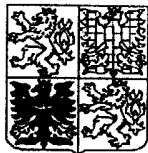


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

288 048

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1994 - 150

(22) Přihlášeno: 24.07.1992

(30) Právo přednosti:
25.07.1991 US 1991/735069

(40) Zveřejněno: 13.07.1994
(Věstník č. 7/1994)

(47) Uděleno: 08.02.2001

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 11.04.2001
(Věstník č. 4/2001)

(86) PCT číslo: PCT/US92/06193

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 93/01831

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:
A 61 K 39/00
A 61 P 39/00

(73) Majitel patentu:

IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION,
San Diego, CA, US;

(72) Původce vynálezu:

Raychaudhuri Syamal, San Diego, CA, US;
Rastetter William H., Rancho Santa Fe, CA, US;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard ing. patentový zástupce, U průhonu 36,
Praha 4, 17000;

(54) Název vynálezu:

**Farmaceutická kompozice k indukci
cytotoxické odpovědi T-lymfocytů**

(57) Anotace:

Popisuje se farmaceutická kompozice k indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů, která obsahuje antigen indukující v kombinaci s níže definovaným mikrofluidizovaným antigenním přípravkem cytotoxickou odpověď T-lymfocytů specifickou pro tento antigen, ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím alespoň dvě složky vybrané ze skupiny zahrnující stabilizující detergent, agens vytvářející micely, a biodegradabilní a biokompatibilní olej, kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě, s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin. Tuto kompozici lze využít k léčení lidí a zvířat, například při léčení infekce HIV, malárie, chřipky, hepatitidy, rakoviny, infekce herpetickým virem nebo infekce syncytiálním virem respiračního traktu.

CZ 288048 B6

Farmaceutická kompozice k indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytůOblast techniky

5

Vynález se týká farmaceutických kompozic použitelných k indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů u lidí, jakož i u domestikovaných nebo zemědělských zvířat.

10 Dosavadní stav techniky

Cytotoxické T-lymfocyty (CTL) jsou považovány za hlavní obranný mechanismus hostitele jako odpověď na různé virové infekce a neoplastické nebo nádorové bujení. Tyto buňky eliminují infikované nebo transformované buňky tím, že rozpoznávají antigenní fragmenty asociované s různými molekulami (nazývanými třídou I MHC molekul) na infikovaných nebo transformovaných buňkách. CTL mohou být indukovány experimentálně cytoplazmatickým zatížením specifických buněk jistými rozpustnými antigeny. Imunizace samotným rozpustným antigenem je obecně nedostačující pro specifickou cytotoxickou indukci T-lymfocytů.

20 Jedna metoda, pomocí které může být indukována CTL odpověď, zahrnuje použití rekombinantní techniky k začlenění kritických komponent dotyčného antigenu do genomu benigního infekčního agens. Účelem takovéto strategie je vytvoření antigen-specifické cytotoxické T-lymfocytární odpovědi na žádaný epitop vystavením hostitele mírné, sebeomezující infekci. Byly popsány chimérické vektory používající vaccinia, polio, adeno- a retro-virů, jakož i bakterií, jako je Listeria a BCG. Například Takahashi a sp. 85 Proc. Natl. Acad. Sci., USA 3105, 1988, popisují použití rekombinantního vaccinia viru exprimujícího HIV gp160 obalový gen, jako účinného prostředku k indukci cytotoxických T-lymfocytů.

30 Druhá metoda, kterou lze indukovat buněčně zprostředkovanou odpověď se týká použití adjuvans. Ačkoli použití adjuvans bylo široce diskutováno, není dosud jasné jakým způsobem je buněčně zprostředkovaná imunita indukována, zda tato buněčně zprostředkovaná imunita zahrnuje v sobě cytotoxicitu, za níž odpovídají T-lymfocyty. V následujícím jsou uvedeny reprezentativní publikace v této oblasti.

35 Stover a sp., 351 Nature 456, 1991 (nepřijatelný jakožto prioritní způsob k současné aplikaci) popisují CTL odpověď na beta-galaktosidázu při použití rekombinantní BCG, která obsahuje gen beta-galaktosidázy. Použitím nekompletního Freudova adjuvans a beta-galaktosidázy nebyla detekována takováto odpověď.

40 Mitchell a sp., B. J. Clinical Oncology 856, 1990 (který není přijatelný jakožto prioritní způsob k současné aplikaci) popisují léčbu pacientů s metastázujícím melanomem pomocí adjuvans nazývaného „DETOX“ a allogeneickým lyzátem melanomu podávaným 5x během šesti týdnů. U malé části pacientů byl pozorován vzrůst počtu cytolytických T-buněk. Autoři popisují potřebu zvýšit hladinu produkce cytotoxických T-lymfocytů, a předpokládají úspěšnost kombinované terapie adjuvans s Interleukinem-2, jakož i předléčbu s cyklofosfamidem k snížení hladiny tumor-specifických T-supresorových buněk, které mohou existovat. DETUX obsahuje detoxikovaný endotoxin (monofosforyl lipid A) ze Salmonella minnesota, buněčné stěny z Mycobacterium phlei, squalenový olej a emulgátor.

50 Allison a Gregoriadis, 11 Immunology Today 427, 1990 (nepřijatelný jakožto prioritní způsob k tomuto vynálezu) zaznamenali, že jediné adjuvans „autorizované pro použití“ v lidských vakcínách jsou soli hliníku (alum), který nevyvolává shodně buňkou zprostředkovanou imunitu. Allison a Gregoriadis tvrdí, že je nutné vyvinout adjuvans s účinností Freudova adjuvans a to kompletního, bez jeho různých vedlejších účinků, jako je tvorba granulomů. Autoři došli k závěru, že existují tři možné strategie, například užití liposomů; užití adjuvans nazývané

imunostimulující komplexy (ISCOM, které obsahují saponin nebo Quil A – triterpenoid se dvěma karbohydrátovými řetězci – cholesterol a fosfatidyl cholin). Přípravek je autorizován pro použití ve chřipkové vakcíně pro koně (Morein a sp., Immunological Adjuvants and Vaccines, Plenum Press, 153); a použití emulze (SAF) squalenu nebo Squalanu (za přidání nebo bez přidání pluronic agens) a muramyl dipeptid (MDP). SAF vyvolává buněčnou imunitu u myši, ačkoliv se dlouho myslelo, že subjednotky antigenů nemohou vyvolávat cytotoxickou odpověď T-buněk.

Takahashi a sp., 344 Nature 873, 1990, popisují indukci II třídy restringovaných pomocných a cytotoxických T-lymfocytů za použití ISCOMu jednorázovou subkutánní imunizací myši. Konstatovali, že Freudovo adjuvans, nekompletní Freudovo adjuvans a fyziologický roztok pufrovaný fosfátem, neindukují cytotoxickou T-lymfocytární aktivitu proti cílovým buňkám, na které byly zacíleny. Dále tvrdí, že v kontrastu k výsledkům získaným pomocí jiných forem exogenních rozpustných bílkovinných antigenů ukázali, že je možné senzibilizovat antigen specifickou MHC třídu I restringovaných $CD8^+ CD4^+$ CTL imunizací exogenním intaktním proteinem za použití ISCOMu. Konstatují též, že popisované experimenty naznačují, že je možné vyvolat u člověka CTL indukci použitím ISCOMu obsahujícího HIV bílkoviny a že na ISCOMu založené vakcíny mohou vyvolat dlouhodobou indukci jak CTL, tak tvorby protilátek pomocí čištěného proteinu.

Byars a Allison, 5 Vaccine 223, 1987 popsali použití SAF-1, který obsahuje TWEEN 80, PLURONIC L121 a Squalen nebo Squalan, za přidání nebo bez přidání muramyl dipeptidu, a předpokládají, že jejich výsledky prokazují, že přípravy obsahující muramyl dipeptid budou použitelné pro humánní a veterinární vakcíny. Poslední injekce adjuvans byly aplikovány bez přídavku muramyl dipeptidu. Muramyl dipeptid údajně významně zvyšuje produkci protilátek ve srovnání s použitím adjuvans bez muramyl dipeptidu. Buněčně zprostředkovaná imunita byla prokazována jako opožděný typ přecitlivělosti kožním testem pro stanovení indukce T-pomocných buněk. Tato přecitlivělost je průkaznější a protrahovaná, je-li muramyl dipeptid přidán do adjuvans. Podobné adjuvanty popsali Allison a sp., U.S. Patent 4 770 874 (kde je konstatováno, že kombinace muramyl dipeptidu a pluronového polyolu je základním předpokladem k vyvolání intenzivní buněčné a humorální odpovědi proti vaječnému albuminu); Allison a sp., U.S. Patent 4 772 466; Murphy-Corb a sp., 246 Science 1293, 1989 (kde je konstatováno, že užití kombinovaných adjuvans s muramyl dipeptidem může zvýšit indukci jak humorálního, tak buněčného způsobu imunitní odpovědi); Allison a Bars, 87 Vaccine 56, 1987 (kde je uvedeno, že imunita zprostředkovaná buňkou je vyvolávána pomocí SAF obsahující muramyl dipeptid, což bylo prokázáno pozdním typem přecitlivělosti, dále proliferativní odpovědí T-buněk k antigenu, produkcí Interleukinu-2 a specifickou geneticky omezenou lyzí cílových buněk nesoucích imunizující antigen); Allison a Byars, Immunopharmacology of Infectious Diseases; Vaccine Adjuvants and Modulators of Non-Specific Resistance 191-201, 1987; Morgan a sp., 29 J. Med. Virology 74, 1989; Kenney a sp., 121 J. Immunological Methods 157, 1989; Allison a Byars, 95 J. Immunological Methods 157, 1986 (kde je konstatováno, že hlinité soli a emulze minerálních olejů zvyšují tvorbu protilátek, nikoli však buňkami zprostředkovanou imunitu; a muramyl dipeptidové přípravky vyvolávají imunitu zprostředkovanou buňkami); Byars a sp., B Vaccine 49, 1990 (nepřijatelný jako prioritní způsob k současné aplikaci, kde je tvrzeno, že jejich přípravky adjuvans znatelně zvyšují humorální odpověď, a v menší míře zvyšují buněčně zprostředkovanou reakci na chřipkový hemaglutinační antigen); Allison a Byars, 28 Molecular Immunology 279, 1991 (nepřijatelný jako prioritní způsob k této aplikaci; kde soudí, že funkce muramyl dipeptidu je v expresi cytokinů, kterou tento indukuje, a vzrůstu exprese hlavních histokompatibilitních genů (MHC); a že lepší protilátkové odpovědi i buněčné odpovědi je dosaženo tímto způsobem než pomocí ostatních adjuvans. A věří, že bude prověřeno, zda podobná strategie je prospěšná u lidí); Allison a Byars, Technology Advances in Vaccine Development 401, 1988, (kde je popsána buněčně zprostředkovaná imunita za použití SAF); Epstein a sp., 4 Advances Drug Delivery Reviews 223, 1990 (kteří předkládají přehled o různých adjuvans používaných v přípravě vakcín); Allison a Byars, 95 J. Immunological Methods 157, 1986 (kteří soudí, že přidání muramyl dipeptidu k adjuvans znatelně zvyšuje buněčně zprostředkovanou odpověď na různé antigeny, včetně monoklonálních imunoglobulinů a virových

antigenů); a Morgan a sp., 29 J. Medical Virology 74, 1989, kde je popsáno použití SAF-1 k přípravě vakcín pro Epstein-Barr virus.

- 5 Kwak a sp., Idiotypic Networks in Biology and Medicine, Elsevier Science Publishers, str. 163, 1990 (nepřijatelný jakožto prioritní článek k této aplikaci), popisuje použití SAF bez muramyl dipeptidu jako adjuvans pro B-buňky idiopatického lymfomu u lidí. Konkrétně, emulze Pluronic L121, Squalene, a 0,4% TWEEN-80 ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem byla podávána s idiotypem. Konstatují, že přídavek adjuvans by mohl dále zvyšovat humorální odpověď a může usnadňovat indukci buněčné odpovědi.
- 10 Ostatní imunologické preparáty, včetně liposomů (Allison a sp., U.S. Patents 4 053 585 a 4 117 113); Freudovo Kompletní Adjuvans (Asherson a sp., 22 Immunology 465, 1972; Berman a sp., International J. Cancer 539, 1967; Allison, 18 Immunopotential 73, 1973; a Allison, Non-Specific Factors Influencing Host Resistance 247, 1973); ISCOM (Letvin a sp., 15 87 Vaccines 209, 1987); adjuvans obsahující ne-iontový blok polymerních agens spojených s minerálními oleji, povrchově aktivními agens a TWEENem 80 (Hunter a Bennet, 133 J. Immunology 3167, 1984); a Hunter a sp., 127 J. Immunology 1244, 1981; adjuvans složené z minerálních olejů a emulgačních agens, spolu s nebo bez usmrcených mykobakterií (Sanchez-Pescador a sp., 141 J. Immunology 1720, 1988); a ostatní adjuvans jako je lipofilní derivát 20 muramyl tripeptidu a muramylidipeptid, kovalentně konjugovaný na rekombinovaný protein (id.).

Podstata vynálezu

- 25 Nyní byla nalezena bezpečná a výhodná farmaceutická kompozice, pomocí které mohou být indukovány CTL odpovědi u lidí a domestikovaných nebo zemědělských zvířat. V této kompozici se používá antigenního přípravku, který má nízkou nebo žádnou toxicitu vůči zvířeti a neobsahuje imunostimulační peptid (například muramylidipeptid), jehož přítomnost by snižovala požadovanou buněčnou odpověď. Navíc metodologie je při použití jednoduchá a nevyžaduje 30 zdlouhavé práce *in vivo*, nutné pro změnu stávajících buněk na buňky imunogenní technikou genového inženýrství. Toto zjištění je překvapující, jelikož se neočekávalo, že CTL odpověď by mohla být indukována použitím antigenního přípravku prostého imunostimulačních peptidů nebo jejich ekvivalentů. Vynález umožňuje použití těchto farmaceutických kompozic u širokého spektra nemocí nebo jako profylaktického agens. Tyto kompozice lze použít například k léčení 35 virových onemocnění, u kterých je důležitá CTL odpověď, například při léčbě infekce HIV nebo chřipky. Rovněž je lze široce využít k léčbě bakteriálních infekcí, rakoviny, parazitických infekcí apod. K profylaktickým účelům lze tyto kompozice využít při prevenci virových onemocnění, zejména k profylaxi infekce HIV, a také k profylaxi u pacientů s rizikem rakoviny, například po resekci primárního tumoru.

- 40 Předmětem vynálezu je farmaceutická kompozice k indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů, která obsahuje antigen indukující v kombinaci s níže definovaným mikrofluidizovaným antigenním přípravkem cytotoxickou odpověď T-lymfocytů specifickou pro tento antigen, ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím alespoň dvě složky vybrané ze 45 skupiny zahrnující

- a) stabilizující detergent udržující složky mikrofluidizovaného antigenního přípravku ve formě stabilní emulze,
- 50 b) agens vytvářející micely udržující v kombinaci s dalšími složkami obsaženými v mikrofluidizovaném antigenním přípravku stabilní emulzi a vytvářející strukturu podobnou micelám a
- c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

55

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

- 5 s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidové složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

10 Jako antigen lze použít zejména antigen vybraný z antigenních částí HIV antigenů ze skupiny gp120, gp160, gag, pol, Nef, Tat a Rev, antigenů malárie ze skupiny zahrnující CS protein a Sporozoite povrchový protein 2, povrchových antigenů hepatitidy B ze skupiny Pre-S1, Pre-S2, HBc Ag a HBe Ag, chřipkových antigenů ze skupiny HA, NP a NA, povrchových antigenů hepatitidy A, antigenů herpetického viru ze skupiny EBV gp340, EBV gp85, HSV gB, HSV gD, HSV gH, HSV časný bílkovinný produkt, cytomegalovirus gB, cytomegalovirus gH a IE protein gP72, antigenů syncyriálního viru respiračního traktu ze skupiny F protein, G protein
15 a N protein, antigenů viru Herpes papiloma E4, E6 a E7 a tumorových antigenů ze skupiny zahrnující karcinom CEA, mucin asociovaný s karcinomem, karcinom P21, karcinom P53, melanom MPG, melanom p97, MAGE antigen, onkogenní produkt Neu karcinomu, genový produkt karcinomu p53, specifický antigen prostaty (PSA) a s prostatou asociovaný antigen, a přeměněný (mutovaný) p21 ras protein, který je přítomen u řady zhoubných nádorů.

20 Kompozici podle vynálezu lze použít k indukci CTL odpovědi u člověka či domestikovaného zvířete (jako je například kočka a pes) nebo zemědělského zvířete (jako je například kůň, kráva nebo vepř) na antigen jiný než je antigen B-buněk, lymfomu nebo albumin. K tomuto účelu se kompozice podle vynálezu podává člověku nebo zvířeti v množství dostačujícím k vyvolání
25 cytotoxické odpovědi T-lymfocytů u zmíněného člověka nebo zvířete.

Přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě, což znamená, že každá ze složek je zvolena tak, že emulze zůstane v emulgovaném stavu po dobu nejméně jednoho měsíce a výhodně po více než jeden rok, aniž by došlo k oddělení fází.

30 Podání kompozice podle vynálezu léčenému člověku nebo zvířeti je nutné pouze jednou.

Jako příklady stabilizujících detergentů obsažených v přípravku lze uvést polysorbitan, 80 (TWEEN) (sorbitan-mono-9-oktadecenoát-poly-oxy-1,2-ethandiyl; vyrábí ICI Americas, Wilmington, SRN), TWEEN 40, TWEEN 20, TWEEN 60, Zwittergent 3-12, TEEPOL HB7
35 a SPAN 85. Tyto detergenty jsou obvykle používány v množství přibližně 0,05 až 0,5 % hmotn., nejčastěji okolo 0,2 % hmotn.

Agens vytvářející micely obsažené v přípravku výhodně působí určité jisté dráždění na místě
40 injekčního vpichu, čímž mobilizuje makrofágy ke zvýšení buněčné odpovědi. Jako příklady těchto agens lze uvést polymerní tenzidy popsané v publikacích BASF Wyandott, například Schmolka, 54 J. Am. Oil. Chem. Soc. 110, 1977, a Hunter a sp., 129 J. Immunol. 1244, 1981, PLURONIC L62LF, L101 a L64, L121, PEG1000, a TETRONIC 1501, 150R1, 701, 901, 1301 a 130R1. Chemické struktury těchto látek jsou v oboru dobře známé. Výhodně se používá agens
45 s hydrofilně-lipofilní rovnováhou (HLB) mezi 0 a 2, jak definovali Hunter a Bennett, 133 Journal of Immunology 3167, 1984. Agens vytvářející micely je výhodně přítomno v množství mezi 0,001 a 10 % hmotn., nejvýhodněji v množství mezi 0,001 a 5 % hmotn.

Biodegradabilní a biokompatibilní olej se volí tak, aby podporoval retenci antigenu v emulzi typu
50 olej ve vodě, tj. aby zajišťoval vehikulum pro požadovaný antigen, přičemž tento olej má výhodně teplotu tání nižší než 65 °C, takže se emulze vytváří buď při teplotě místnosti (kolem 20 °C až 25 °C), nebo jakmile je teplota emulze snížena na teplotu místnosti. Mezi příklady takových olejů patří squalen, EICOSAN, tetratetracontan, glycerol a podzemnicový olej nebo jiné rostlinné oleje. Výhodně se olej používá v množství mezi 1 a 10 % hmotn. nejvýhodněji mezi 2,5

a 5 % hmotn. Olej je biodegradabilní a biokompatibilní, takže organismus může olej časem rozštěpit a při používání oleje tak nejsou patrné nepříznivé účinky, jako granulomy.

5 Mikrofluidizovaný antigenní přípravek obsažený v kompozici podle vynálezu je prostý imuno-stimulující peptidické složky, zejména muramyldipeptidu (MDP). Takový peptid by interferoval s indukcí CTL odpovědi, pokud by byl podán v množství vyšším než zhruba 20 µg na normální podání u člověka. Bylo zjištěno, že ač takové peptidy mohou zvyšovat humorální odpověď, jsou nevýhodné, je-li požadována cytotoxická odpověď T-lymfocytů.

10 Kompozice podle vynálezu jsou výrazně výhodnější než známé kompozice (včetně ISCOMů, DETOXu a SAFu) pro použití u člověka. Na rozdíl od těchto známých kompozic antigenní přípravek v kompozicích podle vynálezu jednak obsahuje agens vytvářející micely a jednak neobsahuje peptidy, skelety buněčných stěn nebo složky bakteriálních buněk. Kompozice podle vynálezu rovněž indukuje CTL odpověď, která se buď u známých kompozic nevyskytuje, nebo je
15 u vynálezu ve srovnání se známými kompozicemi podstatně zvýšená.

Přípravek podle vynálezu je netoxický pro člověka nebo zvířata, kterým má být podáván. Termín „netoxický“ znamená, že byl u ošetřovaného zvířete nebo člověka pozorován pouze malý nebo
20 vůbec žádný vedlejší účinek. Odborníkovi v oblasti lékařské nebo veterinární praxe je zřejmé, že tento výraz má široký význam. Například u zvířete nebo člověka v podstatě zdravého může být tolerována pouze slabá toxicita, zatímco u člověka nacházejícího se v terminálním stádiu nemoci (s předpokladem dalšího trvání života méně než tři roky) může být tolerována podstatně vyšší toxicita.

25 Antigenní přípravek může obsahovat všechny tři uvedené složky a), b) a c) nebo pouze dvě z těchto složek.

Při použití proti virové infekci spočívá aplikace kompozice v podstatě v jejím jediném podání
30 člověku nebo zvířeti, infikovanému virem a trpícímu jedním nebo více symptomy virové infekce, jak určí lékař v daném oboru.

Kompozice podle vynálezu lze využít například při léčení infekce HIV, malárie, chřipky, hepatitidy, rakoviny, infekce herpetickým virem nebo infekce syncyriální virem respiračního
35 traktu.

Vynález ilustrují následující příklady provedení vynálezu, jimiž se však rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje.

40 Příklady provedení vynálezu

Nejprve budou popsány obrázky na připojených výkresech.

45 Popis obrázků

Obr. 1A – 1C jsou grafickým zobrazením dat srovnávajících CTL indukci u různých ovalbuminových přípravků;

50 E:T představuje na všech obrázcích poměr působku k cílovým buňkám (osa x), na ose y jsou % cytotoxicity.

Obr. 1A: imunizováno pomocí ova v HBSS.

Obr. 1B: cytoplazmatické zatížení s ova.

55 Obr. 1C: imunizováno pomocí ova v AF.

Obr. 2A a 2B jsou grafickým zobrazením dat srovnávajících CTL indukci pomocí různých beta-galaktosidázových přípravků;

E:T jako na obr. 1 (osa x), na ose y jsou % cytotoxicity.

Obr. 2A: imunizováno pomocí beta-gal v HBSS.

Obr. 2B: imunizováno pomocí beta-gal v AF.

Obr. 3 je grafickým zobrazením dat srovnávajících CTL indukci ovalbuminem v liposomu (—□—) a v antigenním přípravku (—●—);

E:T jako na obr. 1 (osa x), na ose y jsou % cytotoxicity.

Obr. 4 a 5 jsou grafickým zobrazením dat ukazujících vliv vyčerpání CD4 a CD8 na CTL indukci.

E:T jako na obr. 1 (osa x), osa y jsou cytotoxicity v % (—□—) nevyčerpané, (—◇—) CD4 vyčerpané, (—■—) CD8 vyčerpané.

Obr. 6 je grafickým zobrazením dat ukazujících CTL indukci směsí látek pluronic a TWEEN s antigenem.

E:T jako na obr. 1 (osa x), na ose y jsou % cytotoxicity; (—□—) buňky EL4, (—◆—) buňky EG7.

Obr. 7 je grafickým zobrazením dat ukazujících CTL indukci směsí látek Squalane a TWEEN s antigenem.

E:T jako na obr. 1 (osa x), osa y jsou % cytotoxicity; (—□—) buňky EL4, (—◆—) buňky EG7.

Obr. 8 je grafickým zobrazením dat ukazujících CTL indukci směsí látek Squalane a pluronic s antigenem.

E:T jako na obr. 1 (osa x), osa y jsou % cytotoxicity; (—□—) buňky EL4, (—◆—) buňky EG7.

Obr. 9 je grafickým zobrazením indukce tvorby antigp120IIIb protilátek u opice pomocí různých antigenních přípravků;

osa x je 1/zředění séra, osa y je naměřená absorbance při 405 nm; jednotlivé křivky (—□— —■— —●— atd.) značí použité antigenní přípravky.

Obr. 10A – 10B jsou grafickým zobrazením dat srovnávajících gp120 specifickou CTL odpověď u opic imunizovaných s vakcínou gp120 a gp120-AF.

E:T jako na obr. 1 (osa x), osa y jsou % cytotoxicity.

Antigenní přípravek

Antigenní přípravky použité v tomto vynálezu jsou obecně popsány předtím. Ty běžně známé se projeví tím způsobem, že ekvivalentní přípravky se dají pohodlně připravit a lze předpokládat, že

mají ekvivalentní vlastnosti, co se týká indukce CTL odpovědi. Takové přípravky jsou testovány na jejich vlastnosti použitím technik, které jsou ekvivalentní technikám níže popsaným.

Následují příklady vynálezu s použitím antigenních přípravků (AF) složených cca z 15 % Squalanu (0,6 % TWEEN 80) a (0,0045 – 3,75 % pluronic-u) ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem–Imed STP. Specificky taková emulze AF obsahuje: 150 mg Squalanu, 0,045–37,5 mg poloxamer 401 (PLURONIC L121), 6 mg TWEEN 80, 0,184 mg KCl, 7,36 mg chloridu sodného, 0,552 mg monobázického fosfátu draselného, 3,3 mg dibázického fosfátu sodného (bezvodého), na 1 ml vody, pH 7,4. Tato emulze byla mikrofluidizována použitím standardní techniky (Microfluidics Model M110F) s modulem zpětného tlaku $7,584 \cdot 10^4$ – $9,653 \cdot 10^4$ Pa s postupným návratem na atmosférický tlak, ochlazením a balením do suchého ledu.

V jiných příkladech byl antigen smíchán s mikrofluidizovanou směsí Squalanu (S), pluronic-u (P) a TWEENu 80 (T), aby bylo dosaženo konečné koncentrace Squalanu 5 %, 0,2 % TWEENu 80 a 0,0015–1,25 % pluronic-u, vzhledem ke každé látce. Aby byly definovány vlastnosti subkomponent nutných k indukci antigen–specifické imunitní odpovědi, byly připraveny směsi Squalan–TWEEN 80, pluronic–TWEEN 80 nebo Squalan–pluronic v téže koncentraci jako tomu bylo při přípravě tří–složkové směsi. Pluronic, Squalan nebo TWEEN 80 byly rovněž připraveny individuálně pro stanovení účinku jednotlivých složek na CTL indukci. Byly provedeny též substituce TWEENem 20, TWEENem 40 nebo Zwittergent–em za TWEEN 80, aby byl zjištěn vliv různých derivátů TWEENu na CTL indukci v ova systému. Náhrada Squalanu ve tří–složkovém přípravku byla uskutečněna s Eicoson–em nebo Triaccontonem a náhrada za kopolymer pluronic v témže tří–složkovém přípravku byla provedena použitím PEG 1000, Pluronic L62LF a Tetronic 1501 a 150R1. Různé analogy v různých kombinacích byly smíchány jako dvousložkové přípravky a testovány na ova specifickou CTL indukci. Byly to směsi cholesterol–TWEEN 80, Squalan–TWEEN 20, Pristan–TWEEN 80 nebo olivový olej–TWEEN 80. V rámci stabilizační studie byla smíchána mikrofluidizovaná směs Squalan–TWEEN 80 s dextrózou na konečnou koncentraci 5 %. Ve všech případech kombinace složek byla mixována v mikrofluidizačním zařízení za účelem přípravy stabilní emulze. V některých pokusech byly dvousložkové přípravky mixovány s různou koncentrací MDP k indukci CTL a humorální odpovědi. Tabulka 1 popisuje souhrnně seznam různých přípravků používaných v této studii.

35 Tabulka 1

Vliv různých substitucí ve tří– nebo dvousložkových systémech

Substituce ve tříkomponentním přípravku	Pokus # 1 Procent zabitých při E:T 100:1	Pokus # 2 Procent zabitých při E:T 100:1
STP	88	10
Tween 40 (T)	66	– ^a
Tween 20 (T)	48	–
T1501 (P)	39	–
T150R1 (P)	30	–
Pluronic L62LF (P)	47	–
Eicosane (S)	–	47
PEG1000 (P)	–	24
Triaccontane (S)	–	30
Zwittergent (T)	–	0

Tabulka 1 - pokračování

Substituce ve tříkomponentním přípravku	Pokus # 1 Procent zabitých při E:T 100:1	Pokus # 2 Procent zabitých při E:T 100:1
Substituce ve dvousložkovém přípravku		
ST	82	44
PT	77	—
SP	69	—
Cholesterol (S) + Tween 80	38	—
Squalane + Tween 20 (T)	65	—
Pristane (S) + Tween 80	60	—
Olivový olej (S) + Tween 80	69	—
Jednosložkový přípravek		
Pluronic L121	0	—
Squalane	0	—
Tween 80	0	—
Squalane + Tween 80 + 5% dextróza	86	—

—^a neupotřebitelný

5

Byl použit přípravek Syntex coby adjuvans (mikrofluidizovaný; SAFm) jako kontrola adjuvans a skládá se ze dvou částí. Část I obsahuje fyziologický roztok pufrovaný fosfátem a obsahující v konečné koncentraci 5 % Squalane, 1,25 % pluronic-u a 0,2 % TWEEN 80 (vehikulum nebo I-SAF). Část II se skládá z N-acetylmuramyl-L-thronyl-D-izoglutaminu (Thr-MDP), derivatizované komponenty buněčných stěn mykobakterií. Pro účely imunizace je antigen mixován s mikrofluidizačním vehikulem (část I), k získání homogenní emulze. Přidáním MDP je připraven SAFm, krátce se zvíří. Koncentrace MPD ve směsi je měněna za účelem stanovení optima koncentrace pro CTL indukci. Jako kontrola adjuvans byly imunizovány myši rozpustným antigenem smíseným s kamencem (alum), podle návodu výrobce (Pierce Chemical, Rockford, IL) nebo Kompletním Freudovým Adjuvans (CFA).

Přípravek STP antigenu je používán k indukci cytotoxické T-lymfocytární odpovědi u myši. Běžné poznatky tohoto typu se projeví tak, že tento myši model je ukazatelem, že rovnocenné pokusy nebo léčebné aplikace budou podobně indukovat cytotoxickou T-lymfocytární odpověď u lidí, domestikovaných, nebo zemědělských zvířat. Množství antigenního přípravku a antigenu užitečného k produkci žádané buněčné odpovědi může být stanoveno empiricky standardními postupy, dobře známými vzhledem k běžným poznatkům tohoto druhu, bez přílišného experimentování. Tak, je-li to žádoucí aby byly minimalizovány vedlejší účinky při aplikaci těchto směsí, běžné poznatky tohoto druhu dávají možnost stanovení minimální hladiny takové směsi pro podávání člověku a domestikovaným nebo zemědělským zvířatům, aby byla zjištěna CTL odpověď, a tím byla indukována imunita k vhodnému antigenu. Při běžném použití taková směs bude injikována jakýmkoliv z početných standardních způsobů, ale zvláště je preferována intramuskulární injekce do místa, která dovolí emulzi zůstat ve stabilním stavu po dobu několika dní nebo týdnů.

30

Metody

Následující materiály a metody byly použity v příkladech uváděných níže, jestliže není jinak uvedeno:

Myši

Samičky myši C57BL/6 (H-2^b) a BALB/c (H-2^d) byly získány od Harlen Sprague (San Diego, California).

5

Antigeny

Ovalbumin (ova, Grade VII; Sigma Chemical o., St. Louis, MO) byl použit v nativní formě. Beta-galaktosidáza (beta-gal, Grade VIII; BRL) byla použita v nativní formě a po převaření v 1 M NaOH po dobu dvou minut použita jako alkalický výluh. Rekombinantní gp120 byl získán od American Biotechnology.

10

Tumorové buňky a transfektanty

Použité tumorové buňky byly Ia linie EL4/C57BL/6, H-2^b thymoma/ a P815 /DBA/2, H-2^d mastocytoma/. Původ ova-produkujícího EL4 transfektantu, EG7-ova byl popsán dříve od Moore a sp., 54 *Cell* 777, 1988. Beta-gal-produkující transfektant, P13.1, byl odvozen elektroporací 10⁷ PB15 buněk v 1 ml fyziologického roztoku pufrovaného fosfátem (PBS) s 10 mg PstI linearizovaných pCH110 (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ) a 1 mg PvuI linearizovaných pSV2 neo (Southern a sp., 1 *J. Mol. Appl. Genet.* 327, 1982), a následnou selekcí ve 400 µg/ml antibiotika G418. Transfektant C3-4 byl odvozen od BALB/c hybridomu Igm 662 transfekcí s plazmid-kódujícím beta-gal genem fúzovaném do třetího a čtvrtého exonu IgM těžkého řetězce (Rammensee a sp., 30 *Immunogenetics* 296, 1989). gp160IIIb exprimující 3T3 fibroblast, 15-12, byl poskytnut Dr. Germain-em z NIH (Bethesda, MD). K^b transfektované L buněčné linie byly poskytnuty od Dr. Caroone, Monash University, Australia. D^d a L^d transfektované L buněčné linie poskytl Dr. Ted Hensen, Washington University, St. Louis.

20

25

Imunizace

30

Myši byly imunizovány intravenózně pomocí 200 µl suspenze 25 x 10⁶ splenocytů, po cytoplazmatickém zatížení, jak popsal Moore a sp., *supra*, a Cerbone a sp., *J. Exp. Med.* 169:603, 1989. Pro imunizaci ova-antigenovým přípravkem nebo beta-gal-antigenovým přípravkem bylo injikováno 30 µg každého bílkovinného antigenu na myš do tlapky a kořene ocasu subkutánně. Každá injekce obsahuje 67 µg mikrofluidizovaného antigenního přípravku (připraveného standardním postupem) a 30 µg bílkovinného antigenu v konečném objemu 200 µl. Konečný objem byl upraven v HBSS, viz Whittaker Manual (Weltersville, MD). MDP byl připraven v koncentracích mezi 0 a 300 µg. Tam kde bylo uvedeno, byly myši imunizovány rozpustnými antigeny v CFA nebo v kamenci celkovým objemem 200 µl.

35

40

Stimulace efektorových populací in vitro

Slezinné buňky (30 x 10⁶) z normálních a imunizovaných myší, které byly senzibilizovány nejméně 14 dní předem, byly inkubovány s 1,5 x 10⁶ EG7 - ova (ozářené s 20,000 rad) pro ova odpověď nebo 1,6 x 10⁶ C3-4 buněk (ozářených s 20,000 rad) pro beta-gal odpověď na 24-jamkových deskách při 37 °C v 7 % CO₂/vzduch. Všechny tkáňové kultury byly realizovány v kompletním médiu složeném z IMDM média, viz Whittaker Manual (Weltersville, MD), doplněném 10 % fetálního telecího séra (FCS), 2mM glutaminu, gentamycinem a 2 x 10⁻⁵ M 2-merkaptetanolu. Pro depleční experimenty *in vitro*, slezinné buňky, senzibilizované *in vivo* nebo stimulované *in vitro*, byly podrobeny účinku monoklonálních protilátek (mAbs) RL.172 (anti-CD4) nebo mAbs 3.168 (anti-CD8) pro odstranění CD4⁺ nebo CD8⁺ T-buněk (Sarmiento a sp., 125 *J. Immunol.* 2665, 1980, a Ceredig a sp., 314 *Nature* 98, 1985). Monoklonální protilátky mAb RL.172 a mAb 3.168 byly získány od Dr. Jonathana, Sprent at Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA.

45

50

Slezinné buňky (30×10^6) z normálních a imunizovaných myší, které byly senzibilizovány nejméně 21 dní dříve, byly inkubovány s $1,5 \times 10^6$ 15–12 buňkami (podrobeny po 45 minut účinku 200 μg mitomycinu C na 10^8 buněk), nebo s 500 μg 18IIIb peptidu obsahujícího dominantní CTL epitop Balb/c myší v kompletním IMDM médiu (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) obsahující 10 % FCS (ICN Flow; ICN Biochemicals, Inc., Costa Mesa, Ca), 2mM glutamin, gentamycin a 2×10^{-5} M 2-merkaptetanolu. Pro stimulaci *in vitro* stimulované slezinné buňky byly kultivovány v kompletním IMDM obsahujícím 5 % ConA supernatant. Pro depleční pokusy *in vivo* senzibilizované nebo *in vitro* stimulované slezinné buňky byly ošetřeny s mAb RL.172 (anti-CD4) nebo mAb 3.168 (anti-CD8) v přítomnosti králičího komplementu nízké toxicity (Cederlane Laboratories, Ltd., Hornby Ontario, Canada) pro odstranění CD4^+ nebo CD8^+ T-buněk (22, 23). Monoklonální protilátky mAb RL.172 a mAb 3.168 byly darovány Dr. Jonathanem Sprent at Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA.

15 Zkouška cytotoxicity

Cílové buňky (1×10^6) byly značeny se 100 μCi ^{51}Cr chromanem sodným po dobu 60 minut. U cílových buněk citlivých k peptidu bylo přidáno 50 μl roztoku peptidu o koncentraci 1 mg/ml HBSS během značení cílových buněk s ^{51}Cr . Po promytí bylo inkubováno 10^4 značených cílových buněk spolu s efektorovými buňkami sériově ředěnými ve 200 μl RP10 po dobu 4 h při 37 °C. 100 μl supernatantu bylo odděleno a byla stanovena specifická lyze jako: Procenta specifické lyze = $100 \times \text{uvolnění pomocí CTL} - \text{spontánní uvolnění}$ děleno maximální uvolnění minus spontánní uvolnění. Spontánní uvolnění v nepřítomnosti cytotoxických T-lymfocytů (CTL) bylo menší 25 % maximálního uvolnění detergentem a to u všech pokusů.

25 Stanovení protilátkové odpovědi na myších a opicích

Každá jamka v 96-jamkové destičce se dnem ve tvaru U (Costar, Cambridge, MA) byla pokryta 150 ng ova nebo gp120 v 50 μl HBSS a inkubována přes noc při 4 °C. Pro stanovení anti-gp120 a anti-ova protilátkové odpovědi u myší byly plotny blokovány 1% BSA po 1 h. Sériově ředěná séra byla přidávána v objemu 25 μl na jamku a inkubována po 2 h. Plotny byly promyty a 50 μl kozího anti-myšího IgG konjugátu s HRPO (SBT, Alabama) v 1% BSA, při ředění antiséra 1:1000, bylo přidáno na jednu jamku. Po 1 h inkubaci plotny byly promyty a bylo přidáno 100 μl substrátu na jamku. OD_{405} bylo stanoveno v intervalu mezi 10. a 15. minutou. Pro stanovení anti-gp120 protilátkové odpovědi u opic všechny stupně byly obdobné s výjimkou blokády desek a ředění séra, což bylo prováděno v 5% normálním kozím séru v Hankově rovnovážném solném roztoku.

40 Syntéza peptidů

Syntetické peptidy korespondující aminokyselinové sekvenci 253–276 (Sekvenční zápis č. 1: EQLESIIINFEKLTEWTSSNVMEER; kde je užít standardní jednopísmenový kód představující určitou aminokyselinu) ovalbuminu (ova 253–276), aminokyselinovou sekvenci 84–102 myelin basic proteinu (MBP 84–102) (Sekvenční zápis č. 2: DENPVVHFFKNIVTPRTPP), a syntetické peptidy korespondující aminokyselinové sekvenci 308–322 (18IIIb sekvence) od gp120IIIb, byly syntetizovány metodou syntézy peptidů na pevné fázi za užití přístroje Applied Biosystem 430A synthesizer. Aminokyseliny byly kopulovány pomocí preformovaných symetrických anhydridů s výjimkou asparaginu, glutaminu a argininu, které byly kopulovány přes hydroxybenzotriazolové estery. Kopulační účinnost byla monitorována ninhydrinovou reakcí podle metody Kaiser a sp., 34 *Anal. Biochem.* 595, 1970. Peptidy byly uvolňovány z nosiče kapalným fluorovodíkem a „low-high“ procedurou popsanou Tamem a sp., 21 *J. Am. Chem. Soc.* 6442, 1983, a peptidy byly extrahovány z pryskyřice 10% kyselinou octovou. Po lyofilizaci byly peptidy odsoleny na sloupci Sephadexu G-25 a vzorky peptidů pak byly purifikovány HPLC chromatografií s reverzní fází na preparativním sloupci C-18 přístroje Vydac. Purifikované

peptidy (98 %) byly rozpuštěny v HBSS na konečnou koncentraci 10 mg/ml a ředěny na požadovanou koncentraci v kompletním médiu.

CNBr štěpení

5

Na vzorky bílkovin (například beta-galaktosidázu) bylo působeno 100 násobným molárním přebytkem bromkyanu v roztoku 100 mM kyseliny trifluoroctové. Reakce probíhala po dobu 18 h při pokojové teplotě (asi 20 °C) za rotace. Po předepsaném reakčním čase fragmenty peptidů byly separovány od reakčních složek za použití přístroje SEP-PAK C-18 (Waters), eluovány s 95% acetonitrilem a lyofilizovány.

10

Alkalické štěpení

15

Bílkovinné vzorky (například beta-galaktosidáza) byly vystaveny účinku 1 N NaOH a povařeny po 2 min a výsledné peptidické fragmenty byly separovány od reakčních složek za použití přístroje C-18 SEP-PAK (Waters), a eluovány s 95% acetonitrilem a lyofilizovány.

Příklad 1: I. třída restringované CTL senzibilizace

20

Moore a sp., 113 UCLA Symp. Mol. Cell. Biol 1989 a Carbone a Bevan, 171 J. Exp. Medicine 377, 1990, ukázali, že myši imunizované slezinnými buňkami, které byly zatěžovány cytoplazmaticky rozpustným ova, byly senzibilizovány pro ova specifitu, I třída restringované CTL odpovědi. Ova-exprimující EL4 transfektanty EG7-ova byly použity pro in vitro stimulaci in vivo senzibilizovaných slezinných lymfocytů a také použity jako cílové buňky pro ova specifickou CTL zprostředkovanou schopnost zabíjení buněk. Tato studie též demonstruje, že CD8⁺ efekторы indukované EG7-ova transfektantem nebo slezinnými buňkami cytoplazmaticky zatíženými s ova, prokazují determinant mapovaný peptidem ova 258-276 v kontextu s H-2K^b, lyzují EG7-ova, a také zabíjejí EL4 buňky povlečené s ova 258-276 peptidem. Tak, aby se dalo odhadnout, zda endogenní cesta I třídy restringované CD8⁺ T buněk je indukovatelná rozpustným antigenem, uvedený systém byl použit ke zjištění, zda jisté antigenní přípravky lze použít k řízení cesty I třídy restringovaných buněk pomocí rozpustných antigenů.

30

a) ova

35

Myši C57BL/6 byly imunizovány jedenkrát s proměnlivým množstvím ova (30 µg až 1 mg na myš) za přidání a bez přidání antigenního přípravku. Myším byly dávky injikovány subkutánně a do kořene ocasu. Slezinné buňky byly odebrány z imunizovaných myší nejméně 2 týdny po imunizaci a stimulovány in vitro s EG7-ova transfektanty. Koncentrace pouhých 30 µg EG7-ova byl stejně účinná jako 1mg dávka. Proto v dalším byly CTL studie rutinně prováděny se slezinnými buňkami myší senzibilizovaných dávkou 30 µg ova. Po 5 dnech kultivace in vitro s EG7-ova senzibilizace byla hodnocena v přítomnosti ova specifických efektorů schopných lyzovat EG7-ova.

40

Myši injikované rozpustným ova v HBSS dávkou dosahující množství 1 mg, nevykazovaly znaky CTL senzibilizace (obr. 1A). Avšak myši imunizované s 30 µg ova v antigenním přípravku popsaném výše (ukázáno jako AF v obrázcích) vykazaly signifikantní transfektantní specifickou CTL odpověď (obr. 1C). Kromě toho, míra EG7-ova zabíjení pomocí ova-AF imunizovaných slezinných buněk byla porovnatelná s takovouto vlastností slezinných buněk imunizovaných myší zatížených ova (obr. 1B).

50

Okolnost, že specifita CTL senzibilizace in vivo byla antigen-specifická bylo prokázáno z neschopnosti slezinných buněk myší imunizovaných beta-galaktosidázou manifestovat druhotnou CTL odpověď in vitro, jsou-li stimulovány s EG7-ova. V takovém případě nebyla pozorována ova specifická CTL indukce.

55

b) beta-galaktosidáza

Podobné výsledky byly získány s použitím jiného rozpustného bílkovinného antigenu, beta-gal. Pro stanovení beta-gal-specifické CTL odpovědi použité cílové buňky byly od BALB/c kmene odvozené beta-gal expresivní C3-4 transfektanty. Imunizace BALB/c myši rozpustným beta-gal dala podklad CTL odpovědi. Proto, pro stanovení specifické CTL odpovědi, byl odběr posunut nejméně o 8 týdnů před odebráním slezinných lymfocytů, které pak byly kultivovány 5 dnů v přítomnosti ozářených transfektantů C3-4.

Obr. 2B demonstruje, že 30 μ g beta-galaktosidázy v AF indukovalo silně specifickou CTL odpověď proti transfektantu. Myši imunizované pomocí beta-gal-AF vykazaly kolem 80 % specificky zabíjených buněk, při poměru efektoru k cílovým buňkám rovným 3:1 (E:T). Nicméně pouze 20% úmrtnosti stejných cílových buněk bylo dosaženo s efekty izolovanými z myši imunizovaných beta-gal v HBSS při stejném poměru E:T (obr. 2A). Ačkoli ani EL4, ani PB15 nepotlačují II třídu MHC genových produktů a lyze ukazuje syngenní restrikcii, tyto ova a beta-gal specifické efekty jsou I třída MHC restringované buňky.

Aby byla demonstrována prospěšnost antigenního přípravku, byly myši imunizovány rozpustným ova inkapsulovaným do dvou typů liposomů, jeden z nichž byl pH citlivý liposom. Jeden týden nato byly slezinné buňky stimulovány *in vitro*, jak je shora popsáno, a buňky byly testovány proti ^{51}Cr -značeným EG7-ova nebo EL4 buňkám. Obr. 3 ukazuje reprezentativní výsledek, který ukazuje, že ova v liposomu nemůže senzibilizovat myši pro podstatnou CTL indukci. Podobné výsledky byly pozorovány, když pomocí ova bylo imunizováno v kamenci.

Příklad 2: Rozpoznání epitopu pomocí CTL

Carbone a Bevan, *supra*, prokázali, že CTL indukovaná u myši C57BL/6 pomocí EG7-ova transfektantu a cestou cytoplazmaticky ova-zatížených splenocytů, je schopna rozpoznat EL4 buňky pokryté ova peptidem 253-276. Aby bylo prokázáno, že rozpustný ovalbumin v AF indukuje podobnou CTL odpověď, slezinné buňky byly připraveny z imunizovaných myši a stimulovány s EG7-ova. Efekty byly testovány proti EL4 buňkám pokrytým peptidem ova 253-276, nebo s kontrolním peptidem odvozeným od myelin basic proteinu (MBP 84-102). Výsledky ukázaly, že ova-AF senzibilizují CTL s podobnou specifitou jako pomocí transfektantů, nebo cytoplazmatickým zatížením ova (obr. 1A, 1B a 1C). Efektorové buňky senzibilizované pomocí ova-AF účinně lyzují EG7-ova a netransfektované EL4 buňky pokryté ova peptidem 253-276, (50 μ g/ 10^8 buněk), ale neštěpí EL4 buňky pokryté 50 μ g MBP peptidu na 10^8 buněk.

V beta-galaktosidázovém systému, Carbone a Bevan, *supra*, ukázali, že beta-gal exprimující transfektant a cytoplazmaticky zatížené splenocyty rozpustnou beta-galaktosidázou indukovaly CTL, když pak tyto buňky lyzovaly beta-gal expresivní transfektant- a nontransfektantní buňky P815 pokryté alkalicky natrávenou beta-galaktosidázou. Rozpustná beta-galaktosidáza indukuje CTL, které pak mají podobnou specifitu jako po imunizaci v AF (obr. 2).

Příklad 3: CTL efekty jsou CDB⁺ T buňky

Že rozpustné bílkovinné antigeny v AF indukují CD8⁺ efektor T buněk bylo prokázáno následovně. Splenocyty z imunizovaných myši byly kultivovány po pět dnů s transfektanty ozářenými *in vitro*. Nato byly buňky odebrány a zbaveny CD4⁺ nebo CD8⁺ buněk použitím monoklonálních anti-CD4 nebo anti-CD8 protilátek plus komplement. Vyčerpané populace byly nato testovány proti ^{51}Cr -EG7-ova v ova systému nebo ^{51}Cr -P13.1 v beta-gal systému. Údaje prezentované na obr. 4 ukazují, že v ova systému zbavení CD8⁺ buněk zrušilo cytolytickou

aktivitu propůjčenou kompletnímu efektoru buněčné populace. Nicméně vyčerpání $CD4^+$ T buněčné populace nemělo jakýkoli vliv na lyzy EG7–ova.

- 5 Podobně v beta–gal systému vyčerpání $CD8^+$ T buněk rušilo cytolytický účinek slezinných buněk vyvolaný imunizací beta–gal–antigenovým přípravkem (data nejsou uvedena).

Příklad 4: Rozpustný ova v AF senzibilizuje $CD8^+$ T buňky

- 10 Aby bylo demonstrováno, že ova–AF senzibilizuje $CD8^+$ buněčnou populaci in vivo a je kritickým faktorem pro druhotnou odpověď in vitro, $CD4^+$ nebo $CD8^+$ populace byly vyčerpány ze slezin myši imunizovaných ova–AF a přirozených myši. Ošetřené populace pak byly stimulovány in vitro se samotným EG7–ova, nebo v kombinaci $CD4^+$ a $CD8^+$ T buněk z myši imunizovaných pomocí ova–AF, nebo v různých kombinacích $CD4^+$ nebo $CD8^+$ T buněk z přirozených myši. Obr. 5 ukazuje, že senzibilizované $CD8^+$ buňky jsou dominantní pro manifestaci sekundární CTL odpovědi in vitro. Tato data také ukazují, že pro účinnou sekundární CTL odpověď jsou vyžadovány $CD4^+$ T buňky. $CD4^+$ buňky nejsou nutné k senzibilizaci.

- 20 Uvedené příklady demonstrují účinek antigenního přípravku na indukci I třídy restringované CTL odpovědi proti rozpustným bílkovinným antigenům. Antigenní přípravek zprostředkoval CTL senzibilizaci rozpustným antigenem, která je podobné povahy jako je aktivita indukovaná transfektanty a splenocyty cytoplazmaticky zatíženými rozpustným ova nebo beta–gal. V ovalbuminovém systému, EG7–ova, cytoplazmaticky zatížené splenocyty a ova–AF vyvolávají: (a) I třídu restringovaných $CD8^+$ CTL; (b) CTL, které rozpoznávají cílové buňky senzibilizované pomocí ova 253–276 syntetického peptidu; a (c) dlouho přežívající CTL po 25 pouhé jediné imunizaci. V beta–gal systému, beta–gal–AF indukovaná CTL rozpozná beta–gal expresivní transfektant C3–4, a též netransfektované senzibilizované P815 buňky s alkalicky štěpenou beta–galaktosidázou. To je analogické k případu pozorovaného při CTL indukci cestou imunizace pomocí slezinných buněk cytoplazmaticky zatížených beta–galaktosidázou. Indukce 30 ova specifické CTL antigenním přípravkem je unikátní, protože ani ova inkapsulovaná do pH citlivých liposomů ani do kamence (data nejsou ukázána), nemůže indukovat senzibilizaci in vivo.

- 35 Tyto příklady ukazují, že antigenní přípravek shora použitý a jeho ekvivalenty jsou použitelné v humánní terapii a vývoji vakcín k indukci CTL u různých karcinomů a virových onemocnění.

Příklad 5

- 40 Toto je specifický příklad prokazující použití výše uvedeného AF na produkční třídu I restringovaných CTL senzibilizací rozpustným gp120 z HIV.

- 45 Linie expresních buněk gp160 IIIB (15–12) byla produkována v Balb/c fibroblastech, v odvozené linii 3T3. Ta byla získána od Dr. Ron Germain–a a Dr. Jay Berzovsky–ho, National Institute of Health, Bethesda, M. D. Linie expresivních buněk gp160 byla použita pro in vitro stimulaci slezinných lymfocytů senzibilizovaných in vivo, a též použita jako cílové buňky. V mnoha pokusech byl použit peptid 18IIb, který obsahuje dominantní CTL epitop, pro stimulaci in vitro. Pro peptidickou restimulaci v kultuře byl do média přidáván IL–2. Balb/c myši byly imunizovány jedenkrát s 1 μ g gp120 na myš za přidání AF, nebo bez jeho přidání. Myši byly injikovány 50 subkutánně nebo do ocasu. Slezinné buňky byly odebrané z imunizovaných myši tři týdny po imunizaci a stimulovány in vitro pomocí ozářených gp160 transfektantů nebo peptidem 18IIb. Po pěti dnech kultivace in vitro bylo dosaženo senzibilizace přítomností specifických efektorů schopných lyzovat gp160 transfektanty, a nikoli netransfektované buněčné linie. V některých experimentech byly použity vac:gp160 infikované P815 buňky jako buňky cílové. Výsledky jsou 55 ukázány v tabulce 4A, kde CTL odpověď je potencovaná pomocí AF a gp120. Je hodno

zaznamenání, že v gp120 systému je jediný případ, kde optimum AF působení na gp120 specifickou CTL indukci (jedinou imunizací s 1 µg gp120 v AF) neobsahovalo vůbec, nebo obsahovalo pouze minimum pluronic-u. Avšak, když byly myši imunizovány opakovaně s 5 µg gp120 v AF obsahujícím vyšší koncentraci pluronic-u (3,75 %), byla pozorována výrazná indukce CTL (data neuvedena).

Následující příklad demonstruje použití antigenního přípravku tohoto vynálezu za použití pouze jedné nebo dvou komponent. Tyto příklady prokazují, že CTL-odpovědi mohou být indukovány s pouhými dvěma komponentami ze tří komponent, které byly používány dříve.

Příklad 6: Stanovení kritických komponent nutných pro CTL indukci

Aby mohlo být stanoveno, zda všechny shora zmíněné komponenty jsou nutné pro specifickou indukci antigenem, byly myši imunizovány ovalbuminem v mikrofluidizovaném přípravku různých kombinací dvou ze tří složek přítomných v AF. Třetí komponenta je substituována PBS. Dvousložková kombinace byla použita následovně: Squalane/TWEEN v PBS, Squalane/Pluronic v PBS nebo Pluronic/TWEEN v PBS. Jiné sestavení skupin bylo tam, kde myši byly imunizovány pomocí ova v jednosložkovém systému, to je Squalane v PBS, Pluronic v PBS nebo jen TWEEN v PBS.

Shora zmíněné tříložkové antigenní přípravky mají toto složení: 0,300 g TWEEN 80 (Aldrich, WI), 1,875 g Pluronic L121 (BASF, NJ), a 7,5 g Squalene (Aldrich, WI), doplněno do 50 ml přidáním PBS.

Dvousložkové přípravky byly tohoto složení:

Squalane/TWEEN: 0,300 g TWEEN 80 a 7,5 g Squalane, doplněno na 50 ml s PBS.
Pluronic/TWEEN: 1,875 g Pluronic L121 a 0,300 g TWEEN 80, doplněno na 50 ml s PBS.
Pluronic/Squalane: 1,875 g Pluronic L121 a 7,5 g Squalane, doplněno do 50 ml s PBS.

Tříložkové přípravky s proměnlivou koncentrací pluronic-u byly tyto:

Squalane a TWEEN koncentrace byly zachovány jako předtím, ale koncentrace pluronic-u byly měněny:

Pro 50 ml objemy:

S (gramy)	T (gramy)	P (gramy)	P
7,5	0,300	0,75	1,5%
		0,075	0,15%
		0,0075	0,015%
		0,00075	0,0015%
		0,00091	0,0018%
		0,00045	0,0009%
		0,00017	0,0003%

Vzorky pak byly zpracovány pomocí mikrofluidizačního přístroje, model 110T, Microfluid. Corp, dány do lahviček a skladovány při 4 °C do použití.

Ovalbumin (ova, Sima, MO) byl navážen a dán do roztoku 0,3 mg/ml v HBSS (Whittaker), supra. Zásobní roztok 0,3 mg/ml byl kombinován s dvou-složkovými přípravky v následujících poměrech: 5 dílů ovalbuminového roztoku (0,3 mg/ml), 3,3 částí dvousložkového přípravku a 1,7 částí HBSS. Podobně i beta-gal a HIV gp120 byly smíchány s AF.

Přípravek byl protřepán a uložen v ledu do doby injekování. Všechny roztoky byly kombinovány těsně před aplikací.

Každá myš obdržela 200 μ l jednoho přípravku obsahujícího 30 μ l ova subkutánní injekcí a do kořene ocasu. Myši pak byly ponechány v klidu nejméně dva až čtyři týdny před odběrem sleziny.

Dva týdny po imunizaci byly slezinové buňky vypreparovány a stimulovány *in vitro* ozářenými EG7-ova. Po pěti dnech kultivace byla stanovena přítomnost ova specifických CTL testováním proti ^{51}Cr -EG7-ova nebo ^{51}Cr -EL4 ve čtyřhodinové analýze sledováním ^{51}Cr . Získané výsledky jsou prezentovány na obr. 6–8 a ukazují, že ovalbumin připravený v mikrofluidizovaném dvousložkovém systému může senzibilizovat ova specifické CTL *in vivo*.

Později byl hodnocen relativní přínos jednotlivých komponent na jejich schopnost indukvat CTL, když jsou kombinovány s bílkovinným antigenem. Pro účely imunizace byl rozpustný antigen mixován s mikrofluidizovanými vehikuly tak, aby byla získána stabilní homogenní emulze s částicemi o rozměrech od 250 do 300 nm. Pro další definování komponent Squalane-TWEEN 80-pluronic (STP) přípravku zodpovědného za CTL indukci, byly myši imunizovány ova ve Squalane-TWEEN 80 směsi, pluronic-TWEEN 80 (PT) směsi nebo Squalane-pluronic (SP) směsi a jako kontrola ve Squalanu (S), TWEENU 80 (T) nebo pluronic-u (P). Myši byly též imunizovány s ova-SAFm (obsahující 70 μ g MDP) nebo ova-kamenec jako kontroly adjuvans. Za účelem pozitivní kontroly byly myši imunizovány slezinovými buňkami cytoplazmaticky zatíženými rozpustným ova. Byly též použity další kombinace a náhrady a výsledky jsou prezentovány v tabulce 1. Výsledky ukazují, že 30 μ g ova v kombinaci s STP nebo ST senzibilizuje I třídu restringované CTL odpovědi u myší. Senzibilizace ova specifických CTL pomocí ova v STP nebo ova v ST se zdá být lepší než ta, která je indukována slezinovými buňkami cytoplazmaticky zatíženými rozpustným ova. Přípravky ova v PT nebo v SP mohly indukvat ova specifickou CTL odpověď u myší pouze nedůsledně a spoře. Na rozdíl od SAFm, přidání MDP k ST přípravku nemůže vyrovnat ova specifickou CTL indukci u myší (tabulka 2). Specifická CTL indukce se nevyskytovala, když byly myši imunizovány s ova-SAFm nebo ova-kamencem, ani když byly myši imunizovány s jednotlivými složkami S, P nebo T smíchány s ova. Myši imunizované s ova v množství do 1 mg v (a) HBSS, v (b) SAFm nebo (c) po absorpci na kamenec nesenzibilizují ova specifickou CTL odpověď.

35

Tabulka 2

Indukce ova specifické CTL odpovědi není blokována ST + MDP

Stimulátor	Cílové buňky	E – T	% cytotoxicity u myší imunizovaných s ^x			
			ova-ST	ova-ST	ova-ST MDP myš 300 μ g	ova-ST MDP myš 72 μ g
EG7-ova	EG7-ova	100:1	0	100	82	76
		33:1	0	86	67	62
		11:1	0	33	39	25
		3:1	0	6	13	3
		1:1	0	0	0	0
		3:1	0	0	0	0

40

^x myši byly imunizovány s ova v různých přípravcích (30 μ g),^{xx} % cytotoxicity byla vypočítána odečtením procent zabitých buněk od antigen-neexprimovaných buněčných linií.

Příklad 7: Komponenty nutné pro ova specifickou produkci protilátek

Myši byly imunizovány třikrát ve dvoutýdenních intervalech s 30 µg ova v HBSS, STP, PT nebo SP. Jako pozitivní kontroly byly myši imunizovány s ova-SAFm, protože je známo, že SAFm indukuje silnou protilátkovou odpověď.

Sedm dní po druhé a třetí imunizaci byly myši vykrváčeny a získaná séra byla testována na ova specifickou protilátkovou odpověď. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Tyto ukazují, že myši imunizované s ova v STP, ST nebo SAFm projeví podobné anti-ova odpovědi po třech imunizacích.

Tabulka 3

Indukce anti-ova protilátkové odpovědi

Imunizováno s ^a ova v	Počet myší s odpovědí/celkový počet injikovaných myší	Anti-ova protilátkový titr ^b 1/sérové zředění
Pokus č. 1		
HBSS	0/3	< 1/20; < 1/20; > 15,360
STP	3/3	> 1/15,360; > 1/15,360; > 1/15,360
ST	3/3	1/3840; 1/15,360; 1/3840
PT	3/3	> 1/15,360; > 1/15,360; > 1/15,360
SP	3/3	> 1/15,360; > 1/15,360; > 1/15,360
SAFm	3/3	> 1/15,360; > 1/15,360; 1/3840
Pokus č. 2		
STP.0015 %	3/3	> 1/4860; > 1/4860; > 1/4860
STP.015 %	3/3	> 1/4860; > 1/4860; > 1/4860
STP.15 %	3/3	> 1/4860; > 1/4860; 1/1620
STP 1.5 %	3/3	> 1/4860; > 1/4860; 1/1620
HBSS	1/3	< 1/20; 1/180; < 1/20
ST	3/3	> 1/4860; > 1/4860; > 1/4860
STP	3/3	> 1/4860; > 1/4860; > 1/4860

^a Myši byly imunizovány třikrát s 30 µg ova v různých přípravcích.

^b Titr protilátek byl vypočítán jako ředění séra, které dávalo OD₄₀₅ větší než OD₄₀₅ + 2SD získané s pre-imunními séry.

Příklad 8: Specifické CTL indukce s HIV gp120

HIV gp120 IIIB byl použit jako třetí antigenní systém k prokázání CTL indukce v STP nebo jiných dvou- a třísložkových obdobách přípravku. Myši byly imunizovány s 1 µg gp120 IIIB v HBSS, STP, PT nebo ST. Jako kontrolní skupina byly myši imunizovány s 1 µg gp120 IIIB v SAFm nebo CFA (kompletní Freudovo adjuvans) (tabulka 4B). Tři týdny po imunizaci byly slezinové buňky vypreparovány a stimulovány *in vitro* transfektantními buňkami po jejich ovlivnění mitomycinem nebo po ovlivnění těchto transfektantů 15–12 peptidem 18IIIB. Po pětidenní kultivaci byly rezultující efektorové buňky testovány proti vaccinia gp160 IIIB, nebo parenterálně vaccinia-infikovaným P815 jako cílovým buňkám. Výsledky demonstrují, že gp120-Squalane-TWEEN 80 shodně indukovaly gp120 specifickou CTL odpověď u myší (tabulky 4A a 4B). CFA nebo SAFm byly jakkoli neschopné indukovat gp120 specifickou CTL odpověď (tabulka 4B). V separátní studii byly testovány gp120 v ST s proměnlivými dávkami od 0,0015 % do 1,5 % na indukci CTL.

Tabulka 4A

Indukce gp120 specifické CTL odpovědi u myší

Stimulátor	cílové buňky**	E-T	gp120-HBSS	% cytotoxicity u myší imunizovaných pomocí*	
				gp120-ST	gp120-STP
18IIIb/II.2	vac:gp120	100:1	23	42	NA***
		33:1	23	38	NA
		11:1	0	0	NA
		3:1	0	35	NA
18IIIb/II.2	15-12	100:1	0	50	0
		33:1	0	35	0
		11:1	0	27	0
		3:1	0	18	0
18IIIb/II.2	ST3 + 18IIIb	100:1	0	59	13
		33:1	0	59	2
		11:1	0	57	0
		3:1	0	29	0
15-12	vac:gp120	100:1	35	84	NA
		33:1	19	65	NA
		11:1	12	37	NA
		3:1	0	22	NA
		1:1	0	0	NA

5

* myši byly imunizovány pomocí 1 µg gp120III v různých přípravcích,

** % cytotoxicity byla vypočítána dělením % zabitých buněk antigenem neexprimovanými buněčnými liniemi,

*** NA; není k dispozici – neupotřebitelné.

10

Tabulka 4B

Indukce gp120 specifické CTL odpovědi u myší^a

15

% cytotoxicity u myší infikovaných pomocí ^b							
gp120-HBSS		gp120-ST		gp120-CFA		gp120-Saf-M	
^c E:T	%	E:T	%	E:T	%	E:T	%
100:1	16	67:1	94	17:1	0	100:1	3
33:1	14	22:1	91	6:1	0	33:1	2
11:1	2	7:1	58	2:1	0	11:1	0
3:1	0	2.5:1	57	.7:1	0	3:1	0
1:1	0	.8:1	12	.2:1	0	1:1	0
3:1	0	.3:1	7	.07:1	0	.3:1	0

^a Myši byly imunizovány s 1 µg gp120IIIb v různých přípravcích.^b Slezinné buňky od různých skupin myší byly stimulovány *in vitro* s 18IIIb peptidem a IL-2.^c Cytotoxicita byla testována proti ⁵¹Cr značeným 3T3 nebo 15-12 buňkám; % cytotoxicity byla vypočítána dělením % zabitých buněk antigenem neexprimovanými buněčnými liniemi.

20

Příklad 9: Indukce gp120 specifické humorální odpovědi u myši

Pro indukci gp120 specifických humorálních odpovědí byly myši imunizovány s 1 µg gp120IIIb třikrát ve dvoutýdenních intervalech. Zvířata byla vykrváčena a testována na přítomnost IgG protilátek detekcí gp120IIIb za užití ELISA analýzy na pevné fázi. Výsledky experimentu 1 demonstrují, že gp120-ST nebo -PT jsou lepší imunogeny než gp120-HBSS, gp120SAFm (tabulka 5) nebo gp120-STP. Nicméně, výsledky v experimentu 2 demonstrují, že gp120 v ST nebo STP (obsahující koncentrace pluronic-u 1,5 % nebo 3,75 %) mohou indukovat protilátkovou odpověď vysokého titru.

Tabulka 5

Indukce anti-gp120 protilátkové odpovědi

Imunizováno s ^a gp120 v	počet myši s odpovědí/celkový počet injikovaných myši	anti-gp120 protilátkový titr ^b (1/ředění séra)
Pokus č. 1		
HBSS	2/3	1/60; < 1/20; 1/60
STP	1/3	< 1/20; > 1/4860; < 1/20
ST	3/3	> 1/4860; > 1/4860; > 1/4860
PT	3/3	> 1/4860; > 1/4860; > 1/4860
SP	2/3	< 1/20; 1/540; 1/540
SAFm	3/3	1/180; > 1/4860; 1/540
Pokus č. 2		
STP 0.0015 %	2/3	1/180; 1/1620; < 1/20
STP 0.015 %	0/3	< 1/20; < 1/20; < 1/20
STP 0.15 %	2/3	> 1/4860; 1/1620; < 1/20
STP 1.5 %	3/3	> 1/4860; > 1/4860; < 1/4860
HBSS	1/3	< 1/20; < 1/20; > 1/4860
ST	3/3	> 1/4860; > 1/4860; > 1/4860
STP	2/3	> 1/4860; > 1/4860; 1/20

^a Myši byly imunizovány s 1 µg gp120IIIb třikrát v různých přípravcích.

^b Anti-gp120 protilátkový titr byl vypočítán stejně jako je uvedeno v tabulce 3.

Příklad 10: gp120 specifická protilátková odpověď u opic

Opice (2 na skupinu) byly imunizovány s gp120-SAFm, gp120-SPT, gp120-ST nebo gp120-HBSS. Jako kontrolní skupina byly imunizovány opice s rekombinantní vakcínou obsahující gp160 IIIb. Opice byly imunizovány ve dvoutýdenních intervalech a vykrváčeny 2 týdny a 3 týdny po druhé imunizaci. Pre-imunní a imunní séra z každé opice byla sériově ředěna a analyzována na anti-gp120 aktivitu metodou ELISA, jak bylo popsáno v materiálech a metodách. Údaje (obr. 9) ukazují, že opice imunizované s gp120-STP nebo gp120-SAFm vykazují podobnou odpověď. Jedna opice imunizovaná s gp120-ST, vykazuje anti-gp120 odpověď, podobnou jako u gp120-SAFm nebo gp120-SPT imunizované skupiny. Jedna opice imunizovaná s gp120-ST nebyla schopna indukovat silnou anti-gp120 odpověď ani po dvou imunizacích.

Příklad 11: gp120 specifické CTL odpovědi u opic

Opice byly několikrát imunizovány s 30–50 µg HIV gp120 v AF nebo v HBSS. Jako kontrolní skupina byly imunizovány opice s rekombinantní vakcínou gp160. Naše předběžné výsledky ukazují, že 1/2 opic imunizovaných s gp120-AF a 1/2 opic imunizovaných s gp160:vakcínou preferenčně zabíjela autologní cílové buňky infikované s vac:gp160 (obr. 10A a 10B).

Charakteristika sekvencí:

(2) INFORMACE PRO SEQ ID č.: 1:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 24
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) SŘETĚZENÍ: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) SEKVENČNÍ POPIS: SEQ ID č. 1:

Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu
 Trp Thr 16

Ser Ser Asn Val Met Glu Glu Arg 24

(2) INFORMACE PRO SEQ ID č.: 2:

(i) SEKVENČNÍ CHARAKTERISTIKY:

- (A) DÉLKA: 19
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) SŘETĚZENÍ: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) SEKVENČNÍ POPIS: SEQ ID č. 2:

Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr
 Pro Arg 16

Thr Pro Pro 19

PATENTOVÉ NÁROKY

45

1. Farmaceutická kompozice k indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů, vyznačující se tím, že obsahuje antigen indukující v kombinaci s níže definovaným mikrofluidizovaným antigenním přípravkem cytotoxickou odpověď T-lymfocytů specifickou pro tento antigen, ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím alespoň dvě složky vybrané ze skupiny zahrnující

50

- a) stabilizující detergent udržující složky mikrofluidizovaného antigenního přípravku ve formě stabilní emulze,

b) agens vytvářející micely udržující v kombinaci s dalšími složkami obsaženými v mikrofluidizovaném antigenním přípravku stabilní emulzi a vytvářející strukturu podobnou micelám a

5 c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

10 s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

15 2. Kompozice podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antigen je vybrán z antigenních částí HIV antigenů ze skupiny gp120, gp160, gag, pol, Nef, Tat a Rev, antigenů malárie ze skupiny zahrnující CS protein a Sporozoite povrchový protein 2, povrchových antigenů hepatitidy B ze skupiny Pre-S1, Pre-S2, HBc Ag a HBe Ag, chřipkových antigenů ze skupiny HA, NP a NA, povrchových antigenů hepatitidy A, antigenů herpetického viru ze skupiny
20 EBV gp340, EBV gp85, HSV gB, HSV gD, HSV gH, HSV časný bílkovinný produkt, cytomegalovirus gB, cytomegalovirus gH a IE protein gP72, antigenů syncyriálního viru respiračního traktu ze skupiny F protein, G protein a N protein, antigenů viru Herpes papiloma E4, E6 a E7 a tumorových antigenů ze skupiny zahrnující karcinom CEA, mucin asociovaný s karcinomem, karcinom P21, karcinom P53, melanom MPG, melanom p97, MAGE antigen,
25 onkogenní produkt Neu karcinomu, genový produkt karcinomu p53, specifický antigen prostaty, tedy PSA, a s prostatou asociovaný antigen, a přeměněný p21 ras protein.

3. Kompozice podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje antigen ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím
30

a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,

b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a

35 c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

40 s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

45 4. Kompozice podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antigen je vybrán z HIV antigenů ze skupiny gp120, gp160, gag, pol, Nef, Tat a Rev, antigenů malárie ze skupiny zahrnující CS protein a Sporozoite povrchový protein 2, povrchových antigenů hepatitidy B ze skupiny Pre-S1, Pre-S2, HBc Ag a HBe Ag, chřipkových antigenů ze skupiny HA, NP a NA, povrchových antigenů hepatitidy A, antigenů herpetického viru ze skupiny EBV gp340, EBV
50 gp85, HSV gB, HSV gD, HSV gH, HSV časný bílkovinný produkt, cytomegalovirus gB, cytomegalovirus gH a IE protein gP72, antigenů viru Herpes papiloma E4, E6 a E7, antigenů syncyriálního viru respiračního traktu ze skupiny F protein, G protein a N protein a tumorových antigenů ze skupiny zahrnující karcinom CEA, mucin asociovaný s karcinomem, karcinom P21, karcinom P53, melanom MPG, melanom p97, MAGE antigen, onkogenní produkt Neu

karcinomu, genový produkt karcinomu p53, specifický antigen prostaty, tedy PSA, a s prostatou asociovaný antigen, a přeměněný p21 ras protein.

5. Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení infekce HIV, **v y z n a č u j í c í s e t í m**,
5 že obsahuje HIV antigen ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím

a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,

10 b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a

c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve
15 vodě,

s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující
indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky,
a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

20 6. Kompozice podle nároku 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že HIV antigen je vybrán ze
skupiny zahrnující gp120, gp160, gag, pol, Nef, Tat a Rev.

7. Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení malárie, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že
25 obsahuje antigen asociovaný s malárií ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem
obsahujícím

a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,

30 b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a

c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve
35 vodě,

s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující
indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky,
a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

40 8. Kompozice podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antigen asociovaný s malárií
je vybrán ze skupiny zahrnující CS protein a Sporozoite povrchový protein 2.

9. Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení chřipky, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že
45 obsahuje antigen asociovaný s chřipkou ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem
obsahujícím

a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,

50 b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a

c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

- s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

10. Kompozice podle nároku 9, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antigen asociovaný s chřipkou je vybrán ze skupiny zahrnující HA, NP a NA.

11. Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení hepatitidy, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje antigen asociovaný s hepatitidou ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím

- a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,
- b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a
- c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

- s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

12. Kompozice podle nároku 11, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antigen asociovaný s hepatitidou je vybrán ze skupiny zahrnující povrchový antigen hepatitidy A nebo Pre-S1, Pre-S2, HBc Ag a HBE Ag.

13. Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení rakoviny, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje antigen asociovaný s rakovinou ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím

- a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,
- b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a
- c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

- s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

14. Kompozice podle nároku 13, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antigen asociovaný s rakovinou je vybrán ze skupiny zahrnující karcinom CEA, mucin asociovaný s karcinomem, karcinom P21, karcinom P53, melanom MPG, melanom p97, onkogenní produkt Neu karcinomu, genový produkt karcinomu p53, a přeměněný p21 ras protein.

15. Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení infekce herpetickým virem, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že obsahuje herpetický antigen ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím
- 5 a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,
- b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a
- 10 c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,
- kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,
- 15 s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.
- 20 16. Kompozice podle nároku 15, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že herpetický antigen je vybrán ze skupiny zahrnující EBV gp340, EBV gp85, HSV gB, HSV gD, HSV gH, HSV časný bílkovinný produkt, cytomegalovirus gB, cytomegalovirus gH a IE protein gp72.
17. Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení infekce syncytiálním virem respiračního traktu, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje antigen syncytiálního viru respiračního traktu
- 25 ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím
- a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,
- b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a
- 30 c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,
- kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,
- 35 s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.
- 40 18. Kompozice podle nároku 17, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že antigen syncytiálního viru respiračního traktu je vybrán ze skupiny zahrnující F protein, G protein a N protein.
19. Kompozice podle nároku 1 pro použití k indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů
- 45 u člověka nebo domácího či zemědělského zvířete, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje směs antigenu s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím dvě složky vybrané ze skupiny zahrnující
- a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,
- 50 b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a
- c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

20. Kompozice podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že je určena k indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů u člověka nebo u domácího či zemědělského zvířete infikovaného virem a trpícího jedním nebo několika symptomy infekce tímto virem.

21. Kompozice podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že antigen je vybrán z antigenních částí HIV antigenů ze skupiny gp160, gag, pol, Nef, Tat a Rev, antigenů malárie ze skupiny zahrnující CS protein a Sporozoite povrchový protein 2, povrchových antigenů hepatitidy B ze skupiny Pre-S1, Pre-S2, HBc Ag a HBe Ag, chřipkových antigenů ze skupiny HA, NP a NA, povrchových antigenů hepatitidy A, antigenů herpetického viru ze skupiny EBV gp340, EBV gp85, HSV gB, HSV gD, HSV gH, HSV časný bílkovinný produkt, cytomegalovirus gB, cytomegalovirus gH a IE protein gP72, antigenů viru Herpes papiloma E4, E6 a E7, antigenů syncyriálního viru respiračního traktu ze skupiny F protein, G protein a N protein a tumorových antigenů ze skupiny zahrnující karcinom CEA, mucin asociovaný s karcinomem, karcinom P21, karcinom P53, melanom MPG, melanom p97, MAGE antigen, onkogenní produkt Neu karcinomu, genový produkt karcinomu p53, specifický antigen prostaty, tedy PSA, a s prostatou asociovaný antigen, a přeměněný p21 ras protein.

22. Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení infekce HIV, **vyznačující se tím**, že obsahuje HIV antigen ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím dvě složky vybrané ze skupiny zahrnující

- a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,
- b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a
- c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

23. Kompozice podle nároku 22, **vyznačující se tím**, že HIV antigen je vybrán ze skupiny zahrnující gp160, gag, pol, Nef, Tat a Rev.

24. Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení malárie, **vyznačující se tím**, že obsahuje antigen asociovaný s malárií ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím dvě složky vybrané ze skupiny zahrnující

- a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,
- b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a
- c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

- 5 s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

- 10 **25.** Kompozice podle nároku 24, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antigen asociovaný s malárií je vybrán ze skupiny zahrnující CS protein a Sporozoite povrchový protein 2.

- 15 **26.** Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení chřipky, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje antigen asociovaný s chřipkou ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím dvě složky vybrané ze skupiny zahrnující

- a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,
20 b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a
25 c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

- 25 s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

- 30 **27.** Kompozice podle nároku 26, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antigen asociovaný s chřipkou je vybrán ze skupiny zahrnující HA, NP a NA.

- 35 **28.** Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení hepatitidy, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje antigen asociovaný s hepatitidou ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím dvě složky vybrané ze skupiny zahrnující

- a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,
40 b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a
c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

45 kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

- s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

- 50 **29.** Kompozice podle nároku 28, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antigen asociovaný s hepatitidou je vybrán ze skupiny zahrnující povrchové antigeny hepatitidy A a povrchové antigeny hepatitidy B ze skupiny Pre-S1, Pre-S2, HBc Ag a HBE Ag.

55

30. Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení rakoviny, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje antigen asociovaný s rakovinou ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím dvě složky vybrané ze skupiny zahrnující

- 5 a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,
- b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a
- 10 c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

15 s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

20 31. Kompozice podle nároku 30, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antigen asociovaný s rakovinou je vybrán ze skupiny zahrnující karcinom CEA, mucin asociovaný s karcinomem, karcinom P21, karcinom P53, MAGE, melanom MPG, melanom p97, onkogenní produkt Neu karcinomu, genový produkt karcinomu p53, a přeměněný p21 ras protein.

25 32. Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení infekce herpetickým virem, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje herpetický antigen ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím dvě složky vybrané ze skupiny zahrnující

- a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,
- 30 b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a
- c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

35 kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.

40 33. Kompozice podle nároku 32, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že herpetický antigen je vybrán ze skupiny zahrnující EBV gp340, EBV gp85, HSV gB, HSV gD, HSV gH, HSV časný bílkovinný produkt, cytomegalovirus gB, cytomegalovirus gH a IE protein gp72.

45 34. Kompozice podle nároku 1 pro použití k léčení infekce syncytiálním virem respiračního traktu, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje antigen syncytiálního viru respiračního traktu ve směsi s mikrofluidizovaným antigenním přípravkem obsahujícím dvě složky vybrané ze skupiny zahrnující

- 50 a) stabilizující detergent, definovaný v nároku 1,
- b) agens vytvářející micely, definované v nároku 1, a
- 55 c) biodegradabilní a biokompatibilní olej,

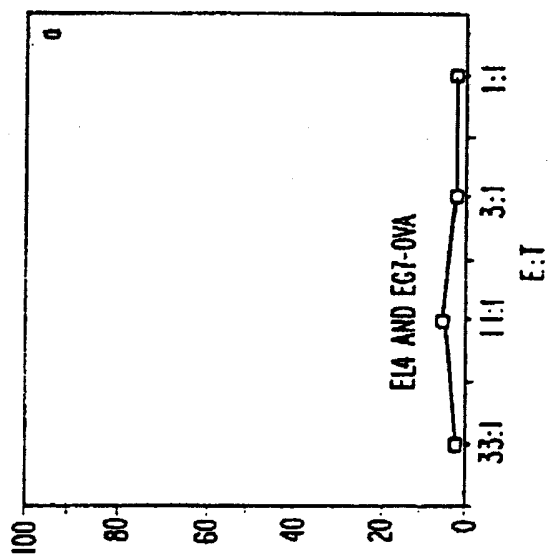
kterýžto mikrofluidizovaný antigenní přípravek je formulován jako stabilní emulze typu olej ve vodě,

- 5 s tím, že tento mikrofluidizovaný antigenní přípravek neobsahuje další součásti způsobující indukci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů a je prostý imunostimulující peptidické složky, a antigenem není antigen B-buněk lymfomu nebo albumin.
- 10 **35.** Kompozice podle nároku 34, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že antigen syncytiálního viru respiračního traktu je vybrán ze skupiny zahrnující F protein, G protein a N protein.

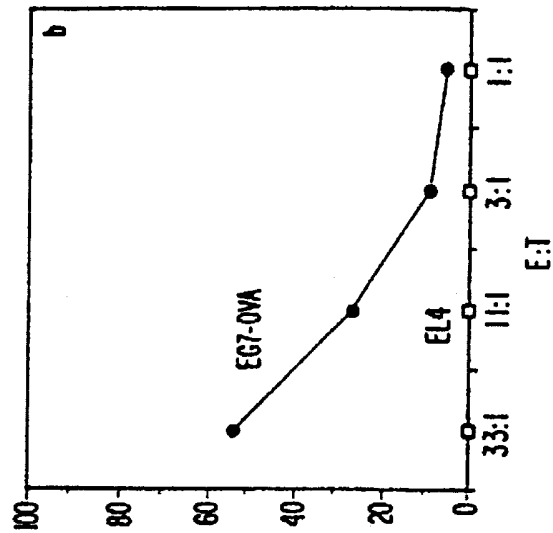
15

7 výkresů

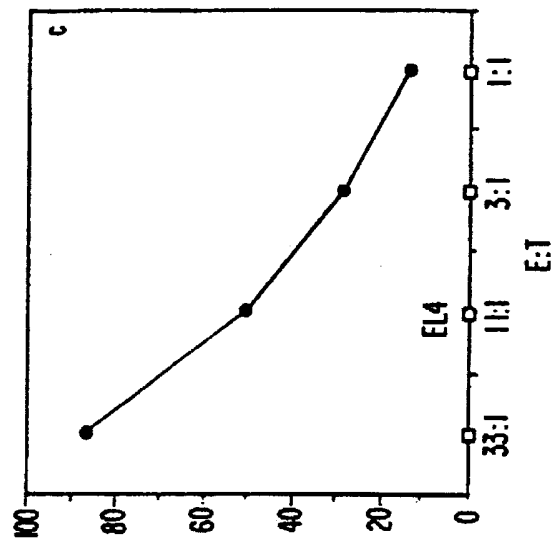
OBR. 1A



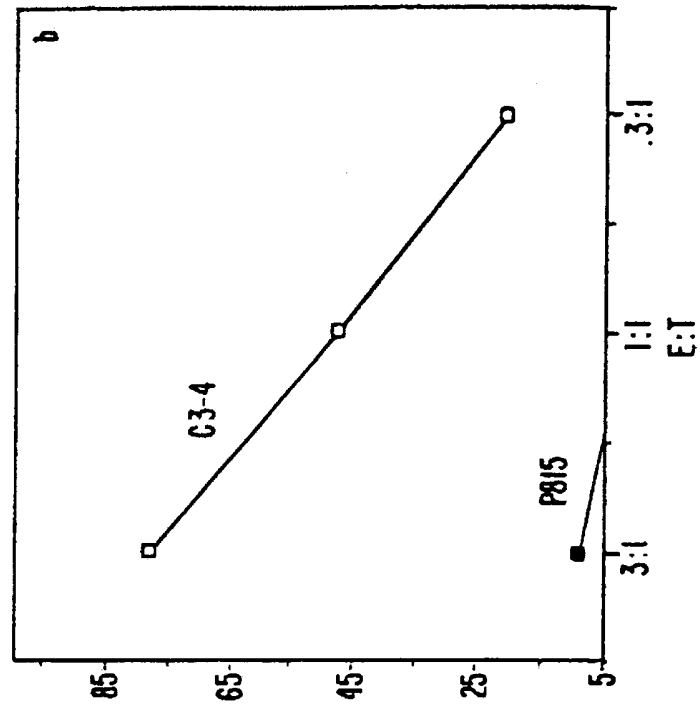
OBR. 1B



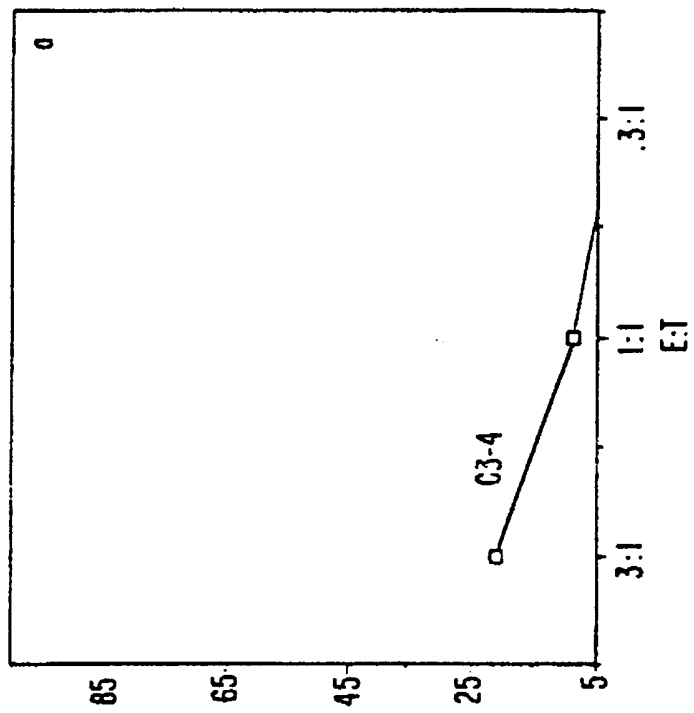
OBR. 1C

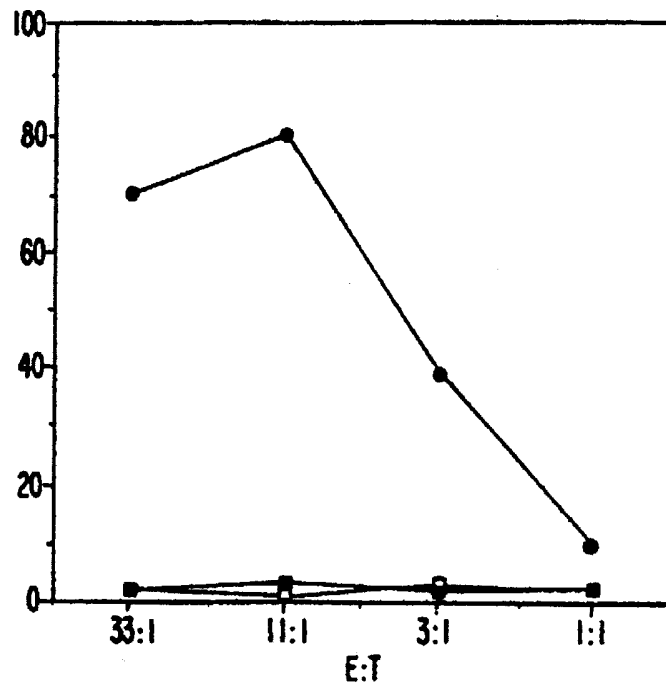


OBR. 2B

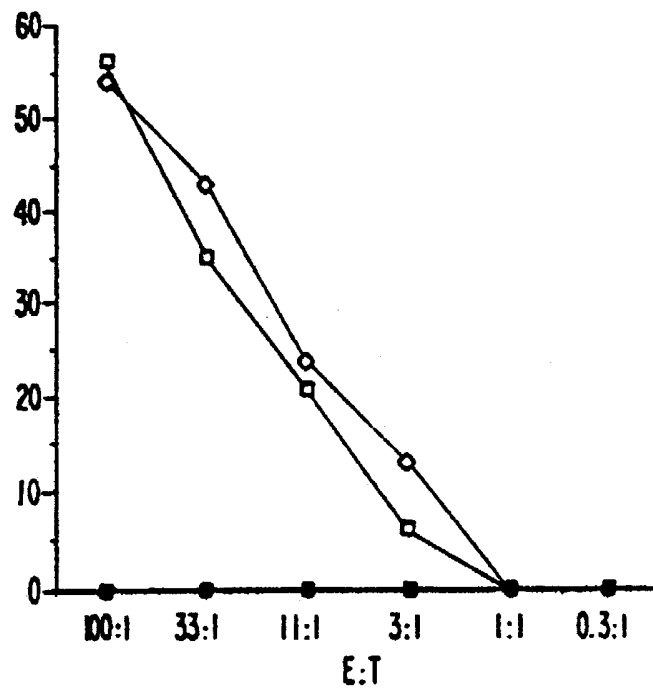


OBR. 2A

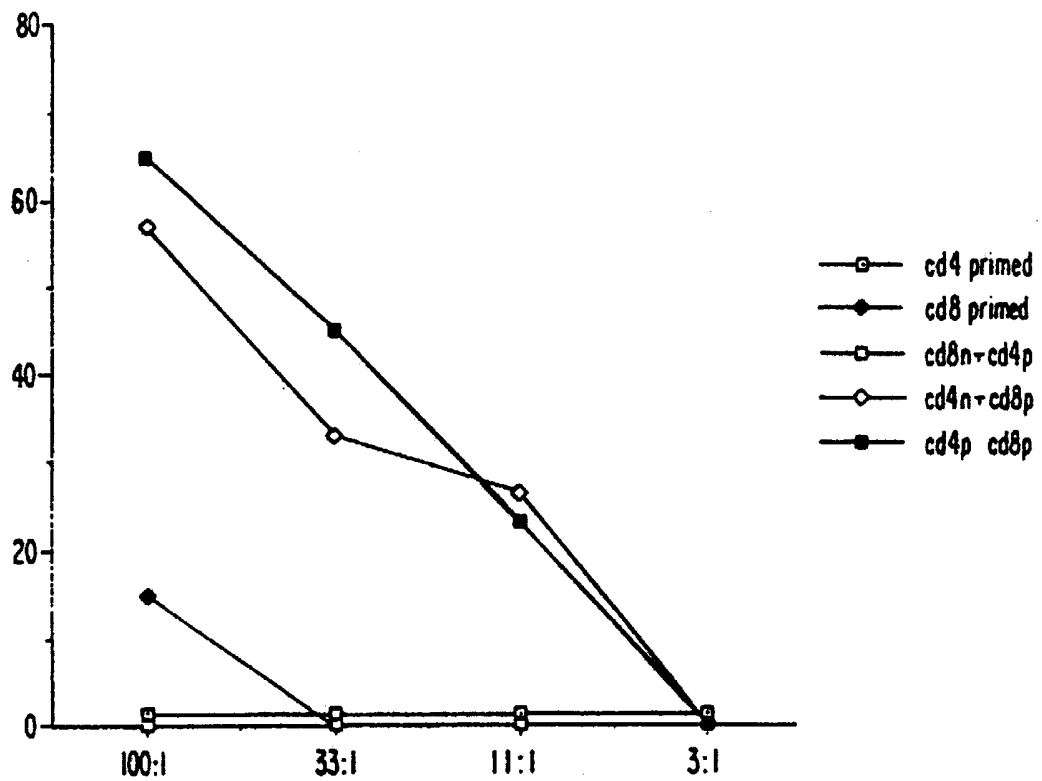




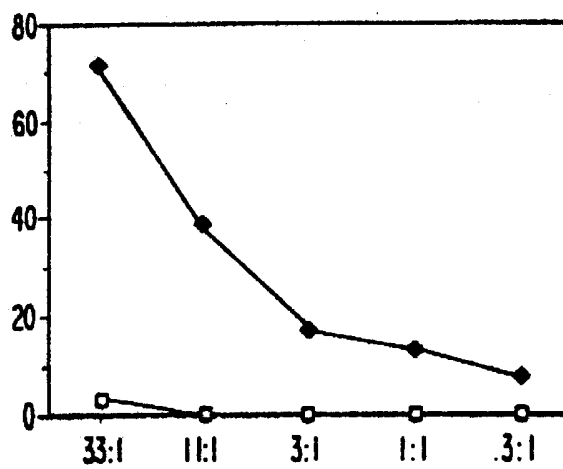
OBR. 3



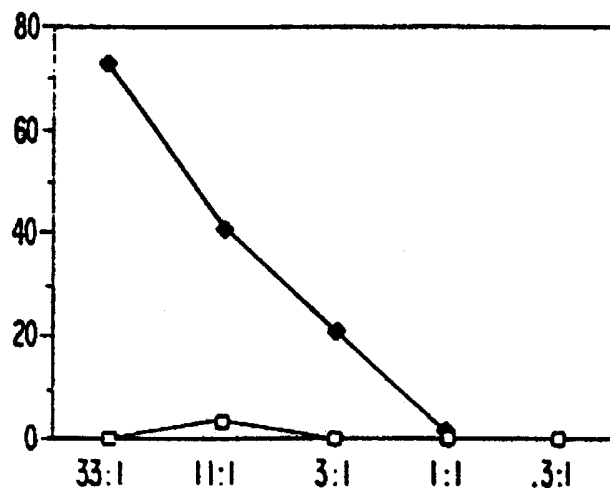
OBR. 4



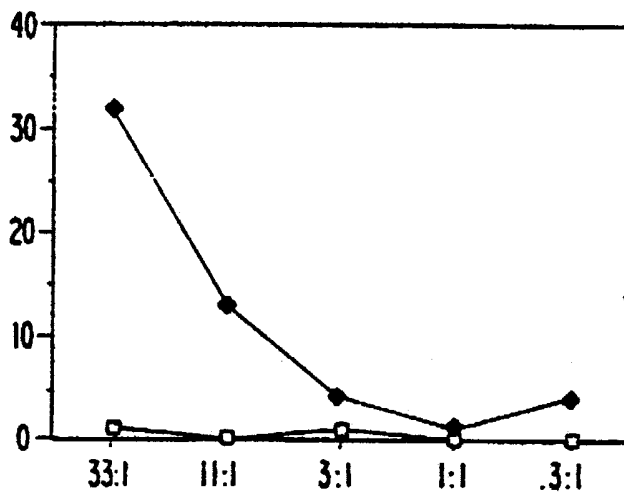
OBR. 5



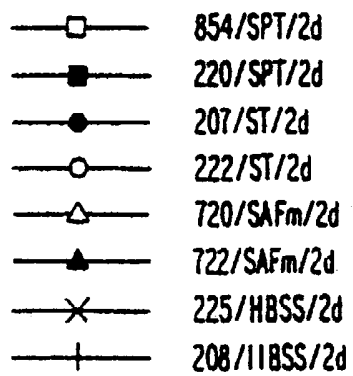
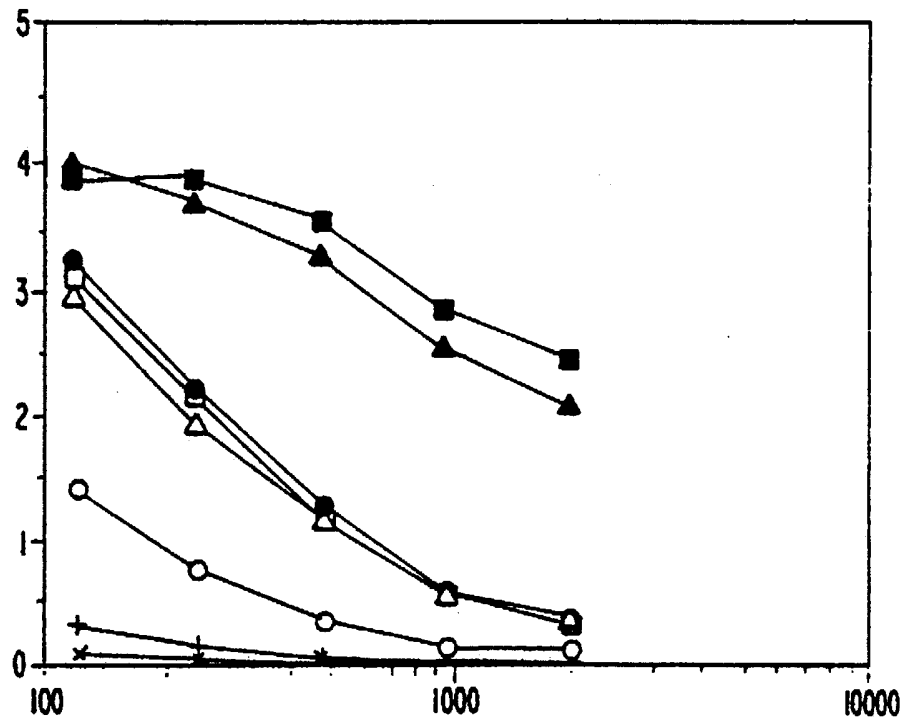
OBR. 6



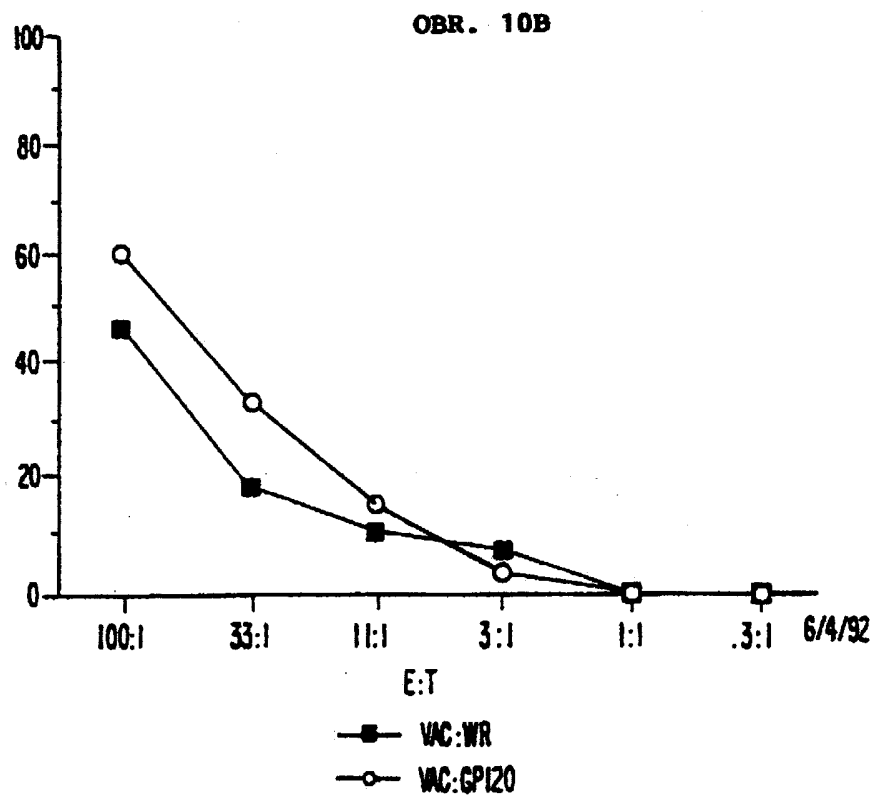
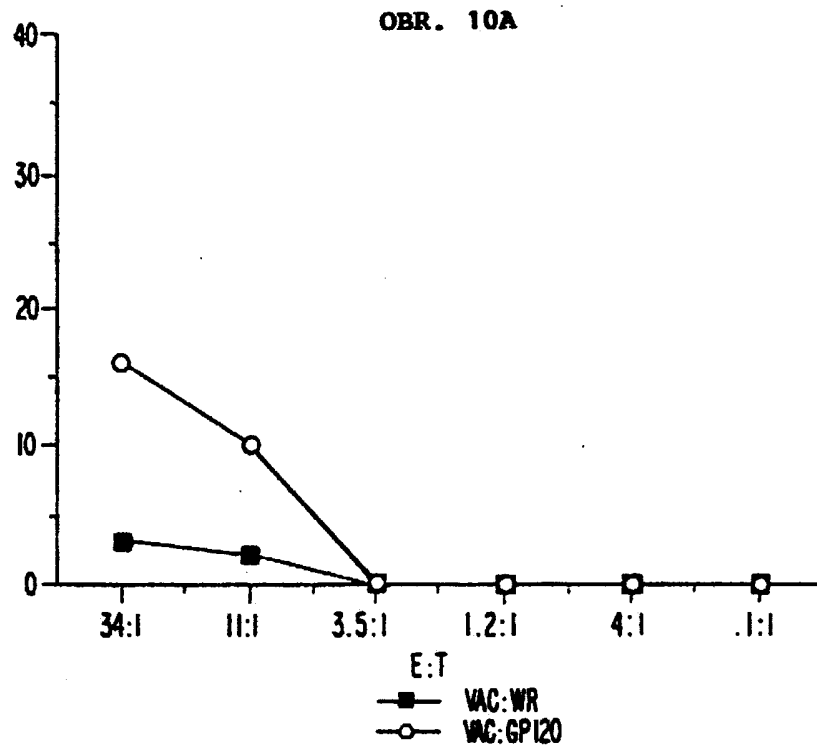
OBR. 7



OBR. 8



OBR. 9



Konec dokumentu
