky za vzniku jediného účinného činidla.

Signalizace spojená s GM-1 a Gb-3

Věří se, že navázání GM1 nebo Gb3 může vést k nitrobuněčné signalizaci přímo nebo nepřímo. Také se našel důkaz, který naznačuje, že EtxB interaguje s alespoň jedním jiným receptorem, který se podílí na nitrobuněčné signalizaci spojené s GM1. Může dojít k tomu, že navázání EtxB (nebo CtxB) na GM1 umožňuje navázání na protein, který způsobuje nitrobuněčnou signalizaci. Je známo, které procesy mohou způsobit nitrobuněčnou signalizaci. Může to být fosforylace GM1 nebo proteinu. V případě, že EtxB/CtxB se váže na GM1, který se nachází na povrchu buněk, navázaný GM1 se internalizuje do vesiklů (Williams et al (1999) Immunology Today 20, 95-101). GM1 a jiné glykolipidy (jako je Gb3) jsou známy tím, že se přednostně nacházejí v „membránových štěpech", kde se také nacházejí klíčové proteinové receptory. Je proto možné, že internalizace GM1, což je výsledek navázání B-podjednotky, způsobuje spojení takových proteinů, což vede ke zprostředkování nitrobuněčných signalizačních jevů.

18.01.01

Definice

Adjuvans je sloučenina, která nespecificky zvyšuje imunitní odezvu na antigen, čímž se liší od nosiče vakcíny, důvodem je cílení antigenu na požadované místo. Termín „imunomodulátor" se použije pro indikaci činidla, které působí jako adjuvans, aby stimuloval jistou imunitní odezvu, ale které také řídí imunitní odezvu do určitého směru.

Termín „společná aplikace" se používá v případě, že místo a čas aplikace antigenu a imunomodulátoru jsou takové, že se stimuluje nezbytná imunitní odezva. Zatímco antigen a imunomodulátor se může aplikovat ve stejný okamžik a na stejném místě, může být výhodné aplikovat antigen v odlišném čase a/nebo na odlišné místo ve srovnání s imunomodulátorem. Antigen a imunomodulátor se může aplikovat spolu s prvním krokem pak se může imunitní odezva podpořit v druhém kroku aplikací samotného antigenu.

Termín „antigenní determinanta" znamená místo na antigenu, které rozeznávají protilátky nebo receptor T-buňky. Přednostně jde o krátký peptid získaný z proteinového antigenu nebo jako jeho část, termín se však také zahrnuje glykopeptidy a sacharidové antigenní determinanty. Termín také zahrnuje upravené sekvence aminokyselin nebo sacharidů, které stimulují odezvy, které rozeznávají celý organizmus.

Existuje řada známých metod, kterými je možné identifikovat antigenní determinanty v případě daného infekčního agens.

Potencionální ochranné antigeny se mohou identifikovat zesílením imunitní odezvy v infikovaných pacientech nebo u rekonvalescentů, u infikovaných zvířat nebo rekonvalescentů nebo monitorováním imunitní odezvy *in vitro* na přípravky obsahující antigen. Například

16.01.01

i) vzorky sér od infikovaných nebo rekonvalescentních pacientů nebo infikovaných nebo rekonvalescentních zvířat se mohou testovat proti lyzátům celých buněk infekčním agens nebo lyzáty buněk infikovaných uvedeným činidlem standardními metodami westernova přenosu, aby se detekoval antigen(y) rozeznávané imunitním sérem.

ii) vzorky sér z infikovaných nebo rekonvalescentních pacientů nebo infikovaných nebo rekonvalescentních zvířat se mohou testovat proti částečně nebo vysoce čištěným antigenům, které pocházejí z infekčního agens, nebo lyzáty buněk infikovanými uvedeným agens, standardní metodou testu ELISA, kde částečně nebo vysoce čištěné antigeny se používají k potažení prohlubní na mikrotitračních destičkách nebo pomocí imunoblotování pro detekci těchto antigenů, které jsou rozeznávány imunitním sérem.

iii) vzorky séra z infikovaných nebo rekonvalescentních pacientů nebo infikovaných nebo rekonvalescentních zvířat se mohou testovat proti lyzátům celých buněk získaných z rekombinantních expresívních systémů, která kódují jeden nebo více antigenů rozeznávaných imunitním sérem,

iv) vzorky séra z infikovaných nebo rekonvalescentních pacientů nebo z infikovaných nebo rekonvalescentních zvířat se mohou testovat proti expresívní knihovně, která obsahuje klonované geny z infekčních agens za použití imunodetekce přenosem kolonií za účelem zjistit ty klony, které exprimují antigeny nebo jejich fragmenty pomocí imunitního systému nebo

v) PBL z krve infikovaných nebo rekonvalescentních pacientů nebo PBL, buněk mízních uzlin, buněk sleziny nebo buněk lamina propria z infikovaných nebo rekonvalescentních zvířat se mohou kultivovat *in*

16.01.01

vitro v přítomnosti částečně nebo zcela čištěných antigenů získaných buď z infekčního činidla nebo lyzátů buněk infikovaných uvedeným činidlem nebo rekombinantním expresívním systémem, který kóduje jeden nebo více antigenů tak, že detekuje specifické proliferativní odezvy T buněk.

V jiném případě je možné detekovat genové produkty, které jsou podstatné pro přežití patogenů *in vitro* jak se ukazuje pomocí metody značené mutageneze vyvinuté Holdenem nebo detekcí genových produktů specificky indukovaných *in vivo*, jako je IVET (technologie exprese in vivo), kterou vyvinul Mekalanos, nebo diferenciální fluorescenční indukcí, kterou vyvinul Falkow, identifikace sady genů mezi které patří potencionální ochranné antigeny. Za použití těchto metod se mohou genové produkty testovat, jak se uvádí shora v textu. Geny se mohou klonovat do expresívních vektorů a antigeny se získaly z inkluze do vakcinačních sloučenin spolu s činidly, které modulují aktivitu spojenou s glykosfingolipidem.

Zde existuje řada známých metod, které umožňují izolaci antigenů v případě daného infekčního agens.

Povrchové komponenty infekčního činidla obsahující jeden nebo více potencionálních ochranných antigenů se mohou extrahovat z agens nebo z buněk infikovaných agens za použití postupů, které umožní získání antigenů. To může zahrnovat použití metody porušení buněk, přičemž se lyzují buňky, jako je sonikace a/nebo extrakce detergentem. Centrifugace, ultrafiltrace nebo srážení se mohou použít při přípravě shromážděných antigenů. Přípravky antigenů, které obsahují glykoproteiny HSV-1 se popisují v publikaci Richards et al., (1998) J. Infect. Dis. 177, 1451-7, kde se nacházejí příklady takových metod.

16.01.01

Antigeny infekčního činidla nebo z buněk infikovaných uvedeným agens se mohou extrahovat různými postupy, které zahrnují extrakci z moče, zásaditou nebo kyselou extrakci nebo extrakci detergentem a se podrobí chromatografické separaci. Materiál získaný v mezerovém prostoru nebo při maximu eluce obsahující jeden nebo více potencionálních ochranných antigenů se může použít u vakcinačních sloučenin.

V jiném případě geny, které kódují jeden nebo více potencionálních ochranných antigenů se může klonovat do různých expresívních vektorů vhodných pro produkci antigenu. To může zahrnovat bakteriální nebo eukaryontní expresívní systémy. Jsou to například *Escherichia coli, Bacillus spp., Vibrio spp., Sacarromyces cerevisiae,* buněčné linie savců a hmyzu. Antigeny se mohou získat běžnou extrakcí, separací a/nebo chromatografickými postupy.

Termíny „CtxB", „EtxB" a „VtxB" zahrnují přirozené a rekombinantní formy molekul. Zvláště se preferuje rekombinantní forma. Rekombinantní forma molekuly se může produkovat způsobem, při kterém gen nebo geny kódující specifický polypetidový řetězec (nebo řetězce), ze kterého se tvoří peptid, se začlení do vhodného vektoru a pak se použije při transfekci vhodného hostitele. Například gen kódující polypeptidový řetězec, ze kterého vzniká EtxB se pak může začlenit například do plazmidu pMN68, který se pak použije k transfekci hostitelských buněk, jako je *Vibrio* sp.60. Protein se pak čistí a izoluje řadou způsobů. Mutantní geny exprimující aktivní mutantní protein CtxB, EtxB nebo VtxB se mohou produkovat známými metodami z genu divokého typu.

Termíny „CtxB", „EtxB" a VtxB také zahrnují mutantní molekuly a jiné syntetické molekuly (obsahující části CtxB, EtxB nebo VtxB), které si uchovávají kapacitu napodobovat účinky navázání GM1 nebo Gb3.

16.01.01

Činidla jiná než je EtxB a CtxB, která si uchovávají vazebnou kapacitu a činidla jiná než VtxB, která si uchovávají vazebnou aktivitu Gb3 zahrnují protilátky, které váží GM1 nebo Gb3.

V případě produkce protilátek se různí hostitelé zahrnující kozy, králíky, krysy, myši atd se mohou imunizovat injekcí GM1 nebo Gb3 nebo jejich libovolným derivátem nebo homologem. V závislosti na specie hostitele mohou se za účelem zvýšení imunologické odezvy použít různá adjuvans. Taková adjuvans zahrnují, ale nejsou omezeny na minerální gely podle Freunda, jako je hydroxid hlinitý a povrchově aktivní látky, jako je lyzolecitin, pluronové polyoly, polyanionty, peptidy, olejové emulze, hemocyanin přílipkovitých plžů a dinitrofenol. BCG (Bacilli Calmette-Guerin) a Corynebacterium parvum se mohou použít jako lidská adjuvans.

Podle vynálezu se preferují humanizované monoklonální protilátky. Monoklonální protilátky se mohou připravit za použití metody, která je vhodná pro produkci molekul protilátek kontinuální kultivací buněčných linií. Metody zahrnují, ale nejsou omezeny na techniku hybrodomu, která se popisuje shora v textu (Koehler and Milstein, 1975, Nature 256: 495-497), techniku hybridomu lidských B-buněk (Kosbor et al., (1983) Immunol. Today 4: 72, Cote et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 2026-2030) a technika EBV-hybridomu (Cple et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc., pp 77-96). Navíc se může použít metoda vyvinutá pro produkci „chimerových protilátek", sestřih genů myších protilátek na geny lidských protilátek za vzniku molekuly s vhodnou antigenní specifitou a biologickou aktivitou (popisuje se v publikaci Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-6855, Neuberger et al., (1984) Nature 312: 604-608, Takeda et al., (1985) Nature 314: 452-454). V jiném

16.01.01

případě metoda popsaná pro produkci protilátek s jedním řetězcem (US patent č. 4,946,779) se může upravit pro produkci cílové interakční části specifických jednořetězových protilátek.

Protilátky se mohou produkovat indukcí produkce *in vivo* v populaci lymfocytů nebo testováním knihovny rekombinantních imunoglobulinů nebo panelů vysoce specifických vazebných činidel, jak se popisuje v publikaci Orlandi et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci 86: 3833-3837 a Winter G and Milstein C., 1991, Nature 3837 a Winter G and Milstein C., (1991), Nature 349: 293-299.

Mohou se vytvořit fragmenty protilátek, které obsahují specifická vazebná místa pro GM1 nebo Gb3. Takové fragmenty například zahrnují fragmenty $F(ab')_2$, které mohou vznikat trávením molekuly protilátek pepsinem a fragmenty Fab, se mohou vytvořit snížením množství disulfidových můstků fragmentů $F(ab')_2$. V jiném případě se může zkonstruovat expresívní knihovna Fab, což umožní rychle a jednoduše stanovit monoklonální fragmenty Fab s požadovanou specifitou (Huse WD et al., (1989) Science 256: 1275-1281).

Peptidové nebo organické knihovny se mohou připravit kombinační chemií a pak se u nich může testovat jejich schopnost vázat GM1/Gb3. Syntetické sloučeniny, přirozené produkty a jiné zdroje potencionálně biologicky aktivních materiálů se mohou testovat řadou způsobů, které jsou v oboru dobře známy.

GM1 nebo Gb3 nebo jejich fragmenty se mohou použít při testování peptidů nebo molekul libovolnou z řady testovacích technik. Molekula může být volná v roztoku, fixovaná na pevném povrchu, může vznikat na buněčném povrchu nebo se může nacházet uvnitř buňky. Měří se odstranění aktivity nebo tvorby vazebných komplexů mezi GM1 nebo Gb3.

16.01.01

Jiný způsob stanovení navázání na GM1/Gb3 je použitím čištěného GM1/Gb3 pro potažení mikrotitračních destiček. Po blokování destiček se zkoumané činidlo aplikuje na destičku a nechá se reagovat před promytím a detekcí se specifickými protilátkami s uvedeným činidlem. Konjugace protilátek buď přímo nebo nepřímo s enzymem nebo s radioaktivní značkou umožňuje následnou kvantifikaci navázání buď za použití kolorimetrických nebo radioaktivních metod (test ELISA nebo RIA).

Jiný způsob navázání GM1/Gb3 je navázáním sacharidové části GM1/Gb3 na vhodnou kolonovou matrici, aby mohla proběhnout standardní afinitní chromatografie. Odstranění známých sloučenin aplikovaných na kolonu z ředidla se použije jako důkaz pro vazebnou aktivitu, kde směs sloučenin se aplikuje na kolonu. Eluce a následná analýza stanoví vlastnosti činidla vázaného na gangliozid. V případě proteinů analýza bude zahrnovat sekvenování peptidů a mapování tryptickým štěpením, pak následuje porovnávání s dostupnou databází. Jestliže eluované proteiny se nemohou identifikovat způsobem standardní biochemické analýzy, pak se pro další charakterizace sloučeniny použije například stanovení hmotnosti laserovou desorpční hmotnostní spektrofotometrií. Neproteinové látky, které se eluovaly z GM1-afinitních kolon se budou analyzovat pomocí HPLC a hmotnostní spektrofotometrií jednotlivých homogenních píků.

Jiným způsobem stanovení schopnosti vázat se na GM1/Gb3 a přesné afinity interakce bude použitím plasmonové povrchové rezonance, jak se popisuje v publikaci Kuziemko et al., (1996) Biochem. 35: 6375-6384).

V jiném případě vykázání fágů je možné použít při identifikaci vhodného činidla, které se váže na GM1 nebo Gb3.

16.01.01

Vykazování fágů je protokol molekulárního testování, které využívá rekombinantního bakteriofága. Technologie zahrnuje transformaci bakteriofága genem, který kóduje vhodný ligand (v tomto případě vhodného kandidáta jako činidlo), jenž je schopný reagovat s GM1/Gb3 (nebo jeho derivátem nebo homologem) nebo nukleotidovou sekvenci (nebo jeho derivát nebo homolog), která kóduje to samé. Transformovaný bakteriofág (který se přednostně váže na pevný povrch) exprimuje vhodný ligand (takový, jako je kandidát činidla) a objevuje se v obalu fága. Izolovaly se a amplifikovaly se entity (jako jsou buňky) nesoucí cílové molekuly, které rozeznávají kandidáta činidla. Úspěšný kandidát činidla se pak dále charakterizuje. Vykázání fága má ve srovnání se standardní technologie testování afinity ligandů jisté výhody. Na povrchu fága se objevuje kandidát činidla ve třírozměrné konfiguraci, která je velmi blízká jeho přirozené konfiguraci. To umožňuje specifické a vysoce afinitní navázání za účelem testování.

Jinou metodou testování je testování s vysokou propustností. testují se činidla, která mají vhodnou vazebnou afinitu vůči GM1 nebo Gb3 a testy se zakládají na metodě popsané v dokumentu WO 84/03564. Na pevném substrátu se syntetizovalo velké množství různých malých peptidových testovaných sloučenin, jako jsou plastové kuličky nebo některé jiné povrchy. Peptidová testovací činidla reagují s fragmenty cílových interakčních komponentů a promyjí se. Vázaný cílový interakční komponent se pak detekuje vhodnou adaptovanou metodou známou v oboru. Čištěný cílový interakční komponent se může také potáhnout přímo na plotny za účelem použití ve shora v textu popsané testovací metodě vhodné pro léky. V jiném případě se mohou pro zachycení peptidu použít protilátky, které nejsou neutralizující, a mobilizují ho na pevném povrchu.

Činidlo, které vykazuje GM1 nebo Gb3 vazebnou aktivitu je také schopné zesítění receptorů GM1 nebo Gb3. EtxB je jedno

16.01.01

takové činidlo, které je schopné zesítění receptorů GM1 na základě své pentamerní formy.

Existuje řada metod pro identifikaci činidel, které vykazují účinek na nitrobuněčnou signalizaci zprostředkovanou navázáním GM1/Gb3, ale které se sami neváží na GM1 nebo Gb3. Jestli například činidlo pozitivně reguluje CD25 nebo MHC třídy II na B buňkách nebo pozitivně reguluje CD25 nebo podporuje apoptózu buněk CD8+T nebo pozitivně reguluje vylučování Il-10 monocyty, není schopno se vázat na GM1 nebo Gb3 (což se prokáže jedním z vazebných testů, které se popisují shora v textu), pak je možné vytvořit závěr, že činidlo je schopné napodobit účinek navázání na GM1/Gb3.

Přehled obrázků na výkrese

Obrázek č. 1 znázorňuje stimulaci celkového Ig a IgA v séru (MS) a IgA v roztoku po promytí očí (EW) u myší imunizovaných HSV-1 glykoproteiny/rEtxB.

Obrázek č. 2 znázorňuje proliferaci T buněk (mezenterických mízních uzlin) MLN nebo (cervikálních mízních uzlin) CLN lymfocytů u myší imunizovaných HSV-1/rEtxB.

Obrázek č. 3 znázorňuje T buněčnou proliferaci buněk z MLN a CLN myší imunizovaných intranazálně HSV-1 Gp v přítomnosti 1 až 20 μg EtxB.

Obrázek č. 4 znázorňuje množství anti-HSV-1 serového Ig u myší po aplikaci glykoproteinů HSV-1 třikrát v desetidenních intervalech s různým množstvím rEtxB nebo rCtxB jako adjuvans.

Obrázek č. 5 znázorňuje omezení tvorby viru, klinického onemocnění a latence u myší imunizovaných HSV-1/rEtxB.

16.01.01

Obrázek č. 6 znázorňuje distribuci izotopu Ig v MS následující po infekci způsobené HSV-1 nebo po imunizaci HSV-1 Gp v přítomnosti EtxB nebo CtxB jako imunomodulátoru.

Obrázek č. 7 znázorňuje distribuci podtříd Ig po intranazální aplikaci HSV-1 Gp buď rETxB nebo rCtxB jako imunomodulátoru.

Obrázek č. 8 znázorňuje imunogenní účinek různého množství rEtxB nebo rCtxB na množství IgA specifických pro HSV-1 v roztoku po promytí očí, což následuje po aplikaci glykoproteinů HSV-1.

Obrázek č. 9 znázorňuje odezvu sérových imunoglobulinů po imunizaci myší HSV-1 nebo samotných napodobenin glykoproteinů (gp) nebo glykoproteinů v přítomnosti adjuvans.

Obrázek č. 10 znázorňuje sliznicové IgA v roztoku po vymytí očí po intranazální imunizaci myší HSV-1 nebo samotnými napodobeninami glykoproteinů nebo v přítomnosti adjuvans.

Obrázek č. 11 znázorňuje sliznicové IgA v roztoku po promytí vagíny po intranazální imunizaci myší HSV-1 nebo samotnými napodobeninami glykoproteinů (gp) nebo napodobeninami glykoproteinů v přítomnosti adjuvans.

Obrázek č. 12 znázorňuje množství imunoglubulinu specifického pro HSV-1 v séru myší imunizovaných glykoproteiny HSV-1 v přítomnosti různých dávek rEtxB jako adjuvans.

Obrázek č. 13 znázorňuje množství IgA v roztoku po promytí očí u myší imunizovaných glykoproteiny HSV-1 v přítomnosti různých koncentrací rEtxB.

Obrázek č. 14 znázorňuje množství IgA v roztoku po promytí vagíny u myší imunizovaných glykoproteiny HSV-1 v přítomnosti různých koncentrací rEtxB.

16.01.01

Obrázek č. 15 znázorňuje distribuci podtřídy IgG odezvy sérových protilátek na HSV-1 po intranazální imunizaci Ctx/CtxB nebo rEtxB nebo po oční infekci HSV-1.

Obrázek č. 16 znázorňuje produkci cytokinů z kultur buněk mízních uzlin, které se odebraly z myší infikovaných buď HSV-1 prostřednictvím skarifikace očí nebo se imunizovaly intranazální aplikací HSV-1 glykoproteinů Ctx/CtxB nebo rEtxB jako adjuvans.

Obrázek č. 17 znázorňuje stupeň ochrany před oční infekcí HSV-1 u myší imunizovaných intranazálně směsí HSV-1 nebo glykoproteiny v přítomnosti rEtxB jako imunomodulátoru.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: rEtxB se může pro účely imunizace používat ve spojení s HSV-1 Gp.

Myši se imunizovaly intranázalně třikrát 10 μg glykoproteinů HSV-1 (Gp) a buď s 10 nebo 20 μg rEtxB. Kontroly se buď neupravovaly nebo vznikly napodobeniny virového glykoproteinu získaného z tkáňových kultur buněk, které nejsou infikovány HIV. Množství protilátek se exprimuje jako procento množství po infekci. Produkce celkového množství Ig a IgA v séru a IgA v roztoku po promytí očí se stimulovalo HSV-1 glykoproteiny/rEtxB (obrázek č. 1). Ukázalo se, že dávky rEtxB, které jsou tak nízké jako je 0,1 μg, jsou stále účinné při stimulaci uvedené odezvy.

T-lymfocyty, které pocházejí z imunizovaných myší z cervikálních mízních uzlin (které tvoří vakcinační místo) a z mezenterických mízních uzlin (které jsou vzdáleny od vakcinačního místa), proliferují, když se kultivují in vitro

16.01.01

HSV-1, ale nikoliv, když se kultivují in vitro s napodobeninou HSV-1 Gp nebo bez antigenu (obrázek č. 2).

Proliferace T lymfocytů MLN a CLN myší imunizovaných HSV-1 Gp a kolísavé množství EtxB při odezvě HSV-1 Gp je zobrazeno na obrázku č. 3.

Produkce sérových Ig anti-HSV-1 u myší po aplikaci glykoproteinů HSV-1 ve třídenních intervalech s různými množství EtxB (nebo CtxB) je zobrazena na obrázku č. 4.

Nakonec se ukázalo, že myši imunizované HSV-1 a rEtxB vykazují zvýšenou tvorbu viru po skarifikaci rohovky HSV-1 (obrázek č. 5a) a omezení lokálního šíření (otok), rozšíření trigeminálního ganglionu (infekce zosteriformu), rozšíření na centrální nervový systém (encefalitida) a latenci ve srovnání s kontrolou (5b).

Příklad 2: rCtxB a rEtxB působí jako imunomodulátory

V případě, že EtxB se použije jako imunomodulátor, rozložení izotopu Ig je asymetrické (obrázek č. 6). Rozložení podtříd Ig se liší v závislosti na skutečnosti, zda se použije jako imunomodulátor rCtxB nebo rEtxb (obrázek č. 7).

Příklad 3: rEtxB je účinnější modulátor ve srovnání rCtxB

Množství IgA specifického pro HSV (obrázek č. 8) je po stimulaci rEtxB/HSV-1 Gp vyšší ve srovnání s rCtxB/HSV-1 Gp.

Příklad 4: (obrázek č. 9)

Myši se imunizovaly třikrát intranazálně se samotnými glykoproteiny HSV-1, napodobenými přípravky glykoproteinů HSV-1 (připravených tak, že se vezmou neinfikované tkáňové kultury buněk a vystavíme je stejnému režimu léčby jako ty buňky, které slouží pro izolaci a čištění protein HSV-1) nebo glykoproteiny HSV-1 v kombinaci s různými zdánlivými

16.01.01

slizničními adjuvans. V každém případě dávka glykoproteinů HSV-1 byla při imunizaci 10 μg a ty se kombinovaly s 10 μg rekombinantního EtxB nebo CtxB, které slouží jako adjuvans nebo směs 0,5 μg Ctx a 10 μg CtxB. Tři týdny po konečné imunizaci se sebraly vzorky krve a testem ELISA se změřilo celkové množství protilátek proti HSV-1. Množství protilátek se vykazuje jako procento množství stimulovaných po oční infekci vyvolané skarifikací s 10^5 pfu HSV-1 kmen SC16. Data (zobrazená na obrázku č. 9) ukazují, že nejsilnější sérová protilátková odezva se stimuluje, když se antigen kombinuje se směsí celého Ctx a CtxB. Silná odezva se však také stimuluje, když se rEtxB použije jako adjuvans. Naopak rCtxB je velmi slabé adjuvans.

Příklad 5 (obrázek č. 10)

Myši se imunizovaly jak se popisuje v příkladu 4. Sekreční produkce IgA v očích se testovaly tak, že se získaly roztoky vymytím slz z očí v po sobě jdoucích dnech a tyto vzorky se pak shromáždily a zkoumaly se testem ELISA za použití specifických protilátek, které detekují IgA. Množství protilátek se exprimuje jako procento množství stimulované po oční infekci vyvolané 10^5 pfu HSV-1 kmen SC16. Data jasně demonstrují (znázorněno na obrázku č. 10), že vysoké množství vylučovaných protilátek se produkuje po imunizaci v přítomnosti buď Ctx/CtxB nebo EtxB. Na rozdíl od výsledků analýzy sérové protilátkové odezvy neexistuje rozdíl v množství protilátek v očích mezi zvířaty imunizovanými Ctx/CtxB nebo EtxB, které slouží jako adjuvans. Stejně jako se sérovými protilátkami existuje jasný důkaz, že rCtxB je velmi slabé adjuvans.

Příklad 6: (Obrázek č. 11)

Myši se imunizovaly způsobem, který se popisuje v příkladu 4. Sekreční produkce IgA ve vagíně se testovala odebráním

16.01.01

roztoku po promytí pohlavních orgánů v po sobě jdoucích dnech a tyto vzorky se pak slily a testovaly se testem ELISA za použití specifických anti-IgA detekčních protilátek. Množství protilátek se vyjadřuje jako koncové titry, které se vypočítaly lineární regresní analýzou. Data jasně ukazují, že velké množství vylučovaných anti-HSV-1 protilátek se produkuje v jistých místech sliznice po imunizaci v přítomnosti buď Ctx/CtxB nebo EtxB. Ve vagíně se uvolňuje největší množství protilátek po imunizaci v přítomnosti rEtxB. Menší množství se uvolnilo po imunizaci Ctx/CtxB a k velmi malému vylučování dochází, když se jako adjuvans použije rCtxB.

Příklad 7: (obrázek č. 12)

Myši se imunizovaly třikrát intranazálně glykoproteiny HSV-1 (10 μg) a to buď samotnými nebo v přítomnosti zvyšující se dávky rEtxB, které slouží jako adjuvans. Tři týdny po konečné imunizaci se odebrala krev a množství anti-HSV-protilátek se testovalo testem ELISA. Množství protilátek se vyjádřilo jako procento množství vyvolané po oční infekci indukované skarifikací 10^5 pfu HSV-1 kmen SC16. Data jasně ukazují, že kapacita rEtxB vyvolat protilátkovou odezvu na heterologní přidané antigeny je jev závislý na dávce, kdy maximální odezva se objeví při dávce v množství 20 až 50 μg rEtxB. Dále je jasné, že při dávce 20 μg rEtxB je množství anti-HSV-1 protilátek stimulovaných intranazální infekcí srovnatelná nebo vyšší s množstvím vyvolané infekcí živým virulentním virem.

Příklad 8: (obrázek č. 13)

Myši se imunizovaly, jak se popisuje v příkladu 7. Sekreční produkce IgA v očích se stanovila získáním roztoků po vymytí slz v po sobě jdoucích dnech a tyto vzorky se pak slily a testovaly se testem ELISA za použití specifických anti-IgA detekujících protilátek. Množství protilátek se exprimuje

18.01.01

vyjadřuje jako procento množství stimulované po oční infekci vyvolané skarifikací 10^5 pfu HSV-1 kmen SC16. Data demonstrují, že maximální IgA odezva v očích se stimuluje, když se aplikují HSV-1 glykoproteiny v kombinaci s 20 μg rEtxB. Při této dávce Produkce IgA je nižší než produkce během virové infekce očí.

Příklad 9: (obrázek č. 14)

Myši se imunizovaly způsobem, který se popisuje v příkladu 7. Sekreční produkce IgA ve vagíně se stanovila tak, že se získaly roztoky po promytí pohlavních orgánů během po sobě jdoucích dní a tyto vzorky se pak slily a testovaly se testem ELISA za použití specifických anti-IgA detekujících protilátek. Množství protilátek se vykazuje jako konečné titry, které se vypočítaly lineární regresní analýzou. Data ukazují, že optimální anti-HSV-1 odezva se stimuluje ve vagíně, když se jako adjuvans použije 20 μg nebo více rEtxB.

Příklad 10: (obrázek č. 15)

Myši se infikovaly buď 10^5 pfu HSV-1 kmen SC16 skarifikací rohovky nebo třínásobnou nazální imunizací 10 μg glykoproteinů HSV-1 v kombinaci Ctx/CtxB nebo rEtxB. Tři týdny po konečné inokulaci se odebralo sérum a analyzovala se v něm testem ELISA přítomnost IgG1 IgG2 proti HSV-1. Množství protilátek se exprimovalo jako konečné titry, které se vypočítaly lineární regresní analýzou (obrázek č. 7a). Data jasně ukazují, že podstata protilátkové odezvy na HSV-1 je ovlivněna způsobem, jakým se antigeny prezentují imunitnímu systému. Infekce HSV-1 přednostně aktivuje produkci protilátek spojenou s Th1, jak se charakterizuje vysokým množstvím izotypu protilátek fixující komplement IgG2a. Infekce stimuluje relativně malé množství isotypu IgG spojeného s Th2 IgG1. Tento profil imunitní odezvy je jasně viditelný, když data se exprimují jako poměr IgG1:IgG2, jak se ukazuje na obrázku č. 7b. Poměr je po infekci podstatně nižší než 1. Intranazální imunizace

16.01.01

v přítomnosti Ctx/CtxB jako adjuvans umožňuje uvolnění IgG1 spojeného s Th2. Také se produkuje podstatné množství IgG2 , což naznačuje, že Ctx/CtxB způsobuje aktivaci buněk Th1 a Th2. Aktivace obou odezev a relativní dominance Th2 se odráží v poměru IgG1:IgG2, který je přibližně 3. Je zajímavé, že podstata odezvy na HSV-1 stimulovaná rEtxB, které slouží jako adjuvans, skoro exkluzivně dominuje Th2. Vysoké množství IgG1 vzniká pouze s malým množstvím IgG2a. Tento silný sklon směrem k Th2 odpovědi se odráží v hodnotě poměru IgG1: IgG2, která je přibližně 9.

Příklad 11: (obrázek č. 16)

Myši se infikovaly buď 10^5 pfu HSV-1 kmen SC16 skarifikací rohovky nebo se třikrát imunizovaly intranazálně 10 μg HSV-1 glykoproteiny v kombinaci s Ctx/CtxB nebo rEtxB. Tři týdny po konečné inokulaci se ze zvířat odstranily mízní uzliny a použily se k vytvoření suspenzí z jediné buňky, které se kultivovaly buď v přítomnosti mrtvých HSV-1 nebo napodobeniny přípravku viru z tkáňových kultur buněk, které nejsou infikovány. 4. a 7. den kultivace se odebraly vzorky a provedl se test cELISA, přičemž se projevilo vylučování cytokinů. Data jasně ukazují, že T-buňky v kulturách byly schopny odpovídat na HSV-1, ale nikoli na napodobeninu virového přípravku. Buňky mízních uzlin získané z myší, které se infikovaly HSV-1, produkují převážně cytokin spojený s Th1 γ-interferon (γ-IFN). Buňky mízních uzlin odebrané zvířatům , které se imunizovaly intranazálně produkovaly velké množství cytokinů spojených s Th2 IL-4 a IL-10. Navíc, jak Ctx/CtxB a rEtxB vedly k aktivaci T buněk, které vylučují γ-IFN po in vitro stimulaci pomocí HSV-1. To indikuje, že ačkoli při odezvě na adjuvans dominuje produkce cytokinů Th2, objevuje se také aktivace Th1. Toto zjištění odpovídá zjištění vycházející z analýzy protilátkové odpovědi.

16.01.01

2000-4147

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidla, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu, nebo činidla, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidla, které vykazuje účinek na nitrobuněčnou signalizaci zprostředkovaný navázáním na GM1 nebo Gb3

jako imunomodulátoru v případě vakcíny proti infekčním onemocnění.

2. Použití podle nároku 1, kde imunomodulátorem je EtxB, který neobsahuje celý toxin.

3. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde infekční onemocnění je to onemocnění, kde infekční agens je členem rodiny herpes virů.

4. Použití podle nároku 3, kde infekční onemocnění je způsobené infekčním agens a to se vybralo ze skupiny zahrnující HSV-1, HSV-2, EBV, VZV, CMV, HHV-6, HHV-7 a HHV-8.

5. Použití podle nároku 4, kde infekční agens se vybralo ze skupiny zahrnující HSV-1, HSV-2, CMV nebo EBV.

6. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde infekční onemocnění je způsobeno infekčním agens a infekční agens je virus influenzy.

7. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde infekční onemocnění je způsobeno infekčním agens a to je virus parainfluenzy.

8. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde infekční onemocnění je způsobené infekčním agens a infekční agens je respirační syncytiální virus.

9. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde infekční onemocnění je způsobeno infekčním agens a infekční agens je virus hepatitidy.

10. Použití podle nároku 9, kde infekční agens se vybralo ze skupiny zahrnující virus hepatitidy A, B, C a D.

16.01.01

11. Použití podle nároku 10, kde infekční agens je virus hepatitidy A nebo C.

12. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde infekční onemocnění je meningitida.

13. Použití podle nároku 12, kde infekční onemocnění je způsobené infekčním agens a infekční agens se vybralo ze skupiny obsahující *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae typ B a Streptococcus pneumoniae.*

14. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde infekční onemocnění je pneumonia nebo infekce dýchacích cest.

15. Použití podle nároku 14, kde infekční onemocnění je způsobené infekčním agens a infekční agens se vybralo ze skupiny, která zahrnuje *Streptococcus pneumoniae, Legonella pneumophila a Mycobacterium tuberculosis.*

16. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde infekční onemocnění je pohlavně přenosné onemocnění.

17. Použití podle nároku 16, kde infekční onemocnění je způsobeno infekčním agens a infekční agens se vybralo ze skupiny zahrnující *Neisseria gonnorheae,* HIV-1, HIV-2 a *Chlamydia trachomatis.*

18. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde infekční onemocnění je gastrointestinální onemocnění.

19. Použití podle nároku 18, kde infekční onemocnění je způsobené infekčním agens a infekční agens se vybralo ze skupiny, která zahrnuje enteropatogenní, enterotoxigenní, enteroinvazivní, enterohemoragické a enterokumulativní *E. coli,* rotavirus, *Salmonella enteritidis, Salmonella typhi, Helicobacter pylori, Bacillus cereus, Campylobacter jejuni a Vibrio cholerae.*

20. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde infekční onemocnění je superficiální infekce.

21. Použití podle nároku 20, kde infekční onemocnění je způsobeno infekčním agens a infekční agens se vybralo ze

skupiny zahrnující *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes a Streptococcus mutans.*

22. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde infekční onemocnění je parazitické onemocnění.

23. Použití podle nároku 22, kde infekční onemocnění je způsobené infekčním agens a infekční agens se vybralo ze skupiny zahrnující malárii, *Trypanasoma spp., Toxoplasma gondii, Leishmania donovani a Oncocerca spp.*.

24. Vakcinační prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je vhodný pro použití proti infekčnímu onemocnění, které je způsobené infekčním agens, přičemž vakcinační prostředek obsahuje antigenní determinantu a imunomodulátor vybraný z

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu, nebo činidlo, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo, které vykazuje účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3,

kde uvedená antigenní determinanta je antigenní determinanta uvedeného antigenního agens.

25. Vakcinační prostředek podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e infekční onemocnění je HSV-1 infekce a antigenní determinantou je antigenní determinanta HSV-1.

26. Vakcinační prostředek podle nároku 24 nebo 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e imunomodulátorem je EtxB bez celého toxinu.

27. Vakcinační prostředek podle nároku 24, 25 nebo 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e imunomodulátor a antigenní determinanta jsou oddělené části.

28. Vakcinační prostředek podle nároku 24, 25 nebo 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e imunomodulátor a

antigenní determinanta jsou spojeny síťovadlem se dvěmi funkcemi.

29. Sada vhodná pro vakcinaci savce proti infekčnímu onemocnění, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje

a) jedno z následujících činidel:

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu, nebo činidlo, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo, které vykazuje účinek na nitrobuněčnou signalizaci zprostředkovanou navázáním na GM1 nebo Gb3 a

b) antigenní determinantu, která je antigenní determinantou infekčního onemocnění a je vhodná pro společnou aplikaci s uvedeným vakcinačním imunomodulátorem.

30. Způsob prevence a léčby onemocnění hostitele, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje inokulaci uvedeného hostitele vakcínou, která obsahuje alespoň jednu antigenní determinantu a imunomodulátor, kterým je:

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu, nebo činidlo, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo, které vykazuje účinek na nitrobuněčnou signalizaci zprostředkovaný navázáním na GM1 nebo Gb3.

31. Použití

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidla, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu, nebo činidla, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidla, které vykazuje účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3

k pozitivní regulaci produkce protilátek na povrchu sliznice.

32. Použití

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidla, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu, nebo činidla, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidla, které vykazuje účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3 a

jako imunomodulátoru ve vakcíně, aby se u savce prodloužila prezentace antigenu a vznikla trvalá imunologická paměť.

33. Vakcinační kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je vhodná pro použití proti infekčnímu onemocnění, které je způsobeno infekčním agens, přičemž vakcína obsahuje antigenní determinantu a imunomodulátor vybraný z

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidlo, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu, nebo činidlo, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidlo, které vykazuje účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3, kde

uvedená antigenní determinanta je antigenní determinanta uvedeného infekčního agens a kde imunomodulátor prodlužuje prezentaci antigenní determinanty a vzniká trvalá imunologická paměť.

34. Použití

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidla, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu, nebo činidla, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

16.01.01

(iii) činidla, které vykazuje účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3,

v konjugátu s antigenem nebo s antigenní determinantou pro cílové zavedení uvedeného antigenu nebo antigenní determinanty do cytozolu nebo do jádra buňky prezentující antigen.

35. Použití

(i) EtxB, CtxB nebo VtxB bez celého toxinu,

(ii) činidla, které je jiné než EtxB nebo CtxB a které vykazuje GM1-vazebnou aktivitu, nebo činidla, které je jiné než VtxB a které vykazuje Gb3-vazebnou aktivitu nebo

(iii) činidla, které vykazuje účinek na nitrobuněčné signalizační jevy zprostředkované navázáním na GM1 nebo Gb3

v konjugátu s antigenem nebo s antigenní determinantou pro pozitivní regulaci prezentace uvedené antigenní determinanty nebo antigenní determinanty získané z uvedeného antigenu molekulami MHC třídy I.

36. Vakcinační prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje

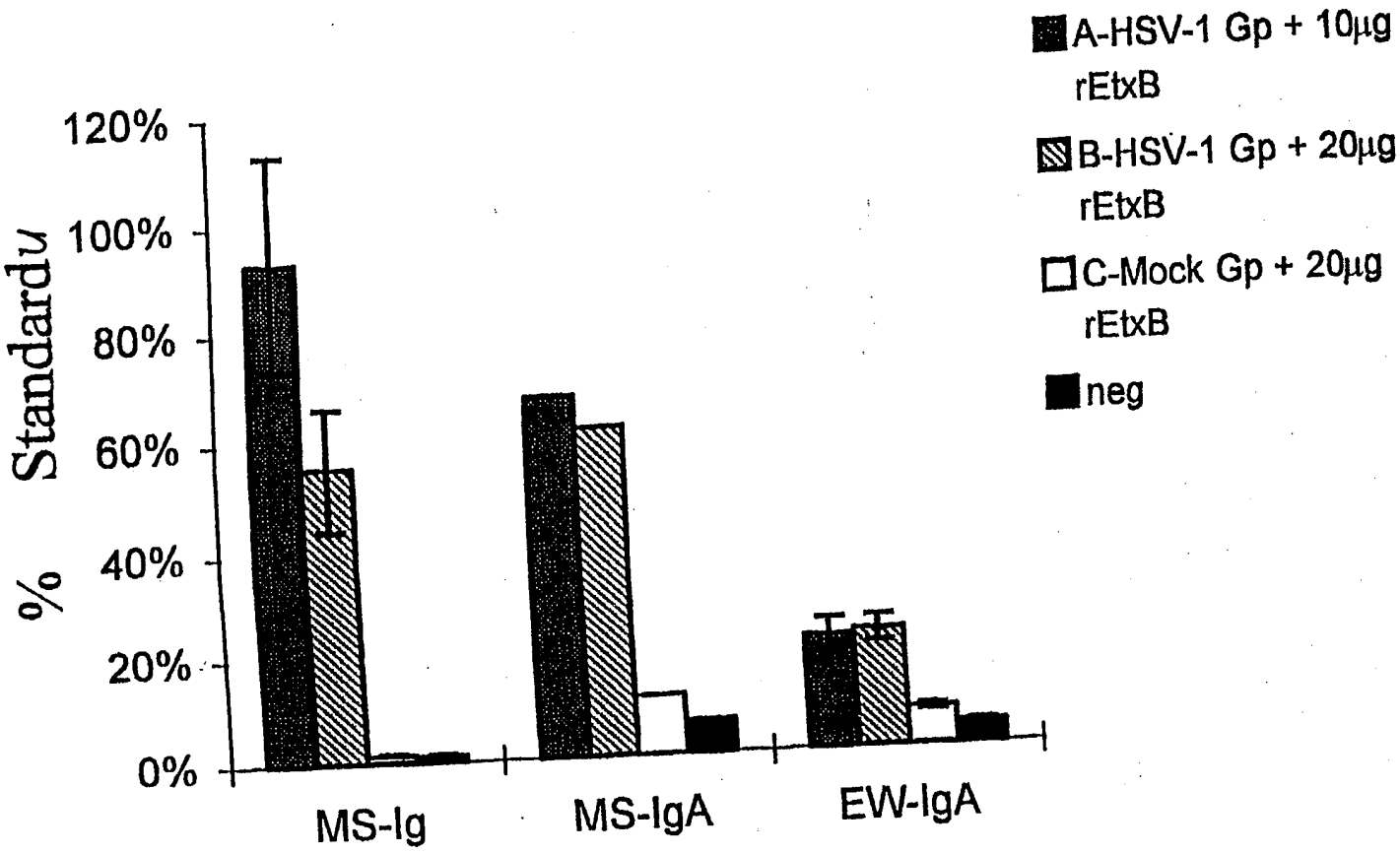
a) EtxB, CtxB nebo činidlo jiné než EtxB nebo Ctx, které vykazuje GM1 vazebnou kapacitu a

b) antigen EBV,

které jsou vhodné pro použití při léčbě a/nebo prevenci onemocnění spojené s EBV.

37. Terapeutická kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje EtxB, CtxB nebo činidlo jiné než EtxB nebo CtxB, které vykazuje GM1-vazebnou kapacitu, a je vhodná pro použití při léčbě onemocnění spojené s EBV.

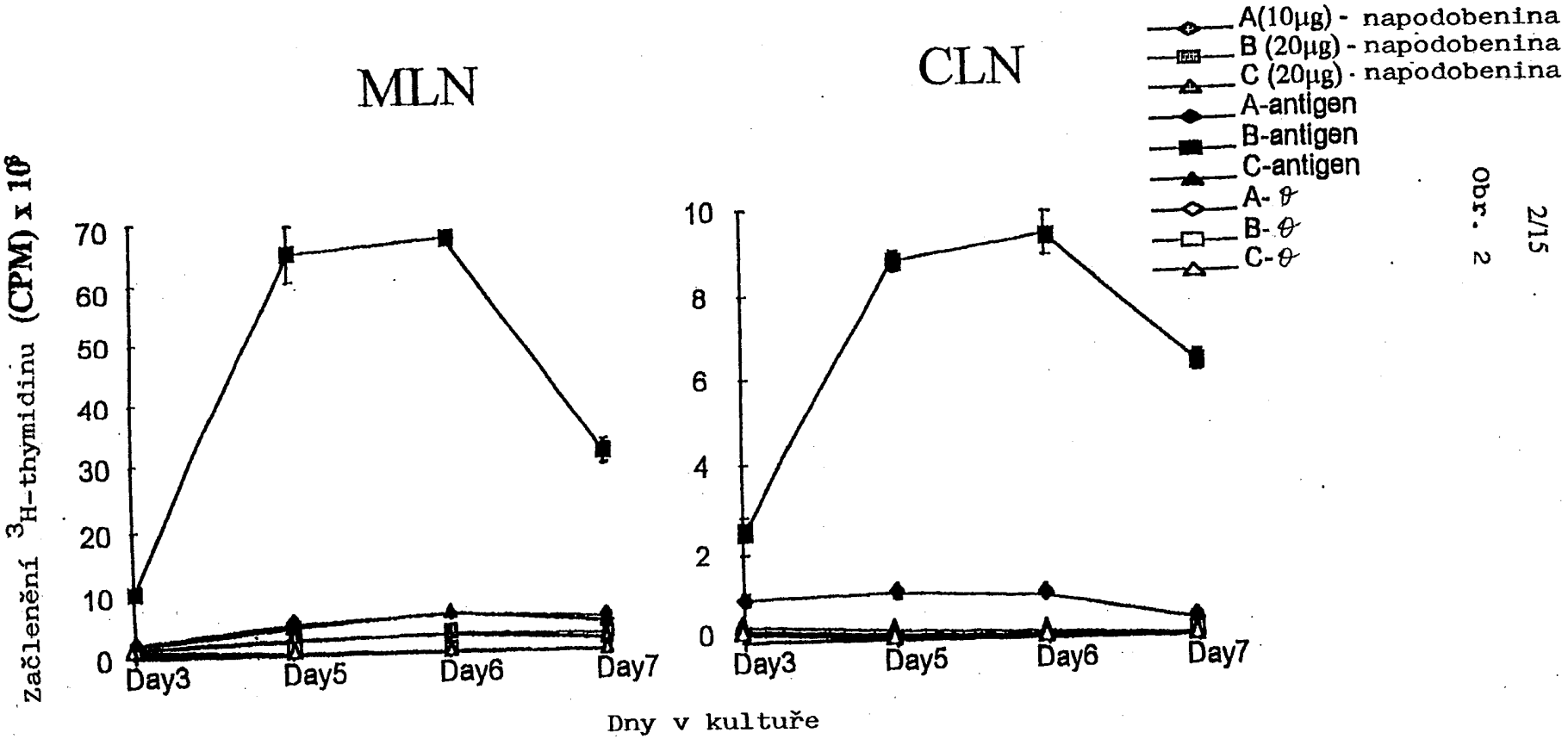
Úroveň Ig nebo IgA v MS nebo IgA v EW ve srovnání s hodnotami pro kontrolní myši po imunizaci HSV-1 nebo napodobeninou Gp s různým množstvím rETxB. Mock = napodobenina



1/15
obr. 1

2000-4147

Proliferace T-buněk MLN nebo CLN lymfocytů u myší po podání HSV-1 glykoproteinů (gp) s 10 μg (A), 20 μg (B) rEtxB nebo napodobeninou Gp s 20 μg rEtxB (C) intranasálně při pěstování in vitro s HSV-1, napodobeninou nebo bez antigenu

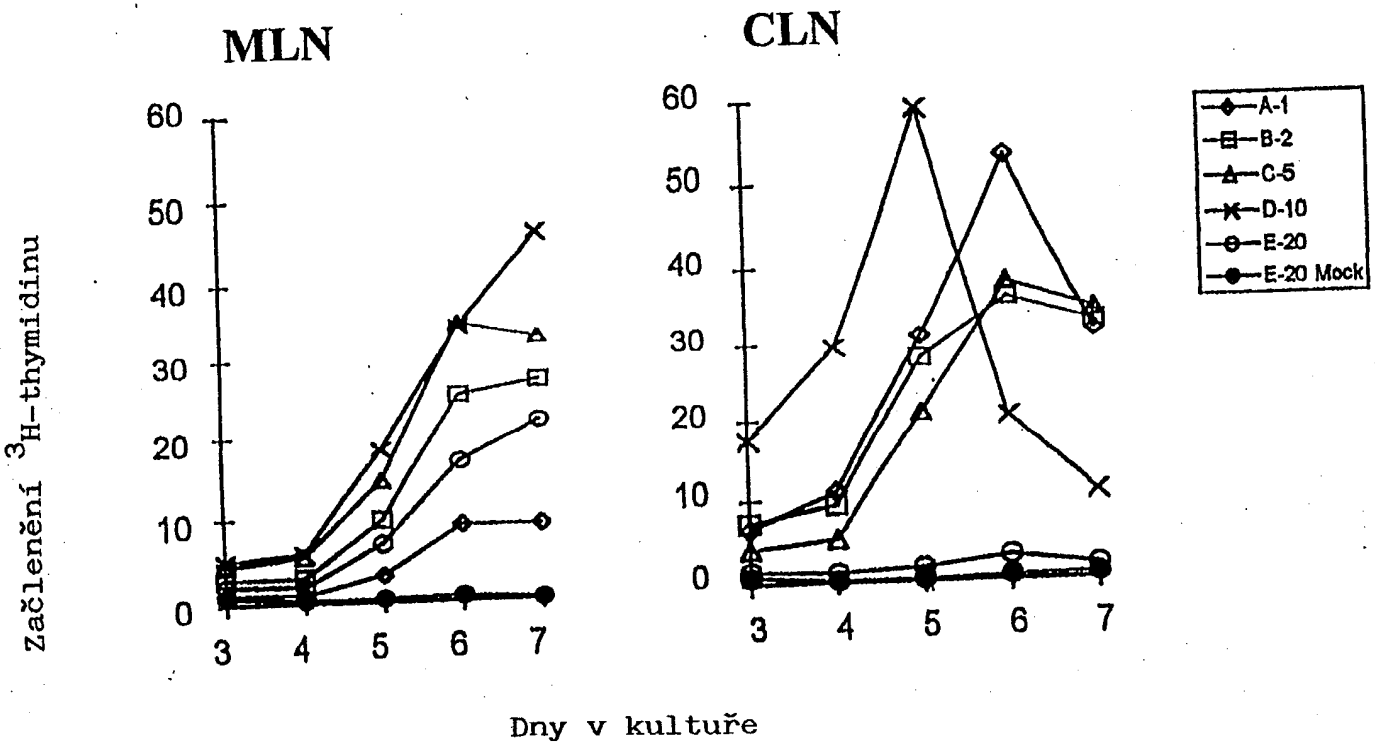


Obr. 2

2/15

2000-9174

Proliferaceč T-buněk MLN a CLN myší, imunizovaných intranasálně HSV-1 Gp v přítomnosti 1 až 20 μG EtxB jako pomocného činidla . Mock = napodobenina

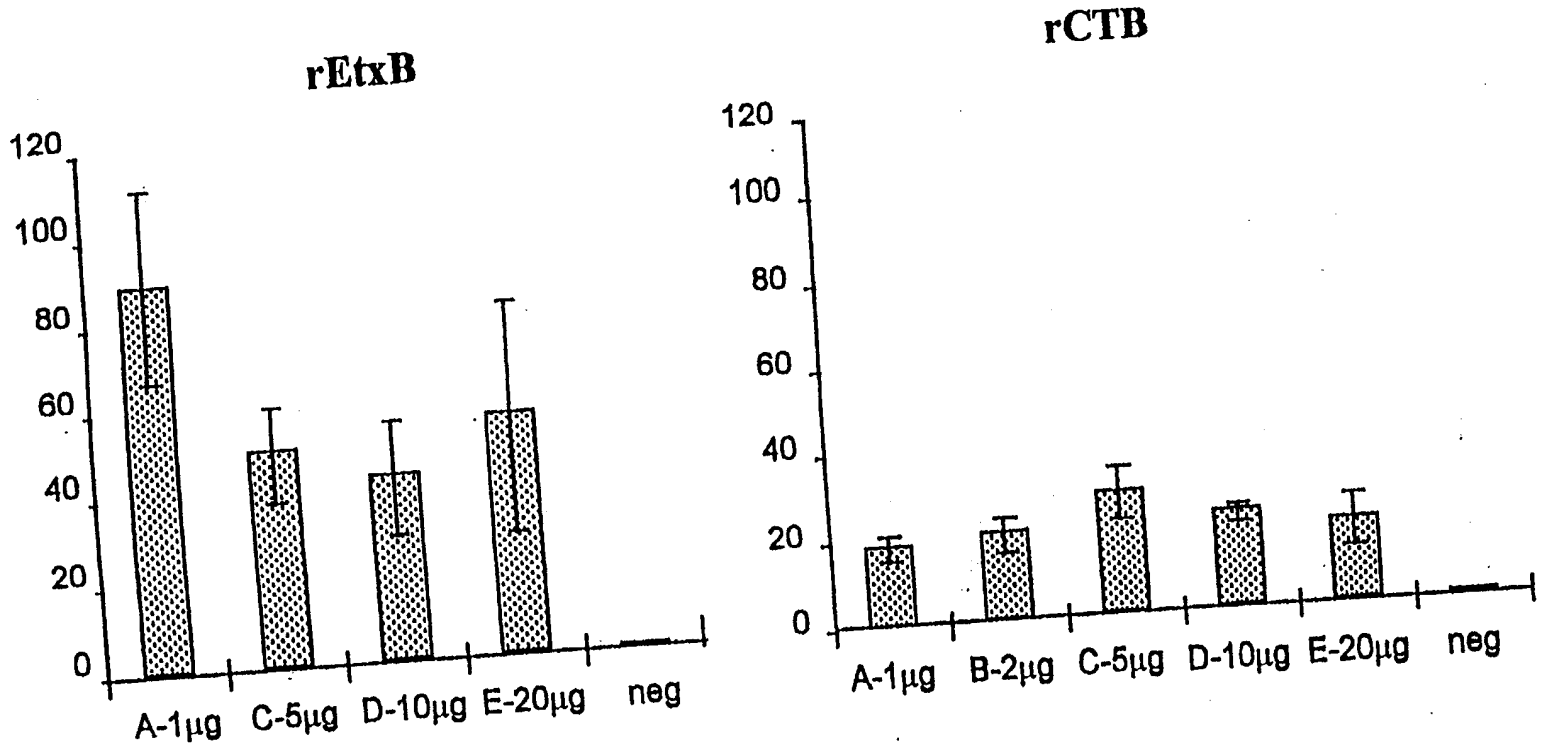


3/15

Obr. 3

2000-4147

Anti-HSV-1 serum 1 Ig u myší po podání HSV-1 glykoproteinů 3krát v intervalech 10 dnů s různým množstvím rEtxB nebo rCTB jako pomocné látky



Obr. 4

2000-4147

Obr. 5a. Množství viru v oku po skarifikaci rohovky u myší s HSV-1 (SC16).

Dny po infekci	10μg rEtxB + HSV-1 gp (%)[1]	20μg rEtxB + HSV-1 gp (%)	20μg rEtxB + napodobenina gp[2](%)
1	0	30	60
2	60	80	95
3	60	80	95
6	10	0	70
7	10	0	70
8	0	0	10
9	0	0	0

[1] Procento zvířat, u nichž bylo možno po promytí oka v sekretu prokázat přítomnost živých částic viru, tvořících plaky.

[2] Simulovaně infikovaná zvířata obdržela glykoproteiny, připravené z neinfikované tkáně buněk v kultuře.

Obr. 5b. Klinické onemocnění po skarifikaci rohovky u myší s HSV-1 (SC16).

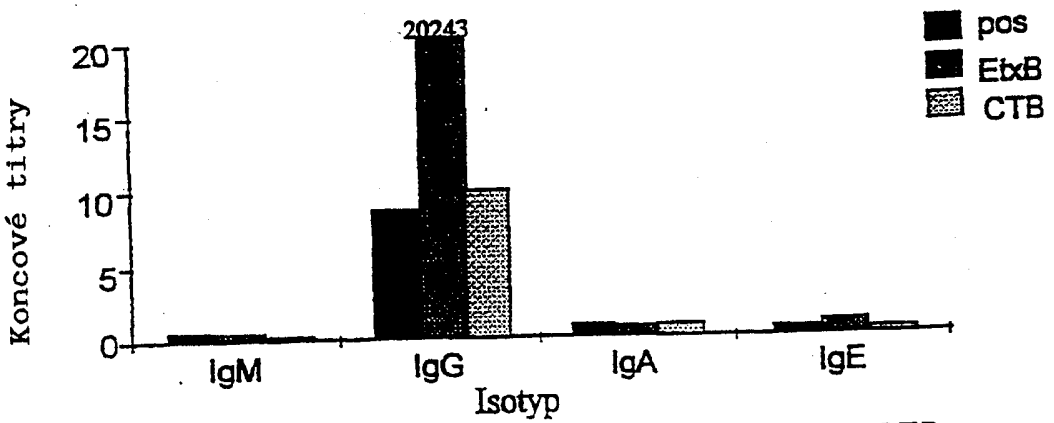
	Vředy rohovky[2] (%)	Otok (%)	Změny víček (%)	Zosteri-formní infekce (%)	Encefa-litis (%)	Latence[1] (%) TG1	TG2	TG3
10μg rEtxB +HSV-1 gp	80	0	0	0	0	22	11	0
20μg rEtxB +HSV-1 gp	70	0	0	0	0	80	10	0
20μg rEtxB +napod. gp	80	45	55	40	40	83	30	16

[1]Latence byla stanovena extrakcí ganglia trigeminu TG z přežívajících myší 2 měsíce po infekci s následným společným pěstováním s buňkami Vero. Uvedená čísla jsou pro každý lalok TG (TG1, TG2, TG3).

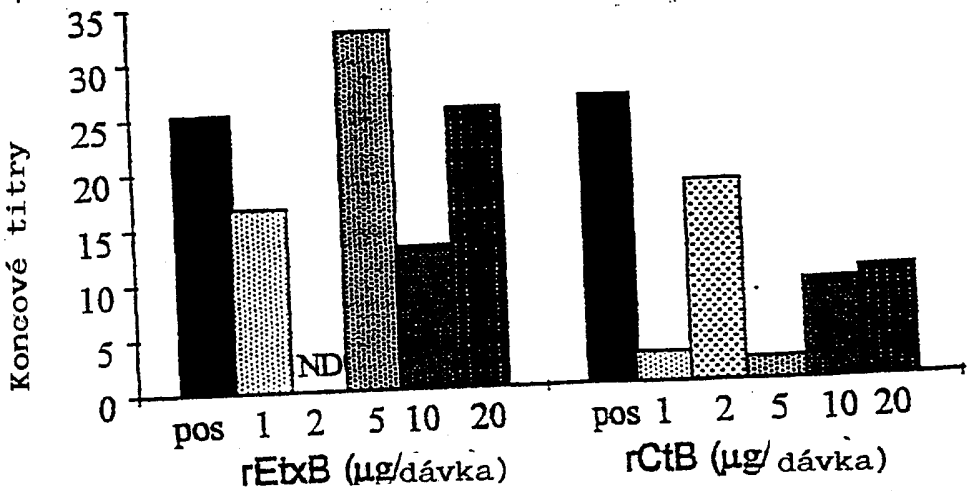
[2]Čísla znamenají procento zvířat s popsanými příznaky v průběhu akutní infekce. Každá myš byla denně sledována v průběhu prvních 11 dnů infekce.

N = 15 ve skupině

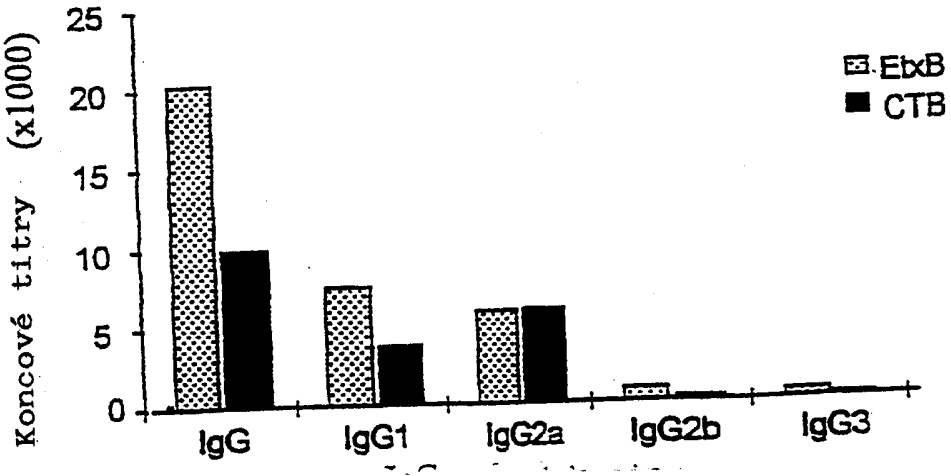
Obr. 6. Distribuce isotypu Ig v MS myší po infekci (pos) nebo po imunizaci HSV-1 Gp v přítomnosti EtxB nebo CTB jako pomocné látky



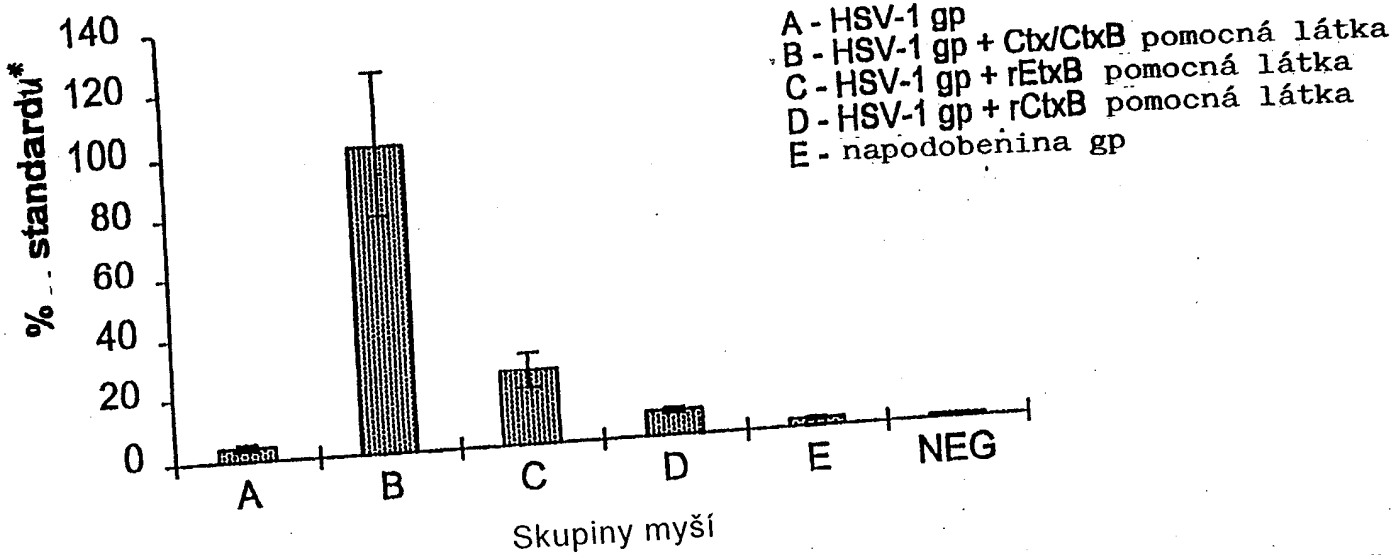
Obr. 7. Pomocný účinek různých množství rEtxB nebo rCTB na množství IgA, specifického pro HSV-1 v promývací vodě z očí po podání HSV-1 glykoproteinu.



Obr. 8. Distribuce podskupin po podání HSV-1 Gp intranasálně spolu s rEtxB nebo rCTB jako pomocné látky.



Tvorba imunoglobulinu v séru po imunizaci myší HSV-1 nebo napodobeninou glykoproteinu (gp) popřípadě v přítomnosti pomocné látky



Obr. 9

7/15

*množství protilátek bylo měřeno pomocí ELISA a vyjádřeno v procentech množství, stimulovaného oční infekcí, vyvolanou skarifikací při použití 10^5 pfu HSV-1, kmen SC16.

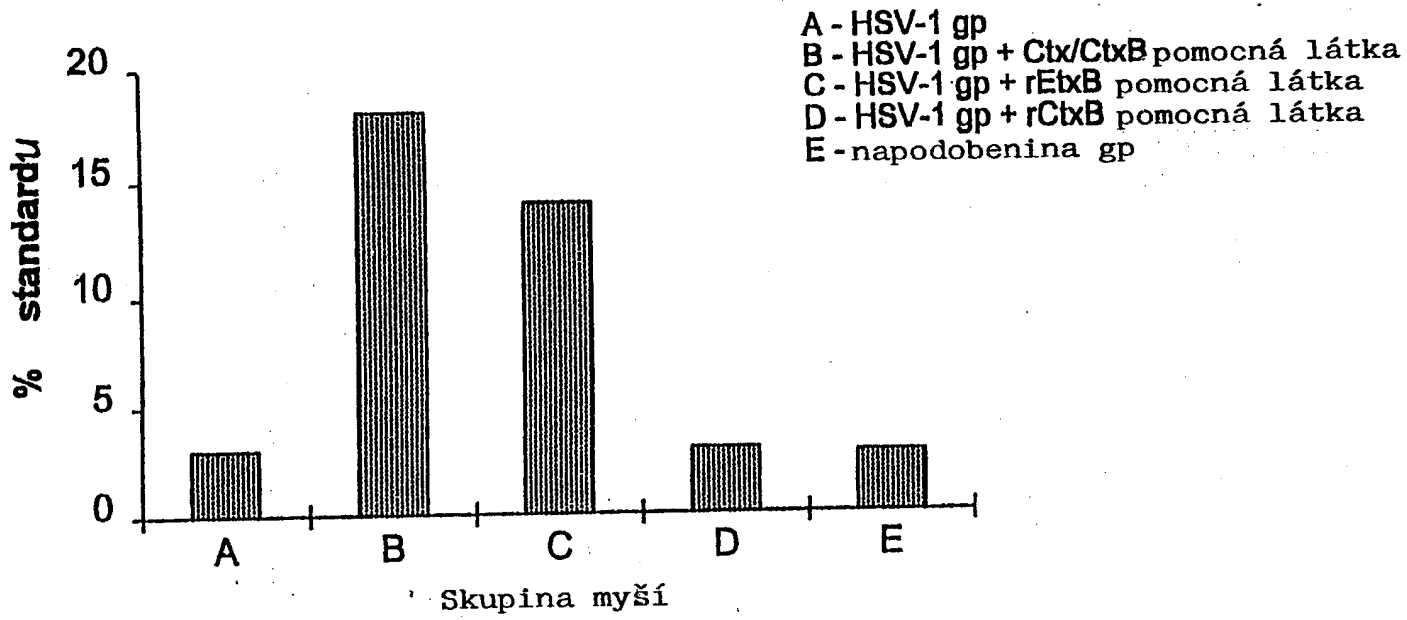
Ctx/CtxB = 0,5 μg Ctx + 10 μg CtxB

rEtxB = 10 μg rekombinantního EtxB

gp = 10 μg HSV-1 nebo napodobenina glykoproteinu, jak je uvedeno

P000-414

Slizniční IgA v promývací kapalině z oka po intranasální imunizaci myši s použitím HSV-1 nebo napodobeniny glykoproteinu (gp), popřípadě v přítomnosti pomocné látky



Obr. 10

množství protilátek bylo měřeno pomocí ELISA a vyjádřeno v procentech množství, stimulovaného oční infekcí, vyvolanou skarifikací při použití 10^5 pfu HSV-1, kmen SC16.

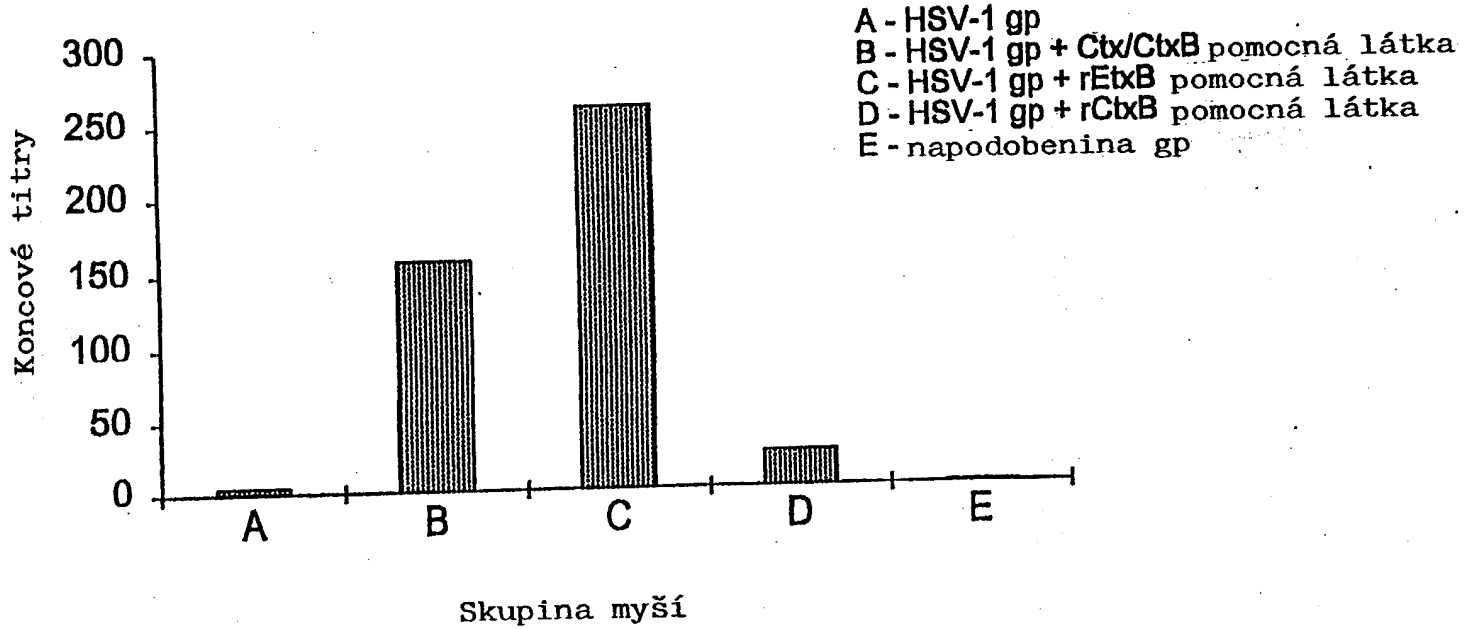
Ctx/CtxB = 0,5 μg Ctx + 10 μg CtxB

rEtxB = 10 μg rekombinantního EtxB

gp = 10 μg HSV-1 nebo napodobenina glykoproteinu, jak je uvedeno

PV 2000-4144

Slizniční IgA v promývací kapalině z pochvy po intranasální imunizaci myši s použitím HSV-1 nebo napodobeniny glykoproteinu (gp), popřípadě v přítomnosti pomocné látky



Obr. 11

množství protilátek bylo měřeno pomocí ELISA a vyjádřeno v koncovém bodě titrace, vypočítaném lineární regresní analýzou

Ctx/CtxB = 0,5 μg Ctx + 10 μg CtxB

rEtxB = 10 μg rekombinantního EtxB

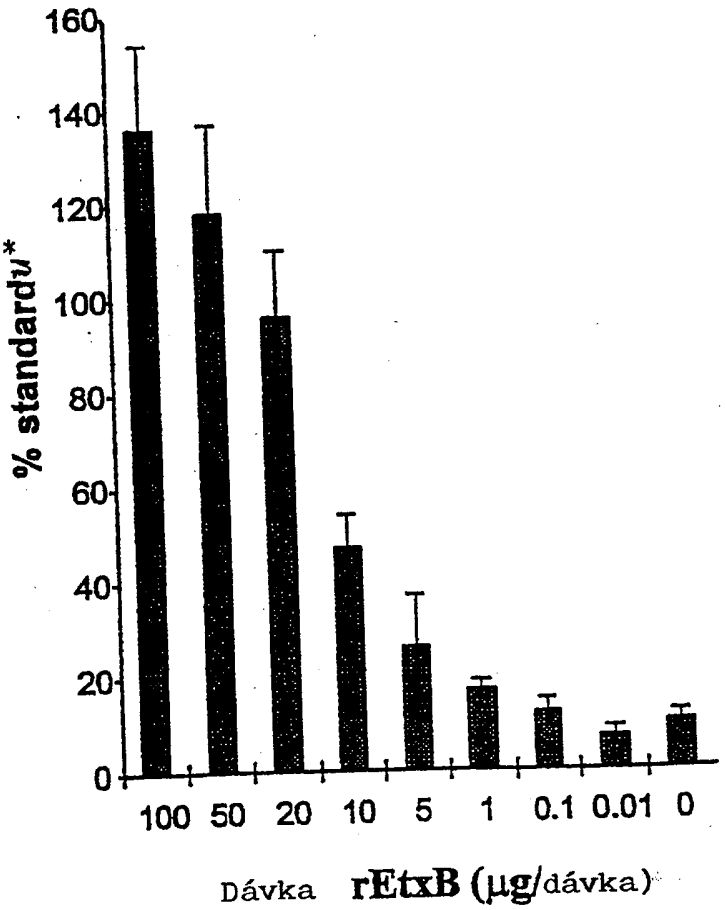
gp = 10 μg HSV-1 nebo napodobenina glykoproteinu, jak je uvedeno

2000-4147

16.01.01
2000-4147

Obr. 12

Úroveň imunoglobulinů, specifických pro HSV-1 v séru myší, imunizovaných HSV-1 glykoproteiny v přítomnosti různých dávek rEtxB jako pomocné látky

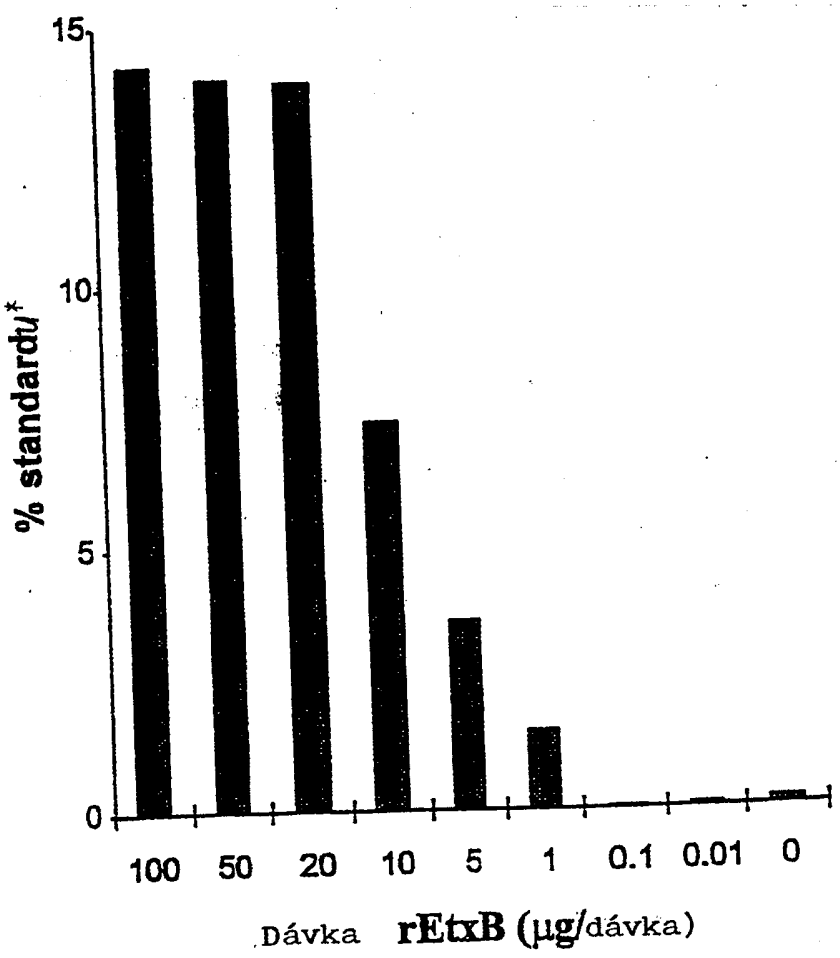


* koncentrace protilátek byla stanovena pomocí ELISA vyjádřeno v procentech množství, stimulovaného oční infekcí, vyvolanou skarifikací rohovky při použití 10^5 pfu HSV-1, kmen SC16

16.01.01
2000-4147

Obr. 13

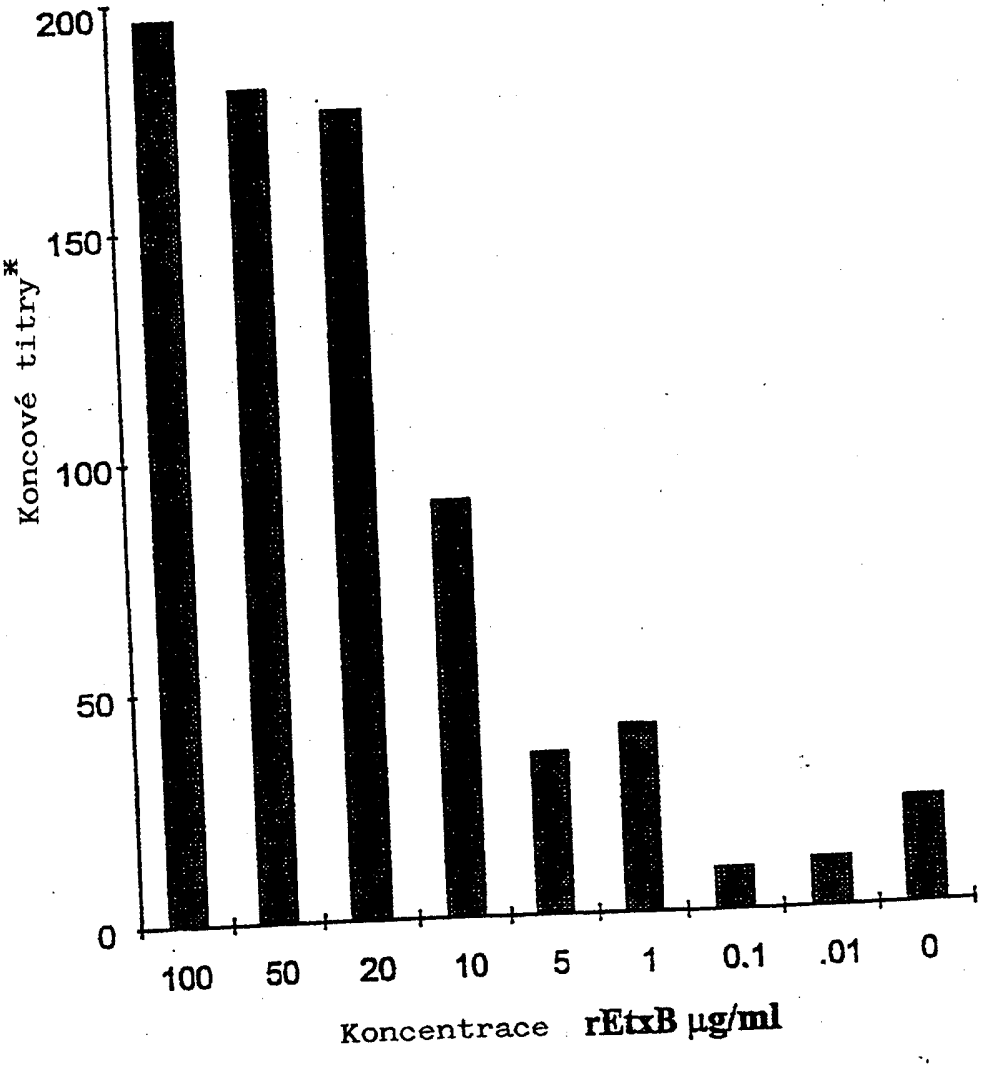
Koncentrace IgA v promývací kapalině z oka myší, imunizovaných HSV-1 glykoproteiny v přítomnosti různé koncentrace rEtxB



* koncentrace protilátek byla stanovena pomocí ELISA vyjádřeno v procentech množství, stimulovaného oční infekcí, vyvolanou skarifikací rohovky při použití 10^5 pfu HSV-1, kmen SC16

Obr. 14

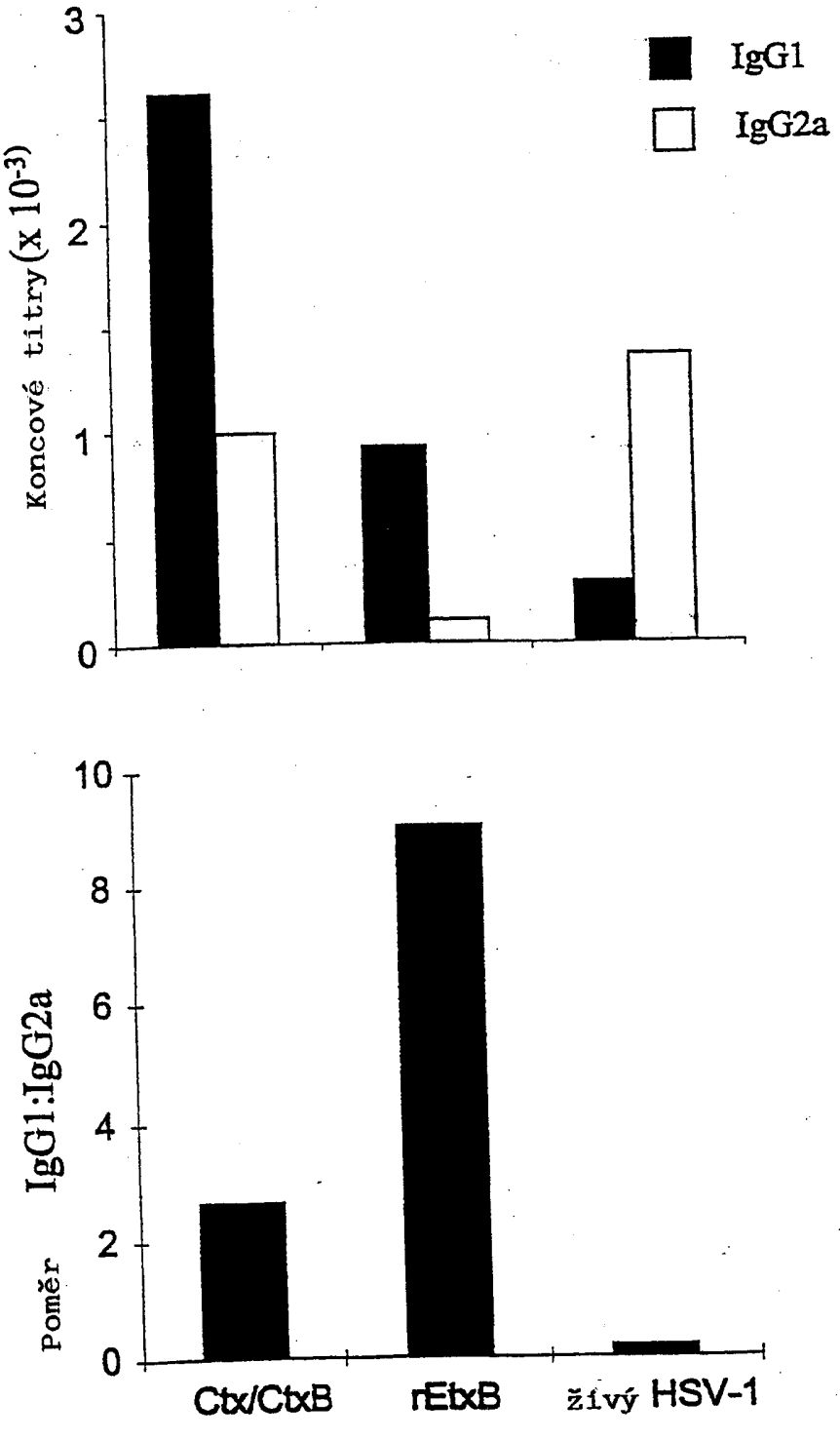
Koncentrace IgA v promývací kapalině z pochvy myší, imunizovaných HSV-1 glykoproteiny v přítomnosti různé koncentrace rEtxB



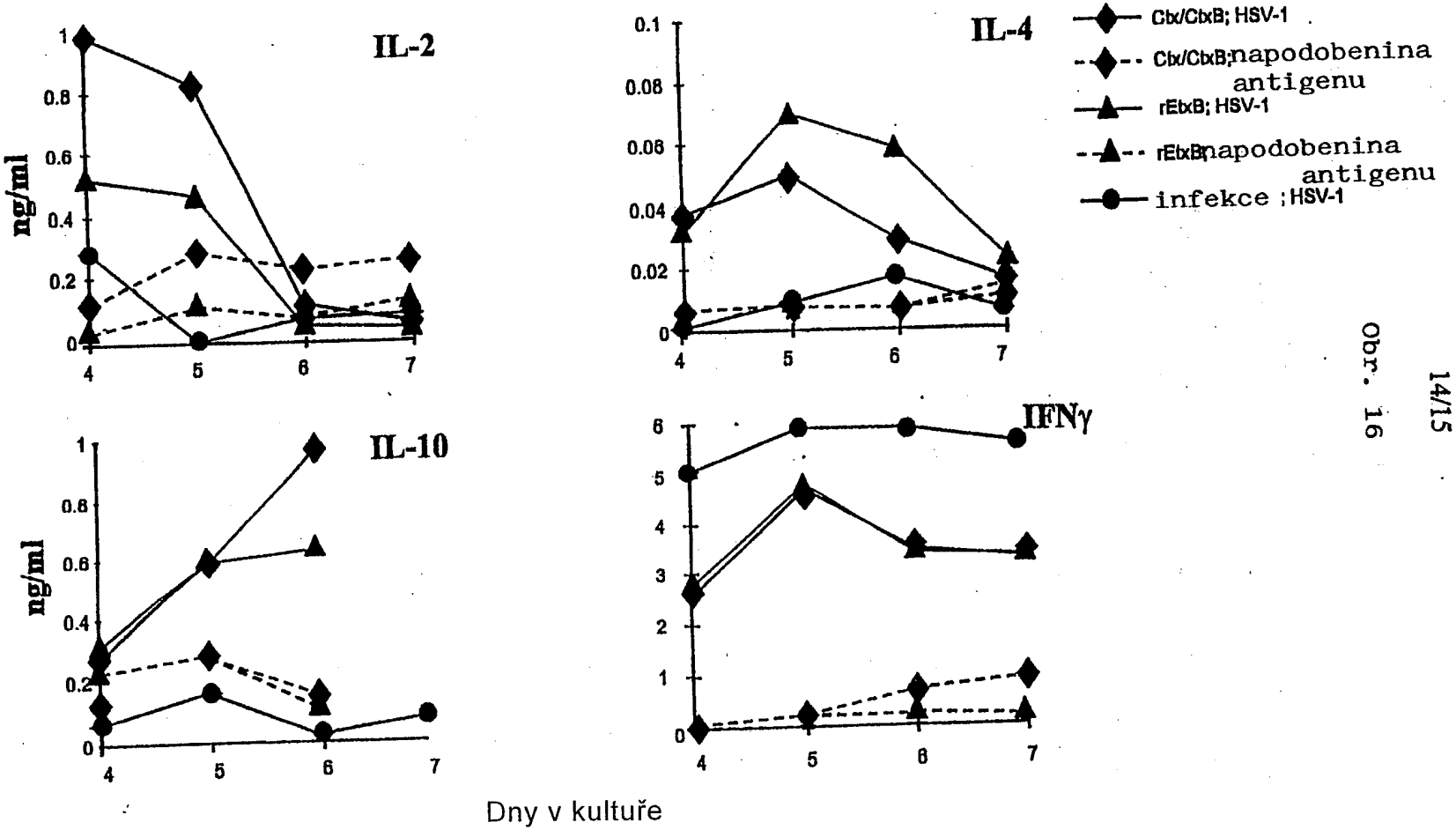
*množství protilátek bylo měřeno pomocí ELISA a vyjádřeno v koncovém bodě titrace, vypočítaném lineární regresní analýzou

Obr. 15

Distribuce podskupiny IgG sérových protilátek proti HSV-1 po intranasální imunizaci s použitím Ctx/CtxB nebo rEtxB nebo po oční infekci HSV-1



Produkce cytokinů z kultur buněk lymfatických uzlin myší, infikovaných HSV-1 skarifikací rohovky nebo imunizovaných intranasálním podáním HSV-1 glykoproteinů spolu s Ctx/CtxB nebo rEtxB jako pomocnou látkou



Obr. 16

14/15

Cytokiny byly stanoveny pomocí cELISA a množství bylo vypočítáno proti standardní křivce, připravené s použitím rekombinantních cytokinů. Hodnoty jsou z kultur myší, imunizovaných intranasálně 10 μg HSV-1 glykoproteinů s Ctx/CtxB nebo rEtxB jako pomocnou látkou a pěstovaných s usmrceným HSV-1 nebo stejně zpracovanou napodobeninou viru (napodobenina antigenu).

PV 2000-4174

Obr. 17

Úroveň ochrany proti oční infekci HSV-1 u myší, imunizovaných intranasálně směsí HSV-1 nebo napodobeniny glykoproteinů v přítomnosti rEtxB jako pomocné látky

Imunizace	Vředy rohovky (%)	Opacita/ /otok (%)	Změny víček (%)	Zosteriformní infekce (%)	Encefalitis (%)	Latence (%) TGI	TGII	TGIII
10μg HSV-1 gp +10μg rEtxB v dávce	69[1]	10	0	3	0	22	11	0
10μg napod. gp +10μg rEtxB v dávce	80[2]	68	74	72	50	83	30	16

[1]n = 29

[2]n = 30

2000-4147