

(19)



(10) **LT 5435 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5435**

(51) Int. Cl. (2006): **A61K 39/39**
A61K 39/12

(21) Paraiškos numeris: **2006 036**

(22) Paraiškos padavimo data: **2006 05 17**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2007 05 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2007 07 25**

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

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/FR2004/002911**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2004 11 15**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2006 05 17**

(30) Prioritetas: **03/13,406, 2003 11 17, FR**

(72) Išradėjas:

Jean HAENSLER, FR

(73) Patent savininkas:

SANOFI PASTEUR, 2, avenue pont Pasteur, 69007 Lyon, FR

(74) Patentinis patikėtinis:

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

(54) Pavadinimas:

Vakcinos kompozicijos mišinys su alkilfosfatidilcholinu

(57) Referatas:

Išradimas yra susijęs su farmacine kompozicija, turinčia bent vieno vakcinos antigeno. Išradimo kompozicija yra besiskirianti tuo, kad joje yra bent vieno fosfatidilcholino fosfatinio esterio darinio, kurio struktūra atitinka I formulę, kurioje R₁ yra žemesnysis alkilas, o R₂ ir R₃ yra vienodi arba skirtingi, ir kiekvienas iš jų gali reikšti linijinio angliavandenilio grandinės, turinčias 13-21 anglies atomą.

VAKCINOS KOMPOZICIJA, SUMAIŠYTA SU ALKILFOSFATIDILCHOLINU

Šis išradimas priklauso vakcinų sričiai, konkrečiau adjuvantinėms vakcinoms. Konkrečiau, šis išradimas yra susijęs su farmacinėmis kompozicijomis, kuriose yra bent vienas vakcininis antigenas ir bent vienas fosfatidilcholino fosfatinio esterio darinys. Pagal ankstesnį technikos lygį yra žinoma praktika vakcinoje esančių antigenų imuniniam atsakui padidinti arba orientuoti, panaudojant adjuvantus. Tai gali būti pageidautina todėl, kad antigenas, kai jis naudojamas vienas, yra nepakankamai imunogeniškas, ypač dėl to, kad jis yra labai didelio grynumo laipsnio, arba todėl, kad kadangi norima padidinti vakcinoje esančių antigenų kiekį arba pakartotiniams skiepams gauti, arba kitu atveju todėl, kad yra pageidaujama pailginti vakcinos suteikiamos apsaugos trukmę. Kai kuriais atvejais tai yra daugiau kokybės, o ne kiekybės klausimas modifikuojant sukeltą atsaką.

Nors pagal ankstesnį technikos lygį yra gausybė pasiūlytų produktų, kurie gali būti naudojami kaip adjuvantai, reikia pažymėti, kad dauguma adjuvantinių vakcinų, kurios yra autorizuotos su prekės ženklais žmonių medicinai, adjuvantais turi aliuminio druską arba emulsiją.

Dabartiniu metu yra nemažas poreikavimas naujų prieinamų adjuvantų, kurių savybės duotų galimybę modifikuoti imuninį atsaką, tuo pačiu metu išlaikydamos visiškai saugaus vartojimo savybes.

Be to, kitoje srityje, kuri yra transfekcijos sritis, buvo pasiūlytas katijoninių lipidų panaudojimas. Tokiu būdu, pavyzdžiui, publikacijoje, pavadintoje *“Modulation of Cellular Immune Response Against Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 3 by Cationic Liposome Encapsulated DNA Immunization”*, tirtas keleto katijoninių lipidų, sudarančių liposomas, sugebėjimas pernešti dominančią plazmidės DNR į ląsteles. Ši publikacija yra reikšminga vakcinų srityje, kadangi transfekuota DNR koduoja antigenus, prieš kuriuos norima gauti imuninės sistemos atsaką. Kad būtų gaunamas geras imuninis atsakas, pirmiausia reikia, kad būtų ekspresuojamas antigenas ir tokiu būdu DRN “paduodama” geriausiomis sąlygomis ląstelėms, galinčioms ją ekspresuoti. Transfekuojančių agentų, kurie veikia kaip DNR “transporteris”, vaidinamas vaidmuo skiriasi nuo adjuvanto vaidmens, kuris lydi vakcinos antigeną, esantį farmacinėje kompozicijoje. Šios publikacijos autorių gauti rezultatai rodo, kad gautas atsakas yra didesnis, kai DNR yra transportuojama liposomų pagalba, lyginant su

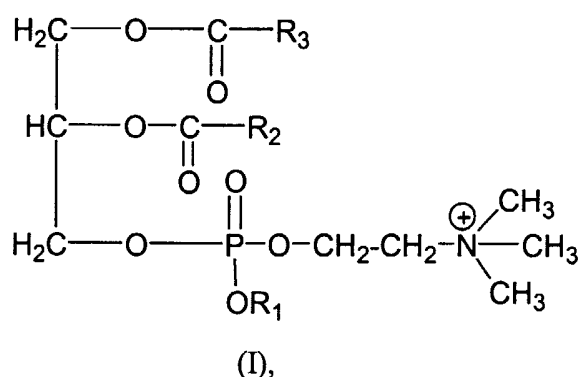
tuo, kai DNR yra įleidžiama "apnuoginta"; vis dėlto, priklausomai nuo liposomoms suformuoti naudojamų lipidų prigimtės, varijuoja gautų atsakų prigimtis ir intensyvumas.

Nepaisant gausios literatūros apie įvairius produktus, kurie gali būti naudojami kaip adjuvantai, vis tik išlieka poreikis produkto, kuris galėtų būti naudojamas be rizikos organizmui, į kurį jis yra įvedamas, ir kuris galėtų padidinti ir (arba) modifikuoti imuninės sistemos atsaką į vakcinos antigeną, su kuriuo jis yra įvedamas.

Vienas iš šio išradimo tikslų yra pateikti tokį produktą.

Kitas šio išradimo tikslas yra pateikti nesunkiai prieinamą vakcinos adjuvantą, kurio kaina būtų tokia, kad jį būtų galima dėti į vakcinos kompozicijas nedidinant jos savikainos uždraustu būdu.

Šiems tikslams pasiekti šio išradimo tikslas yra farmacinė kompozicija, kurioje yra bent vienas vakcinos antigenas, besiskirianti tuo, kad joje yra bent vienas fosfatidilcholino fosfatinio esterio darinys, turintis tokią struktūrą:



kurioje:

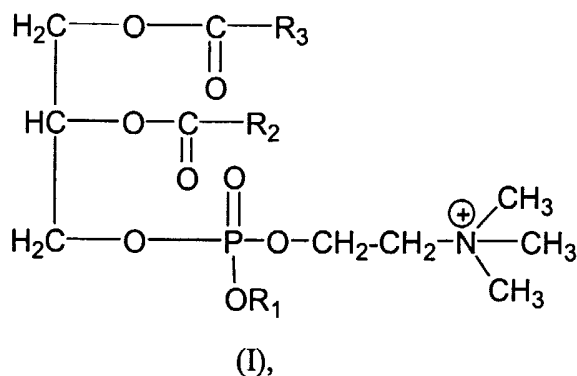
- R_1 yra žemesnysis alkilas,
- R_2 ir R_3 yra vienodi arba skirtingi ir kiekvienas gali reikšti linijinio angliavandenilio pagrindo grandinę, turinčias nuo 13 iki 21 anglies atomo.

Pagal ypatingą įgyvendinimo variantą R_1 reiškia etilo radikalą; taigi, šio darinio degradacija organizme, į kurį jis buvo įvestas, duos biosuderinamus produktus – fosfatidilcholinus ir etanolį.

Pagal ypatingą įgyvendinimo variantą R_2 ir R_3 yra pasirinkti iš radikalų, atsirandančių iš tokių riebalų rūgščių: miristino rūgšties, palmitino rūgšties, stearino rūgšties ir oleino rūgšties.

Pagal ypatingą tinkamiausią įgyvendinimo variantą R_2 ir R_3 yra vienodi ir reiškia oleilo rūgšties radikalą. Toks produktas, kuris gali būti ištiesai pagamintas cheminės sintezės būdu, duoda visas saugumo garantijas ir farmaciniam naudojimui pageidaujamą atkartojamumą.

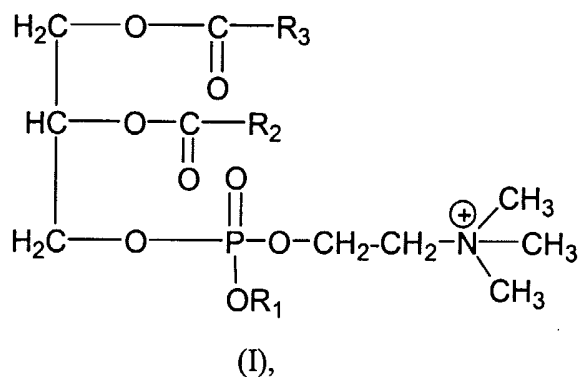
Šio išradimo objektas taip pat yra fosfatidilcholino fosfatinio esterio darinio, turinčio struktūrą:



kurioje:

- R_1 yra žemesnysis alkilas,
- R_2 ir R_3 yra vienodi arba skirtingi ir kiekvienas gali reikšti linijinio angliavandenilio pagrindo grandines, turinčias nuo 13 iki 21 anglies atomo, panaudojimas vakcininiams adjuvantui gaminti.

Šio išradimo objektas taip pat yra žinduolio imunizavimo būdas pagal kurį bent vienas vakcinos antigenas yra įvedamas minėtam žinduoliui ir taip pat minėtam žinduoliui yra įvedamas fosfatidilcholino fosfatinio esterio darinys, turintis struktūrą:



kurioje:

- R_1 yra žemesnysis alkilas,
- R_2 ir R_3 yra vienodi arba skirtingi ir kiekvienas gali reikšti linijinio angliavandenilio pagrindo grandines, turinčias nuo 13 iki 21 anglies atomo.

Tokiu būdu, imuninės sistemos atsakas yra modifikuotas, lyginant su atsaku, kuris būtų gaunamas, jeigu vakcinos antigenas būtų įvedamas be fosfatidilcholino darinio.

Daug kitų šio išradimo privalumų paaiškės skaitant smulkų aprašymą, kuris pateikiamas toliau.

Šis išradimas yra susijęs su farmacine kompozicija, turinčia bent vieno vakcinos antigeno. Laikoma, kad terminas "vakcinos antigenas" reiškia antigeną, galintį indukuoti imuninės sistemos atsaką, kai jis yra įvedamas žmonėms arba gyvūnui. Šis imuninės sistemos atsakas gali sukelti antikūnų gaminimąsi arba tam tikrų ląstelių aktyvaciją, ypačiai antigeną pateikiančių ląstelių (pavyzdžiui: dendritinių ląstelių), T limfocitų, B limfocitų.

Ši farmacinė kompozicija gali būti kompozicija profilaktikos tikslams arba terapiniams tikslams, arba ir tam ir tam.

Ji gali būti įvedama paprastai vakcinoms naudojamais arba rekomenduojamais būdais: parenteriniu keliu, per gleivinę, ir gali būti įvairių formų: leidžiamas arba purškiamas skystis, formos, gautos liofilizuojant arba džiovinant išpurškimo būdu, arba išdžiovinant ore ir t.t. Jos gali būti įvedamos švirkštu arba inžektoriumi be adatos, skirtu injekcijai į raumenis, poodinei arba intrakutaninei injekcijai. Taip pat ji gali būti įvedama sroviniu vaistų purkštuku, galinčiu paduoti sausus miltelius arba skystą purškalą į gleivinės membranas, kaip antai nosies, plaučių, vaginos arba tiesiosios žarnos.

Šiose farmacinėse kompozicijose naudojami vakcinų antigenai pagal šį išradimą yra "tiesioginiai" antigenai, t.y. jie nėra šiuos antigenus koduojančios DNR, bet patys yra antigenai; jie gali būti pilnas mikroorganizmas arba tik dalis šio mikroorganizmo; taigi, iš paprastai vakcinose naudojamų antigenų galima paminėti:

- polisacharidai, kur jie yra vieni arba surišti su nešiklių elementais, tokiais kaip baltymai-nešikliai,
- gyvi prislopinti pilni mikroorganizmai,
- inaktyvuoti mikroorganizmai,
- rekombinantiniai peptidai ir baltymai,
- glikoproteinai, glikolipidai, lipopeptidai,
- sintetiniai peptidai,
- suardyti mikroorganizmai atveju vakcinų, vadinamų "susaldytomis" vakcinomis.

Šie antigenai yra antigenai, naudojami arba galima juos naudoti įvairių ligų gydymui arba prevencijai, tokių kaip, pavyzdžiui: difteritas, stabligė, polio, pasiutligė, kokliušas, hepatitas A, B ir C, geltonasis drugys, vidurių šiltinė, vėjaraupiai, tymai, kiaulytė, raudoniukė, japoniškas encefalitas, meningitas, plaučių uždegimo streptokokinės infekcijos, rotavirusinės infekcijos, AIDS, kai kurios vėžio formos, tuberkuliozė, Laimo liga, kvėpavimo takų infekcijos, pūslelinė, *Chlamydia*, *Neisseria gonorrhea*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* arba *Haemophilus influenza*, tipas B, maliarijos, leišmaniozės, listeriozės, ir kt. sukelti negalavimai.

Šio išradimo farmacinė kompozicija gali būti kompozicija, skirta imunizacijai prieš atskirą patogeną arba vėžio rūšį, t.y. joje yra vieno patogeno arba vėžio rūšies antigenų, arba kitu atveju ji gali būti kompozicija, skirta imunizuoti prieš keletą patogenų arba vėžio rūšių (ji yra vadinama vakcininiu deriniu).

Naudojamo fosfatidilcholino fosfatinio esterio darinio veikimas yra stimuliuoti vakcinos kompoziciją, t.y. padidinti arba modifikuoti organizmo, kuriam įvedama ši vakcinos kompozicija, imuninės sistemos atsaką, lyginant su atsaku, kuris būtų gaunamas nesant tokio junginio. Ypatingai tai gali būti humoralinio atsako padidinimas, arba ląstelinio atsako padidinimas, arba abu atvejai. Poveikis taip pat gali būti ne atsako padidinimas, bet skirtinga sukulto atsako orientacija: pavyzdžiui, orientacija į ląstelinį atsaką, labiau nei į humoralinį atsaką, tam tikrų citokinų gaminimasis labiau nei kitų citokinų, tam tikrų tipų arba subtipų antikūnų gaminimasis labiau nei kitų, tam tikrų ląstelių stimuliacija labiau nei kitų ir t.t. Adjuvanto veikimas taip pat gali susidėti iš imuninio atsako trukmės didinimo laikui bėgant. Į jį taip pat gali įeiti galimybė sumažinti įvedimų skaičių, reikalingą imunizuojamam individui apsaugoti, arba, kitaip tariant, sumažinti skiriamoje dozėje esantį antigeno kiekį.

Šio išradimo darinio adjuvantinis veikimas gali būti gaunamas arba tada, kai jis yra sumaišomas su farmacinės kompozicijos antigenų(-ais) įvedant juos, t.y. kai jis yra tiesiog farmacinėje kompozicijoje, arba, kitu atveju, kai jis įvedamas atskirai nuo antigeno(-ų), kurių imunogeninę galią norima modifikuoti. Vienok yra pageidautina naudoti jį toje pačioje farmacinėje kompozicijoje kaip ir įvedamas antigenas(-ai).

Šio išradimo tikslams yra laikoma, kad terminas "fosfatidilcholinai" reiškia fosfolipidus, turinčius glicerolio molekulę, 2 riebalų rūgštis, fosfato grupę ir choliną. Šie junginiai, taip pat vadinami lecitinais, skiriasi savo riebalų rūgštimis.

Išradimo tikslams 2 riebalų rūgštys R_2 ir R_3 gali būti vienodos arba skirtingos, sočios arba nesočios; geriau, kai fosfatidilcholinai yra padaryti esterinant riebalų rūgštis, turinčias 13 anglies atomų, ypač tokias: miristino rūgštį, palmitino rūgštį, stearino rūgštį arba oleino rūgštį.

Laikoma, kad terminas “žemesnysis alkilo radikalas R_1 ” reiškia alkilo radikalą, turintį daugiausiai 5 anglies atomus. Tiksliau sakant, pagal šį išradimą fosfatidilcholino darinys yra fosfatidilcholino fosfatinis esteris; jis gali būti esteris, gautas fosfatidilcholino ir metanolio, etanolio, propanolio, butanolio arba pentanolio reakcijoje; ypač geri rezultatai buvo gauti su esteriu iš etanolio.

Šio išradimo tikslams tinkami junginiai gali būti gaunami grynai cheminės sintezės būdu arba, kitu atveju, esterinant gamtinius fosfatidilcholinius, tokius kaip iš sojos pupelių arba kiaušinių išekstrahuotą fosfatidilcholiną. Tai yra junginiai, kurie gali būti naudojami farmaciniu požiūriu priimtinių druskų forma, ypač chlorido forma. Iš ypač tinkamų junginių gali būti paminėtini 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-etilfosfocholinai, 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocholinai, 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocholinai, 1,2-stereoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocholinai, 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocholinai, arba dar ir 1,2-palmitoiloleoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocholinai, kuris yra ypač lengvai gaunamas iš Avanti® Polar Lipids Inc. kompanijos. Šie junginiai yra gaunami miltelių arba tirpalų chloroforme formoje.

Pagal šį išradimą junginiai yra disperguojami vandenyje arba vandeniniame buferyje taip, kad susidarytų suspensija, kuri tada yra sumaišoma su tirpalu, turinčiu vakcinos antigenų arba, kitu atveju, fosfatidilcholino fosfatinio esterio darinio turinti suspensija yra naudojama ištirpinti liofilizatui, kuriame yra vakcinos antigenai. Kitu atveju, yra galima disperguoti arba hidratuoti fosfatidilcholino fosfatinio esterio darinį vandeniui arba buferiui, jau turinčiu bent vieno vakcinos antigeno.

Naudojami fosfatidilcholino fosfatinio esterio dariniai gali sudaryti lipidines pūsleles arba liposomas, geriausia, kai jų dydis yra tarp 50 ir 220 nm.

Taip pat galima naudoti šio išradimo adjuvantus emulsiją sudarančiose kompozicijose.

Toliau duodami pavyzdžiai iliustruoja (neribojančiu būdu) šio išradimo įgyvendinimą.

1 pavyzdys: Vakcinų kompozicijos, antigenų turinčios TAT baltymų

1.1. Kompozicijų paruošimas

Vakcinų kompozicijos gaminamos turinčios, kaip vakcinų antigeno, rekombinantinio baltymo, kuris gali būti naudojamas vakcinoje prieš AIDS; tai yra detoksikuotas TAT III B baltymas, kuris yra gaunamas ekspresuojant *E.coli* ir jį išskiriant per įvairias chromatografijos stadijas, po to chemiškai inaktyvuojant, kaip aprašyta WO99/33346 paraiškoje, kur jam priskirtas pavadinimas "karboksimetilintas Tat".

Kompozicija pagaminama žemiau aprašytu būdu. Yra gaunamas miltelių pavidalo 1,2-dioleoil-*sn*-glicerio-3-etilfosfocholino (etil-PC) chloridas, kurį tiekia Avanti® Polar Lipids Inc. kompanija, ir soliubilizuojamas 4/1 chloroformo/metanolio mišinyje, kad koncentracija būtų 2 mg/ml.

3,18 ml gauto tirpalo, t.y. 6,36 mg etil-PC įpilama į stiklinę apvaliadugnę kolbą; tirpiklis garinamas rotoriniu garintuvu, kol ant apvaliadugnės kolbos sienelių yra gaunama lygi lipido plėvelė. Tada ši plėvelė yra džiovinama stipriame vakuume, kad būtų pašalinami bet kokie likusio tirpiklio pėdsakai.

Po to plėvelė rehidratuojama 4 ml distiliuoto vandens 40 °C temperatūroje, naudojant ultragarsinę vonią. Tokiu būdu gauta pūslelių dispersija išspaudžiama per keletą polikarbonatinių membranų (0,8 µm; 0,4 µm ir 0,2 µm), uždėtų ant preso (Lipex Biomembranes, Inc.), termostatuoto 50 °C temperatūroje spaudžiant azotu.

Tada gauta liposomų suspensija, turinti 1,59 mg/ml koncentraciją, yra sumaišoma pagal tūrį su koncentruotu Tat tirpalu, gaunant 200 µg/ml buferyje, susidedančiame iš 100 mmol/l TRIS, 200 mmol/l NaCl, pH 7,4.

Taip pat yra pagaminama kompozicija, turinti tik TAT antigeno, be adjuvanto.

Tokiu būdu gautos 200 µl dozės turi tokį komponentų kiekį:

- 1) 20 µg TAT
- 2) 20 µg TAT ir 159 µg etil-PC.

1.2. Imunizavimas

Dviem grupėms 8 savaičių amžiaus BALB/c pelių patelių buvo suleidžiama viena iš 1.1 paragrafe pagamintų kompozicijų poodiniu būdu, imant vieną 200 μ l dozę pelei; injekcijos leidžiamos nulinę dieną (D0) ir 21-ą dieną (D21).

Norint įvertinti pirminį atsaką, iš retroakiduobinės ertmės imami kraujo mėginiai D14, o D35 – norint įvertinti antrinį atsaką. Būdingi IgG1 ir IgG2a titrai nustatomi naudojant standartizuotus ELISA testus.

D37 pelės numarinamos; išimama jų blužnis ir išskiriamos blužnies ląstelės.

Gauti rezultatai apie humoralinius atsakus suvesti žemiau duodamoje lentelėje, kurioje IgG titrai yra išreikšti sutartiniais ELISA vienetais ($\log_{10}$).

Kiekvienai pelių grupei nurodyta reikšmė yra titrų, gautų iš kiekvienos pelės reikšmių, geometrinis vidurkis

Pelių grupė	IgG1 titras D14	IgG2a titras D14	IgG1 titras D35	IgG2a titras D35
tik Tat	1,943	1,045	3,950	2,437
Tat + etil-PC	2,931	2,429	4,889	4,368

Gauti rezultatai rodo, kad šio išradimo kompozicijos duoda galimybę gauti humoralinį atsaką, kuris yra aiškiai didesnis nei atsakas, gaunamas kai naudojamas vienas antigenas.

Pastebėta, kad adjuvanto poveikis yra aiškiai išreikštas IgG2a atsako atžvilgiu, kas rodo, kad imuninis atsakas yra orientuotas labiau į TH1-tipo atsaką.

Norint įvertinti šio išradimo farmacinių kompozicijų poveikį į ląstelinį atsaką, buvo atlikti blužnies ląstelių, galinčių gaminti γ -interferoną, skaičiavimai, naudojant ELISPOT testą. Šis testas buvo atliktas ir su šviežiomis ląstelėmis, ir su restimuluotomis ląstelėmis.

Bandymui atlikti blužnies ląstelės auginamos auginimo lėkštelėse 200000 ląstelių duobutėje greičiu, esant arba vienai terpei, arba rekombinantiniam TAT antigenui. Paauginus 16 valandų, išryškinama ELISPOT, t.y. suskaičiuojamas kiekis taškelių, atitinkančių γ -interferoną išskiriančias ląsteles. Gauti rezultatai susumuoti toliau duodomose lentelėse; nurodytos reikšmės yra vidurkiai (pelių grupei) skirtumų, apskaičiuotų kiekvienai pelei, tarp taškelių skaičiaus, skaičiuojamo milijonui ląstelių duobutėse su rekombinantiniu TAT ir taškelių skaičiaus, skaičiuojamo milijonui ląstelių duobutėse vien tik su terpe.

Žemiau duodamoje lentelėje susumuoti rezultatai, gauti su šviežiomis ląstelėmis.

Tirtoji farmacinė kompozicija	Taškelių skaičius milijonui ląstelių
TAT 20 µg	31,67
TAT 20 µg + etil-PC	129,17

Žemiau duodamoje lentelėje susumuota rezultatai, gauti su restimuliuotomis ląstelėmis su rekombinantiniu TAT, esant IL2.

Tirtoji farmacinė kompozicija	Taškelių skaičius milijonui ląstelių
TAT 20 µg	44,16
TAT 20 µg + etil-PC	411,66

Šie rezultatai rodo teigiamą poveikį, gautą naudojant šio išradimo farmacinę kompoziciją į CD4+ ląstelių stimuliavimą.

2 pavyzdys: Vakcinės kompozicijos, antigenų turinčios citomegaloviruso glikoproteiną gB

2.1. Kompozicijų paruošimas

Buvo pagaminta vakcinės kompozicija, į kurią kaip vakcininis antigenas įeina rekombinantinis baltymas, išvestas iš Towne kamieno citomegaloviruso (CMV) apvalkalo glikoproteino, gB, kurio nukleotidinė ir baltyminė sekos yra aprašytos USP 5,834,307 patente. Šis rekombinantinis baltymas yra produkuojamas panaudojant rekombinantinę CHO liniją, transfekuatą plazmide, vadinama pPRgB27clv4, kuri turi modifikuotą gB geną. Faktiškai norint palengvinti šio rekombinantinio baltymo gaminimąsi CHO linijoje, gB genas buvo modifikuotas iš anksto, iškerpant dalį geno, kuris koduoja gB baltymo transmembraninę sritį, atitinkančią aminorūgščių seką tarp valino 677 ir arginino 752 ir įvedant 3 taškines mutacijas tokiu būdu, kad gamtiniame gB baltyme esanti skaldymo vieta yra pašalinama. Faktiškai rekombinantinės CHO linijos produkuojamas rekombinantinis baltymas atitinka sutrumpintą gB baltymą, nebeturintį skaldymo vietos ir transmembraninės srities, vadinamas gBdTM.

Plazmidės pPRgB27clv4 sukonstravimas ir sutrumpinto gB baltymo (gBdTM) produkavimas CHO linijoje yra aprašyti US 6,100,064. Sutrumpintas gB baltymas gryninamas leidžiant per imunoafinę kolonėlę, naudojant 15D8 monokloninį antikūną, aprašytą L. Rasmussen et al. (J. Virol. (1985) 55:274-280).

LT 5435 B

Yra gaunamas miltelių pavidalo 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocholino (etil-DSPC) chloridas ir 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocholino (etil-DOPC) chloridas, kuriuos tiekia Avanti® Polar Lipids Inc. kompanija. Su kiekvienu iš šių produktų yra atliekamos tokios operacijos: 5 mg miltelių yra soliubilizuojami 5 ml 4:1 (tūris/tūris) chloroforme/metanolyje. Tirpalas džiovinamas stiklinėje apvaliadugnėje kolboje panaudojant rotorinį garintuvą taip, kad ant apvaliadugnės kolbos sienelių susidarytų lipido plėvelė. Tada ši plėvelė yra džiovinama stipriame vakuume, kad būtų pašalinami bet kokie likusio tirpiklio pėdsakai, ir po to ji tirpinama 2,5 ml vandens 60 °C temperatūroje, kad galutinė koncentracija būtų 2 mg/ml. Susidariusi liposominė suspensija homogenizuojama purtant 10 minučių ir veikiama ultragarsu ultragarsinėje vonioje 5 minutes, po to išspaudžiama per presą panaudojant Lipex presą (Northern Lipids Inc. Vancouver, CA), termostatuotą 50 °C temperatūroje penkis kartus, naudojant polikarbonatinę membraną, kurios porėtumas 0,2 µm.

Taip pat yra pagaminama kompozicija, turinti etil-PC emulsijoje.

Tam tikslui 25 mg 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-etilfosfocholino chlorido (etil-DOPC – Avanti Polar Lipids) soliubilizuojama stiklinėje apvaliadugnėje kolboje, panaudojant 10 ml 4:1 (tūris/tūris) chloroformo/metanolio. Gautas tirpalas yra džiovinamas rotoriniu garintuvu taip, kad ant apvaliadugnės kolbos sienelių liktų lipido plėvelė. Tada ši plėvelė yra džiovinama stipriame vakuume, kad būtų pašalinami bet kokie likusio tirpiklio pėdsakai.

375 mg industrinio Tween® 80, kurį tiekia Merck kompanija, atsveriami į stiklinėlę, į ją pridedama 29,29 g vandens, ir mišinys maišomas tol, kol paviršinio aktyvumo medžiaga visiškai ištirpsta. Ankstesnėje stadijoje gauta lipido plėvelė tirpinama šiame Tween® 80 tirpale. Į šią suspensiją pridedama 1475 mg skvaleno (Fluka), ir gauta emulsija homogenizuojama Ultraturrax (8000-9500 aps./min), o po to M110 mikroskystintuvu (Microfluidics, Newton MA), 20 perėjimų esant 414 kPa slėgiui.

Galutinė skvaleno koncentracija šioje emulsijoje yra 5 %.

Imunizavimo dozės yra pagaminamos sumaišant aukščiau aprašytas adjuvanto kompozicijas arba vandenį su vandeniniais antigeno pradiniais tirpalais, turinčiais 160 µg/ml gB baltymo ir su PBS buferiu taip, kad būtų gaunamos 50 µl dozės, turinčios tokias kompozicijas:

- 1) 2 µg gB
- 2) 2 µg gB ir 50 µg etil-DOPC

- 3) 2 µg gB ir 50 µg etil-DSPC
- 4) 2 µg gB ir 50 µg etil-DOPC, 1,25 mg skvaleno ir 0,3 mg Tween® 80.

2.2. Imunizavimas

Gaunamos 4 grupės 8 savaičių amžiaus OFM nelinijinių pelių ir joms suleidžiama viena iš 2.1 paragrafe pagamintų kompozicijų poodiniu būdu, imant 50 µl pelei; injekcijos atliktos D0 ir D21.

Norint įvertinti pirminį atsaką, imami kraujo mėginiai iš retroakiduobinės ertmės D20, ir D34 – norint įvertinti antrinį atsaką. Būdingi IgG1 ir IgG2a titrai nustatomi naudojant standartizuotus ELISA testus.

D37 pelės numarinamos; išimama jų blužnis, išskiriamos blužnies ląstelės ir stimuliuojamos rekombinantiniu gB baltymu arba nestimuliuojamos.

Tada išmatuojama citokinų (IL5, γ-IFN ir TNF-α) koncentracija nuopiluose nuo blužnies ląstelių, stimuliuotų 5 dienas gB baltymu, ir taip pat nuopile nuo nestimuliuotų ląstelių, panaudojant ELISA testus, kad lyginant būtų galima iš to nustatyti specifinį citokinų gaminimąsi.

Gauti rezultatai humoralinių atsakų požiūriu surinkti žemiau duodamoje lentelėje, kur joje IgG titrai yra išreikšti sutartiniais ELISA vienetais (log10).

Kiekvienai pelių grupei nurodytos reikšmės yra titrų reikšmių, gautų kiekvienai pelei, geometrinis vidurkis.

Pelių grupės	IgG1 titras D21	IgG2a titras D21	IgG1 titras D35	IgG2a titras D35
vien tik gB	2,703±0,773	1,624±0,572	4,409±0,564	3,187±0,595
gB+etil-DOPC	3,673±0,521	3,763±0,371	4,472±0,453	4,741±0,260
gB+etil-DSPC	3,708±0,545	3,869±0,303	4,388±0,393	4,600±0,246
gB+etil-DSPC +emulsija	4,205±0,388	2,944±0,445	5,294±0,416	4,272±0,348

Žemiau duodamoje lentelėje pateikti citokinų rezultatai; nurodytos reikšmės kiekvienam citokinui yra skirtumas pg/ml tarp citokinų, išmatuotų restimuliuotoms gB baltymu ląstelėms kiekių vidurkio ir citokinų, išmatuotų ląstelėms, augintoms vien tik terpėje (laikoma foniniu testo triukšmu); todėl gali būti laikoma, kad šie nurodyti kiekiai yra kiekiai, specifiskai produkuoti kaip atsakas į stimuliavimą gB baltymu.

Pelių grupės	γ -IFN	IL5	TNF- α
vien tik gB	2193	399	61
GB+etil-DOPC	56338	416	310
GB+etil-DSPC	28756	32	93
gB+etil-DSPC +emulsija	3432	4054	134

Visi šiame bandyme pateikti rezultatai rodo gerą fosfatidilcholino fosfatinių esterų adjuvantinį efektą, kuris turi didelę gebą didinti Th1-tipo imuninį atsaką (didina IgG2a ir γ -interferoną), tačiau neinhibuoja jau antigeno sukulto Th2-tipo atsako.

3 pavyzdys: Intradermiškai vartojamos vakcinų kompozicijos

3.1. Kompozicijų paruošimas

Yra gaunamas miltelių pavidalo 1,2-dioleoil-*sn*-glicerio-3-etilfosfocholino (etil-DOPC) chloridas, kurį tiekia Avanti® Polar Lipids Inc. kompanija. 5 mg šių miltelių yra soliubilizuojami 10 ml 4:1 (tūris/tūris) chloroforme/metanolyje. Gautas tirpalas džiovinamas stiklinėje apvaliadugnėje kolboje panaudojant rotorinį garintuvą taip, kad ant apvaliadugnės kolbos sienelių susidarytų lipido plėvelė. Tada ši plėvelė yra džiovinama stipriame vakuume, kad būtų pašalinami bet kokie likusio tirpiklio pėdsakai, ir po to ji tirpinama 2,5 ml vandens 60 °C temperatūroje, kad galutinė koncentracija būtų 2 mg/ml. Susidariusi liposominė suspensija homogenizuojama, purtant 10 minučių ir veikiant ultragarsu ultragarsinėje vonioje 5 minutes, po to išspaudžiama per Lipex presą (Northern Lipids Inc. Vancouver, CA), termostatuotą 50 °C temperatūroje vieną kartą per 0,8 μ m polikarbonatinę membraną, po to vieną kartą per 0,4 μ m polikarbonatinę membraną, ir pagaliau penkis kartus per polikarbonatinę membraną, kurios porėtumas 0,2 μ m.

Taip pat yra paruošiamas antigeno, susidedančio iš gB baltymo, pradinis tirpalas, gautas kaip aprašyta ankstesniame pavyzdyje, kurio koncentracija yra 160 μ g/ml.

Antigeno tirpalas sumaišomas su adjuvanto suspensija 2 mg/ml proporcijomis, skaičiuojant, kad eksperimentinės vakcinų turėtų 50 μ l dozėje tokias kompozicijas:

- 1) 2 μ g gB
- 2) 2 μ g gB ir 50 μ g etil-DOPC
- 3) 0,2 μ g gB

- 4) 0,2 µg gB ir 50 µg etil-DOPC.

3.2. Imunizavimas

Gaunamos 4 grupės 8 savaičių amžiaus OF1 pelių.

Kiekvienai pelių grupei buvo suleista po oda viena iš aukščiau nurodytų kompozicijų.

Imunizacija atlikta D0 ir D20.

Norint įvertinti pirminį atsaką, kraujo mėginiai buvo paimti iš retroakiduobinės ertmės D20 prieš 2-ją imunizaciją ir D35 – norint įvertinti antrinį atsaką.

Specifiniai IgG1 ir IgG2a titrai buvo nustatyti standartizuotais ELISA bandymais.

Pelės buvo numarintos D35; išimtos jų blužnys, išskirtos blužnies ląstelės ir stimuliuotos rekombinantiniu gB baltymu, arba nestimuliuotos.

Citokinų (IL5, γ -IFN ir TNF- α) koncentracijos nuopiluose nuo blužnies ląstelių, stimuliuotų 5 dienas gB baltymu, bei nuopiluose nuo nestimuliuotų ląstelių, buvo nustatomos ELISA testais, norint palyginimo būdu iš to nustatyti specifinę citokinų produkciją.

Gauti rezultatai, ryšium su humoraliniais atsakais susumuoti žemiau duodamoje lentelėje, kurioje IgG titrai yra išreikšti sutartiniais ELISA vienetais (log10).

Kiekvienai pelių grupei nurodyta reikšmė yra titrų reikšmių, gautų kiekvienai pelei, geometrinis vidurkis..

Pelių grupė	IgG1 titras D20	IgG2a titras D20	IgG1 titras D35	IgG2a titras D35
2 µg gB	2,095	1,097	4,478	2,829
2 µg gB + etil-DOPC	4,111	3,574	5,023	4,766
0,2 µg gB	1,351	1,185	2,738	1,647
0,2 µg gB + etil-DOPC	3,621	2,607	4,698	4,087

Citokinų rezultatai duoti žemiau esančioje lentelėje; kiekvienam citokinui pateiktos reikšmės yra skirtumas pg/ml tarp citokinų, išmatuotų restimuliuotoms gB baltymu ląstelėms, ir citokinų, išmatuotų vien tik terpėje augintoms ląstelėms (laikoma testo foniniu triukšmu), kiekių vidurkis; todėl galima laikyti, kad nurodyti kiekiai yra specifiškai produkuoti kiekiai kaip atsakas į stimuliavimą gB baltymu.

Pelių grupė	γ -IFN	IL5	TNF- α
2 μ g gB	3295	1891	65
2 μ g gB + etil-DOPC	49716	1373	638
0,2 μ g gB	2892	102	135
0,2 μ g gB + etil-DOPC	37877	690	533

Iš šio bandymo matoma, kad šio išradimo adjuvantas yra veiksmingas, kai jis vartojamas intraderminiū būdu, ir jis gali tiek padidinti imuninį atsaką tam pačiam antigenų kiekiui, tiek ir sumažinti esančių antigenų kiekį, esančių suleistoje dozėje.

Čia adjuvantinis efektas yra matomas ir dėl Th2-tipo atsako (IgG1) ir taip pat, o tai labai efektinga, dėl Th1-tipo atsako (IgG2a, γ -interferonas).

4 pavyzdys: Vakcinų kompozicija, turinti SARS antigeno

4.1. Kompozicijų pagaminimas

Pagaminta inaktyvuoto žmogaus koronaviruso, šiuo atveju SARS (sunkus ūmus respiratorinis sindromas) viruso, gauto auginant ląstelių liniją ir tada inaktyvuojant, suspensija; naudojamos suspensijos koncentracija prieš inaktyvaciją yra 7,56 log CCID₅₀; ji praskiedžiama 1/10, norint gauti suspensiją, turinčią 6,56 log CCID₅₀ koncentraciją.

Yra gaunamas miltelių pavidalo 1,2-dioleoil-*sn*-glicerio-3-etilfosfocholino (etil-DOPC) chloridas, kurį tiekia Avanti® Polar Lipids Inc., kompanija; 30 mg šių miltelių yra soliubilizuojama 10 ml 4:1 (tūris/tūris) chloroforme/metanolyje. Gautas tirpalas džiovinamas stiklinėje apvaliadugnėje kolboje panaudojant rotorinį garintuvą taip, kad ant apvaliadugnės kolbos sienelių liktų lipido plėvelė. Tada ši plėvelė yra džiovinama stipriame vakuume, kad būtų pašalinami bet kokie likusio tirpiklio pėdsakai, ir po to ji tirpinama 5 ml vandens 60 °C temperatūroje, kad galutinė koncentracija būtų 6 mg/ml. Susidariusi liposominė suspensija homogenizuojama, purtant 10 minučių ir veikiant ultragarsu ultragarsinėje vonioje 5 minutes, po to išspaudžiama per Lipex presą (Northern Lipids Inc. Vancouver, CA), termostatuotą 50 °C temperatūroje vieną kartą per polikarbonatinę membraną, kurios porėtumas 0,2 μ m.

200 μ l imunizacijos dozės gaunamos pagaminant žemiau duodamoje lentelėje nurodytus mišinius:

Vanduo	6,56 log CCID ₅₀ viruso suspensija	Adjuvantas	Fosfatinis buferis	Viruso kiekis dozėje
1,418 ml	110 µl skiedž. 1/10	-	472 µl	10 ^{4,6} CCID ₅₀
1,151 ml	110 µl skiedž. 1/10	267 µl etil- DOPC	472 µl	10 ^{4,6} CCID ₅₀
1,418 ml	110 µl skiedž. 1	-	472 µl	10 ^{5,6} CCID ₅₀
1,151 ml	110 µl skiedž. 1	267 µl etil- DOPC	472 µl	10 ^{5,6} CCID ₅₀

4.2. Imunizavimas

Sudaromos 4 grupės po 8 BALB/c peles ir imunizuojamos 3 savaitių intervalais viena iš aukščiau nurodytų kompozicijų; daromos poodinės injekcijos; kiekvieną kartą suleidžiamos 200 µl dozės.

Praėjus 2 savaitėms po kiekvienos injekcijos, imami kraujo mėginiai, norint įvertinti bendrą poveikį prieš (inaktyvuoto) SARS viruso antikūninį atsaką pagal ELISA testą, t.y. D14 pirminiam atsakui ir D33 – antriam atsakui.

Blužnies ląstelės paimamos D33.

SARS specifinis ląstelinis atsakas buvo vertinamas panaudojant ląstelių, išskiriančių γ -interferoną, ELISPOT testą arba *ex vivo*, arba po *in vitro* stimuliacijos inaktyvuotu pilnu virusu 7 dienas. Kiekvienu atveju blužnies ląstelės (*ex vivo* arba restimuliuotos *in vitro*) yra inkubuojamos 16 valandų arba su inaktyvuotu pilnu virusu, arba su sumaišytais 18-meriniais peptidais, kurių sekos persikloja (daugiau nei 10 aminorūgščių) ir atitinka įvairius SARS viruso antigenus.

Be to, yra įvertinama indukuoto T-helperio ląstelinio atsako poliarizacija panaudojant citokinų, kuriuos išskyrė blužnies ląstelės, stimuliuotos pilnai inaktyvuotu virusu arba peptidų mišiniu, ELISA testą.

Gauti rezultatai, ryšium su humoraliniu atsaku yra duoti žemiau pateiktoje lentelėje; jie yra išreikšti ELISA testo sutartiniais log10 vienetais ir atitinka kiekvienos pelių grupės titrų geometrinius vidurkius.

Imunizavimo kompozicija	IgG titras D14	IgG titras D33
$10^{4,6}$ CCID ₅₀	1	1,191
$10^{4,6}$ CCID ₅₀ + etil-DOPC	1,246	2,424
$10^{5,6}$ CCID ₅₀	1,776	3,122
$10^{5,6}$ CCID ₅₀ + etil-DOPC	2,621	4,387

Šie rezultatai rodo, kad šio išradimo adjuvantas duoda galimybę padidinti humoralinį atsaką prieš virusinį antigeną.

Kai dėl ląstelinio atsako, gauti rezultatai, naudojant ELISPOT skaičiavimą su šviežiomis ląstelėmis (*ex vivo*), stimuliuotomis pilnu virusu, yra pateikti žemiau esančioje lentelėje, kurioje parodyti geometriniai vidurkiai kiekvienai pelių grupei.

Imunizavimo kompozicija	Taškelių skaičius/ 10^6 blužnies ląstelių
$10^{4,6}$ CCID ₅₀	2
$10^{4,6}$ CCID ₅₀ + etil-DOPC	18
$10^{5,6}$ CCID ₅₀	17
$10^{5,6}$ CCID ₅₀ + etil-DOPC	132

O dėl rezultatų apie atsaką į peptidų mišinius, atsakai kinta priklausomai nuo naudojamų peptidų mišinių.

ELISPOT rezultatai, gauti po restimuliavimo su inaktyvuotu SARS virusu, taip pat rodo, kad γ -interferono gaminimasis buvo padidintas esant etil-DOPC, priklausomai nuo naudojamų peptidų.

Šie rezultatai rodo, kad šio išradimo adjuvantas duoda galimybę padidinti CD4+ T-ląstelių atsaką prieš virusinį antigeną.

Kai dėl γ -IFN (Th1 citokinas) ir IL-5 (Th2 citokinas) citokinų ELISA testų, buvo pastebėta, kad po stimuliacijos inaktyvuotu virusu, γ -IFN gaminimasis žymiai padidėjo pelėms, kurios prie antigeno buvo gavę etil-DOPC; antra vertus, IL-5 gaminimasis aiškiai nepasikeitė.

Gauti rezultatai yra pateikti žemiau duodamoje lentelėje; jie išreikšti pg/ml ir atitinka geometrinius vidurkius pelių grupėms.

LT 5435 B

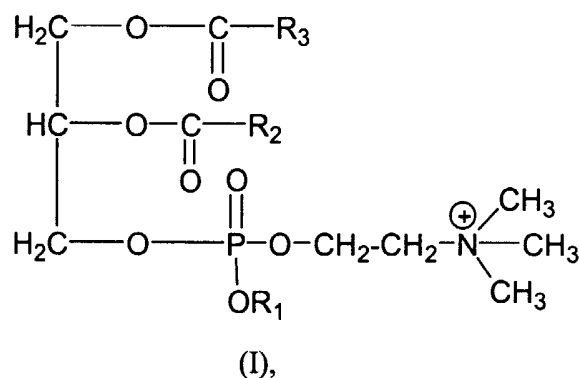
Imunizavimo kompozicija	Stimuliacija inaktyvuotu pilnu virusu	
	γ -IFN (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)
$10^{4,6}$ CCID ₅₀	4910	2793
$10^{4,6}$ CCID ₅₀ + etil-DOPC	9262	3037
$10^{5,6}$ CCID ₅₀	7223	3649
$10^{5,6}$ CCID ₅₀ + etil-DOPC	51453	5270

Šie rezultatai rodo, kad šio išradimo adjuvantas duoda galimybę padidinti Th1-tipo ląstelinį atsaką.

Taigi, visi šie rezultatai rodo, kad šio išradimo adjuvantas duoda galimybę žymiai padidinti ir ląstelinį (Th1), ir humoralinį atsaką, sukliamą tada, kai yra įvedamas antigenas, susidedantis iš inaktyvuoto viruso.

Išradimo apibrėžtis

1. Farmacinė kompozicija, apimanti bent vieną tiesioginį vakcinos antigeną, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji taip pat apima bent vieną fosfatidilcholino fosfatinio esterio darinį, turintį struktūrą:



kurioje:

R_1 yra žemesnysis alkilas,

R_2 ir R_3 yra vienodi arba skirtingi ir kiekvienas gali reikšti linijinio angliavandenilio grandinės, turinčias nuo 13 iki 21 anglies atomo.

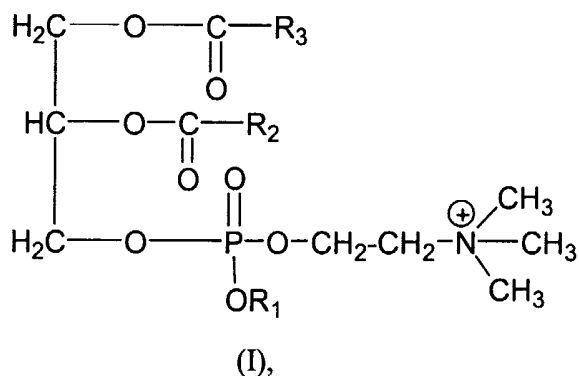
2. Kompozicija pagal ankstesnįjį punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad R_1 reiškia etilo radikalą.

3. Kompozicija pagal bet kurį iš ankstesniųjų punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad R_2 ir R_3 yra pasirinkti iš radikalų, gaunamų iš tokių riebalų rūgščių: miristino rūgšties, palmitino rūgšties, stearino rūgšties ir oleino rūgšties.

4. Kompozicija pagal vieną iš ankstesniųjų punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad R_2 ir R_3 yra vienodi ir reiškia oleino rūgšties radikalą.

5. Kompozicija pagal vieną iš ankstesniųjų punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji taip pat apima emulsiją.

6. Fosfatidilcholino darinio, turinčio struktūrą:



kurioje:

R_1 yra žemesnysis alkilas,

R_2 ir R_3 yra vienodi arba skirtingi ir kiekvienas gali reikšti linijinio angliavandenilio grandines, turinčias nuo 13 iki 21 anglies atomo, panaudojimas vakcinos adjuvantui paruošti.

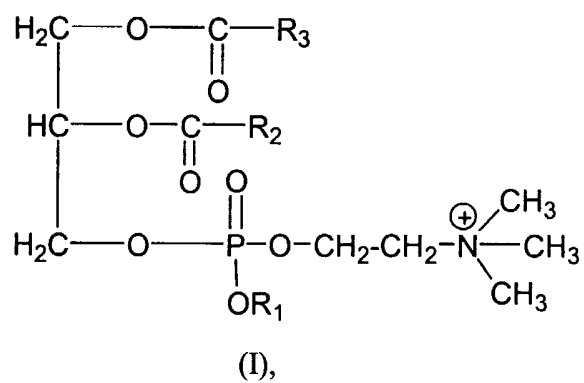
7. Panaudojimas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_1 reiškia etilo radikala.

8. Panaudojimas pagal bet kurį iš 6 ir 7 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_2 ir R_3 yra pasirinkti iš radikalų, gaunamų iš tokių riebalų rūgščių: miristino rūgšties, palmitino rūgšties, stearino rūgšties ir oleino rūgšties.

9. Panaudojimas pagal vieną iš 6-8 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_2 ir R_3 yra vienodi ir reiškia oleino rūgšties radikala.

10. Farmacinės kompozicijos pagal 1 punktą panaudojimas vakcinos, skirtos žinduolio imunizavimui, gamyboje, kai minėtam žinduoliui yra įvedamas bent vienas tiesioginis vakcinos antigenas ir taip pat minėtam žinduoliui yra įvedamas fosfatidilcholino fosfatinio esterio darinys, turintis struktūrą:

LT 5435 B



kurioje:

R_1 yra žemesnysis alkilas,

R_2 ir R_3 yra vienodi arba skirtingi ir kiekvienas gali reikšti linijinio angliavandenilio pagrindo grandines, turinčias nuo 13 iki 21 anglies atomo.