

(19)



(10) **LT 5351 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5351** (51) Int. Cl. (2006): **A61K 31/70**
A61K 39/00

(21) Paraiškos numeris: **2005 087**

(22) Paraiškos padavimo data: **2005 09 21**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2006 04 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2006 07 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/CU2004/000003**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2004 02 27**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2005 09 21**

(30) Prioritetas: **47-2003, 2003 02 27, CU**

(72) Išradėjas:

Luis Enrique FERNANDEZ MOLINA, CU
Circle MESA PARDILLO, CU

(73) Patent savininkas:

CENTRO DE IMMUNOLOGIA MOLECULAR, Calle 216 Esq., 15, Atabey, Playa.,
12100 Ciudad de la Habana, CU

(74) Patentinis patikėtinis:

Marius JAKULIS - JASON, AAA Baltic Service Company, Jasinskio g. 16B,
Biurų centras Victoria, LT-01112 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Vakcinos kompozicijos gangliozido pagrindu, skirtos įvedimui po oda

(57) Referatas:

Aprašytos vakcinos kompozicijos, kuriose gangliozidai ir N. meningitidis OMP buvo sujungti, suformuojant labai mažo dydžio proteoliposomas (VSSP), skirtas įvedimui po oda. Šios kompozicijos nereikalauja bet kokių papildomų adjuvantų naudojimo. Aprašytos kompozicijos įgalina pranašesnį imunologinį gydymą gangliozidais, dalinai N-AcGM3/VSSP ir N-GcGM3/VSSP, injekcijos vietoje sukeliant mažiau agresyvią reakciją. Šias vakcinos kompozicijas galima naudoti paprastesniu būdu ir sveikesniu pacientams.

Technikos sritis: Šis išradimas susijęs su vakcinų kompozicijomis, įvedamomis po oda, turinčiomis gangliozidų, naudojamomis imunologiniam gydymui autoimuninių ligų, infekcinių ligų ir auglių, nenaudojant bet kokių papildomų adjuvantų.

Ankstesnis tyrimų būvis

Ilgą laiką yra žinomas noras naudoti autoimuninių ligų ir vėžio imunologinį gydymą, pavyzdžiui USA-A-4965198 patente aprašo GM2 gangliozido panaudojimą šių ligų prevencijai ir gydymui. Užregistruotoje patente paraiškoje EP-A-661061 ir patente US-A-6149921 yra aprašytos vakcinų kompozicijos, tam kad sužadintų arba padidintų antikūno atsaką prieš gangliozidą, kuris yra imunogene ir imunologiniame adjuvante.

Aprašyti imunogenai yra: VSSP (labai mažo dydžio proteoliposomos), sudarytos susijungus N-AcetilGM3 ir N-GlicolilGM3 glikolizidams nuo dabar: (N-AcGM3) ir (N-GcGM3), su *Neisseria meningitidis* išorinės membranos baltymų kompleksu (OMP).

Tokie imunogenai nuo dabar bus vadinami N-AcGM3/VSSP ir N-GcGM3/VSSP; jie yra labai mažo dydžio ir praktiškai nematomi elektroniniu mikroskopu, tirpūs vandenyje ir su padidintu plūduriavimo pajėgumu.

Vakcinų kompozicijoms, aprašytoms EP-A-661061 ir US-A-6149921 buvo reikalingas adjuvantas, toks kaip labai gerai žinomas Freundo nepilnasis adjuvantas.

Užregistruotoje patente paraiškoje WO-A-02145746 yra aprašytos vakcinų kompozicijos, turinčios (A) vieną arba daugiau antigenų su žemu antigeniškumu; (B) VSSP su sujungtu gangliozidu, daugiausia N-AcGM3/VSSP ir N-GcGM3/VSSP; ir (C) galiausiai, vieną arba daugiau adjuvantų.

Carr A. ir kt. straipsnyje, paskelbtame Melanoma Research, 2001, Vol. 11, pp 219-227 aprašytas vakcinų, turinčių N-AcGM3 gangliozidą priešnavikinis aktyvumas, esant pelių melanomai B16.

Šiame straipsnyje yra tirta imunologinio adjuvanto, ypač pilnojo Freundo adjuvanto arba panašaus į nepilnąjį Freundo adjuvantą – Montanido ISA 51, įtaka. Vakcinų buvo įvedamos į raumenis ir nustatyta, kad pelės, imunizuotos N-AcGM3/VSSP, bet kuriuo iš adjuvantų, Freundo arba Montanidu ISA 51, rodė IgM ir

IgG anti-N-AcGM3 atsaką 8-tą savaitę. Priešingai N-AcGM3/VSSP vakcina be adjuvantų nerodė jokio imunologinio atsako (psl. 223, dešinysis stulpelis).

Taigi, žinomas tyrimų lygis rodo, kad vakcinos, turinčios VSSP sujungtą su gangliozidais, turėtų būti komponuojamos su adjuvantais, būtent Freundo (pilnuoju arba nepilnuoju) arba Montanidu ISA 51.

Tačiau yra labai gerai žinoma, kad kai jie įvedami parenteraliai, tokie adjuvantai, dalinai Freundo pilnasis adjuvantas, sukelia tam tikrus nepatogius šalutinius efektus, tokius kaip injekcijos vietos chroniškas uždegimas, galimos granulomos ir sterilūs abscesai arba išopėjusios nekrozės audiniuose. Montanidas ISA 51 yra mažiau agresyvus, bet taip pat gali sukelti tam tikrus uždegiminius sutrikimus.

Būtų labai pageidautina pritaikymo požiūriu imunologiniam autoimuninių, infekcinių ir navikinių ligų gydymui naudoti naujas gangliozidų vakcinų kompozicijas, kurios yra mažiau agresyvios injekcijos vietoje ir kurios gali būti lengviau naudojamos su mažiau nepatogumų pacientams.

Šio išradimo autoriai atrado, kad vakcinos gangliozido pagrindu sukomponuotos su VSSP, jeigu jos įvedamos po oda, gali būti naudojamos be jokių adjuvantų ir turėti svarbias imunologines savybes.

Šio išradimo tikslai yra naujos vakcinos kompozicijos, įjungtos į VSSP, geriausiai N-AcGM3/VSSP ir N-GcGM3/VSSP, kurios neturi jokių imunologinių adjuvantų ir yra įvedamos po oda.

Dar vienas šio išradimo tikslas yra pacientų, kuriems reikalinga sustiprinti imunologinį atsaką, gydymo būdas, kuris glūdi poodiniame įvedime gangliozido vakcinos kompozicijų, geriausiai N-AcGM3/VSSP ir N-GcGM3/VSSP, kurios neturi jokių imunologinių adjuvantų.

Taip pat šio išradimo tikslas yra N-AcGM3/VSSP ir/arba N-GcGM3/VSSP vakcinos kompozicijų, neturinčių kitų antigeninių komponentų, išskyrus gangliozidus, arba bet kokių kitų imunologinių adjuvantų ir yra įvedamos po oda.

Detalus išradimo aprašymas

Šio išradimo vakcinos kompozicijų tikslas yra ištirpinti arba vandenyje disperguoti vieną arba daugiau gangliozidų ir juos įjungti į *N. meningitidis* (VSSP)

OMP, galinčių stimuliuoti (sužadinti) imunologinį atsaką įvedus po oda be jokių papildomų imunologinių adjuvantų.

VSSP yra labai stabili gangliozido hidrofobinė asociacija su *Neisseria meningitidis* išoriniu baltymų kompleksu be kovalentinių ryšių būtinybės. Tokios gangliozidų-baltymų sistemos yra detalai aprašytos patentuose EP-A-661061 ir US-A-6149921 ir kitose publikacijose, pavyzdžiui, Estevez et al. Vaccine, 1999; Vol. 18(1-2); pp 190-197. Šiuose dokumentuose taip pat aprašyta jų gavimo metodika.

Tarp gangliozidų, įskaitant VSSP rezultatus, laikomi geresniais šio išradimo N-AcGM3 ir N-GcGM3, kur ypatingai pageidautinas N-AcGM3.

Abiejų konjuguotų gangliozidų detalus imunogeniškumo aprašymas, kaip ir jų pritaikymas kaip priešvėžinių darinių ir įgyto imuniteto stimulatoriaus gali būti randamas aukščiau minėtuose dokumentuose ir apžvalginiuose straipsniuose: Bitton ir kt., Oncology Reports (2002), Vol. 9, pp. 267-276, ir paskutiniuose pranešimuose ir moksliniuose susitikimuose, pavyzdžiui 6-ajame Lotynų Amerikos imunologijos kongrese, vykusiame 2002m. gruodžio mėn. Havanoje, Saurez G. Ir kt. pranešime "N-acetil-GM3/VSSP/Montanido ISA 51 gangliozido vėžio vakcinos klinikinių bandymų I-oji fazė sudėtingiems krūties vėžio pacientams."

Vakcinų kompozicijos neturinčios kitų antigeninių komponentų, išskyrus gangliozidus, yra pageidautinas išradimų objektas, turintis unikalius imunologinius komponentus N-AcGM3 (N-AcGM3/VSSP) ir N-GcGM3 (N-GcGM3/VSSP), kur ypatingai pageidautinas yra būtent N-AcGM3/VSSP.

Šio išradimo vakcinos kompozicijų objektas yra VSSP tirpalai arba vandeninės dispersijos, kurios galiausiai gali turėti netoksinius, nedaržinančius, su vandeniu suderinamus tirpiklius, paprastai naudojamus vaistuose, skirtuose parenteraliniam vartojimui, galėtų būti polietilenglikolis.

Konjuguotų gangliozidų koncentracija tirpaluose arba vandeninėse dispersijose yra ne kritinė ir gali būti diapazone tarp 0,03 % ir 3 % (t/t), geriausiai tarp 0,04 % ir 2,5 % (m/t). Po oda įvedamų dozių diapazonas, naudojamų minėtoms vakcinoms šiame išradime, yra tarp 50 µg ir 2,4 mg, geriausiai tarp 200 µg ir 2 mg.

Šio išradimo vakcinos kompozicijų pagrindinė charakteristika yra ta, kad jas numatyta įvesti po oda be jokio papildomo imunologinio adjuvanto.

Imunologiniai adjuvantai yra dažnai naudojami vakcinų kompozicijose. Tokie adjuvantai palaiko imunogeninį poveikį skirtingais būdais:

- sukuriant antigeninį depozitą injekcijos vietoje, išvaduojant arba išlaisvinant antigeną sisteminėje formoje;
- padedant antigenui pasiekti blužnį ir limfinius mazgus per susiformavimą aliejaus mikrolašelių, lengvai sugaunamus makrofagų;
- tiesiogiai ar netiesiogiai aktyvuojant ląsteles, įtrauktas į imuninį atsaką;
- labiausiai žinomi imunologiniai adjuvantai yra pilnasis ir nepilnasis Freundo adjuvantas, Montanidas ISA, Ribi adjuvantai, Hunterio TiterMax, aliuminio druskos, Gerbu adjuvantas, QS-21 ir kt.

Šio išradimo autoriai netikėtai surado, kad gangliozidų/VSSP vakcinos yra įvedant po oda, adjuvantai gali būti pilnai eliminuojami. Todėl, nepaisant ankstesnio modernumo, beveik pilnai buvo atsisakyta įvedimo į raumenis.

Tuo būdu šis išradimas demonstruoja nepaneigiamus pranašumus beveik visada, jeigu tai liečia minėtas uždegimines problemas, kylančias vietoje, kai naudojami adjuvantai. Vakcinacijos su gangliozidais būdas yra paprastas, efektyvus ir mažiau agresyvus pacientams.

Sekančiuose pavyzdžiuose pateikiamos palyginamosios eksperimentinės detalės, įskaitant sąlygų sudarymą demonstruoti vakcinų kompozicijų, neturinčių imunologinių adjuvantų, imunologinį efektyvumą.

1 pavyzdys:

Panaudojant procedūrą, aprašytą US-A-6149921 patento 3 pavyzdyje, buvo paruošta vandeninė vakcinos kompozicija (Tris-HCl buferis), turinti 2,4 mg/ml N-AcGM3/VSSP. Į tokios imunogeninės kompozicijos mėginį buvo pridėtas toks pat tūris Montanido ISA 51 adjuvanto (Seppic Paris, France). Į tokį patį kitą mėginį tuo pačiu metu buvo pridėtas identiškas tūris Tris-HCl buferio.

Buvo gautos dvi vakcinų kompozicijos:

A: vandeninis tirpalas, turintis 1.2 mg/ml N-AcGM3/VSSP.

B: V/A emulsija, turinti 1.2 mg/ml N-AcGM3/VSSP.

Buvo parinktos 50 C57BL/6 pelių patelių, kurių svoris tarp 18-20 g ir suskirstytos į 5 eksperimentines grupes po 10 gyvūnų kiekvienoje.

1 grupės (kontrolinės) gyvūnai buvo inokuliuoti į raumenis 0, 14, 28 ir 42 dienomis po 0,1 ml fosfatinio buferio (PBS).

2 grupės gyvūnai buvo inokuliuoti į raumenis 0, 14, 28 ir 42 dienomis po 0,1 ml B vakcinos kompozicija (120 µg N-AcGM3/VSSP).

3 grupės (kontrolinės) gyvūnai buvo inokuliuoti po oda 0, 14, 28 ir 42 dienomis po 0,1 ml fosfatinio buferio (PBS).

4 grupės gyvūnai buvo inokuliuoti po oda 0, 14, 28 ir 42 dienomis po 0,1 ml B vakcinos kompozicija (120 µg N-AcGM3/VSSP).

5 grupės gyvūnai buvo inokuliuoti po oda 0, 14, 28 ir 42 dienomis po 0,1 ml A vakcinos kompozicija (120 µg N-AcGM3/VSSP).

Visų grupių pelės 63-ą dieną buvo užkrėstos melanomos MB16F10 ląstelėmis (5×10^3) po oda (0,2 ml).

Nuo 0 dienos gyvūnai buvo smulkiai apibūdinami ir du kartus savaitėje buvo nustatomi sekantys parametrai: auglio tūris, išgyvenimas ir progresijos laikas.

Buvo gauti sekantys rezultatai:

Auglio tūris:

1 figūroje pavaizduota kiekvienos eksperimentinės grupės auglio augimo kinetika. Buvo naudojamas Mann-Whitney U testas (dviejų dalių) statistiniam auglio tūrio reikšmių patikimumui pasiekti suporuotose grupėse iš visų individualizuotų gyvūnų 33-čią dieną po užkrėtimo augliu.

Šis statistinis metodas yra ypatingai tinkamas įvertinimui šios rūšies eksperimentų, kuriuose yra natūralus duomenų išsisklaidymas, susijęs su biologine įvairove.

p reikšmė išreiškia tikimybę, susijusią su praktine reikšme, išskaičiuota iš pavyzdžio ir įgalina charakterizuoti Alfa reikšmės (reikšmingumo) artumą, išskaičiuotą stadigrafu ir tikrųjų duomenų, patvirtinančių nulinę hipotezę ($p > 0,05$)

Rezultatai parodyti 1 figūroje ir 1 lentelėje

1 lentelė. Vakcinacijos efektas auglio tūriui

Grupės	Auglio tūris (cm ³)	
	33 dienos	
	Vidurkis	Mann-Whitney U p reikšmės (padalinta iš dviejų)
1 grupė	6,53	-
2 grupė	3,99	0,46 ^a
3 grupė	6,63	-
4 grupė	4,11	0,12 ^b
5 grupė	1,89	0,01 ^c

a: p reikšmė kaip 2 grupės palyginimo su 1 grupe rezultatas

b: p reikšmė kaip 4 grupės palyginimo su 3 grupe rezultatas

c: p reikšmė kaip 5 grupės palyginimo su 3 grupe rezultatas

Iš 1 figūros ir 1 lentelės galima matyti, kad 5 grupės pelės, vakcinuotos po oda kompozicija, kuri yra šio išradimo objektas, rodo žymų auglio tūrio sumažėjimą, palyginus su kitomis eksperimento grupėmis ir atitinkama kontrole.

Išgyvenimas

Šis parametras išreiškia vakcinacijos sugebėjimą padidinti gyvenimo trukmę imunizuotų gyvūnų, nepaisant auglio, kuris yra letalus, kaip pavyzdžiui MB16. Parametrai yra išmatuoti dienomis, palyginus su negydytų gyvūnų išgyvenimu. Statistinei svarbai yra naudotas Log-Rank testas.

Gautos reikšmės parodytos 2 figūroje ir 2 lentelėje. 2 lentelėje frazė “referencinė x grupė” reiškia grupę, kuri palyginta su kiekvienu stulpeliu.

2 lentelė. Išgyvenimo laiko statistika pagal Log-Rank testą

Grupės	Išgyvenimas (dienos)		p	p	p
	media	mediana	(referencinė 1 grupė)	(referencinė 3 grupė)	(referencinė 5 grupė)
1 grupė	35	33	-	-	-
2 grupė	43	36	0,06	-	0,26
3 grupė	40	40	-	-	0,002
4 grupė	42	40	-	0,53	0,13
5 grupė	52	53	-	0,002	-

Šie rezultatai rodo, kad pelės, apjungtos į 5 grupę, kurios buvo vakcinuotos po oda vakcina, kuri yra šio išradimo objektas, rodo ilgiausią išgyvenimo laiką po auglio įskiepijimo.

Progresijos laikas

Progresijos laikas yra parametras, kuris išreiškia periodą, per kurį auglys tampa matomas kiekviename gyvūne individualiai, matuojant nuo inokuliacijos momento. Rezultatai parodyti 3-oje lentelėje.

3 lentelė. Progresijos laiko statistika pagal Log-Rank testą

Grupės	Progresijos laikas (dienos)		p	p	p
	media	mediana	(referencinė 1 grupė)	(referencinė 3 grupė)	(referencinė 5 grupė)
1 grupė	19	19	-	-	-
2 grupė	32	19	0,02	-	0,5
3 grupė	19	19	-	-	0,004
4 grupė	23	19	-	0,5	0,06
5 grupė	37	26	-	0,004	-

Pelėms, kurioms pasibaigus eksperimento laikui neišsivystė auglys, progresija buvo laikoma 60 dienų.

Poveikti progresijos laiko pratęsimą yra akivaizdžiai labai pageidaujamas parametras siekiant nustatyti esminius skirtumus vakcinose prieš vėžį ir pagal rezultatus, stebimus 3 lentelėje su 5-os grupės gyvūnais, vakcinuotais po oda VSSP kompozicija, kuri yra šio išradimo objektas, rodo labiau tinkamus teigiamus rezultatus.

Auglio regresija

4 ir 5 grupėse, vakcinuotose po oda atitinkamai su ir be adjuvanto, buvo stebimi gyvūnai su auglio regresija. 4-os grupės gyvūnams auglys buvo išmatuojamas 19-tą dieną po užkrėtimo, praktiškai neaugo iki 35 dienos, kai buvo rasta neigiamas. 5-os grupės pelėse buvo rastas auglys apčiuopiant 26-tą dieną po inokuliacijos ir buvo užregistruota neigiamas 29-tą dieną.

Bendras įvertinimas

Eksperimentų rezultatai rodo, kad šio išradimo vakcinos kompozicija didina išgyvenimo laiką ir progresijos laiką, tuo pačiu metu mažina auglio augimo greitį, lyginant su kontroline grupe, veikta su PBS.

Iš kitos pusės, vakcinos kompozicijos su Montanido ISA 51 adjuvantu, apsaugo tiksliai jeigu įvedama į raumenis ir rodo visišką neefektyvumą, jeigu įvedama po oda.

Apibendrinant, vakcinavimas po oda su šio išradimo vakcinos kompozicija, rodo geresnius rezultatus, palyginus su rezultatais, gautais vakcinuojant į raumenis su vakcinos kompozicija, turinčia Montanido tipo adjuvantą.

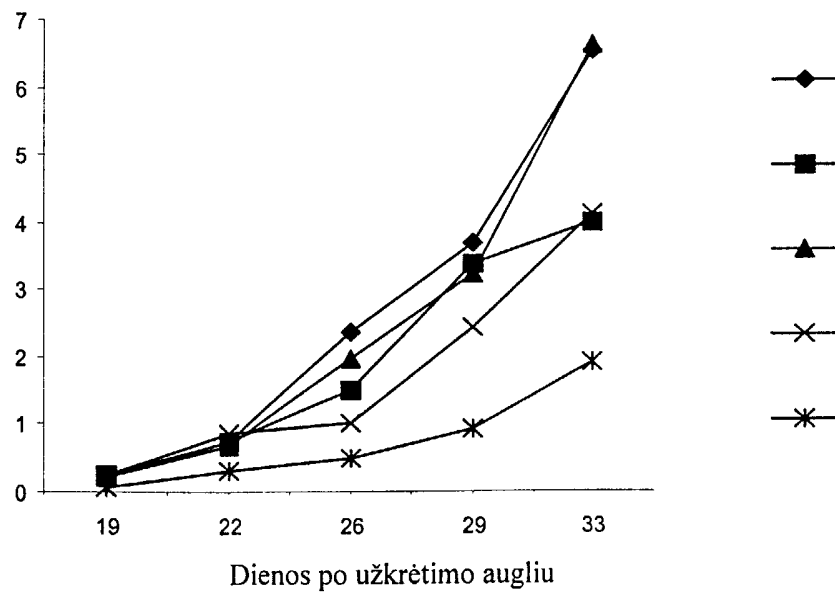
Trumpas figūrų aprašymas

1 figūroje pavaizduotas grafikas, parodantis auglio tūrio įvertinimą 5 gyvūnų grupėse, skirtingai paveiktose vakcinomis ir užkrėstose piktybiniu augliu.

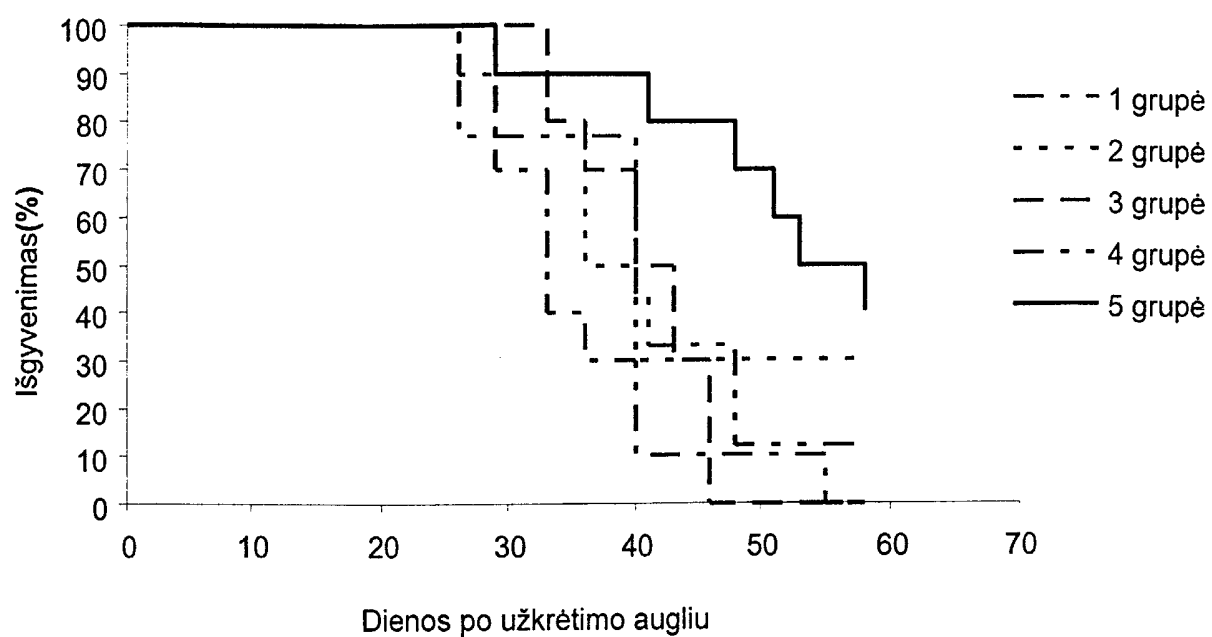
2 figūroje pavaizduotas grafikas, kuris įgalina įvertinti 5 eksperimentinių gyvūnų grupių išgyvenimo parametrus.

Išradimo apibrėžtis

1. Vakcinos kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi ištirpintą ar vandens dispersijoje vieną arba daugiau gangliozidų, įjungtų į VSSP, sugebančių stimuliuoti imuninį atsaką įvedus po oda be jokių papildomų imunologinių adjuvantų.
2. Vakcinos kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad gangliozidai, įjungti į VSSP, yra parinkti iš N-AcGM3 ir N-GcGM3.
3. Vakcinos kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad gangliozidas, įjungtas į VSSP, yra N-AcGM3.
4. Vakcinos kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kompozicija neturi kitų antigenų, išskyrus gangliozidus.
5. Vakcinos kompozicija pagal 2 arba 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi N-AcGM3/VSSP ir N-GcGM3/VSSP kaip specifinius imunologinius komponentus.
6. Vakcinos kompozicija pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi N-AcGM3/VSSP kaip specifinį imunologinį komponentą.
7. Vakcinos kompozicija pagal bet kurį iš 1-6 punktą, skirta poodiniam įvedimui pacientams, kuriems reikia imunologinio atsako pastiprinimo.



1 figūra



2 figūra