



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **101140**

(13) **C2**

(51) МПК

A61K 39/39 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2007 04420**
(22) Дата подання заявки: **16.10.2005**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **11.03.2013**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **04025096.1**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **21.10.2004**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.06.2007, Бюл.№ 9**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **11.03.2013, Бюл.№ 5**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/EP2005/011127, 16.10.2005**

- (72) Винахідник(и):
**Лойфер Альбрехт (DE),
Айзеле Бернд (DE),
Гроде Леандер (DE)**
(73) Власник(и):
**ВАКЦІНЕ ПРОЄКТ МЕНІДЖМЕНТ ГМБХ,
Mellendorffer Strasse 9, 30625 Hannover,
Germany (DE)**
(74) Представник:
**Пахаренко Антоніна Павлівна, реєстр.
№4**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
MATSUMOTO SONKICHI ET AL:
"Recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin secreting merozoite surface protein 1 (MSP1) induces protection against rodent malaria parasite infection depending on MSP1-stimulated interferon gamma and parasite-specific antibodies" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 188, no. 5, 7 September 1998, pages 845-854.
HESS J ET AL: "Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of lysteria monocytogenes" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 95, April 1998, pages 5299-5304.
GRODE LEANDER ET AL: "Cell-mediated immunity induced by recombinant Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin strains against an intracellular bacterial pathogen: Importance of antigen secretion or membrane-targeted antigen display as lipoprotein for vaccine efficacy." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 168, no. 4, 15 February 2002, pages 1869-1876.
GRODE LEANDER ET AL: "Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 115, no. 9, September 2005), pages 2472-2479.
EP 0902086 A, 17.03.1999.
WO 2004094469 A, 04.11.2004.

(54) КОМБІНАЦІЯ РЕКОМБІНАНТНОЇ МІКОБАКТЕРІЇ І БІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО АГЕНТА ЯК ВАКЦИНИ

(57) Реферат:

UA 101140 C2

Винахід належить до комбінації для застосування у способі викликання ТН1 імунної відповіді, де комбінація містить першу складову і окремо другу складову, де першою складовою є бактеріальна клітина, яка включає, принаймні, одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує фаголізосомальний вислизуючий пептид або поліпептид, де бактеріальною клітиною є уреазо-дефіцитна клітина *Mycobacterium*; і де другою складовою є біологічно активний агент, що викликає імунну відповідь.

Представлений винахід стосується комбінації, що містить, принаймні, дві складові, застосування такої комбінації як фармацевтичної композиції, її застосування для виготовлення медикаменту, способів лікування пацієнта використовуючи таку комбінацію і способу виготовлення такої комбінації.

5 Сучасна молекулярна медицина надзвичайно сфокусована на застосуванні імуногенних сполук або сполук, що модулюють імунну систему пацієнта, для лікування такого пацієнта. Відповідними захворюваннями є, серед інших, пухлини і інфекційні захворювання.

В обох випадках, антигенні сполуки, тобто, сполуки, які придатні для викликання імунної відповіді або для підсилення імунної відповіді вводять в тіло пацієнта. Придатність відповідних сполук є, однак, в багатьох випадках обмеженою, що потребує підтримки імунної відповіді для того щоб досягти клінічно релевантного рівня ефективності і дії. Така підтримка може бути спровокована неодноразовим введенням відповідного агенту або шляхом використання ад'юванту.

15 Попередній рівень техніки забезпечує декілька ад'ювантів, такі як мінеральні олії, інактивовані мікобактерії, сполуки алюмінію і їм подібні.

Однак, ад'юванти відомі з рівня техніки не завжди виконані таким чином, що придатні для задовольняння медичних потреб, зокрема, для поєднання з новими режимами лікування, такими як застосування клітин, що експресують цитокін, наприклад, як описано в міжнародній патентній заявці PCT/US94/01631.

20 Таким чином, проблемою, на вирішення якої спрямований представлений винахід, є забезпечення композиції, більш особливо фармацевтичних композицій, які включають, принаймні, першу складову і другу складову, де першою складовою є ад'ювант і другою складовою є біологічно активний агент.

Ця проблема вирішується в першому аспекті за допомогою комбінації, що містить першу складову і другу складову, де першою складовою є бактеріальна клітина, яка включає, принаймні, одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує фаголізосомальний вислизаючий пептид або поліпептид; і де другою складовою є біологічно активний агент.

У втіленні винаходу, бактеріальна клітина є уреаза-дефіцитною.

В наступному втіленні, бактеріальна клітина є клітиною *Mycobacterium*.

30 В переважному втіленні, клітиною є клітина *Mycobacterium bovis*.

В переважному втіленні, принаймні, одна клітинна субодинаця уреази, що кодується нуклеїновою кислотою бактеріальної клітини, є інактивованою.

В більш переважному втіленні, принаймні, кодувальна послідовність С субодинаці бактеріальної уреази є інактивованою.

35 У втіленні винаходу, фаголізосомальним вислизаючим доменом є фаголізосомальний вислизаючий домен *Listeria*.

У втіленні винаходу, фаголізосомальний домен кодується молекулою нуклеїнової кислоти, що вибирають з групи, яка включає

40 а) нуклеотидну послідовність, що включає нуклеотид 211-1722, як показано в SEQ. ED. NO. 1;

б) нуклеотидну послідовність, яка кодує ту ж саму амінокислотну послідовність як і послідовність з а); і

в) нуклеотидну послідовність, що гібридує за жорстких умов з послідовністю з а) або б).

45 У втіленні винаходу, бактеріальна клітина включає, принаймні, одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує пептид або поліпептид здатний викликати імунну відповідь у ссавця.

В переважному втіленні, пептид або поліпептид вибирають з аутоантигенів, пухлинних антигенів, вірусних антигенів, паразитних антигенів, бактеріальних антигенів і їх імуногенних фрагментів.

50 В наступному переважному втіленні, пептид або поліпептид є частиною злитого поліпептиду.

У втіленні винаходу, злитий поліпептид включає

а) принаймні, один домен поліпептиду, де поліпептидний домен здатний викликати захворювання, що вибирають з групи, що включає рак і інфекційні захворювання.

55 Спеціалісту в цій галузі повинно бути зрозуміло, що композиція представленого винаходу і її складові або окремо, або в комбінації можуть також переважно використовуватись для профілактики захворювання. Це в переважному втіленні ґрунтується на тому факті, що перша складова комбінації згідно з представленим винаходом є придатною для викликання імунної відповіді і більш особливо специфічної імунної відповіді, яка дозволяє забезпечити відповідній

людині або тварині захист від хвороби перед появою хвороби і більш особливо перед клінічно або медично релевантним проявленням захворювань.

В переважному втіленні рак є імуногенною пухлиною і де пухлину, переважно, вибирають з групи, що включає рак простати, меланому, рак нирки, пухлину молочної залози, пухлини мозку, немілоклітинний рак легені, рак товстої кишки, і сквамозну пухлина голови і шиї.

В альтернативному втіленні, інфекційним захворюванням є малярія. В переважному втіленні, біологічно активним агентом є gp190/MSP1 протеїн *Plasmodium* або його фрагмент здатний викликати імунну відповідь у ссавця.

В альтернативному втіленні, інфекційним захворюванням є HCMV інфекція, переважно HCMV інфекція людини. В переважному втіленні, біологічно активним агентом є щільне тіло як тут описано.

В альтернативному втіленні інфекційним захворюванням є туберкульоз. Переважно, біологічно активним агентом є антиген з *Mycobacterium*, переважно *Mycobacterium* ssp.. Більш переважно, мікобактерію вибирають з групи, що включає *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum* і *M. paratuberculosis*. Навіть більш переважно, антигеном є антиген 85.

В четвертому аспекті проблема, що лежить в основі представленого винаходу, вирішується за допомогою застосування комбінації згідно з першим аспектом представленого винаходу або кожної складової такої комбінації для виготовлення вакцини.

В п'ятому аспекті проблема, що лежить в основі представленого винаходу, вирішується за допомогою способу лікування пацієнта, що страждає на захворювання і потребує такого лікування, що включає введення комбінації згідно з першим аспектом представленого винаходу або фармацевтичної комбінації згідно з другим аспектом представленого винаходу.

В шостому аспекті проблема, що лежить в основі представленого винаходу, вирішується за допомогою способу виготовлення фармацевтичної комбінації, переважно фармацевтичної композиції згідно з другим аспектом представленого винаходу, що включає стадії

- одержання, як першої складової, бактеріальної клітини, яка включає, принаймні, одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує фаголізосомальний вислизаючий пептид або поліпептид;

- одержання, як другої складової, біологічно активного агенту; і

- формулювання першої складової і другої складової в фармацевтичну композицію.

В сьомому аспекті проблема, що лежить в основі представленого винаходу, вирішується за допомогою способу виготовлення фармацевтичної комбінації, переважно, фармацевтичної композиції згідно з другим аспектом представленого винаходу, що включає стадії

- одержання, як першої складової, бактеріальної клітини, яка включає, принаймні, одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує фаголізосомальний вислизаючий пептид або поліпептид;

- одержання, як другої складової, біологічно активного агенту; і

- формулювання окремо першої складової і другої складової.

У втіленні винаходу, сформульовану першу складову і сформульовану другу складову пакують у одну упаковку.

Альтернативно, сформульовану першу складову і сформульовану другу складову пакують у окремі упаковки.

В більш переважному втіленні, пакетики є одиничними дозованими формами або включають мікрокапсульовані одиничні дозовані форми.

Винахідники неочікувано знайшли, що бактеріальна клітина, яка може або бути Грам-позитивною або Грам-негативною бактеріальною клітиною, яка експресує фаголізосомальний вислизаючий пептид або поліпептид, є особливо корисним ад'ювантом, який може бути використаний в комбінації з біологічно активним агентом. Більш особливо, винахідники зрозуміли, що *Mycobacterium bovis*, переважно бацила Кальметта-Герена (BCG) *Mycobacterium bovis* і більш переважно *Mycobacterium*, така як BCG, що кодує або експресує фаголізосомальний вислизаючий пептид або поліпептид, є придатним засобом для викликання імунної відповіді або підсилення імунної відповіді, особливо, опосередкованої використанням біологічно активних агентів і більш особливо інших біологічно активних агентів, що викликають імунну відповідь. Особливо переважним типом біологічно активних агентів, що викликають імунну відповідь, є клітина, що експресує, принаймні, один цитокін або паразитний антиген, або пухлинний або паразитний антиген або вірусний антиген.

Без бажання пов'язати з будь-якої теорією, винахідники встановили, що такий фаголізосомальний вислизаючий пептид або поліпептид, беручи до уваги, що будь-які антигени похідні з бактеріальної клітини або з біологічно активного агенту і придатні для викликання імунної відповіді, є більш ефективними у випадку коли доступний такий фаголізосомальний

вислизаючий пептид. Іншими словами, дозволяючи антигенам, що створюються у провокованій бактеріальній клітині в фаголізосомах, вислизати з них і таким чином бути присутніми у імунній системі збільшуючи доступність BCG специфічних антигенів і створюючи таким чином відмінно діючий ад'ювант, що використовується у поєднанні з представленим винаходом.

5 Цей вид вивільнення пептидів в МНС класу I шляху представлення може підсилювати вже існуючу BCG-специфічну імунну відповідь і активність ад'юванту.

Дія ад'юванту BCG і більш особливо BCG або будь-якого мікроорганізму, переважно будь-якого організму *Mycobacterium*, який кодує або експресує фаголізосомальний вислизаючий пептид або поліпептид, є наступним неочікуваним відкриттям винахідників, який можна, переважно, здійснити коли така дія ад'юванту, що продукується мікроорганізмом, поєднується або спільно вводиться з іншим або другим біологічно активним агентом. На відміну від інших ад'ювантів, які стимулюють TH2 імунну відповідь, згаданий вище ад'ювант, тобто мікроорганізм, може використовуватись для викликання TH1 імунної відповіді. Така TH1 імунна відповідь є корисною доки вона індукує клітинну імунну відповідь. Тому, в наступному аспекті, винахід стосується застосування мікроорганізму, який кодує і/або експресує фаголізосомальний вислизаючий пептид, де мікроорганізмом є переважно BCG і більш переважно BCG, як тут описано, і найбільш переважно уре С-дефіцитна BCG, як ад'ювант.

Навіть більш неочікувано, винахідники знайшли, що мікроорганізм, переважно BCG або його похідні, які кодують і/або експресують фаголізосомальний вислизаючий пептид і більш переважно BCG, як тут описано, в його різних втіленнях, включаючи, але не обмежується, rBCG.Hly і більш переважно уре С-дефіцитну BCG, таку як BCG: rBCG Δ ureC: Hly і її похідні знаходяться над BCG без фаголізосомального вислизаючого пептиду доки вони здатні індукувати визначену CD8 відповідь, яка є специфічною для відповідного мікроорганізму, такого як *Mycobacterium*, і, крім того, також виражати CD8 відповідь, яка є специфічною для антигену представленого або даного біологічно активного агенту як тут описано і/або визначено. Іншими словами, мікроорганізм, який використовується або розглядається тут як перша складова, в цьому втіленні, тобто, включає фаголізосомальний вислизаючий пептид і більш переважно додатково є ureC негативною, не обмежується викликанням мікроорганізм-специфічної CD8 імунної відповіді на відміну від того, що очікувалось спеціалістом в цій галузі.

В переважному втіленні, таким фаголізосомальним вислизаючим пептидом або поліпептидом є фаголізосомальний вислизаючий поліпептид *L. monocytogenes*, лістеріолізін (Hly). Лістеріолізін є поро-утворюючим сульфгідрилактивуючим цитолізином і відповідає за вивільнення мікроорганізмів *L. monocytogenes* з фаголізосомальних вакуолей в цитозоль клітин хазяїв. Ця функція вислизання може бути перенесена до різних бактеріальних клітин, таких як *Bacillus subtilis*, ослаблених штамів *Salmonella* ssp. і *Mycobacterium*, як наприклад описано в міжнародній заявці РСТ/ЕР2004/004345. Також, Міжнародна заявка WO 99/101496 описує рекомбінантні штами *Mycobacterium bovis*, що секретиють біологічно активні лістеріолізінзлиті протеїни. Бактеріальна клітина, що формує першу складову композиції згідно з представленим винаходом, таким чином проявляє поро-формуючий механізм пробивання ендосомальних мембран, що призводить до відмінного імунотоксичу.

Спеціалісту в цій галузі бути зрозуміло, що існують деякі фаголізосомальні вислизаючі домени, де фаголізосомальний вислизаючий домен *Listeria*, який, наприклад, описаний в US 5,733,151, є переважним. Більш переважно, фаголізосомальний вислизаючий домен є похідним від організму *L. monocytogenes*, найбільш переважно, фаголізосомальний вислизаючий домен кодується молекулою нуклеїнової кислоти, що вибирають з а) нуклеотидної послідовності, що включає нуклеотиди 211-1.722 як показано в SEQ. ID. NO. 1, б) нуклеотидної послідовності, яка кодує ту ж саму амінокислотну послідовність як послідовність з а) і в) нуклеотидної послідовності, що гібридизує за жорстких умов з послідовністю з а) або б). Іншими фаголізосомальними вислизаючими поліпептидами, які можуть бути використані для таких цілей є, серед інших, гемолізін (Perfringolysin) з *Clostridium perfringens* (O'Brien DK, et al. Infect Immun. 2004 Sep; 72(9):5204-15); гемолізін з *Vibrio*, більш особливо *Vibrio vulnificus* (Lee SE et al., Biochem Biophys Res Commun. 2004 Nov 5; 324(1): 86-91); гемолізін/цитолізін з групи B streptococcus (Liu GY et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Oct 5; 101(40):14491-14496. Epub 2004 Sep 20); гемолізін BL з *Bacillus*, більш особливо *Bacillus cereus* (Moravsek M et al., FEMS Microbiol Lett. 2004 Sep 1; 238(1): 107-13); гемолізін з *Bordetella*, більш особливо *Bordetella pertussis* (Bassinet L et al., Infect Immun. 2004 Sep; 72(9):5530-3); гемолізін з *Escherichia coli* (Wyborn NR et al., Microbiology. 2004 May; 150(Pt 5): 1495- 505) і гемолізін з *Shigella* (Sharma K et al., Microbios. 2001; 106(413):31-8).

Окремо від нуклеотидної послідовності зображеної на SEQ ID No. 1, представлений винахід також включає послідовності нуклеїнової кислоти, що з нею гібридизують. В представленому

винаході, термін "гібридизація" використовується у значенні описаному в Sambrook et al. (Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104). У відповідності з представленим винаходом термін "гібридизація" використовується, якщо сигнал позитивної гібридизації може все ще спостерігатись після промивання протягом однієї години 1 × SSC і 0,1% SDS при 55°C, переважно при 62°C і більш переважно при 68°C. Послідовністю, що гібридизує з нуклеотидною послідовністю згідно з SEQ ID No. 1 за таких умов промивання, є фаголізосомальний вислизаючий домен, що кодується переважною нуклеотидною послідовністю представленого винаходу.

Нуклеотидну послідовність, що кодує фаголізосомальний вислизаючий домен, як описано вище, можна безпосередньо одержати з організму *Listeria* або з будь-якого рекомбінантного джерела, наприклад, рекомбінантної клітини *E. coli*, що містить відповідну молекулу нуклеїнової кислоти *Listeria* або її варіант, як описано вище.

Зрозуміло, що така бактеріальна клітина включає, принаймні, одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує фаголізосомальний вислизаючий пептид і більш особливо такою бактеріальною клітиною є клітина *Mycobacterium*, що включає Hly, і яка є особливо переважною для композиції згідно з представленим винаходом. В наступному переважному втіленні, згадана бактеріальна клітина є також уреазо-дефіцитною, більш особливо уреC дефіцитною. Такий організм також згадується як BCG: rBCG ΔureC: Hly або як BKG.

Mycobacterium і більш особливо *Mycobacterium bovis* бацила Кальметта-Герена (BCG) широко використовується як доступна вакцина для профілактики туберкульозу, хоча її ефективність все ще є сумнівною. Тим не менше, погоджуються з тим, що BCG може захищати від, або, принаймні, покращувати, стан при складних формах системного туберкульозу у дітей.

Однак, зараз розроблюються нові форми BCG. Винахідники знайшли, що ці нові форми BCG є особливо корисними як ад'юванти, коли вводяться разом з біологічно активним агентом і можуть, таким чином, використовуватись як перша складова комбінації згідно з представленим винаходом.

Бактеріальна клітина, яка використовується як перша складова комбінації згідно з представленим винаходом, переважно є уреазо-дефіцитною. Ця риса призводить до підвищення профілю безпеки внаслідок дефіциту сечовини, мікобактеріальна клітина не повинна виживати в оточенні, де необхідна така ферментна активність, така як в фаголізосомах.

Уреазо-дефіцит може бути досягнутий шляхом часткового або повного інактивування однієї або декількох клітинних молекул нуклеїнової кислоти, яка кодує субодиницю уреази, особливо ureA, що кодує субодиницю уреази A, ureB, що кодує субодиницю уреази B і/або ureC, що кодує субодиницю уреази C. Послідовності ureA, ureB і ureC в *Mycobacteria*, особливо *M. bovis* і *M. Tuberculosis*, і протеїни, що ними кодуються, описується Reyrat et al. (1995) і Clemens et al. (1995), які включені сюди як посилання.

Переважно, уреазо-дефіцитний бактеріальний штам одержують делецією і/або вставкою одного або декількох нуклеотидів в послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують уреазну субодиницю, і/або послідовності контролю експресії. Делеції і/або вставки можна одержати за допомогою рекомбінації гомологу, вставки транспозону або за допомогою інших придатних способів.

У особливо переважному втіленні, ureC послідовність є інактивованою, наприклад, шляхом створення суїцидного вектору, що містить ureC ген розбитий селекційним маркерним геном, трансформування цільової клітини вектором і дослідження селекції маркер-позитивних клітин, що мають уреазу негативного фенотипу, проводили як описано Reyrat et al. (supra).

Згідно з представленим винаходом, різні види *Mycobacterium* можуть використовуватись як бактеріальна клітина, що утворює першу складову композиції згідно з представленим винаходом, а саме *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. smegmatis*, *M. canettii*, *M. marinum* або *M. fortuitum*. Також попадає в межі представленого винаходу, що можуть бути використані інші мікроорганізми, переважно, внутрішньоклітинні мікроорганізми, які проявляють одну або обидві із згаданих вище характеристик, а саме кодування або експресія фаголізосомального вислизаючого пептиду або поліпептиду, і які є уреазо-негативними, більш особливо ureC-негативними.

В наступному втіленні винаходу, відповідна бактеріальна клітина є атенуованою. В більш переважному втіленні, бактеріальна клітина є атенуованою, але все ще живою і більш особливо є придатною для викликання TN1 відповіді.

В більш переважному втіленні винаходу, відповідна бактеріальна клітина є живою бактеріальною клітиною.

В наступному втіленні винаходу, бактеріальна клітина також включає, принаймні, одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує пептид або поліпептид здатний викликати імунну відповідь у ссавця. Як тут використовується, термін викликати імунну відповідь у ссавця означає, що при взаємодії такого пептиду або поліпептиду або його частини з імунною системою ссавця, може виникати імунна відповідь, яка є В клітинно-опосередкованою імунною відповіддю. Альтернативно, однак, імунна відповідь є Т-клітинно-опосередкованою імунною відповіддю, більш переважно МНС клас 1-обмеженою CD 8 Т клітинною відповіддю.

Більш переважно, такий пептид або поліпептид вибирають з групи, що включає аутоантигени, пухлинні антигени, вірусні антигени, паразитні антигени, бактеріальні антигени і їх імуногенні фрагменти. Переважно, імуногенним фрагментом є частина такого антигену, який все ще здатен викликати імунну відповідь. Особливо переважним антигеном є gp190/MSP1 протеїн *Plasmodium*, як описано тут більш детально. Наступним особливо переважним вірусним антигеном є щільні тіла HCMV, як описано тут більш детально. Ще одним наступним антигеном є антигени придатні для викликання імунної відповіді проти туберкульозу і більш специфічно проти *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum* і *M. paratuberculosis*. Особливо переважним антигеном є антиген 85. Такий антиген є, в переважному втіленні, другою складовою.

Як відомо спеціалісту в цій галузі, коли б тут не згадувався антиген, цей термін також включає його фрагменти або мутовані форми. Його фрагменти і мутовані форми розглядаються як відповідний антиген доки така мутована форма або її фрагмент проявляє, принаймні, одну характеристику повнодовжинного або дикого антигену. Переважно, такою характеристикою є його здатність викликати імунну відповідь, більш переважно імунну відповідь, коли використовується разом або в комбінації з першою складовою або ад'ювантом, як тут описано. В навіть більш переважному втіленні, такою імунною відповіддю є специфічна CD8 імунна відповідь. Відповідно, це стосується також поліпептидів і протеїнів.

Як також відомо спеціалісту в цій галузі, коли б тут не згадувалась нуклеїнова кислота і нуклеїнова кислота, що кодує поліпептид або протеїн, відповідно, термін також включає такі нуклеїнові кислоти, що кодують поліпептид або протеїн, що необов'язково є фрагментом або його мутованою формою, як переважно тут визначено, в межах виродження генетичного коду або в межах необхідності адаптації послідовності до використовуваного кодону відповідного хазяїна або продукуючого організму.

Термін, що поліпептид, протеїн або антиген є похідним з організму, переважно означає, що амінокислотна послідовність відповідного поліпептиду, протеїну або антигену є послідовністю відповідного організму, де послідовність, а таким чином також і відповідна нуклеїнова кислота, що його кодує, можуть бути фрагментами і її мутованими формами.

Відомо, що пептид або поліпептид здатний викликати імунну відповідь у ссавця може бути другою складовою композиції. В межах представленого винаходу, що пептид або поліпептид є частиною злитого поліпептиду. Переважно, такий злитий поліпептид включає пептид або поліпептид здатний викликати імунну відповідь у ссавця або його домен все ще має цю рису, і злитий поліпептид також включає фаголізосомальний вислизаючий домен, переважно фаголізосомальний вислизаючий домен, як описано вище, у зв'язку із втіленнями першої складової представленого винаходу. Домен поліпептиду, який здатний викликати імунну відповідь у ссавця, може бути, у випадку такого пептиду, бактеріальним антигеном, похідним від мікроорганізму, переважно, з виду *Mycobacterium* і більш переважно з *Mycobacterium tuberculosis* або з *Mycobacterium bovis*. Цей домен має довжину, принаймні, 6, переважно, принаймні, 8 амінокислот. Імуногенний домен переважно є частиною природного поліпептиду *Mycobacterium*. Однак, модифіковані імуногенні домени, які можуть бути похідними від природного імуногенного домену внаслідок заміщення, делеції і/або додавання однієї або декількох амінокислот, також знаходяться в рамках представленого винаходу. В переважному втіленні, доменом є домен gp190/MSP1 протеїну *Plasmodium*.

У втіленні винаходу, злитий протеїн кодується молекулою рекомбінантної нуклеїнової кислоти, тобто молекули нуклеїнової кислоти згідно з SEQ ID No. 1. Ця молекула нуклеїнової кислоти включає послідовність, що кодує сигнальний пептид (нуклеотиди 1 - 120), послідовність, що кодує імуногенний домен (нуклеотиди 112 - 153), послідовність, що кодує пептидний лінкер (нуклеотиди 154 - 210), послідовність, що кодує фаголізосомальний домен (нуклеотиди 211 - 1722), іншу послідовність, що кодує пептидний лінкер (нуклеотиди 1723 - 1800) і послідовність, що кодує випадковий пептид (нуклеотид 1801 - 1870). Відповідна амінокислотна послідовність показана на SEQ ID No. 2.

У особливо переважному втіленні, більш особливо, коли першою складовою є або rBCG:Hly, або rBCGΔureC:Hly, другою складовою є біологічно активний агент і, більш особливо,

генетично модифікована клітина. Переважно, генетично модифікованою клітиною є еукаріотична клітина. Більш переважно, така генетично модифікована клітина експресує, принаймні, один цитокін. Цитокін, як тут використовується, секритується протеїном, який впливає на поведінку і характеристики інших клітин. Переважними цитокінами є інтерлейкіни, хемокіни, лімфокіни, монокіни і фактори росту. Особливо переважними цитокінами є інтерлейкіни і інтерферони, де переважними інтерлейкінами є інтерлейкін-2, інтерлейкін-4, інтерлейкін-12, переважно інтерлейкін-2, і інтерфероном є переважно інтерферон-альфа, інтерферон-бета або інтерферон-гама, більш переважно інтерферон-гама.

Як переважно тут використовується, генетично модифікованою клітиною є клітина модифікована стосовно організації генетичного матеріалу, який присутній в клітині, шляхом вставки екзогенного генетичного матеріалу. Таке модифікування організації генетичного матеріалу включає введення генетичного матеріалу ще не присутнього в клітині, для того щоб чужорідна нуклеїнова кислота стала своєю, або для активування частини ендогенного генетичного матеріалу, де такий генетичний матеріал не присутній або активний без присутності згаданого екзогенного генетичного матеріалу, де екзогенний генетичний матеріал, необов'язково, є генетичним матеріалом, але може бути будь-яким матеріалом активним до такої міри. Способи здійснення такої модифікації добре відомі в цій галузі. Наприклад, екзогенний ДНК матеріал можна ввести в клітину за допомогою технології осадження фосфату кальцію, технології вірусного вектору, електропорації, ліпофекції, систем вірусного вектору, таких як адено-зв'язані вірусні системи, мікроін'єкції або біолістичних підходів. Результатом такого генетичного маніпулювання є генетично модифікована клітина, що буде здатна експресувати певний генний продукт, який не експресувався до цього.

Винахідники знайшли, що співекспресія інтерлейкінів, і більш особливо інтерлейкін-2 і інтерферон-гама, в комбінації з бактеріальною клітиною описаною, як перша складова комбінації згідно з представленим винаходом, забезпечує дуже ефективний шлях підвищення імунної відповіді організму, більш особливо TH1 відповіді. Окрему клітину можна вибрати з різних клітин, таких як непрофесійні клітини, що представляють антиген, професійні клітини, що представляють антиген, пухлинні клітини і дендровидні клітини. Серед цих типів клітин, пухлинні клітини є особливо переважними. При введенні таких пухлинних клітин, ракові пацієнти, яким вводять такі пухлинні клітини, зазнають підвищення ефективності дії пухлинної вакцинації. Переважно, клітини, що використовуються для такої вакцинації, беруть з тих же самих або подібних пухлинних утворень, як і пухлина, що лікується використовуючи комбінації згідно з представленим винаходом. Корисна дія використовуваних генетично модифікованих клітин, які, серед іншого, описані в Міжнародній заявці WO 94/18995, таким чином, підвищується при використанні бактеріальної клітини, яка складає першу складову комбінації згідно з представленим винаходом.

В межах представленого винаходу, професійним антигеном представленою клітиною є дендровидна клітина, яка використовується або як біологічно активний агент, як визначено вище, або використовується як інший компонент біологічно активного агента, де переважно в такому втіленні біологічно активним агентом є генетично модифікована клітина, більш переважно клітина, що експресує цитокін, як тут описано, де клітина навіть більш переважно спів-експресує два цитокіни і найбільш переважно інтерлейкін-2 і інтерферон-гама. Дендровидні клітини переважно вводять з антигенів з пухлини, де пухлиною є пухлина для лікування якої використовується дендровидна клітина, переважно в комбінації з ад'ювантами, як тут описано, і/або комбінації ад'ювантів і біологічно активного агента, такого як, наприклад, згадані клітини, що співекспресують цитокіни. Введення дендровидних клітин відоме середньому спеціалісту в цій галузі, наприклад, описується Van and Hart ((2004), *Cytotherapy*: 6(2): 111-121.)- Такі дендровидні клітини переважно використовуються для лікування будь-якого захворювання описаного тут або окремо, або в комбінації з будь-яким з ад'ювантів описаних тут, особливо BCG і BKG, або будь-якої комбінації першої і другої складової описаної тут. Переважно, таким захворюванням є будь-яке пухлинне захворювання описане тут.

Переважають пухлинами і раковими утвореннями, відповідно, на які може бути спрямоване використання такого виду підходу, є, особливо, імуногенні пухлини або ракові утворення, такі як, серед інших, меланома, реальний рак, пухлина молочної залози, пухлина мозку, пухлина простати, немілкоклітинний рак легені, рак товстої кишки і пухлина сквамозних клітин голови і шиї.

Експресія цитокіну і більш особливо спів-експресія інтерлейкіну-2 і інтерферону-гама дозволяє підвищити ефективність дії пухлинних антигенів представлених генетично модифікованою клітиною. Покращення протипухлинної відповіді відбувається приблизно по двом різним механізмам, які спрямовані у тому ж самому напрямкові. З одного боку,

секретування $IFN\gamma$ підвищує експресію MHC і адгезію молекул на поверхню клітини для покращення присутності специфічних пухлинних антигенів у $CD8^+$ Т-клітині MHC I молекул і, таким чином, покращує розпізнавання пухлинних клітин Т-клітинами. З іншого боку, секретування IL-2 в закритій близькості до пухлинних клітин підвищує активність $CD8^+$ Т-клітин.

5 Переважно, генетично модифікована клітина, що експресує, принаймні, один цитокін, є в переважному втіленні, принаймні, до деякої міри залежною від пухлини для лікування якої вона використовується. Звичайно, повинно бути зрозуміло, що інші лінії клітин також можуть бути використані, де більш переважно, що згадані клітини на додаток до генетично модифікованих, як тут описано, також експресують деякі антигени, що характеризують пухлину, що таким чином

10 лікується.

Спеціалісту в цій галузі відомо, що, в принципі, генетично модифікованою клітиною може бути аутологічна клітина. Це означає, що клітина береться від пацієнта, що лікується, використовуючи комбінацію згідно з представленим винаходом, де клітини зазвичай відбираються з пухлини, що лікується, і клітини модифікують з одержанням генетично

15 модифікованих клітин, як тут описано. Потім, цей вид клітин вводиться пацієнтові знову як частина комбінації згідно з представленим винаходом.

Для того щоб підвищити ефективність генетично модифікованих клітин, ці клітини також можуть експресувати інші імуномолекули. Як тут використовується, імуномолекулою є будь-яка молекула, яка здатна впливати на імунну систему. Імуномолекулами є, серед інших, цитокіни,

20 адгезійні молекули, спів-стимуляторний фактор, пухлино-зв'язаний антиген, пухлино специфічний антиген і паразитний антиген.

В наступному втіленні винаходу, генетично модифікованою клітиною є алогенна клітина. Алогенною клітиною є, в переважному втіленні, клітина, яка походить від тих же самих видів, однак, не є такою ж самою. Алогенними клітинами є клітини, що є похідними від тих же самих

25 видів, але антигенно окремими. В особливо переважному втіленні винаходу, алогенна клітина підбирається за сумісністю до відповідної популяції клітин пухлини, що лікується. Більш переважно, сумісність буде залежати від деяких або всіх класів лімфоцитного антигену людини (HLA) у пацієнтів, що лікуються, використовуючи комбінацію згідно з представленим винаходом. Однак, можуть використовуватись різні ступені сумісності. Більш особливо, сумісність буде мати

30 HLA клас I сумісності. HLA клас I включає підкласи A, B і C. Буде наданий HLA клас I сумісності, якщо є сумісність між клітиною, що використовується як друга складова композиції згідно з представленим винаходом, і клітинами, що складають пухлину у пацієнта, що лікується, використовуючи згадану композицію.

Відомо, що сумісність і рамки такої необхідної сумісності знаходяться в межах знань середнього спеціаліста в цій галузі. Один з експериментальних підходів полягає у інокулюванні

35 різними групами тварин/пацієнтів з різними ступенями сумісності з наступним аналізом впливу на пухлину. Альтернативно, тест може бути проведений безпосередньо на пухлині пацієнтів.

Особливо переважною лінією клітин є LNCaP, яка спів-експресує інтерлейкін-2 і інтерферон-гама і яка використовується як друга складова у поєднанні з комбінацією згідно з

40 представленим винаходом, більш особливо для лікування раку простати, де першою складовою є rBCG:Hly або rBCGΔureC:Hly.

В наступному втіленні винаходу, біологічно активним агентом є паразитний антиген, більш особливо gp190/MSP1 протеїн Plasmodium. Переважно, відповідний антиген є похідним від Plasmodium falciparum. Переважно, відповідний антиген є похідним амінокислотної

45 послідовності MSP-1 протеїну Plasmodium, переважно MSP-1 протеїну Plasmodium falciparum. Термін паразитний антиген, як тут використовується, означає повнодовжинний антиген, також як і його фрагменти доки вони придатні для викликання імунної відповіді, більш переважно TH1 відповіді або TH1 опосередкованої відповіді, переважно у ссавця, навіть більш переважно у поєднанні з композицією згідно з представленим винаходом, де першою складовою є

50 найбільш переважно rBCG:Hly і rBCGΔureC:Hly, відповідно.

Це втілення особливо корисне при лікуванні малярії.

В межах представленого винаходу, такий паразитний антиген може бути експресований бактеріальною клітиною, що діє як перша складова, або комбінацією згідно з представленим

55 винаходом, або еукаріотичною клітиною, що діє як друга складова композиції згідно з представленим винаходом. Однак, це також в межах представленого винаходу, що паразитний антиген експресується бактеріальною клітиною, яка включає, принаймні, одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує фаголізосомальний вислизаючий пептид або поліпептид, як розкрито для різних втілень представленого винаходу.

Відомо, що gp190/MSP включає декілька доменів, що зустрічаються в природі, і що такі домени або індивідуально, або в комбінації можуть бути паразитним антигеном, як тут

60

переважно використовується. gp190/MSP1 розглядається для повноти як потенційний кандидат для вакцини проти малярії. Однак, його одержання розглядається як надзвичайно важке, що перешкоджає об'ємному виробництву цього антигену. З огляду на це, одержання сильних малярійних вакцин не доступне. Однак, ґрунтуючись на рівні техніки, а саме міжнародній заявці WO 98/14583, цей антиген Plasmodium може зараз бути доступним у великих кількостях. Відомо, що такий паразитний антиген не обмежується gp190/MSP1 антигеном, але також включає його гомологи знайдені в інших видах Plasmodium не говорячи вже про Plasmodium falciparum, такий як P. vivax. Згадана міжнародна заявка включена сюди як посилання і дозволяє спеціалісту в цій галузі одержати будь-яку кількість цього антигену, що необхідний для включення в композицію згідно з представленим винаходом як другої складової. ДНК вакцини, наприклад, описуються Grode L, Mollenkopf HJ, Mattow J, Stein M, Mann P, Knapp B, Ulmer J, Kaufmann SH. Application of mycobacterial proteomics to vaccine design: improved protection by Mycobacterium bovis BCG prime-Rv3407 DNA boost vaccination against tuberculosis. Infect Immun. 2004 Nov;72(II):6471-9.

В наступному втіленні винаходу, біологічно активним агентом є часточка або група вірусних часточок або множина вірусних часточок, яка переважно вивільнюється після інфікування клітин ссавця цитомегаловірусом людини (HCMV), часточки (а) є оточеними ліпідною мембраною в яку включені вірусні глікопротеїни, і (б) не містять ні вірусну ДНК, ні капсиди, або є щільними тілами, переважно щільними тілами цитомегаловірусу людини. Такі часточки, як буде описано тут більш детально, переважно використовуються для профілактики інфікування і/або лікування цитомегаловірусу людини, який є вірусом бета-герпесу. Особливо важною групою суб'єктів, яка може лікуватись використовуючи комбінацію згідно з цим аспектом представленого винаходу є пацієнти, які мають зазнати трансплантації кісткового мозку.

У імунікомпетентних осіб, HCMV інфекція зазвичай не спостерігається, при наявності більшості середніх і неспецифічних симптомів. І навпаки, в деяких групах ризику, наприклад, у імносупресованих пацієнтів, таких як СНІД пацієнти або пацієнти з трансплантованими органами, і після пренатальної інфекції, HCMV інфекція має серйозні проявлення, які, тому, складають наступну групу пацієнтів, яка може лікуватись використовуючи комбінацію ад'юванту і відповідних часточок.

У відповідності з знаннями одержаними з міжнародної заявки РСТ/ЕР 00/01794, так звані щільні тіла HCMV перевіряли на ефективність по індукванню імунної відповіді і в кінці кінців імунного захисту від HCMV інфекції. Таким чином, згадані щільні тіла забезпечують довготривале індуквання нейтралізуючих антитіл, які захищають від HCMV інфекції в штамі, що перекривається. Це забезпечується ефективним індукванням так званих "помічників клітинної відповіді" (СО4-позитивні Т лімфоцити) проти HCMV із сприянням розвитку В-лімфоцитів, що секретують антитіла. Крім того, згадані щільні тіла є придатними для індуквання утворення цитотоксичних Т-клітин проти HCMV, де лімфоцити цього типу є надзвичайно важливими для припинення HCMV інфекції, яка має місце і обмежує розповсюдження вірусу у тілі. На кінець, такі щільні тіла є придатними для зменшення побічної дії вакцини.

Щільні тіла індукуються HCMV інфекцією і вивільнюються в культуральне середовище вперше інфікованих культур фібробластів людини. Вони є структурами, що можна побачити у електронний мікроскоп і більше ніж 90 % протеїнової маси яких складає рр65. Вони співставимі з вірусними часточками по присутності клітинної ліпідної мембрани модифікованої вірусними глікопротеїнами і по виділенню з клітини. Вірусні глікопротеїни в цьому конверті дуже можливо знаходяться в природній конфігурації. Оскільки щільні тіла не містять ні вірусної ДНК, ні капсид, вони не є інфекційними. Вони можуть бути сконцентрованими у великій кількості з надсосадкової рідини культури клітин за допомогою звичайних методик. Профілактичне застосування, також як і застосування як терапевтичної вакцини можуть бути реалізовані використовуючи такі щільні тіла, особливо в комбінації з ад'ювантом описаним тут.

Щільні тіла оточені мембраною, яка забезпечує можливість злиття часточок з деякими клітинами ссавців, так що їх вміст попадає в цитоплазму клітини. Мембрана часточок містить вірусні глікопротеїни, які представляють головні антигени для вірус-нейтралізуючих антитіл. Часточки також характеризуються тим, що вони не містять ні вірусної ДНК, ні капсид. Крім того, вони містять вірусний Т-клітинний антиген рр65 (ppUL83), який стимулює утворення Т-хелперів і є есенціальним антигеном для індуквання цитотоксичності Тлімфоцитів (CTL) проти HCMV.

Ці властивості, особливо комбінація антигенів здатна індукувати нейтралізуючі антитіла, і адекватну клітинну відповідь, робить часточки придатними як вакцини проти HCMV.

Також, щільні тіла індукують незалежно від шляху введення, відповідей клітин Т-хелперів Th1 типу, які визначають їх як вакцини проти HCMV.

В наступному втіленні винаходу, описуються щільні тіла або відповідні часточки, які містять злитий протеїн, який включає в одній з частин один або декілька сегментів вірусного Т-клітинного антигену pp65 (ppUL83) або протеїн і в іншій частині один або декілька сегментів одного або декількох протеїнів.

Це робить можливим оптимізування антигенності часточок оскільки цей злитий протеїн присутній у часточках у великій кількості. Додатково відомо, що експресія клітинних антигенів і гуморальної імунної відповіді в одній молекулі може чітко збільшувати антигенність. Різні сегменти pp65 і інші протеїни можуть бути злиті разом безпосередньо, але це також можливо, наприклад, для чотирьох лінкерних послідовностей, які не є природними складовими одного з включених протеїнів, присутнього між різними сегментами. Послідовності цього типу можуть виникати завдяки клонуванню або бути об'єднаними для того щоб вплинути на властивості антигену. Однак, злитий протеїн переважно не містить сторонніх послідовностей, які не є складовими одного із злитих партнерів. В таких втіленнях, злитий протеїн включає одну або більше частин pp65 і одну або більше частин одного або декількох інших протеїнів.

Це стосується всіх втілень згаданих тут вище, що повний pp65 або одна або декілька його частин можуть бути присутні у злитому протеїні. Формулювання "злитий протеїн (включає) pp65", як зрозуміло, призначене не для обмеження в цій заявці тільки повним pp65. "Частина" або "сегмент" протеїну присутній у злитому протеїні включає, принаймні, 6, переважно, принаймні, 8, найбільш переважно, принаймні, 9, 15 або 20 послідовних амінокислот протеїну з якого він походить.

Переважне втілення включає злитий протеїн pp65 (ppUL83) і один або більше нейтралізуючих епітопів вірусних глікопротеїнів gB або gH. Часточки цього типу можна одержати, як описано в міжнародній заявці PCT/EP 00/01794. Злитий протеїн може входити, через антиген-специфічне поглинання, в глікопротеїн-специфічні В клітини, які в свою чергу містять епітоми глікопротеїнів і pp65 в контексті МНС класу II. Крім того, також можливо для частин злитого протеїну представленого професійними антиген-вмісними клітинами (APC) в контексті МНС класу II. У обох випадках, результатом є ефективне стимулювання Т_H відповіді на pp65 і на вірусні глікопротеїни. Ці Т_H клітини здатні стимулювати глікопротеїн-специфічні В-клітини, які містять пептиди pp65 і вірусні глікопротеїни у контексті МНС класу II, з утворенням нейтралізуючих антитіл гологічних і гетерологічних. Крім того, часточки цього типу можуть, подібно інфекційним віріонам, бути введенні у клітини і пептиди pp65 можуть бути введенні за допомогою екзогенного введення в МНС клас I шляху. Це досягається, незвичайно для мертвих вакцин, стимулюванням CTL відповіді до HCMV.

В наступному переважному втіленні, часточки містять злитий протеїн, що включає pp65 і одну або більше частин іншого протеїну HCMV, IE1 протеїн (ppUL123). Зокрема, повинні бути присутні ті частини IE1 протеїну проти яких спрямовані цитотоксичні Т-клітини, що утворюються в людях під час природного інфікування. В деяких випадках, пептиди IE1 протеїну представлені молекулами МНС класу I, ніж пептидами pp65. Введення таких додаткових "CTL" епітопів з IE1 призначено для того щоб гарантувати, що після імунізації, інокульовані суб'єкти, які експресують різні молекули МНС класу I, здатні генерувати CTL проти HCMV як у всебічному способі, як це можливо.

В наступному переважному втіленні, часточки містять злитий протеїн, що включає pp65, один або більше нейтралізуючих епітопів HCMV глікопротеїнів і один або більше CTL епітопів IE1. Злитий pp65 з нейтралізуючими епітопами і CTL епітопами призначений для гарантування, що можливе одночасно утворення обох нейтралізуючих антитіл і CTL у суб'єкті, якому вони інокульовані, в найповнішому з можливих значень, тобто у максимальної кількості людей, що відрізняють в МНС класі I.

В наступному переважному втіленні, часточки містять злитий протеїн pp65 і один або більше епітопів іншого патогену людини. Придатними частинами інших патогенів людини є антигени проти яких в людині утворюються нейтралізуючі антитіла. Можливо через злиття таких "нейтралізуючих антигенів" з Т-клітинним антигеном pp65 очікувати значне збільшення імунної відповіді (антитілогенез) порівняно з використанням виділеного "нейтралізуючого антигену". Прикладами таких "нейтралізуючих антигенів", які слід згадати, є поверхневі протеїни вірусу гепатиту В (з HBsAG регіону), вірусу гепатиту С (наприклад Е2), вірусу імунодефіциту людини (HIV, з Env регіону), вірусу грипу (гемагглютинін, нейрамінідаза, нуклеопротеїн) або інші вірусні патогени. Такими придатними патогенами людини є бактерія, така як Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Mycobacterium tuberculosis, Neisseria, meningitidis і інші. На кінець, антигени з еукаріотичних патогенів, таких як Plasmodia (малярія), може бути злита з pp65.

В наступному переважному втіленні, часточки містять злитий протеїн, що включає pp65 і одну або більше частин протеїнів інших патогенів проти яких генерується CTL в людині на

природну інфекцію, яка продукує ці патогени. Прикладами таких CTL епітопів, які можна згадати, є частини протеїнів HIV-1, HBV, HCV або вірусу грипу. Винахід таким чином використовує унікальні імуногенні властивості щільних тіл для генерування захисного CTL проти гетеро логічних патогенів у людей.

5 В наступному переважному втіленні, часточки містять злитий протеїн, що включає pp65, один або більше нейтралізуючих епітопів гетерологічного патогену і один або більше CTL епітопів того ж самого патогену. Цей злитий протеїн призначений для гарантування того, що інокульовані суб'єкти будуть здатні утворювати і захисні антитіла, і CTL проти цього патогену.

10 Винахід додатково стосується вірусних часточок, що містять, принаймні, два різні глікопротеїни, які є варіантами того ж самого глікопротеїну з різних штамів HCMV.

Переважне втілення винаходу включає як раз два варіанти, один варіант відповідає штаму Тоуна HCMV, і інший варіант відповідає штаму Ad169 HCMV. Переважне втілення винаходу включає глікопротеїн gB і штаму Тоуна, і штаму Ad169.

15 Ці два протеїни можна включити з ідентичною ефективністю в мембрану рекомбінантних щільних тіл в інфікованих клітинах. Такі рекомбінантні щільні тіла придатні не тільки для штаму-перекриття, але також штам-специфічної нейтралізуючої імунної відповіді на два прототиби штамів HCMV.

20 На кінець, винахід також стосується способу за яким одержують вірусні часточки, які повністю вільні від інфекційного вірусу. Як тут переважно використовується, термін вільний від інфекційного вірусу означає, що одержані таким чином рецептури неінфіковані до рівня детектування. Якщо часточки одержуються з популяції клітин, яка інфікована HCMV, існує ризик, що часточки інфекційного вірусу будуть присутні під час очистки часточки. Це створює проблеми для вакцини.

25 Спосіб винаходу мінімізує цей ризик. З цією метою, спочатку одержують штам HCMV, що зазнає делеції в есенціальному гені. Під цим розуміють делецію функціонування гену. В більшості випадків, це ґрунтується на відсутності продукту функціонального гену, але також можливе для порушення функціонування регуляторної послідовності гену таких шляхом, що HCMV стає не життєздатним. Це може мати місце при зміні послідовності нуклеїнової кислоти HCMV, наприклад, шляхом точкових мутацій, реальних делецій, вставок або інших мутацій. Цей дефективний вірус може реплікуватись тільки в клітинах, які експресують ген, який видалений в HCMV і, таким чином, робить його доступним для збірки варіонів. Первинні фібробласти на даний момент представляють тільки помірно пермісивну систему для *in vitro* реплікації HCMV. Стабільна трансфекція таких клітин на даний момент можлива тільки за допомогою способі ретровірусного трансферу. Однак, це є серйозною перепорою, якщо такі клітини будуть використовуватись для одержання вакцин. Спосіб винаходу робить доступними стабільні трансфіковані клітини, які можна одержати без переносу ретровірусного гену, але в який також може бути реплікований HCMV.

30 Переважне втілення винаходу включає фібробласти крайньої плоти людини, які стабільно трансфіковані геном UL86 основного капсидного протеїну. Трансфекцію переважно проводять з використанням ліпід-вмісного помічника, який забезпечує дуже високу ефективність трансфекції. В переважному втіленні, для трансфекції використовують "реагент Фугена", який можна одержати від Roche Diagnostics, Mannheim.

45 Дефективний вірус, в якому видалений гену UL86 основного капсидного протеїну, можна реплікувати в ці клітини. Якщо "недоповнені" фібробласти інфікувати цим дефективним вірусом, тоді можна виділити вільні часточки вірусної вакцини з часточок інфекційного вірусу.

Іншою можливістю одержання часточок винаходу без ризику інфекції є відтворення часточок в клітинах без інфікування HCMV. З цією метою, всі гени, які кодуєть складники часточок повинні бути експресовані в цих клітинах. З цією ціллю ці гени повинні бути вставлені в клітини.

50 Переважно з цією ціллю використовували клітини комах інфіковані бакуловірусами. Гени, які кодуєть поліпептидні складові часточок, клонували в бакуловірусних векторах експресії. Продування рекомбінантних бакуловірусів відбувалось із спів-інфікуванням клітин комах, переважно Sf9 клітини, різними вірусами. Гени експресували в клітинах комах і одержані полі пептиди одержували одержуючи бажані часточки. На кінець, часточки виділяли з клітин комах. Це розкриває одну з можливостей одержання неінфікованих часточок, які можна використати як вакцини.

55 Альтернативною можливістю є клонування складових необхідних для відтворення щільних тіл у рекомбінантних бакуловірусах під контролем основного ІЕ промотора/підсилювача (MIEP) HCMV. Видно, що рекомбінантні бакуловіруси здатні інфікувати вищі еукаріотичні клітини, такі як, наприклад, клітини ссавців, і що інородні гени під контролем сильного еукаріотичного промотора, такого як MIEP, сильно експресуються в таких клітинах. Перевагою такої процедури

буде те, що будь-які важливі модифікації, такі як глікозилування, антигенних протеїнів щільних тіл будуть відбуватись більш природним чином в клітинах ссавця, ніж в клітинах комах. Крім того, існує ряд таких ліній клітин, які вже досліджені на придатність для одержання вакцини.

В наступному втіленні винаходу, біологічно активним агентом є антигенпредставляюча клітина, де така антигенпредставляюча клітина представляє антигени придатні для викликання імунної відповіді проти туберкульоз і більш специфічно проти *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum* і *M. paratuberculosis*. В переважному втіленні антигенпредставляючою клітиною є мікроорганізм, більш переважно мікроорганізм, що вибирають з групи, яка включає *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum* і *M. paratuberculosis*. Комбінація у відповідності з представленим винаходом включає бактеріальну клітину як першу складову і таку антигенпредставляючу клітину або такий антиген сам по собі як другу складову або як біологічно активний агент, може переважно бути використана для профілактики і/або лікування туберкульозу. Переважно, антигеном є антиген 85.

В межах представленого винаходу, що перша складова композиції згідно з представленим винаходом в її різних формах описаних тут і, зокрема, мікроорганізми, що мають фаголізосомальний вислизаючий домен в їх різних втіленнях, таких як rBCG:Hly і rBCG ΔureC:Hly, діє і може таким чином використовуватись як ад'ювант, який є засобом, що відповідає за підвищення імунного статусу пацієнта, що лікується, або потребує лікування, більш переважно імунний статус стосується TH1 і навіть більш переважно імунний статус характеризується підсиленням TH1 відповіді, де така TH1 відповідь підсилюється порівняно з необробленою особою.

Як тут описано, друга складову є переважно фізично іншою або фізично відокремленою від першої складової оскільки вона є агентом, який призначений для специфічної біологічної, біохімічної, фізіологічної або медичної відповіді пацієнта. Дійсно, перша і друга складову є фізично розділеними, що дозволяє незалежне або окреме введення згаданих двох складових. У випадку коли біологічно активним агентом є генетично модифікована клітина, яка експресує цитокін і більш переважно такою клітиною є ракова клітина, специфічна імунна відповідь спрямована на антигени введенні в таку генетично модифіковану клітину. Тим не менше, відомо, що цитокіни завдяки їх способу дії забезпечують загальну прийнятну дію, яка можна розцінювати також як допоміжну дію, як вже забезпечується першою складовою.

В наступному аспекті представлений винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить комбінацію згідно з представленим винаходом і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або ад'юванти або інші наповнювач(і). Переважно, такі носії, розріджувачи, ад'юванти і наповнювачі є інертними і нетоксичними. Фармацевтична композиція, в її різних втіленнях, адаптована для введення різними шляхами. Таке введення включає системне і локальне введення, також як і оральне, підшкірне, парентеральне, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньом'язове, інтраперітоніальне, інтраназальне, інтраєгіральне і інтраокулярне. Переважна фармацевтична композиція є рідиною або фізіологічним буфером, що містить першу і другу складову.

Спеціалісту в цій галузі зрозуміло, що кількість фармацевтичної композиції, що вводиться, залежить від клінічного стану окремого пацієнта, місця і способу введення, розкладу введення, віку пацієнта, статі, ваги тіла і інших факторів відомих медикам. Таким чином, фармацевтично ефективна кількість для цілей профілактики і/або лікування визначається виходячи з таких міркувань які відомо в цій галузі. Переважно, кількість є ефективною для досягнення покращення включаючи, але не обмежується, покращення хворобливого стану або забезпечення більш швидкого відновлення, покращення або усунення симптомів і інших показників як вибрано прийнятним вимірюванням спеціалістом в галузі медицини.

В переважному втіленні, фармацевтична композиція згідно з представленим винаходом може включати інші фармацевтично активні сполуки.

Фармацевтична композиція переважно формулюється таким чином, що забезпечує одиничну дозу для введення або багатодозове введення.

У втіленні винаходу, перша складову і друга складову або як такі, або як частина фармацевтичної композиції, або як фармацевтична композиція, представлені одночасно, або як одинична рецептура, або як окрема рецептар кожної складової. У випадку окремої рецептури, перша рецептура містить першу складову і друга рецептура містить другу складову. Згадана перша і згадана друга рецептура, відповідно, є, в переважних втіленнях, сформованими як будь-яка з фармацевтичних рецептур описаних тут.

Це також в межах представленого винаходу, що перша і друга складову, відповідно, вводяться окремо. Переважно, різниця в часі введення першої і другої складової, відповідно,

становить приблизно одну годину або менше ніж одну годину, переважно приблизно 30 хвилин або менше, і більш переважно приблизно 15 хвилин або менше.

Зрозуміло, що також в межах представленого винаходу, що або перша або друга складова або обидві складові можуть, в різних формах, як тут описано, бути використані для профілактики будь-якого із захворювань описаних тут.

Представлений винахід надалі ілюструється з посиланням на малюнки і приклади з яких можна взяти додаткові ознаки, втілення і переваги винаходу, де

на Фіг. 1 показана діаграма, що зображає імунну відповідь виражену як CD8 + Tet + Т клітини при спільному введенні BKG і вакцини порівняно з контролем;

на Фіг. 2-4 показані схеми імунізації для профілактичної вакцинації пухлини;

на Фіг. 5-7 показані схеми імунізації для терапевтичної вакцинації пухлини; і

Фіг. 8 і 9 є діаграми, що зображають дію різних схем імунізації на ряд IFN-гама позитивних CD8 Т клітин при стимулюванні використовуючи різні пептиди.

Приклад 1: Застосування BKG як ад'юванту для пухлинної вакцини.

В цих експериментальних прикладах описується визначення придатності BKG як ад'юванту для пухлинної вакцини. BKG, як згадується тут, експресує фаголізосомальний вислизуючий пептид з *Listeria monocytogenes* (Hly) і є додатково ureC дефіцитним. Такий модифікований BCG також згадується тут як rBCG: delta ureC: Hly.

В основному, пацієнти і тваринні моделі, відповідно, вакцинували за стандартним протоколом вакцинації, який також згадується як первинна вакцинація. Після цього, тваринам вводять пухлину. За таких умов, у тварин вакцинованих BKG/пухлина клітина не спостерігався ріст пухлини або вони можуть довше опиратись розвитку пухлини, ніж тварина, якій проводили пухлинну вакцинацію без BKG як ад'юванту. Пацієнти вакциновані BKG/пухлинна клітина можуть довше опиратись пухлині порівняно з пацієнтами, яким проводили пухлинну вакцинацію без BKG як ад'юванту. Якщо не вказано інше, використовували наступні матеріали і способи.

Клітини:

Використовували наступні лінії клітин: J558^{OVA} (J558-клітини, що експресують OVA і мають зв'язувати її з клітинною мембраною), J558^{SOVA} (J558-клітини, що експресують OVA і декретують її в оточуюче середовище) і EL-4^{OVA} (EL-4-клітини, що експресують OVA). Культури клітин спочатку витримували з G418 протягом 14 днів. Мусопlasma-тест був негативним. Після початку пасажування для збільшення кількості клітин, ці лінії клітин заморожували порціями 10×10^6 з ДМСО і зберігали в рідкому N₂ протягом, принаймні, 7 днів перед першим використанням в тварині.

Бактерія

Використовували бактерію мітили: BKG (rBCG delta ureC:Hly); надалі згадується як "BKG". BKG вирощували в 7H9 повному Середовищі і заморожували в 10 % гліцерин/PBS. Бактерію можна розморозити і заморозити один раз (але заморожувати тільки без розведення).

Для первинної вакцинації і наступних 2 ревакцинацій 19,3 мкл = 1×10^6 BKG вводили в мишу.

Одержання вакцини:

Заморожені клітини розморозували і двічі промивали стерильним DMEM середовищем. Після цього, клітини суспендували в стерильному DMEM і підраховували. Загальний об'єм ін'єктування складав 100 мкл (одержували згідно з Таблицею 1). Перед ін'єктуванням клітини опромінювали в стерильному шприці (150 Gy гама опроміненням). In vitro контролюх: 3 розморожених клітин перед опроміненням і після опромінення, відповідно, відбирали одну аліквоту клітин і вводили в культуру клітин. Ці контролю показують добре відновлення після розморозування (неопромінені клітини) і відсутність проліферації клітин протягом більше ніж 14 днів після опромінення.

Миші:

C57/B6 самиць 12 тижнів (доставляли у віці 6 тижнів і поміщали на 6 тижнів в лабораторію для тестування); вакцинували п.ш. 100 мкл; голка 25 G; у основи хвоста; через 7 днів відбирали 0,3 мл крові для імуномоніторингу (тетраметр для OVA) при загальній анестезії. Використовуваних мишей приймало відповідне керівництво.

Порядок BKG експ. #1:

день 0 первинна вакцинація (Початок)

7 днів 1^{ий} відбір крові

28 днів 1^а ревакцинація (1^{ий} Повтор)

35 днів 2^{ий} відбір крові

53 днів 2^а ревакцинація (2^{ий} Повтор)

60 днів 3^{ий} відбір крові

74 днів введення пухлини

Використовуваних мишей розділяли на 2 експериментальні і одну контрольну групи:

- група, що одержувала вакцину, плюс BKG (n = 9): підгрупи #1.1, #1.3 і #1.5 (дивіться таблицю 1)

- група, що одержувала вакцину, мінус BKG (n = 9): підгрупи #1.2, #1.4 і #1.6

5 • контрольна група (n = 2): підгрупа #1.7

Таблиця 1

Підгрупи і ін'єктовані вакцини

Експ. група	Клітини	BKG	DMEM [мкл]	BKG [n]	BKG [мкл]	Клітини [n]	Клітини [мкл]	n =
#1.1	J558 ^{mOVA}	+	-	1x10 ⁶	19,3	10x10 ⁶	80,7	3
#1.2	J558 ^{mOVA}	-	-	-	-	1x10 ⁶	100,0	3
#1.3	J558 ^{sOVA}	+	-	1x10 ⁶	19,3	1x10 ⁶	80,7	3
#1.4	J558 ^{sOVA}	-	-	-	-	1x10 ⁶	100	3
#1.5	EL-4 ^{OVA}	+	-	1x10 ⁶	19,3	1x10 ⁶	80,7	3
#1.6	EL-4 ^{OVA}	-	-	-	-	1x10 ⁶	100,0	3
#1.7	Конт.	-	100	-	-	-	-	2
								20

Тримання тварин:

32-умови, IVC-клітки, 2 клітки; періодичність заміни 3-4 дні.

10 FACS аналіз:

FACS проводили для визначення кількості SIINPEKEL-специфічних Т клітин в сліпому методі. Після сортування клітинні компоненти плазми заморожують і зберігають для наступного аналізу при -80 °C.

Паралельні In vitro-експерименти:

Культура клітин що генерує клітини для вакцинації і введення пухлини

Клітини in vitro-контролю, що використовуються без тваринних експериментів

Клітини культур клітин, що використовуються як контролю в FACS експериментах, що продукують тетраметри

Вектрологія

Вектор (SINвектор) позначали рекомбінант для IL-2, IFN γ і OVA. Цей вектор використовували для створення лінії клітин пухлини мишей, що відповідає LNCaP-IL-2-IFN γ клітинам.

Результати:

15 Перші результати імунологічного контролю зображені на Фіг. 1 вказують на те, що є тенденція до вищих кількостей Т-клітин здатних розпізнавати OVA-пептид в групі мишей, що мають BKG як ад'ювант, ніж в групі тварин, які не мали ад'ювант. Це підтверджує, що BKG є ад'ювантом для пухлинної вакцинації, яка підсилює імунологічну відповідь на вакцину.

Приклад 2: Оптимізація режиму обробки для пухлинної вакцинації використовуючи BKG

20 Далі приведений протокол оптимізації режиму введення терапевтичної концепції приведеної в прикладі 1 для того щоб спеціаліст в цій галузі оптимізував основний режим лікування описаний тут. Матеріали і способи приводяться у поєднанні з прикладом 1, вище, якщо не вказано інше.

Режим 1:

25 Використовуючи стабільно тричі-трансфіковану J558 (H2K^b) лінію клітин, що експресує IL-2, EFN γ і овалбумін, три різні дози цих клітин ін'єктували мишам (C57 BL/6 (H2K^b)), а саме: 5x10⁶-клітин, 10x10⁶-клітин і 15x10⁶-клітин. Для кожної дози, група мишей містила п'ять тварин і їх схема ін'єкцій була наступною: первинна імунізація з трьома повтореннями кожні 30 днів; де ін'єкції були з або без BKG (1x10⁶ CFU). Проводили імунологічні дослідження тварин в будь-якому випадку вони показували овалбумін-специфічну імунну відповідь і, зокрема, підвищення імунної відповіді опосередкованої BKG.

Режим 2

Цей дослід складається з ряду Попередніх експериментів ("Попередні експерименти 1-7") і чотирьох основних експериментів ("Експерименти 1-4").

35 Попередній експеримент 1: Встановлення дози пухлинної вакцини з і без BKG як ад'юванту.

Загалом 14 груп мишей кожна з яких включає п'ять мишей (C57 BL/6 (H2K^b)) імунізували пухлинною вакциною в дозах, що збільшуються, (кожна 2 з 14 груп одержувала ту ж саму дозу

пухлинної вакцини). Пухлинна вакцина включає опромінений овальбумін, що експресується алогенними J558 пухлинними клітинами (H2K^b), які ін'єктували п.ш.. BKG в дозі 1×10^6 CFU ін'єктували разом з пухлинними клітинами семи групам. Через один тиждень, також як і 5, 9 і 13 тижнів, відбирали 0,5 мл крові у кожної тварин і визначали овальбумін-специфічну імунну реакцію за допомогою ELISA, мічення внутрішньоклітинного цитокіну або мічення тетрамеру. Загалом використовували сім різних дозувань клітин пухлинної вакцини з або без BKG. Відповідними дозами є $0,1 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$, $5,0 \times 10^6$, $10,0 \times 10^6$, $50,0 \times 10^6$, 100×10^6 , де у відповідних клінічних дослідженнях на людині використовують дозування з переважним інтервалом від 10×10^6 до 300×10^6 клітин. Миші з 2 контрольних груп не одержували пухлинну вакцину. Одна контрольна група одержувала ін'єкцію BKG.

Попередній експеримент 2: Встановлення дози в тесті з B16_{OVA} меланомою)

В цьому дослідженні, чотири групи мишей (C57 BL/6(H2K^b)) одержували дози досліджуваної пухлини (B16_{OVA} меланома п.ш.). Ріст пухлини контролювали до об'єму пухлини більше 2 см. Після досягнення цього об'єму пухлини, мишей умертвляли, відбирали кров і тканину пухлини і зберігали для in vitro аналізу. Якщо ріст пухлини не відбувався, мишей умертвляли через 12 тижнів. Знову, кожну групу містила п'ять мишей, і використовували чотири різні дозування клітин тестованої пухлини, а саме: $1,0 \times 10^6$ клітин, $5,0 \times 10^6$, $10,0 \times 10^6$ і $50,0 \times 10^6$ клітин.

Попередній експеримент 3: Визначення дози ад'юванту

Виходячи з дози визначеної в Попередньому експерименті 1, дозу BKG змінювали, де доза ад'юванту змінювали з коефіцієнтом 10, 100 і 1000 і 0,1, 0,01 і 0,001 порівняно з дозою, яка використовується в Попередньому експерименті 1. Через один тиждень, також як і 5, 9 і 13 тижнів, відбирали 0,5 мл крові у кожної тварин і визначали овальбумін-специфічну імунну реакцію за допомогою ELISA, мічення внутрішньоклітинного цитокіну або мічення тетрамеру.

Попередній експеримент 4: Дослідження шляху введення

Дозу клітин пухлинної вакцини, що визначали в Попередньому експерименті 1 і дозу BKG, що визначали в Попередньому експерименті 3, змінювали в залежності від шляху введення. Шляхами введення були внутрішньовенний, внутрішньошкірний, внутрішньоочеревенний і іпсилатеральний п.ш.. Для кожного шляху введення доза BKG є або однократною, 0,1 кратною або 0,01 кратною дози, як визначено в Попередньому експерименті 3. Способи введення досліджені тут є подібними до потенційно клінічно використовуваних стосовно людей і відрізняються відносно частини імунної системи, яка першою контактує з ад'ювантом. Через один тиждень, також як і 5, 9 і 13 тижнів, відбирали 0,5 мл крові у кожної тварин і визначали овальбумін-специфічну імунну реакцію за допомогою ELISA, мічення внутрішньоклітинного цитокіну або мічення тетрамеру.

Попередній експеримент 5: Дослідження схеми імунізації

Використовуючи дозування клітин пухлинної вакцини як визначено в Попередньому експерименті 1 і дози BKG визначені в Попередньому експерименті 3 досліджували наступні схеми імунізації:

1. Схема імунізації 1: одичне спільне ін'єктування пухлинної вакцини і ад'ювантів (контрольні групи)

2. Схема імунізації 2: ця схема відповідає профілактичній імунізації деяких захворювань подібних кіру, де має місце потрібна основна імунізація і повторна імунізація, де основну імунізацію проводять на початку, два тижні і чотири тижні і повторну імунізацію проводять через ще шість тижнів.

3. Схема імунізації 3: цій схемі відповідає схема, яка є оберненою до первинної терапевтичної вакцинації, що проводиться разом з постійним введенням вакцин з певним інтервалом вакцинацій. Більш специфічно, можуть бути описані три наступні підсхеми.

Схема імунізації 3a: вакцинація кожні 3 тижні (завершальний відбір крові і евтаназія через 12 тижнів);

Схема імунізації 3b: вакцинація кожні 6 тижнів (завершальний відбір крові і евтаназія через 25 тижнів);

Схема імунізації 3c: вакцинація кожні 12 тижнів (завершальний відбір крові і евтаназія через 43 тижні).

Всі три схеми імунізації повторювали, де доза ад'юванту BKG є або дозою визначеною в Попередньому експерименті 3, або її 10-кратною або 0,1-кратною дозою.

Попередній експеримент 6: Визначення дози пухлинної вакцини (TRAMP) з і без BKG

Загалом 12 груп TRAMP мишей (Jackson Laboratory Lines Nos. 003135) вакцинували 0,1-кратною, 1-кратною і 10-кратною дозою клітин пухлинної вакцини TRAMP-C1 визначеної в літературі (5×10^6 клітин). Клітини пухлинної вакцини використовували або без будь-якого генетичного модифікування (wtTRAMP), або як IL-2/TFNґама трансфіковані клітини. Мишей

імунізували п.ш. використовуючи 5×10^5 , 5×10^6 і 5×10^7 TRAMP клітини. Шість груп одержували 1×10^6 CFU BKG як активний ад'ювант разом з клітинами пухлинами. Через один тиждень після імунізації і потім через кожні шість тижнів відбирали 0,5 мл крові і визначали TRAMP-C1-специфічну імунну реакцію за допомогою ELISA, мічення внутрішньоклітинного цитокіну або мічення тетрамеру. Кожні дванадцять тижнів проводили СТ (комп'ютерна томографія) для контролювання розвитку захворювання. TRAMP мишей, які мали справжній рак простати умиряли у віці 32-35 тижнів для того щоб уникнути зайвих страждань звірів. Для того щоб визначити завдяки якій з вакцин спостерігаються зміни у розвитку захворювання, мишей слід спостерігати до 40-ого тижня.

Попередній експеримент 7: Дослідження дози ад'юванту

Дозу клітин пухлинної вакцини визначено в Попередньому експерименті 6 змінювали відносно дози BKG (0,1-кратна, 1-кратна і 10-кратна доза BKG визначена в Попередньому експерименті 6). Аналогічно до Попереднього експерименту 6 досліджували wtTRAMP-C1 також як і генетично модифіковані IL-2/IFN γ -TRAMP-C1 клітини. Через один тиждень після імунізації і потім кожні шість тижнів, у тварин відбирали 0,5 мл крові і визначали TRAMP-C1-специфічну імунну реакцію за допомогою ELISA, мічення внутрішньоклітинного цитокіну або мічення тетрамеру. Кожні дванадцять тижнів проводили СТ для контролювання розвитку захворювання. Завершальний відбір крові і евтаназію проводили на 40 тижні.

Експеримент 1: Профілактична вакцинація пухлини використовуючи систему овалбуміну

C57BL/6 мишей (H2K^b) імунізували використовуючи вакцину клітин пухлини, тобто опромінені алогенні J558 клітини пухлини (H2K^b), що експресують овалбумін, з дозою як визначено в Попередньому експерименті 1. Деякі тварини одержували активний ад'ювант BKG (доза визначена в Попередньому експерименті 3) разом з вакциною пухлини. Через один тиждень у тварин відбирали 0,5 мл крові і визначали овалбумінспецифічну імунну відповідь за допомогою ELISA, мічення внутрішньоклітинного цитокіну або мічення тетрамеру. Через ще чотири тижні визначали реактивність імунної системи проти живих клітин пухлини за допомогою п.ш. ін'єкції овалбуміну, що експресується B16 клітинами пухлини і регулярного контролювання росту пухлини використовуючи дозу клітин пухлини, що відповідає одній з визначених в Попередньому експерименті 2.

Крім того, дію BKG на підсилення пухлино-специфічної імунної реакції порівнюють з диким типом BCG бактерії. Як спосіб введення використовують найкращий спосіб як визначено в Попередньому експерименті 4 в комбінації з двома оптимальними схемами імунізації визначеними в Попередньому експерименті 5, що включають найкращу схему первинної повторної імунізації і найкращу схему постійного введення.

Експеримент 2: Терапевтична пухлинна вакцинація використовуючи систему овалбуміну

На відміну від профілактичної пухлинної імунізації як описано в експерименті 1, ріст пухлини ініційований в C57BL/6 мишах (H2K^b) за допомогою п.ш. ін'єкції неопромінених клітин пухлини, що тестуються, використовуючи дозу як визначено в Попередньому експерименті 2. Тестували пухлину, що має діаметр 0,5 см використовуючи схеми вакцинації описані в Експерименті 1. Тести зупиняли коли розмір пухлини досягав діаметру 2 см. Однак, тварин контролювали максимум один рік. Для того щоб відобразити наявні імунологічні процеси, у мишей кожні чотири тижні відбирали зразки крові по 0,5 мл для того щоб визначити імунну відповідь як визначено в експерименті 1.

Експеримент 3: Профілактична пухлинна вакцинація (TRAMP)

TRAMP мишей проявляють першу внутрішньоепітеліальною неоплазією на шостому - сьомому тижні і виражену клінічну картину карциномою простати, що починається на 15-ому тижні. Така карцинома простати локально обмежується на початку, але починаючи з 24 тижня у приблизно 10 % тварин розвиваються метастази і складне захворювання можна очікувати починаючи з 32-35 тижня. Профілактичну пухлинну вакцинацію починають з 5-ого тижня. Використовують одиничну ін'єкцію вакцини клітин пухлини без ад'юванту і з ад'ювантами. Як вакцину клітин пухлини використовують летально опромінені TRAMP-C1 клітини, які є лінією клітин карциноми простати, що є похідною від TRAMP мишей. Використовуваними клітинами пухлини вакцини є або генетично модифіковані (wtTRAMP) або IL-2/IFN γ -трансфіковані клітини. Додатково тестували дві найкращі схеми імунізації (схема первинної імунізації і довготривала схема) як визначено в Попередніх експериментах. Як контроль розвитку PC, тварин слід піддавати СТ кожні дванадцять тижнів. Можна вирізнити наступні групи:

- HV3.1 без вакцинації (контрольна група)
- HV3.2 тільки пухлинна вакцина (wtTRAMP-C1 клітини) п. ш.
- HV3.3 BKG вакцина (wtTRAMP-C1 клітини + BKG) п. ш.
- HV3.4 BCG вакцина (wtTRAMP-C1 клітини + BCG) п. ш.

- HV3.5 тільки пухлинна вакцина (wtTRAMP) як первинна імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5
- HV3.6 BKG вакцина (wtTRAMP) як первинна імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5
- HV3.7 BCG вакцина (wtTRAMP) як первинна імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5
- HV3.8 тільки пухлинна вакцина (wtTRAMP) як довготривала імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5
- HV3.9 BKG вакцина (wtTRAMP) як довготривала імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5
- HV3.10 BCG вакцина (wtTRAMP) як довготривала імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5
- HV3.11 тільки пухлинна вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP-C1 клітини) п. ш.
- HV3.12 BKG вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP-C1 клітини + BKG) п. ш.
- HV3.13 BCG вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP-C1 клітини + BCG) п. ш.
- HV3.14 тільки пухлинна вакцина (TL2/IFN γ ама-TRAMP) як первинна імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5
- HV3.15 BKG вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP) як первинна імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5
- HV3.16 BCG вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP) як первинна імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5
- HV3.17 тільки пухлинна вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP) як довготривала імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5
- HV3.18 BKG вакцина (BL2/IFN γ ама-TRAMP) як довготривала імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5
- HV3.19 BCG вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP) як довготривала імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

Схема імунізації груп HV3.2 - HV3.4 і HV3.11 - HV3.13 зображена на Фіг. 2 з чисельними позначеннями

- 1: народження мишей; тижнів - 5
- 2: вакцинація; час 0 (миші у віці 5 тижнів)
- 5 3: відбір зразка крові через один тиждень
- 4: відбір зразка крові через сім тижнів
- 5: відбір зразка крові і СТ через 13 тижнів
- 6: відбір зразка крові через 19 тижнів
- 7: відбір зразка крові і СТ через 25 тижнів
- 10 8: відбір зразка крові через 31 тиждень
- 9: відбір зразка крові і СТ через 37 тижнів
- 10: відбір зразка крові через 40 тижнів і евтаназія мишей

Схема імунізації груп HV3.5 - HV3.7 і HV3.14 - HV3.16 зображена на Фіг. 3 з чисельними позначеннями

- 15 1: народження мишей; тижнів - 2
- 2: вакцинація; час 0 (первинна I)
- 3: відбір зразка крові через один тиждень
- 4: вакцинація через два тижні (первинна II)
- 5: вакцинація через чотири тижні (первинна III) (у віці 6 тижнів) 6: відбір зразка крові через
- 20 п'ять тижнів
- 7: вакцинація через десять тижнів (ревакцинація) (у віці 12 тижнів)
- 8: відбір зразка крові і СТ через один тиждень після ревакцинації
- 9: відбір зразка крові через сім тижнів після ревакцинації
- 10: відбір зразка крові і СТ через 13 тижнів після ревакцинації
- 25 11: відбір зразка крові 19 через тижнів після ревакцинації
- 12: відбір зразка крові і СТ через 25 тижнів після ревакцинації
- 13: відбір зразка крові через 28 тижнів після ревакцинації (у віці 40 тижнів) і евтаназія мишей

Схема імунізації груп HV3.8 - HV3.10 і HV3.17 - HV3.19 зображена на Фіг. 4 з чисельними позначеннями

- 30 1: народження мишей; тижнів -2
- 2: перша вакцинація; час 0
- 3: відбір зразка крові через один тиждень

4: друга вакцинація через шість тижнів (інтервал вакцинацій як визначено в Попередньому експерименті 5)

5: відбір зразка крові через один тиждень

6: третя вакцинація через дванадцять* тижнів

5 7: відбір зразка крові і СТ через один тиждень

8: четверта вакцинація через 18* тижнів

9: відбір зразка крові через один тиждень

10: п'ята вакцинація через 24* тижнів

11: відбір зразка крові і СТ через один тиждень

10 12: шоста вакцинація через 30* тижнів

13: відбір зразка крові через один тиждень

14: відбір зразка крові через шість тижнів

15: відбір зразка крові через 40 тижнів і евтаназія мишей

* інтервал вакцинацій залежить від результатів Попереднього експерименту 5

15 Експеримент 4: Терапевтична пухлинна вакцинація (TRAMP)

У всіх TRAMP мишей починає рости пухлина простати з 15 тижнів, яка повністю розвивається до 32 тижня і викликає клінічні проблеми у тварин. Тому, тварин імунізують на 24 тижні. Експеримент зупиняють коли реалізується один із стоп-критеріїв. Максимум, тварин досліджують протягом 40 тижнів. Для того щоб контролювати імунологічні процеси у мишей кожні шість тижнів відбирають 0,5 мл крові і досліджують імунну відповідь як описано у зв'язку з експериментом 1 і використовують таку методику візуалізації як СТ, кожні дванадцять тижнів. Використовують ті ж самі клітини пухлин як описано у зв'язку з експериментом 3.

Тестували наступні групи.

HV4.1 без вакцинації (контрольна група)

HV4.2 тільки пухлинна вакцина (wtTRAMP-C1 клітини) п. ш.

HV4.3 BKG вакцина (wtTRAMP-C1 клітини + BKG) п. ш.

HV4.4 BCG вакцина (wtTRAMP-C1 клітини + BCG) п. ш.

HV4.5 тільки пухлинна вакцина (wtTRAMP) як первинна імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

HV4.6 BKG вакцина (wtTRAMP) як первинна імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

HV4.7 BCG вакцина (wtTRAMP) як первинна імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

HV4.8 тільки пухлинна вакцина (wtTRAMP) як довготривала імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

HV4.9 BKG вакцина (wtTRAMP) як довготривала імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

HV4.10 BCG вакцина (wtTRAMP) як довготривала імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

HV4.11 тільки пухлинна вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP-C1 клітини) п. ш.

HV4.12 BKG вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP-C1 клітини + BKG) п. ш.

HV4.13 BCG вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP-C1 клітини + BCG) п. ш.

HV4.14 тільки пухлинна вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP) як первинна імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

HV4.15 BKG вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP) як первинна імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

HV4.16 BCG вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP) як первинна імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

HV4.17 тільки пухлинна вакцина (EL2/IFN γ ама-TRAMP) як довготривала імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

HV4.18 BKG вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP) як довготривала імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

HV4.19 BCG вакцина (IL2/IFN γ ама-TRAMP) як довготривала імунізація як визначено в Попередньому експерименті 5

25 На Фіг. 5 показана схема імунізації 1 для груп HV4.2 - HV4.4 і HV4.11 - HV4.13 з чисельними позначеннями.

1: народження мишей

2: відбір зразка крові через шість тижнів

3: відбір зразка крові і СТ через дванадцять тижнів

4: відбір зразка крові через 18 тижнів

- 5: вакцинація через 24 тижнів
 - 6: відбір зразка крові і СТ через 25 тижнів
 - 7: відбір зразка крові через 30 тижнів
 - 8: відбір зразка крові і СТ через 36 тижнів
 - 5 9: відбір зразка крові через 40 тижнів і евтаназія мишей
- На Фіг. 6 показана схема імунізації 2 для груп HV4.5 - HV4.7 і HV4.14 - HV4.16 з чисельними позначеннями.
- 1: народження мишей
 - 2: відбір зразка крові через шість тижнів
 - 10 3: відбір зразка крові і СТ через дванадцять тижнів
 - 4: відбір зразка крові через 18 тижнів
 - 5: вакцинація через 24 тижнів (первинна I)
 - 6: відбір зразка крові і СТ через 25 тижнів
 - 7: вакцинація через 26 тижнів (первинна II)
 - 15 8: вакцинація через 28 тижнів (первинна III)
 - 9: відбір зразка крові через 30 тижнів
 - 10: вакцинація (ревакцинація) через 34 тижні
 - 11: відбір зразка крові і СТ через 36 тижнів
 - 12: відбір зразка крові через 40 тижнів і евтаназія мишей
 - 20 На Фіг. 7 показана схема імунізації 3 для груп HV4.8 - HV4.10 і HV4.17 - HV4.19 з чисельними позначеннями.
 - 2: відбір зразка крові через шість тижнів
 - 3: відбір зразка крові і СТ через дванадцять тижнів
 - 4: відбір зразка крові через 18 тижнів
 - 25 5: вакцинація через 24 тижнів (первинна I)
 - 6: відбір зразка крові і СТ через 25 тижнів
 - 7: вакцинація через 30 тижнів (первинна II)
 - 8: відбір зразка крові через 31 тиждень
 - 9: вакцинація через 36 тижнів (первинна III)
 - 30 10: відбір зразка крові і СТ через 37 тижнів
 - 11: вакцинація через 42 тижні (первинна IV)
 - 12: відбір зразка крові через 43 тижнів і евтаназія мишей
- Інтервали вакцинації переважно залежать від результатів Попереднього експерименту 5.
- Приклад 3: Композиція для лікування рака простати
- 35 Композиція яка придатна для лікування рака простати містить як першу складову BCG, яка експресує фаголізосомальний вислизаючий пептид з *Listeria monocytogenes* (Hly) і є додатково ureC-дефіцитною. Така модифікована BCG також згадується тут як rBCG: delta ureC: Hly. Композиції містять як другу складову генетично модифіковані LNCaP клітини. Ці клітини є клітинами карциноми простати, що експресують рекомбінантний інтерлейкін-2 (IL2) і
- 40 інтерферон-гама (IFN гама). Переважно, такі LNCaP клітини експресують обидва цитокіни в приблизно еквімолярних кількостях. Цей вид LNCaP клітин, наприклад, описується в міжнародній заявці WO 94/18995. Такі рекомбінантні клітини рака простати опромінювали перед використанням гама-променями для того щоб зруйнувати їх здатність до реплікації.
- Обидві складові суспендували розчині саліну забуференому фосфатом і зберігали для введення пацієнтові. Композиція містить 1×10^6 BCG клітин і 1×10^6 LNCaP клітин в об'ємі 50 мкл. Композицію ін'єктують в.в. Для того щоб дослідити ефективність проводять ELISPOT аналіз. Такий ELISPOT аналіз, наприклад, описується Mollenkopf H.J., Dietrich G., Fensterle J., Grade L, Diehl K.D., Knapp B., Singh M., O'Hagan D. T., Ulmer J.B., and Kaufmann S. H. Enhanced protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine by adsorption onto cationic PLG microparticles. Vaccine. 2004
- 50 Jul 29;22(21-22):2690-5.
- В альтернативному режимі лікування, згадана вище композиція вводиться один раз, після чого вводяться тільки LNCaP клітини. Також, загальний принцип представленого винаходу полягає у тому що перша і друга складові можуть вводиться з різною частотою і при цьому через різний час.
- 55 Проводили клінічне дослідження гістології і визначали клінічну стадію пухлини, також як і стан пацієнтів, що лікуються. Сурогатний параметр був курсом PSA (простат-специфічний антиген) рівня і ряд пацієнтів мали прийнятний курс PSA рівня.

Завдяки особливій комбінації, що вводиться пацієнтові, буде спостерігатись прийнятний курс PSA рівня також як і покращення коефіцієнту виживання, який є вищим порівняно з показником, що спостерігається без ад'юванту, тобто при введенні тільки LNCaP клітин.

- 60

Приклад 4: Застосування BKG як ад'юванту для HCMV вакцини Цей приклад описує успішну комбінацію BKG як ад'юванту і щільних тіл HCMV, як тут описано, для того щоб викликати клітинний імунітет проти інфекції - цитомегаловірусу людини. Більш особливо, описується, що клітинний імунітет може бути викликаний в межах короткого проміжку часу. Таке швидке індукування HCMV імунітету є особливо важливим у пацієнтів, що зазнають трансплантації кісткового мозку, яка має місце дійсно часто разом з загрозою життю з боку HCMV інфекції. Для пацієнтів, що зазнають трансплантації, необхідним є швидке генерування клітинного імунітету при відсутності часу для вакцинації протягом тривалого часу у відповідності із стандартною практикою.

Використовували наступну схему вакцинації:

Антиген: щільні тіла
доза: 20 мкг/тварину
схема імунізації: D: день 0/7/21
C: день 0/7
B: день 0

Ад'ювант:
доза: 1×10^6 /тварину
схема імунізації: день 0
Структура груп:

Група	Кількість тварин	Вакцини (на тварину) день 0	Вакцини (на тварину) день 7	Вакцини (на тварину) день 21
A	4			
B1	6	20 мкг щільних тіл		
B2	6	20 мкг щільних тіл + 1×10^6 BKG		
C1	6	20 мкг щільних тіл	20 мкг щільних тіл	
C2	6	20 мкг щільних тіл + 1×10^6 BKG	20 мкг щільних тіл	
D1	6	20 мкг щільних тіл	20 мкг щільних тіл	20 мкг щільних тіл
D2	6	20 мкг щільних тіл + 1×10^6 BKG	20 мкг щільних тіл	20 мкг щільних тіл

Рецептуру готували кожні 8 і 9 днів, відповідно, після останньої імунізації.

Результати показані на Фіг. 8 і 9, де Фіг. 9 є діаграмою, що зображає кількість IFN-гама-позитивних клітин на 10^5 CD8+ Т клітин при стимулюванні HCMV-специфічною сумішшю пептидів (від JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany). Послідовності брали з pp65 протеїну HCMV. Це є сумішшю (Permix) 138 пептидів (15 амінокислот, кожний), що має перекривання послідовності 11 амінокислот). Фіг. 8 є діаграмою подібною до діаграми Фіг. 9, де відповідну кількість CD8+ Т клітин визначали при стимулюванні неспецифічним контрольним пептидом. Як можна бачити із згаданих діаграм, у випадку використання BKG як ад'юванту при початку вакцинації, в кожному випадку, кількість IFN-гама-позитивних CD8 клітин становить 10^5 CD8. Кількість Т-клітин значно збільшується. Найбільш явне збільшення можна спостерігати у групах B2 і C2. Це означає, що основна вакцинація BKG в комбінації із щільними тілами, де щільні тіла вводяться в 0 день і через 7 днів, вже значно збільшує кількість IFN-гама-позитивних клітин. Це підтверджує неочікуване відкриття, що лежить в основі представленого винаходу, що можна викликати клітинний імунітет проти HCMV, коли об'єднати щільні тіла і BKG.

Приклад 5: Композиція для лікування і профілактики малярії

Композиція для лікування і профілактики малярії включає як першу складову rBCG: delta ureC: Hly і як другу складову антиген малярії gp190/MSP1. Повинно бути зрозуміло, що антиген може бути присутній як пептид або частина великого пептиду, поліпептиду або навіть протеїну.

Композиція містить 50 мкг MSP1 протеїну і приблизно 1×10^6 rBCG: delta ureC: Hly в 50 мкл PBS буферу. Композиція вводиться п. ш. мишам. Після імунізаційного подразнення і у імунізованих мишей відбирають кров і використовують її в аналітичних методах.

Розвиток процесу вакцинації знову контролювали використовуючи технологію ELISPOT (Mollenkopf H. J., supra) і дослід інгібування інвазії Мерозоїте (Blackman et al. 1990 J.Ecsp. Med. Volume 172 P: 379-382). Ми очікуємо покращення імунного стимулювання і декретування IFN-гама через стимулювання використовуючи MSP-1 специфічні пептиди. Ми також очікуємо індукування інгібування інвазії шляхом відбору сироватки у імунізованих мишей. Результати IFN-гама ELISPOT і інгібування Мерозоїте корелюються із захистом.

Деталі представленого винаходу описуються в описі, пунктах формули винаходу, переліку послідовностей і/або малюнках можуть або окремо, або в будь-якій комбінації бути матеріалом для реалізації винаходу в різних цього формах.

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Комбінація для застосування у способі викликання ТН1 імунної відповіді, де комбінація містить першу складову і окрему другу складову, де першою складовою є бактеріальна клітина, яка включає принаймні одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує фаголізосомальний вислизаючий пептид або поліпептид, де бактеріальною клітиною є уреазо-дефіцитна клітина *Mycobacterium*; і де другою складовою є біологічно активний агент, що викликає імунну відповідь.
2. Комбінація згідно з пунктом 1, де клітиною є клітина *Mycobacterium bovis*.
3. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 1, 2, де принаймні одна клітинна субодинаця уреазу, що кодується нуклеїновою кислотою бактеріальної клітини, є інактивованою.
4. Комбінація згідно з пунктом 3, де принаймні кодувальна послідовність С субодинаці бактеріальної уреазу є інактивованою.
5. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 1-4, де фаголізосомальним вислизаючим доменом є фаголізосомальний вислизаючий домен *Listeria*.
6. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 1-5, де фаголізосомальний домен кодується молекулою нуклеїнової кислоти, що вибирають з групи, яка містить
 - а) нуклеотидну послідовність, що включає нуклеотид 211-1722, як показано в SEQ ID NO: 1;
 - б) нуклеотидну послідовність, яка кодує ту ж саму амінокислотну послідовність як і послідовність з а), і
 - в) нуклеотидну послідовність, що гібридизує за жорстких умов з послідовністю з а) або б).
7. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 1-6, де бактеріальна клітина включає принаймні одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує пептид або поліпептид, здатний викликати імунну відповідь у ссавця.
8. Комбінація згідно з пунктом 7, де пептид або поліпептид вибирають з аутоантигенів, пухлинних антигенів, вірусних антигенів, паразитних антигенів, бактеріальних антигенів і їх імуногенних фрагментів.
9. Комбінація згідно з пунктом 7 або 8, де пептид або поліпептид є частиною злитого поліпептиду.
10. Комбінація згідно з пунктом 9, де злитий поліпептид включає
 - а) принаймні один домен з поліпептиду, де домен поліпептиду здатний викликати імунну відповідь у ссавця, і
 - б) фаголізосомальний вислизаючий домен.
11. Комбінація згідно з пунктом 10, де поліпептидом є поліпептид, як визначено в пункті 9, або його частина.
12. Комбінація згідно з пунктом 10 або 11, де фаголізосомальним вислизаючим доменом є домен фаголізосомального вислизаючого домену, як визначено в будь-якому з пунктів 1-9.
13. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 1-12, де бактеріальною клітиною є rBCGDureC:Hly.
14. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 1-13, де біологічно активним агентом є еукаріотична клітина і, більш переважно, генетично модифікована еукаріотична клітина, яка експресує цитокін.
15. Комбінація згідно з пунктом 14, де цитокін вибирають з групи, що включає інтерлейкін-2, інтерлейкін-4, інтерлейкін-12 і інтерферон-гамма.
16. Комбінація згідно з пунктом 15, де клітина співекспресує два або більше цитокінів.
17. Комбінація згідно з пунктом 16, де клітина співекспресує IL-2 і інтерферон-гамма.
18. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 14-17, де клітина є аутологічною відносно суб'єкта, якому клітина і/або композиція вводиться або повинна бути введена.
19. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 14-18, де клітина є алогенною відносно суб'єкта, якому клітина і/або композиція вводиться або повинна бути введена.
20. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 14-19, де клітину вибирають з групи, що включає непрофесійні клітини, що представляють антиген, професійні клітини, що представляють антиген, пухлинні клітини і дендровидні клітини.
21. Комбінація згідно з пунктом 20, де клітиною пухлини є імуногенна клітина і де клітину пухлини, переважно, вибирають з групи, що містить клітини меланоми, клітини раку нирки, клітини пухлини молочної залози, клітини пухлини мозку, клітини пухлини простати, клітини

немілкоклітинного раку легені, клітини раку товстої кишки і клітини пухлини сквамозних клітин голови і шиї.

22. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 14-21, де клітиною є алогенна клітина і є підібраним HLA класом I.

5 23. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 14-22, де клітина експресує іншу імуномолекулу, що вибирають з групи, яка включає цитокін, молекулу прилипання, співстимуляторний фактор, пухлино-зв'язаний антиген, пухлино-специфічний антиген і паразитний антиген.

24. Комбінація згідно з пунктом 23, де паразитним антигеном є gp190/MSP1 протеїн Plasmodium, переважно, Plasmodium falciparum, або його фрагмент, здатний викликати імунну відповідь у ссавця.

10 25. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 1-13, де біологічно активним агентом є gp190/MSP1 протеїн Plasmodium, переважно, Plasmodium falciparum, або його фрагмент здатний викликати імунну відповідь у ссавця.

15 26. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 1-13, де біологічно активним агентом є цитомегаловірус людини.

27. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 1-13, де біологічно активним агентом є вірусна часточка або її сукупність, переважно, що вивільнюється після інфікування клітин ссавця цитомегаловірусом людини, де часточки (а) є оточеними ліпідною мембраною, в яку вбудовані вірусні глікопротеїни, і (б) не містить ні вірусної ДНК, ні капсид.

20 28. Комбінація згідно з пунктом 27, де часточки містять злитий протеїн, що включає одну або більше частин Т-клітинного антигену pp65 (UL83) і одну або більше частин одного або більше протеїнів, які не є pp65.

25 29. Комбінація згідно з пунктом 28, де Т-клітинний антиген pp65 злитий з однією або більшою кількістю частин глікопротеїну цитомегаловірусу людини, де глікопротеїн вибирають з групи, що включає HCMV глікопротеїн gH, HCMV протеїн IE₁ (ppUL123) і HCMV глікопротеїн gB.

30. Комбінація згідно з пунктом 28, де Т-клітинний антиген злитий з однією або більшою кількістю частин протеїну, який є частиною патогену людини іншого, ніж HCMV.

31. Комбінація згідно з пунктом 30, де патоген вибирають з групи, що включає HIV-1, HBV, HCV і грип.

30 32. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 27-31, де часточка(и) містить(ять) частини принаймні двох глікопротеїнів, які є варіантами окремого глікопротеїну з різних штамів HCMV.

33. Комбінація згідно з пунктом 32, одним або двома варіантами окремого HCMV глікопротеїну є варіант штаму Тоуна HCMV і іншим є варіант штаму Ad169 HCMV.

35 34. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 27-33, де клітинами ссавця є фібробласти, переважно, фібробласти крайньої плоти.

35. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 27-34, де часточка є щільним тілом.

36. Комбінація згідно з будь-яким з пунктів 1-13, де біологічно активним агентом є щільне тіло, переважно, щільне тіло HCMV або щільне тіло згідно з пунктом 35.

40 37. Бактеріальна клітина, яка містить щонайменше одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує фаголізосомальний вислизаючий пептид або поліпептид, де бактеріальною клітиною є уреазо-дефіцитна клітина Mycobacterium, для застосування у способі викликання TN1 імунної відповіді.

38. Бактеріальна клітина згідно з пунктом 37, де клітиною є клітина Mycobacterium bovis.

45 39. Бактеріальна клітина згідно з будь-яким з пунктів 37-38, де принаймні одна клітинна субодинаця уреазу, що кодується нуклеїновою кислотою бактеріальної клітини, є інактивованою.

40. Бактеріальна клітина згідно з пунктом 39, де, принаймні, кодувальна послідовність С субодинаці бактеріальної уреазу є інактивованою.

50 41. Бактеріальна клітина згідно з будь-яким з пунктів 37-40, де фаголізосомальним вислизаючим доменом є фаголізосомальний вислизаючий домен Listeria.

42. Бактеріальна клітина згідно з будь-яким з пунктів 37-41, де фаголізосомальний домен кодується молекулою нуклеїнової кислоти, що вибирають з групи, яка містить

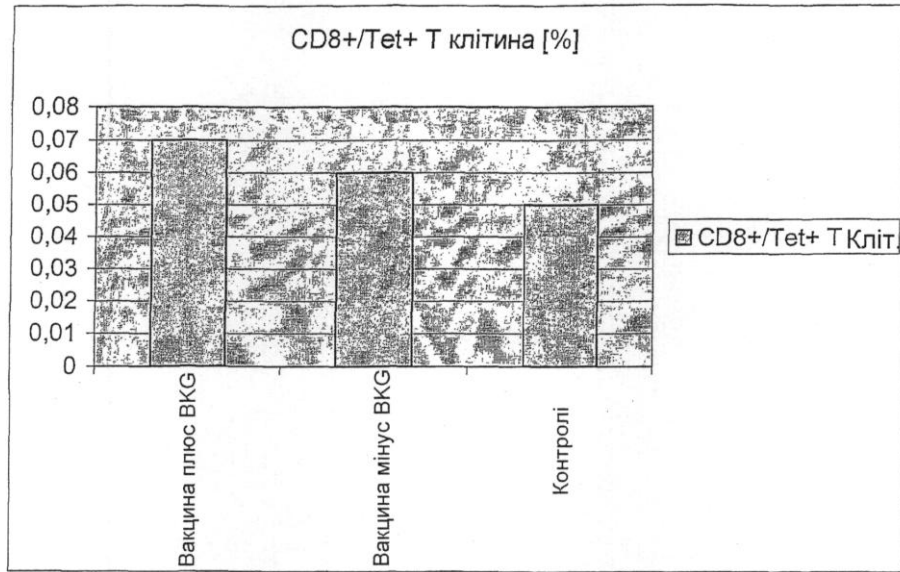
а) нуклеотидну послідовність, що включає нуклеотид 211-1722, як показано в SEQ ID NO: 1,

55 б) нуклеотидну послідовність, яка кодує ту ж саму амінокислотну послідовність як і послідовність з а), і

в) нуклеотидну послідовність, що гібридизує за жорстких умов з послідовністю з а) або б).

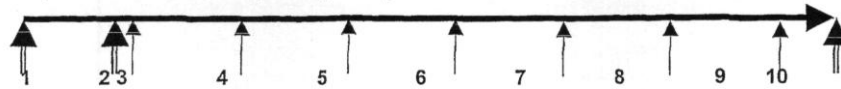
43. Бактеріальна клітина згідно з будь-яким з пунктів 37-42, де бактеріальна клітина включає принаймні одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує пептид або поліпептид, здатний викликати імунну відповідь у ссавця.

44. Бактеріальна клітина згідно з пунктом 43, де пептид або поліпептид вибирають з аутоантигенів, пухлинних антигенів, вірусних антигенів, паразитних антигенів, бактеріальних антигенів і їх імуногенних фрагментів.
- 5 45. Бактеріальна клітина згідно з пунктом 43 або 44, де пептид або поліпептид є частиною злитого поліпептиду.
46. Бактеріальна клітина згідно з пунктом 45, де злитий поліпептид включає
- а) принаймні один домен з поліпептиду, де домен поліпептиду здатний викликати імунну відповідь у ссавця, і
- б) фаголізосомальний вислизаючий домен.
- 10 47. Бактеріальна клітина згідно з пунктом 46, де поліпептидом є поліпептид, як визначено в пункті 44, або його частина.
48. Бактеріальна клітина згідно з пунктом 46 або 47, де фаголізосомальним вислизаючим доменом є домен фаголізосомального вислизаючого домену, як визначено в будь-якому з пунктів 37-45.
- 15 49. Бактеріальна клітина згідно з будь-яким з пунктів 37-47, де бактеріальною клітиною є rBCGΔureC:Hly.
50. Композиція, бажано фармацевтична композиція, що включає комбінацію згідно з будь-яким з пунктів 1-36 і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій, для застосування у способі викликання TH1 імунної відповіді.
- 20 51. Застосування комбінації згідно з будь-яким з пунктів 1-36 або бактеріальної клітини за будь-яким з пп. 37-48, або композиції згідно з пунктом 50, для виготовлення медикаменту, що викликає TH1 імунну відповідь.
52. Застосування згідно з пунктом 51, де медикамент призначений для лікування і/або профілактики захворювання, що вибирають з групи, яка містить рак і інфекційні захворювання.
- 25 53. Застосування згідно з пунктом 52, де раком є імуногенна пухлина і, більш переважно, вибирають з групи, що містить рак простати, меланому, рак нирки, пухлину молочної залози, пухлини мозку, немілкоклітинний рак легені, рак товстої кишки і сквамозну пухлину голови і шиї.
54. Застосування згідно з пунктом 52, де інфекційним захворюванням є малярія.
55. Застосування згідно з пунктом 54, де біологічно активним агентом є gp190/MSP1 протеїн Plasmodium або його фрагмент, здатний викликати імунну відповідь у ссавця.
- 30 56. Застосування згідно з пунктом 52, де інфекційним захворюванням є HCMV інфекція.
57. Застосування згідно з пунктом 56, де біологічно активним агентом є щільне тіло, як визначено в будь-якому з попередніх пунктів.
58. Застосування комбінації за будь-яким з пп. 1-36 або бактеріальної клітини за будь-яким з пп. 37-48 для виготовлення терапевтичної і/або профілактичної вакцини, що викликає TH1 імунну відповідь.
- 35 59. Комбінація за будь-яким з пп. 1-36 або бактеріальна клітина за будь-яким з пп. 37-48, або фармацевтична композиція згідно з пунктом 50, для викликання TH1 імунної відповіді у способі лікування пацієнта, що страждає на захворювання та потребує такого лікування, що включає введення комбінації за будь-яким з пп. 1-36, або бактеріальної клітини за будь-яким з пп. 37-48, або фармацевтичної композиції згідно з пунктом 50.
- 40 60. Комбінація, бактеріальна клітина та фармацевтична композиція за п. 59, де захворювання вибирають з групи, що включає рак та інфекційні захворювання.
61. Спосіб виготовлення фармацевтичної композиції, згідно з пунктом 50, що включає стадії
- 45 - одержання, як першої складової, бактеріальної клітини, яка включає принаймні одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує фаголізосомальний вислизаючий пептид або поліпептид, де клітина є уреазо-дефіцитною клітиною *Mycobacterium*;
- одержання, як другої складової, біологічно активного агента; і
- формулювання першої складової і другої складової у фармацевтичну композицію.
- 50 62. Спосіб виготовлення фармацевтичної композиції, згідно з пунктом 50, що включає стадії
- одержання, як першої складової, бактеріальної клітини, яка включає принаймні одну молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує фаголізосомальний вислизаючий пептид або поліпептид, де бактеріальна клітина є уреазо-дефіцитною і бактеріальною клітиною є клітина *Mycobacterium*,
- 55 - одержання, як другої складової, біологічно активного агента, що викликає імунну відповідь; і
- формулювання окремо першої складової і другої складової.



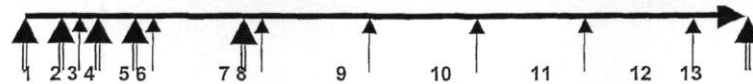
Фіг. 1

Екперимент 3: Схе́ма іму́нізації 1: Гр. HV3.2 - HV3.4 і HV3.11 - HV3.13



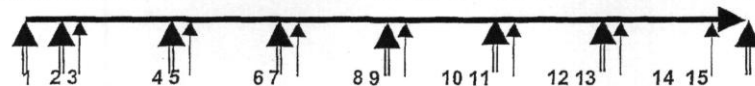
Фіг. 2

Екперимент 3: Схе́ма іму́нізації 2: Гр. HV3.5 - HV3.7 і HV3.14 - HV3.16



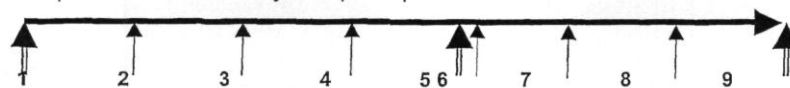
Фіг. 3

Екперимент 3: Схе́ма іму́нізації 3: Гр. HV3.8 - HV3.10 і HV3.17 - HV3.19



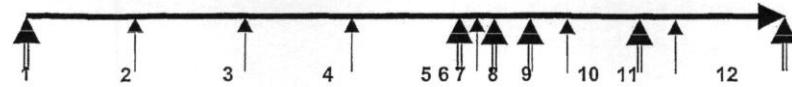
Фіг. 4

Екперимент 4: Схе́ма іму́нізації 1: Гр. HV4.2 - HV4.4 і HV4.11 - HV4.13



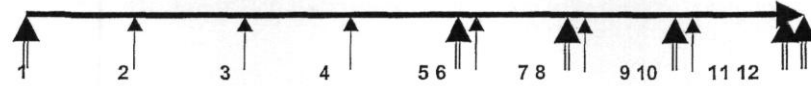
Фіг. 5

Екперимент 4: Схема імунізації 2: Гр. HV4.5 - HV4.7 і HV4.14 - HV4.16

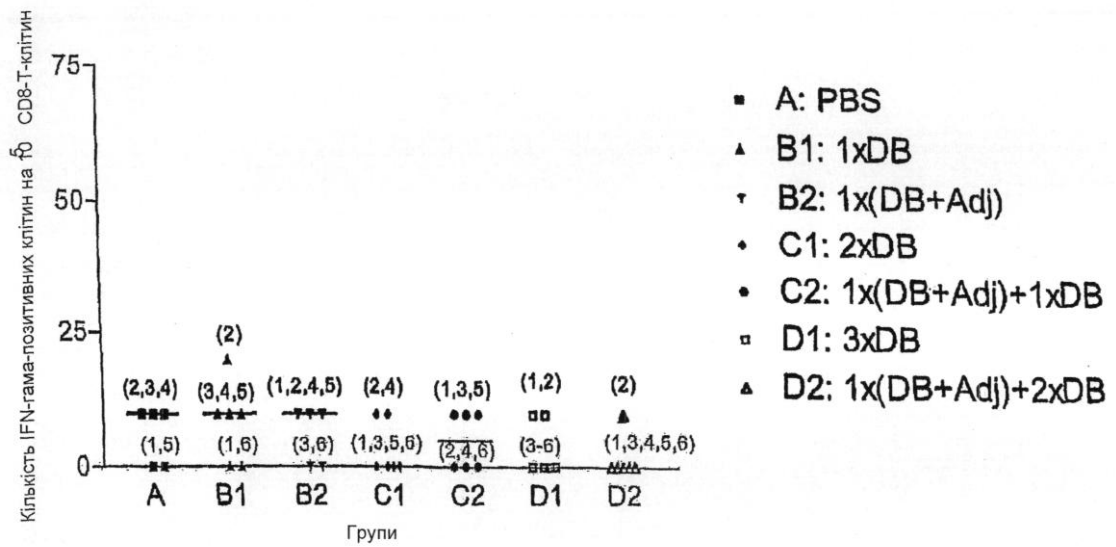


Фиг. 6

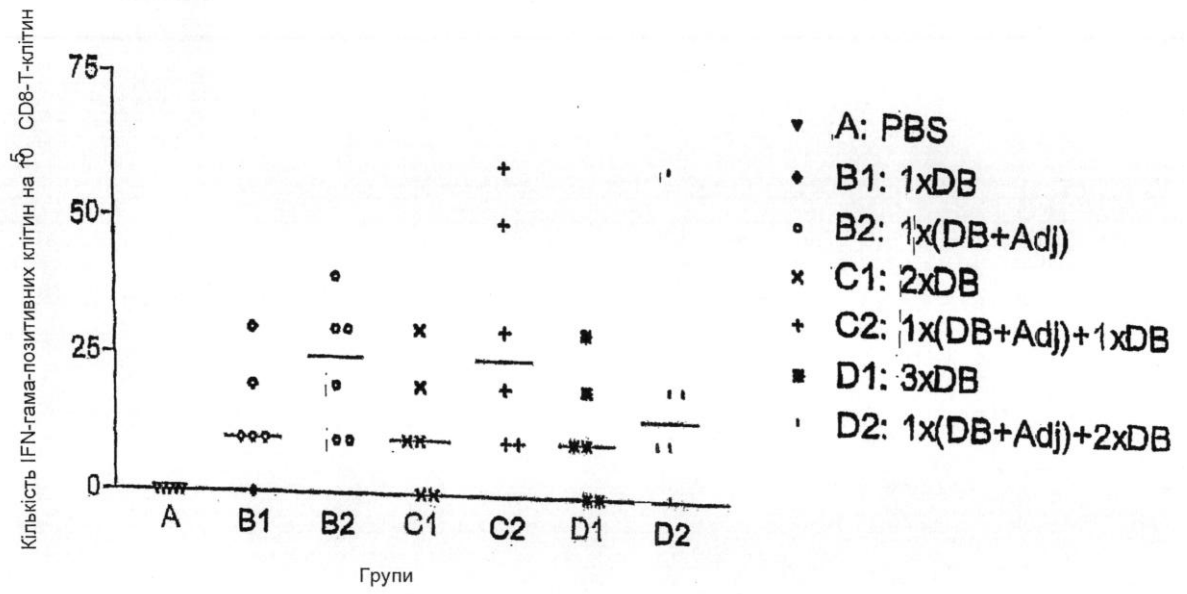
Екперимент 4: Схема імунізації 4: Гр. HV4.8 - HV4.10 і HV4.17 - HV4.19



Фиг. 7



Фиг. 8



Фіг. 9

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- <110> Vakzine Projekt Management GmbH
- <120> Комбінація бактеріальної клітини і біологічно активного агенту
- <130> V 10001 PCT
- <140>
- <141>
- <150>
- <151>
- <160> 2
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 1881
- <212> ДНК
- <213> Шмучна послідовність
- <220>
- <223> Опис шмучної послідовності: молекула рекомбінантної нуклеїнової кислоти
- <220>
- <223> CDS, що містить фазолізосомальний гомен (211-1722) і стопкодон (1879-1881)
- <400> 1
- | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| atgacagacg | tgagccgaaa | gattcgagct | tggggacgcc | gattgatgat | cggcacggca | 60 |
| gcggctgtag | tccttcctggg | cctggtgggg | cttgccggcg | gagcggcaac | cgcgggcgcg | 120 |
| ttctcccggc | cggggctgcc | ggtcgagtac | ctgcagtctg | caaagcaatc | cgctgcaaat | 180 |
| aaattgcact | cagcaggaca | aagcacgaaa | gatgcattctg | cattcaataa | agaaaaattca | 240 |
| atttcattcca | tggcaccacc | agcatctccg | cctgcaagtc | ctaagacgcc | aatcgaaaag | 300 |
| aaacacgcgg | atgaaatcga | taagtatata | caaggattgg | attacaataa | aaacaatgta | 360 |
| ttagtatacc | acggagatgc | agtgcacaaat | gtgcccggca | gaaaagggtta | caaagatgga | 420 |
| aatgaatata | ttgttgtgga | gaaaaagaag | aaatccatca | atcaaaataa | tgcagacatt | 480 |
| caagttgtga | atgcaatttc | gagcctaacc | tatccagggtg | ctctcgtaaa | agcgaattcg | 540 |
| gaattagtag | aaaatcaacc | agatgttctc | cctgtaaaac | gtgattcatt | aacactcagc | 600 |
| attgatattgc | caggtatgac | taatcaagac | aataaaatcg | ttgtaaaaaa | tgccactaaa | 660 |
| tcaaacgtta | acaacgcagt | aaatacatta | gtggaaagat | ggaatgaaaa | atatgctcaa | 720 |
| gcttatccaa | atgtaagtgc | aaaaattgat | tatgatgacg | aaatggctta | cagtgaatca | 780 |
| caattaattg | cgaattttgg | tacagcattt | aaagctgtaa | ataatagctt | gaatgtaaac | 840 |
| ttcggcgcaa | tcagtgaagg | gaaaatgcaa | gaagaagtca | ttagttttta | acaaattttac | 900 |
| tataacgtga | atgttaatga | acctacaaga | ccttcagat | ttttcggcaa | agctgttact | 960 |
| aaagagcagt | tgcaagcgct | tggagtgaat | gcagaaaatc | ctcctgcata | tatctcaagt | 1020 |
| gtggogtatg | gccgtcaagt | ttatttgaaa | ttatcaacta | attcccatag | tactaaagta | 1080 |
| aaagctgctt | ttgatgctgc | cgtaagcgga | aaatctgtct | caggtgatgt | agaactaaca | 1140 |
| aatatcatca | aaaattcttc | cttcaaagcc | gtaatttacg | gaggttccgc | aaaagatgaa | 1200 |
| gttcaaatca | tcgacggcaa | cctcggagac | ttacgcgata | ttttgaaaaa | aggcgctact | 1260 |
| tttaatcgag | aaacaccagg | agttcccat | gcttatacaa | caaacttcct | aaaagacaat | 1320 |
| gaattagctg | ttattaaaaa | caactcagaa | tatattgaaa | caacttcaaa | agcttataca | 1380 |
| gatggaaaaa | ttaacatcga | tcactctgga | ggatacgttg | ctcaattcaa | catttcttgg | 1440 |
| gatgaagtaa | attatgatcc | tgaaggtaac | gaaattgttc | aacataaaaa | ctggagcgaa | 1500 |
| aacaataaaa | gcaagctagc | tcattttcaca | tcgtccatct | atttgccagg | taacgcgaga | 1560 |
| aatattaatg | tttacgctaa | agaatgcact | ggtttagctt | gggaatgggtg | gagaacggta | 1620 |
| attgatgacc | ggaacttacc | acttgtgaaa | aatagaaata | tctccatctg | gggcaccacg | 1680 |
| ctttatccga | aatatagtaa | taaagtagat | aatccaatcg | aatatgcatt | agcctatgga | 1740 |
| agtcagggtg | atcttaaatcc | attaattaat | gaaatcagca | aaatcatttc | agctgcagtt | 1800 |
| ctttcctctt | taacatcgaa | gctacctgca | gagttcgtta | ggcgcggtac | cggaattcga | 1860 |

agcttatcga tgctgacgta g

1881

<210> 2

<211> 626

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: амінокислотна послідовність,
що відповідає послідовності нуклеїнової кислоти 1

<400> 2

```

Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met
 1             5             10             15

Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala
          20             25             30

Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val
          35             40             45

Glu Tyr Leu Gln Ser Ala Lys Gln Ser Ala Ala Asn Lys Leu His Ser
          50             55             60

Ala Gly Gln Ser Thr Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys Glu Asn Ser
          65             70             75             80

Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser Pro Lys Thr
          85             90             95

Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr Ile Gln Gly
          100            105            110

Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly Asp Ala Val
          115            120            125

Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile
          130            135            140

Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn Ala Asp Ile
          145            150            155            160

Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly Ala Leu Val
          165            170            175

Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val Leu Pro Val
          180            185            190

Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly Met Thr Asn
          195            200            205

Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser Asn Val Asn
          210            215            220

Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys Tyr Ala Gln
          225            230            235            240

Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp Glu Met Ala
          245            250            255

Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala Phe Lys Ala
          260            265            270

```

Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser Glu Gly Lys
275 280 285

Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Asn Val Asn
290 295 300

Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys Ala Val Thr
305 310 315 320

Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn Pro Pro Ala
325 330 335

Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Ser
340 345 350

Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp Ala Ala Val
355 360 365

Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn Ile Ile Lys
370 375 380

Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala Lys Asp Glu
385 390 395 400

Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp Ile Leu Lys
405 410 415

Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro Ile Ala Tyr
420 425 430

Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile Lys Asn Asn
435 440 445

Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Lys Ile
450 455 460

Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn Ile Ser Trp
465 470 475 480

Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys
485 490 495

Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser
500 505 510

Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr Ala Lys Glu
515 520 525

Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile Asp Asp Arg
530 535 540

Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr
545 550 555 560

Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Lys Val Asp Asn Pro Ile Glu Tyr Ala
565 570 575

Leu Ala Tyr Gly Ser Gln Gly Asp Leu Asn Pro Leu Ile Asn Glu Ile
580 585 590

Ser Lys Ile Ile Ser Ala Ala Val Leu Ser Ser Leu Thr Ser Lys Leu
595 600 605

Pro Ala Glu Phe Val Arg Arg Gly Ser Gly Ile Arg Ser Leu Ser Met
610 615 620

Ser Thr
625

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601