



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56132 (13) C2

(51) 7 A61K39/39,39/02,39/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**(54) КОМПОЗИЦІЯ ВАКЦИНИ (ВАРІАНТИ), СПОСІБ СТАБІЛІЗАЦІЇ QS21 ВІДНОСНО ГІДРОЛІЗУ (ВАРІАНТИ), СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ КОМПОЗИЦІЇ ВАКЦИНИ**

1

2

(21) 97105147
(22) 01 04 1996
(24) 15 05 2003
(86) PCT/EP96/01464, 01 04 1996
(31) 9508326 7
(32) 25 04 1995
(33) GB
(31) 9513107 4
(32) 28 06 1995
(33) GB
(46) 15 05 2003, Бюл. №5, 2003 р.
(72) Гарсон Наталі Марі, FR, Фріде Мартін, GB
(73) СМІТКЛАЙН БІЧЕМ БАЙОЛОДЖІКАЛС С А, BE
(56) EP A, 0415794, 06 03 91
WO A, 92/06710, 30 04 92
WO A, 90/03184, 05 04 90
WO A, 90/07935, 26 07 90
WO A, 94/00153, 06 01 94
WO A, 94/27636, 08 12 94
WO A, 94/21292, 29 09 94
WO A, 94/19013, 01 09 94
(57) 1 Композиция вакцины, содержащая антиген, QS21 и стерин, отличающаяся тем, что весовое соотношение QS21 и стерина составляет от 1 до 1 100
2 Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что весовое соотношение QS21 и стерина составляет от 1 до 1 5
3 Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что весовое соотношение QS21 и стерина составляет 1 2
4 Композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что стерин является холестерином
5 Композиция по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит 3D-MPL
6 Композиция по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит носитель
7 Композиция по п. 6, отличающаяся тем, что носитель выбран из группы, включающей эмульсии масла в воде, квасцы, микросферы и инкапсулированные частицы антигена
8 Композиция по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит антиген или антигенную композицию, производную

любого человеческого вируса иммунодефицита, вируса иммунодефицита Фелине, вируса ветряной оспы, вируса простого герпеса типа 1, вируса простого герпеса типа 2, цитомегаловируса человека, гепатита А, В, С или Е, респираторно-синцитиального вируса, вируса человеческой инфлюэнцы, НіВ, вируса менингита, сальмонеллы, нейссерии, боррелии, хламидии, бордетеллы, плазмодия и токсоплазмы

9 Композиция по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит антиген, производный неоплазмы

10 Композиция вакцины, содержащая иммунологически активный сапонин и стерин, отличающаяся тем, что активирующая комбинация дополнительно содержит носитель или 3Д-о-ацилированный монофосфолипид А (3D-MPL)

11 Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит антиген или антигенную композицию, производную любого человеческого вируса иммунодефицита, вируса иммунодефицита Фелине, вируса ветряной оспы, вируса простого герпеса типа 1, вируса простого герпеса типа 2, цитомегаловируса человека, гепатита А, В, С или Е, респираторно-синцитиального вируса, вируса человеческой инфлюэнцы, НіВ, вируса менингита, сальмонеллы, нейссерии, боррелии, хламидии, бордетеллы, плазмодия и токсоплазмы

12 Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит антиген, производный неоплазмы

13 Композиция вакцины, содержащая стерин, чистый QS21 или чистый QS17 в липосомной структуре

14 Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что QS21 и QS17 имеют, по меньшей мере, 95 % чистоты

15 Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что QS21 и QS17 имеют, по меньшей мере, 98 % чистоты

16 Композиция по любому из пп. 13-15, отличающаяся тем, что она дополнительно включает 3D-MPL, содержащийся внутри мембраны липосомы

17 Композиция по любому из пп. 13-16, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит

(13) C2

(11) 56132

(19) UA

антиген или антигенную композицию, производную любого человеческого вируса иммунодефицита, вируса иммунодефицита Фелине, вируса ветряной оспы, вируса простого герпеса типа 1, вируса простого герпеса типа 2, цитомегаловируса человека, гепатита А, В, С или Е, респираторно-синцитиального вируса, вируса человеческой инфлюэнцы, H1b, вируса менингита, сальмонеллы, нейссерии, боррелии, хламидии, бордетеллы, плазмодия и токсоплазмы

18 Композиция по любому из пп 13-17, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит антиген, производный неоплазмы

19 Способ стабилизации QS21 по отношению к гидролизу, вызванному основанием, в котором

проводят связывание QS21 и стерина, содержащего липосомы

20 Способ по п 19, отличающийся тем, что стерин является холестерин

21 Способ стабилизации QS21 по отношению к гидролизу, вызванному основанием, в котором проводят связывание QS21 и стерина в весовом соотношении от 1:1 до 1:100

22 Способ по п 21, отличающийся тем, что стерин является холестерин

23 Способ приготовления композиции вакцины по п 1, отличающийся тем, что готовят липидную суспензию, содержащую стерин, затем полученную липидную суспензию микрофлюидируют до тех пор, пока размер липосом не уменьшится до 100 нм, и добавляют QS21.

Настоящее изобретение касается рецептур новых вакцин, способов их изготовления и их использования в медицине. В частности, настоящее изобретение касается вакцин, содержащих антиген, иммунологически активную фракцию, извлеченную из коры *Quillaja Saponaria Molina*, такую как QS21, и стерин

Иммунологически активные фракции сапони-на, имеющие активирующую добавку, извлеченные из коры южно-американского дерева *Quillaja Saponaria Molina*, известны специалистам в соответствующей области. Например, QS21, также известная как QA21, очищенная при помощи жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) фракция из дерева *Quillaja Saponaria Molina*, и способ ее извлечения, раскрыта (как QA21) в США, патент №5,057,540. *Quillaja* сапонин также раскрыт Скоттом (Scott et al, Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 1985, 77, 409). Однако, использование QS21, как активирующей добавки, ассоциировалось с определенным вредом. Например, когда QS21 вводили животным в виде свободных молекул, наблюдался некроз (necrosis), т.е. локальное отмирание ткани в месте инъекции.

Как оказалось, некроза в месте инъекции можно избежать, если использовать рецептуры, содержащие комбинацию QS21 и стерина. Предпочтение отдавалось стеринам, которые включали β -ситостерин, стигмастерин, эргостерин, эргокальциферол и холестерин. Эти стерины хорошо известны специалистам соответствующей области, например, холестерин обнаружен (Merck Index, 11th Edn., page 341) в жире животных, как естественно появляющийся стерин.

Вследствие этого, в качестве первой характерной особенности настоящего изобретения предусматривается композиция вакцин, содержащая антиген, иммунологически активную фракцию сапони-на и стерин. Предпочтительно композиции, согласно изобретению, содержат иммунологически активную фракцию сапони-на в действительно чистом, беспримесном виде. Предпочтительно композиции, согласно изобретению, содержат QS21 в действительно чистом виде, т.е. QS21 является, по крайней мере на 90% чистой, предпоч-

тительно по крайней мере на 95% чистой и более предпочтительно по крайней мере на 98% чистой. Другие иммунологически чистые фракции сапони-на, пригодные для композиций, согласно изобретению, включают QA17/QS17. Композиции, согласно изобретению, содержащие QS21 и холестерин показывают уменьшенную реактогенность вакцины, в то время как в сравниваемых композициях, в которых холестерин отсутствовал, положительный эффект сохранялся. В дополнение к этому известно, что у QS21 понижается эффективность при данных условиях, когда значение pH около 7 и выше. Дополнительное преимущество от настоящих композиций в том, что устойчивость QS21 в гидролизе, в котором в качестве посредника выступает основание, в рецептурах, содержащих холестерин, повышена.

Предпочтительные композиции, согласно изобретению, образуют структуру липосомы (liposome). Композиции, где стерин/иммунологически активная фракция сапони-на образуют ISCOM структуру, также является особенностью данного изобретения.

Обычно соотношение QS21 стерин имеет порядок от 1:100 до 1:1, по весу. Предпочтительно присутствие избытка стерина, соотношение QS21 стерин должно, по крайней мере, иметь порядок 1:2, по весу. Для введения человеку обычно в вакцине QS21 и стерин должны присутствовать в диапазоне приблизительно от 1мкг до приблизительно 100мкг, предпочтительно в диапазоне от 10мкг до 50мкг на дозу.

Липосомы, предпочтительно, содержат нейтральный липид, например, фосфатидилхолин, который, предпочтительно, не кристаллизуется при комнатной температуре, например, фосфатидилхолин яичного желтка, фосфатидилхолин диолеила или фосфатидилхолин дилаурила. Липосомы могут также содержать заряженный липид, который повышает стабильность структуры липосома-QS21 для липосом, составленных из насыщенных липидов. В этих случаях количество заряженных липидов, предпочтительно, 1-20%, по весу, наиболее предпочтительно, 5-10%. Соотношение стерина и фосфолипиду 1-50% (по молям),

наиболее предпочтительно, 20-25%

Предпочтительно композиции, согласно изобретению, содержат MPL (3-деацелированный монофосфорил липид А, известный также как 3D-MPL) 3D-MPL известен из Патента Великобритании GB 2 220 211 (Риби), как смесь из 3-х типов Де-О-ацелированного монофосфорил липида А с 4, 5 или 6 ацелированными цепочками и произведены на Риби Иммунохем, Монтана. Предпочтительней этот вид отражен в заявке на Международный Патент 92/116556

Соответствующие композиции, согласно изобретению, в виде липосом, первоначально готовили без MPL, а MPL затем добавляли, предпочтительно частицами, размером 100нм. Таким образом, MPL не содержит внутри пузырьковую мембрану (известную как, внешняя MPL). Композиции, где MPL содержит внутри пузырьковую мембрану (известную как, внутренняя MPL) также составляют особенность данного изобретения. Антиген может содержаться внутри пузырьковой мембраны или содержаться вне пузырьковой мембраны. Предпочтительны растворимые антигены, которые являются внешними и гидрофобные вещества или липидные антигены, содержащиеся внутри или вне мембраны.

Часто вакцины, согласно изобретению, не требуют никаких специальных носителей и могут быть сформированы в водном или другом, фармацевтически пригодном, буфере. В некоторых случаях может быть выгодно, что вакцины, согласно данному изобретению, будут, кроме того, содержать квасцы или поданы в масляно-водной эмульсии или другим подходящим растворителем, таким, как, например, липосомы, микросферы или капсулированные частички антигена.

Предпочтительно рецептуры вакцины будут содержать антиген или антигенную композицию, способные вызывать реакцию иммунитета у людей или животных против возбудителей болезней. Антиген или антигенные композиции, известные специалистам соответствующей области, могут быть использованы в композициях, согласно изобретению, включающих антигены полисахарида, антиген или антигенные композиции, выведенные из HIV-1 (таких как gp120 или gp160), любого из вирусов иммунодефицита Фелине, вирусов герпеса людей или животных, таких как gD или производных этого или протеина Immediate Early, таких как ICP27 из HSV1 или HSV2, вируса цитомегалии (особенно человеческого) (такого как gB или производных этого), вируса ветряной оспы, опоясывающего лишая (Varicella Zoster virus), (таких как gpI, II или III), или из вируса гепатита, такого как вируса гепатита В, например, поверхностного антигена Гепатита В или производной этого, вируса гепатита А, вируса гепатита С, вируса гепатита Е или из других вирусных возбудителей болезней, таких как респираторного синцитиального вируса (например, протеинов HSRV F и G или иммуногенные фрагменты, раскрыты в Патенте США US Patent 5,149,650 или полипептидов химерика, содержащего иммуногенные фрагменты из протеинов HSRV F и G, гликопротеина FG, раскрытого в Патенте США US Patent 5,194,595), антигенов, извлеченных из штаммов менингита, таких как

менингит А, В, С, пневмонии стрептококковой, вируса человеческой папилломы, вируса инфлюэнцы, инфлюэнцы Haemophilus B (Hib), Epstein Barr Virus (EBV), или извлеченные из бактериальных возбудителей болезней, таких как сальмонелла, нейссерия, боррелия (например, OspA или OspB или производные их), или хламидия, или бордетелла, например, Р 69, РТ и FHA, или извлеченные из паразитов, таких как симпласт или токсоплазма.

HSV Гликопротеин D (gD) или производные этого являются предпочтительной вакциной антигена. Он обнаружен на вирусной мембране, а также найден в цитоплазме инфицированных клеток (Eisenberg R J et al, J of Virol 1980 35 428-435). Он содержит в себе 393 аминокислоты, включая пептидную связь (signal peptide) и имеет молекулярный вес приблизительно 80kD. Для всех HSV гликопротеинов такая оболочка, вероятно, наиболее характерна (Cohen et al J Virology 60 157-166). In vivo это, как известно, играет центральную роль в присоединении вируса на мембранах клетки. Кроме того, гликопротеин D показан тем, что он способен извлекать нейтрализующие тела in vivo и защищать животных от летального исхода. Усеченный вид молекулы gD, не имеющей в фиксированной зоне С окончания, может вырабатываться в клетках млекопитающих как растворимый протеин, который экспортируется в отстоявшуюся жидкость клетки данной культуры. Такие растворимые формы gD предпочтительны. Производство усеченных видов gD описана в Европейском Патенте EP 0 139 417. Предпочтительно gD выводили из HSV-2. Реализацией настоящего изобретения является усеченный HSV-2 гликопротеин D, состоящий из 308 аминокислот, который содержит в себе естественно появляющийся гликопротеин из аминокислот с 1-ой по 306-ую с добавлением аспарагина (Asparagine) и глутамина (Glutamine) на конце фиксированной зоны С окончания усеченного протеина, лишённого своей мембраны. Этот вид протеина включает пептидную связь, которая расщепляется для того, чтобы выделить полностью растворимую 283 аминокислоту протеина из рецепиента клетки.

В качестве другой особенности настоящего изобретения поверхностный антиген Гепатита В является предпочтительным антигеном вакцины.

Использованное здесь выражение "поверхностный антиген Гепатита В" или "HBsAg" включает любой HBsAg антиген или его фрагмент, показывающие антигенность HBV поверхностного антигена. Это понимают следующим образом в дополнение к последовательности из 226 аминокислот HBsAg антигена (смотри Tiollais et al, Nature, 317, 489 (1985) и ссылки на него), HBsAg как здесь описывается, если это требуется, содержит всю или часть pre-S последовательности, как описано в вышеуказанных документах и в Европейском Патенте EP-A- 0 278 940. В частности, HBsAg может содержать в себе полипептид, содержащий последовательность аминокислот, содержащих остатки 12-52, за которыми следуют остатки 133-145, за которыми, в свою очередь, следуют остатки 175-400 L-протеина HBsAg, относительно серотипа аденовируса (ad serotype) от-

крытой для чтения решетки вируса Гепатита В (этот полипептид обозначают как L*, смотри EP 0 414 374) HBsAg в рамках настоящего изобретения может также включать полипептид pre-S1-preS2-S, описанный в Европейском Патенте EP 0 198 474 (Endotronics), или закрытые аналоги его, такие как описаны в Европейском Патенте EP 0 304 578 (Mc Cormick and Jones) HBsAg, как здесь описано, может также относиться к мутантам, например, "исчезающий мутант" (escape mutant), описанный в WO 91/14703 или в заявке на Европейский Патент под номером EP 0 511 855 A1, особенно HBsAg, в котором происходит замена аминокислоты глицина (glycine) в позиции 145 на аргинин (arginine)

Обычно HBsAg существует в виде частиц. Частицы могут содержать в себе, например, один протеин S или могут быть составными частицами, например, (L*,S), где L*, определен выше, а S означает S-протеин HBsAg. Указанная частица находится в особенной дрожжевой форме, которая выражена в дрожжах

Изготовление S-протеина поверхностного антигена Гепатита В хорошо документировано. Смотри, например, Harford et al (1983) in Develop Biol Standard 54, страница 125, Gregg et al (1987) in Biotechnology, 5, страница 479, Европейские Патенты EP 0 226 846, EP 0 299 108 и настоящий документ

Рецептуры в рамках настоящего изобретения могут также содержать антиопухолевый антиген и использоваться для иммунотерапевтического лечения злокачественных опухолей

Приготовление вакцины детально описано в Новых Направлениях и Разработках Вакцин, под редакцией Voller et al, University Park Press, Балтимор, Мериленд, США, 1978. Инкапсуляция в липосомы описана, например, Фуллертоном, Патент США 4,235,877. Соединение протеинов в макромолекулы раскрыто, например, Лихайтом, Патент США 4,372,945 и Армором и др., Патент США 4,474,757

Количество протеина в каждой дозе вакцины выбирается как количество, которое стимулирует иммунозащитную реакцию без существенных, вредных побочных эффектов в типичных вакцинах. Это количество может отличаться в зависимости от спецификации используемого иммуногена и того, как он применяется. Обычно ожидается, что каждая доза вакцины будет содержать 1-1000мкг протеина, предпочтительно 2-100мкг, наиболее предпочтительно 4-40мкг. Оптимальное количество для части вакцин может быть установлено с помощью стандартных исследований путем наблюдения за характерными иммунными реакциями субъектов при поражении болезнью. После первоначальной вакцинации субъекты могут получать один или несколько активаторов иммунизации адекватно промежутку времени

Рецептуры, согласно настоящего изобретения, могут с успехом использоваться как для профилактики, так и для терапии

Соответственно, к тому же особенностью изобретения является то, что оно обеспечивает использование вакцины, согласно изобретению, для лечения людей. Изобретение обеспечивает спо-

соб лечения, заключающийся в назначении пациенту эффективного количества вакцины, согласно настоящего изобретения. В частности, изобретение обеспечивает лечение вирусной, бактериальной, паразитической инфекций и злокачественной опухоли путем назначения пациенту эффективного количества вакцины, согласно настоящего изобретения

Следующие примеры и данные иллюстрируют изобретение

Примеры

1.1 Способ изготовления липосом

Смесь липида (такого, как фосфатидилхолин из яичного желтка либо из синтетика) и холестерина в органическом растворителе сушат в вакууме (или, альтернативно, в потоке инертного газа). Водяной раствор (такой, как фосфат, содержащий солевой раствор) затем добавляют и сосуд встряхивают до тех пор, пока все липиды не будут в виде суспензии. Эта суспензия затем микропсевдооживается (microfluidised) до тех пор пока размеры липосомов не уменьшатся до 100нм, а затем стерильно фильтруют сквозь 0.2мкм фильтр. Вытеснение или разрушение клеточной взвеси ультразвуком может заменить этот шаг

Обычно соотношение холестерина фосфатидилхолин 1:4 (по весу), а водный раствор добавляют, давая конечную концентрацию холестерина от 5 до 50мг/мл. Если MPL в органическом растворе добавляют к липиду в органическом растворе, конечные липосомы содержат MPL в мембране (упоминалось, как внутренняя MPL). Липосомы имеют определенный размер 100нм и упоминаются, как SUV (для маленьких однослойных пузырьков). Если этот раствор повторно охладить и оттаять, то пузырьки сплавятся в большие многослойные структуры (MLV) размером колеблющиеся от 500нм до 15мкм. Липосомы сами по себе стабильны длительное время и не имеют способности вызывать слияние клеток

1.2 Процедура рецептуры

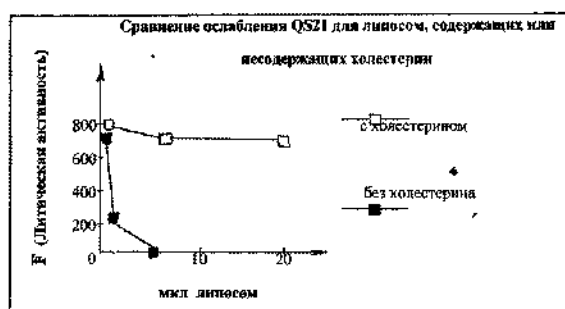
S21 в водном растворе добавляется к липосомам. Эта смесь добавляется затем к раствору антигена, который может, если требуется, содержать MPL в виде частиц размером 100нм

1.3 Литическая активность QS21, содержащаяся липосомами, содержащими холестерин

Когда QS21 добавляют к эритроцитам, они разрушают его, выделяя гемоглобин. Эта литическая активность может быть также измерена используя липосомы, которые содержат холестерин в своей мембране и захваченный флюоресцент, карбофлюоресцеин - как липосомы, выделяют освобожденную краску и ее можно наблюдать с помощью флюоресцентной спектроскопии. Если флюоресцентные липосомы не содержат в своей мембране холестерин, то разрушение липосом не наблюдается. Если QS21 выращивается с липосомами, содержащими холестерин, до добавления ее к эритроцитам, то разрушение эритроцитов уменьшается в зависимости от соотношения QS21 и холестерина. Если используется соотношение 1:1, то литическая активность не выявляется. Если липосомы не содержат холестерин, то подавление лизиса требует тысячекратного избытка

фосфолипидов над QS21

С помощью подобных захватов, точно использующих флуоресцирующие липосомы, можно измерить литическую активность. На графике, приведенном ниже, литическая активность 4мкг QS21, рассматриваемая с липосомами без содержания холестерина (1мкг лецитина яичного желтка на мл) или содержащая холестерин (1мкг лецитина, 500мкг холестерина на мл), была измерена с помощью флуоресценции



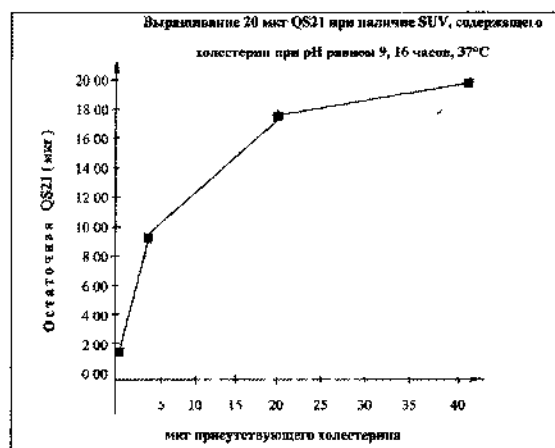
Данные показывают, что QS21 соединяется специальным способом с холестерином, вызывая, таким образом, разрушение (клеток или флуоресцентных липосом). Если QS21 соединяется вначале с холестерином в липосомах, это не является длительно лизирующим по отношению к клеткам или другим липосомам. Это требует минимального соотношения 0.5:1 холестерин:QS21 (по весу).

Холестерин не является растворимым в водном растворе и не имеет формы стабильной суспензии. В присутствии фосфолипидов холестерин находится внутри двухслойного (bilayer) фосфолипида и может иметь вид устойчивой суспензии из пузырьков, называемых липосомами. Были сделаны попытки избежать необходимости добавлять к фосфолипидам растворимые производные Polyoxyethanylcholesterol sebacate растворили в воде при 60мг/мл, однако даже избыток, порядка в 2000 раз, (по весу) не выявил снижения литической активности QS21.

1.4 Повышение стабильности QS21 в липосомах, содержащих холестерин

QS21 очень чувствительна к гидролизу при

значении pH выше 7. Например, график снизу показывает, что при pH равном 9 и температуре 37°C, 90%-ная QS21 гидролизует в течении 16 часов. Если липосомы содержащие холестерин, добавляют к QS21 в соотношении 2:1 (холестерин:QS21 по весу), при таких же условиях гидролиз QS21 не выявляется. Если соотношение 1:1, то 10%-ная QS21 расщепляется.



Сделаем вывод, что когда QS21 соединяется с липосомами, содержащими холестерин, становится намного менее чувствительным гидролиз, в котором в парентерально (минуя пищеварительный тракт), следовательно, вакцины, содержащая QS21, сформированные с pH, имеющим кислую реакцию, и сохраняемые при температуре 4°C, содержат полезную композицию. С использованием липосом можно преодолеть это требование.

1.5 Исследования реактогенности

Мышам вводили в большеберцовую мышцу 5мкг QS21 (или дигитонина), добавленного для повышения количества липосом (выражая через мкг холестерина). Литическая активность выражается как эквивалент QS21, который означает, что количество QS21, требуемое, чтобы достигнуть одинакового гемолиза, такое же как стандартное.

Краснота, некроз и токсичность в месте инъекции оценены визуально после умерщвления мышей.

Рецептура	Литическая активность, мкг	Краснота	Некроз	Токсичность
QS21+PBS	5	+++	±	+++
QS21 + 1мкгхол(SUV)	4	+++	+	++++
QS21+5мкгхол(SUV)	0	-	-	+
QS21+25мкг хол (SUV)	0	±	-	+
Один SUV	0	-	-	-
Дигитонин (digitonin)	5	-	-	±
PBS	0	-	-	-

Данные показывают, что когда литическая активность устраняется при добавлении липосом, содержащих холестерин, то ожидаемая токсичность QS21 также устраняется.

Данные показывают, что когда литическая ак-

тивность устраняется при добавлении липосом, содержащих холестерин, то ожидаемая токсичность QS21 также устраняется.

1.6 Внутримышечная реактогенность кролей

Числа в UI/L

Эксперимент	Рецептура	День 0	Гемолиз	День 1	Гемолиз	День 3	Гемолиз
Кролик № 1	QS21 50мкг	1078	±	8650		1523	
Кролик № 2		1116		4648		1435	
Кролик № 3		660		4819		684	
Кролик № 4		592		5662		684	
Кролик № 5		3400		7528		1736	
Среднее		1389		6281		1212	
Средне-квадратичное		1160		1757		495	

Эксперимент	Рецептура	День 0	Гемолиз	День 1	Гемолиз	День 3	Гемолиз
Кролик № 6	QS21 50мкг Холестерин в SUV 50мкг (1 1)	596	±	1670		460	
Кролик № 7		540		602		594	
Кролик № 8		611		1873		803	
Кролик № 9		521		507		616	
Кролик № 10		1092		787		555	
Среднее		672		1088		606	
Средне-квадратичное		238		636		125	

Эксперимент	Рецептура	День 0	Гемолиз	День 1	Гемолиз	День 3	Гемолиз
Кролик № 11	QS21 50мкг Холестерин в SUV 150мкг (1 3)	332		344	А	387	
Кролик № 12		831		662		694	
Кролик № 13		464		356		519	
Кролик № 14		528		720		614	
Кролик № 15		1027		568		849	
Среднее		637		530		613	
Средне-квадратичное		285		173		175	

Эксперимент	Рецептура	День 0	Гемолиз	День 1	Гемолиз	День 3	Гемолиз
Кролик № 16	QS21 50мкг Холестерин в SUV 250мкг (1 5)	540	±	796		745	
Кролик № 17		498		404		471	
Кролик № 18		442		717		(4535)	
Кролик № 19		822		801		925	
Кролик № 20		3182		2410		960	
Среднее		1097		1088		775	(1527)
Средне-квадратичное		1175		636		224	(1692)

Эксперимент	Рецептура	День 0	Гемолиз	День 1	Гемолиз	День 3	Гемолиз
Кролик №21	PBS	321	±	290		378	
Кролик № 22		660		535		755	
Кролик № 23		650		603		473	
Кролик № 24		1395		(3545)		(5749)	
Кролик № 25		429		323		263	
Среднее		691		438	(1059)	467	(1523)
Средне-квадратичное		419		155	(1396)	210	(2369)

Данные показывают, что добавление липосом, содержащих холестерин, к рецептуре значительно снижает повышение СРК (креатинфосфокиназа), вызванного SQ21. Поскольку повышение СРК является показателем мышечного повреждения, то это показывает уменьшение мышечного повреждения и подтверждается гистопатологией.

1.7. Связывание комплекса липосома-QS21 с квасцом

QS21 выращивали с нейтральными липосомами, содержащими избыток холестерина, а также радиоактивный холестерин, а затем выра-

щивали с квасцом $Al(OH)_3$ в PBS. Поодиночке ни нейтральные липосомы, ни QS21 не связывались с квасцом в PBS, но отрицательно заряженные липосомы связывались посредством QS21. Однако вместе QS21 и нейтральные липосомы связываются с квасцом. Надосадочная жидкость не содержит ни QS21 (проведен тест *orginol*) ни радиактивный холестерин.

Это отражает тот факт, что QS21 связана с липосомами и, допускается связь комбинации липосома-QS21 с квасцом. Это происходит вследствие отрицательного заряда, наложенного на липосомы или вследствие экспозиции гидро-

фобных областей на липосомы. Результаты также подразумевают, что QS21HC выделяет холестерин из мембраны

Это отражает то, что композиции, согласно изобретению, могут быть использованы в вакцинах на основе квасцов

1 8 Сравнение липосомных QS21/MPL и свободных QS21+MPL для антител и стимуляции клеточного иммунитета (CMI)

SUV была приготовлена при помощи вытеснения (EYPC chol MPL 20 5 1)

Для внешних MPL липосомы готовили без MPL, а MPL добавляли в виде частиц, размером 100нм QS21 раньше добавляли к антигену

Холестерин QS21=5 1 (по весам)

MLV формировали при помощи заморажива-

ния-размораживания (freezethawing) SUV 3х до добавления антигена

Для того, чтобы захватить антиген, антиген добавляли к SUV перед процедурой замораживания-размораживания, а QS21 добавляли после замораживания-размораживания Инкапсуляция антигена =5% внутреннего, 95% внешнего Мышам (balb/c для gD, B10BR для RTSs) дважды ввели вакцину в подушечку задней лапы

gD является гликопротеином D, извлеченным из вируса простого герпеса RTSs является поверхностным антигеном гепатита В (HBsAg), генетически модифицированный так, что содержит эпитоп, извлеченный из Plasmodium falciparum sporozoit

Ag=10мкг RTSs		Титры анти HBsAg 15 дней после активации		
Рецептура		IgG1	IgG2a	IgG2b
SUV /QS + (MPL out)	+Ag	1175	10114	71753
MLV /QS + (MPL out)	+Ag	2247	11170	41755
MLV/QS/MPL(in)	+Ag	969	7073	18827
MLV/QS/MPL(in)/Ag(in)	+Ag	1812	2853	9393
QS + MPL	+Ag	372	9294	44457
	Ag	<100	<100	<100
SUV /QS + (MPL out)	+Ag	<100	<100	<100
MLV/QS/MPL(in)		<100	<100	<100

ag=20мкг gD		антигD	CMI	
Рецептура		IgG	IFN-γ96hr (нг/мл)	IL248hr (нг/мл)
SUV/QS + (MPLout)	+Ag	2347	1572	960
SUV/QS-(MPLin)	+Ag	2036	1113	15
MLV/QS/MPL(out)	+Ag	1578	863	15
MLV/QS/MPL(in)	+Ag	676	373	15
MLV/QS/MPL(in)/Ag(in)	+Ag	1064	715	15
QS + MPL	+Ag	1177	764	15
	Ag	<100	567	44
SUV/QS + (MPLout) +Ag	+Ag	<100	181	15
MLV/QS/MPL(in)		<100	814	105

Данные показывают, что при помощи SUV/QS+MPL_(out) легко индуцируются титры антител, по крайней мере, так хорошо, как при помощи QS21+MPL, в такой же мере включающая IL2, которая служит иммунным маркером для клетки,

до тех пор пока ослаблена реактогенность QS21

Дополнительные результаты из второго эксперимента, сравнивающие QS21 и QS21 при наличии холестерина (SUV) в мышах (balb/c) с HVS gD в качестве антигена, показаны ниже

		Изотопы 7 дней после 2-й иммунизации							
Рецептура	антиген	IgG 7 post II (GMT)	IgG 14 post II (GMT)	IgG1 мкг /мл	%	IgG2a мкг /мл	%	IgG1b Мкг /мл	%
SUV/Qs21+MPLout	gD (5 мкг)	20290	16343	331	26	716	56	222	17
SUV/Qs21/MPL in	gD (5 мкг)	12566	10731	418	44	412	44	111	12
QS21+MPL	gD (5 мкг)	10504	10168	200	34	285	48	107	18
SUV/Qs21+MPL out	без	0	0	0	0	0	0	0	0
Qs21	gD (5 мкг)	3468	4132	156	66	67	28	14	6
SUV/Qs21	gD (5 мкг)	11253	11589	484	57	304	36	65	8

1 9 Сравнение gp120 плюс липосомные MPL/QS21 со свободными MPL/QS21

Липосомы =SUV, содержащие в мембране

MPL

Реакция была протестирована через две недели после первой иммунизации

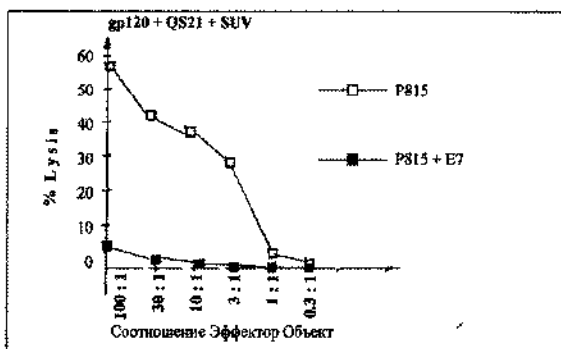
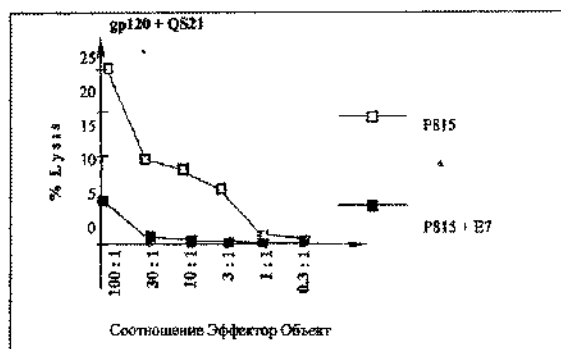
Рецептура	Разрастание	IFN-g Нг/мл	IL2 пг/мл	IL5 пг/мл
SUV/MPL/QS21+Ag	12606	16.6	59	476
MPL+QS21+Ag	16726	15.8	60	404

После второй иммунизации

Рецептура	Разрастание	IFN-g Нг/мл	IL4 пг/мл	IL5 пг/мл
SUV/MPL/QS21+Ag	12606	135	0	250
MPL+QS21+Ag	16726	60	0	500

Данные показывают, что QS21, ассоциированная с холестерин-содержащими липосомами и MPL, индуцирует реакцию Th1/Th0, эквивалентно MPL+QS21. В этом соотношении холестерина и QS21, в кроликах QS21 не является токсичной (by CPK).

Во втором эксперименте мыши (balb/c) была иммунизирована в подушечку задней лапы с gp120 в присутствии QS21 или QS21+SUV, содержащих холестерин. Была измерена цитотоксическая активность Т-лимфоцитов в клетках селезенки.



Это демонстрирует, что QS21 одна индуцирует активность CTL и, что QS21 в реакции липосом, содержащих холестерин, индуцирует активность CTL, по крайней мере, так хорошо как или даже лучше, чем одна QS21.

2. Вакцины

2.1. Рецепттура HbsAg L*,S частиц

10 мкг HbsAg L*,S частиц/на дозу выращивали в течение 1 часа при комнатной температуре после встряхивания. Объем регулируют используемой для инъекции водой и раствором PBS и заканчивают с конечным объемом 70 мкл/на

дозу с водным раствором QS21 (10мкг/на дозу). Значение pH сохраняют в пределах 7/0.5.

Сходные рецепттуры могут быть приготовлены, используя 1 и 50мкг HBsAg L*,S и также, используя антиген HBsAg S.

Эти рецепттуры могут быть протестированы с помощью замещающей терапевтической модели Woodchuck, используя антигены Woodchuck HBV как модель.

Модель Woodchuck

DQ QS21 (т.е. QS21/холестерин или ослабленная QS21) может быть протестирована с помощью терапевтической модели Woodchuck, где животные хронически инфицированы вирусом. Специфическая вакцина вируса гепатита woodchuck может быть добавлена смешанной с QS21, как таковой, или с DQ с или без MPL и вводится животным каждый месяц на протяжении 6 месяцев. Эффективность вакцины может быть оценена через вирусную очистку ДНК (DNA).

2.2. Модель Гвинейская Свинья

2.2.1. Профилактическая модель

Группы из 12 самок гвинейской свиньи Hartley были инфицированы, каждую, внутримышечно в 0-й день и 28-й день с помощью следующей рецепттуры:

1-й эксперимент

gD 5мкг + QS21 50мкг + SUV, содержащая 50мкг холестерина

gD 5мкг + QS21 100мкг + SUV, содержащая 100мкг холестерина

gD 5мкг + QS21 50мкг + SUV, содержащая 250мкг холестерина

gD 5мкг + QS21 50мкг

2-й эксперимент

gD 5мкг + MPL 12.5мкг + QS21 12.5мкг + SUV, содержащая 62.5мкг холестерина, или оставлены неинфицированными.

Животным пускают кровь на 14-ый и 28-ой день после второй иммунизации и титры антител сыворотки gD-средства протестировали с помощью иммуноферментного твердофазного анализа.

Животным затем внутривагинально ввели 10^5 pfu профильтрованного HSV-2 MS. Их ежедневно осматривали, начиная с 4 по 12 день, для оценки первичных герпетических повреждений. Показания были следующими:

Вагинальные повреждения

- кровотечение = 0.5
- краснота для одного или двух дней без кровотечения = 0.5
- краснота и кровотечение в течении дня = 1

17

56132

18

- краснота без кровотечения в течении, по крайней мере, трех последних дней =1
Внешние герпетические пузырьки (везикулы)
- < 4 маленьких пузырьков
- >= 4 маленьких пузырьков или один большой пузырек, 4 >- 4 больших повреждений, 8 со-

вмещающихся больших повреждений =16
- совмещающиеся большие повреждения на всей внешней поверхности гениталий = 32
Результаты показаны в нижеприведенной таблице

Профилактическая Модель (Prophylactic Model)

Эксперимент 1 (холест - ссылка на SUV, содержащую холестерин)

№	Рецептура	Первичные заболевания						
		Животные без повреждений %	Охват вагинальных повреждений %	Охват Внешних повреждений %	Индекс КС PI**	Контроль восстановления VS	Серьезность повреждения	
Средняя	n							
12	gD/QS21 50мкг	50	33	17	73	93%	1 50	6
11	gD / QS21 50мкг - холестер 1/5	64	18	18	67	93%	2 50	4
12	gD / QS21 50мкг - холестер 1/1	100	0	0	0	100%	-	-
12	gD / QS21 50мкг - холестер 1/1	50	33	17	54	95%	0 75	6
12	Необработанные	25	0	75	996	- *	55 00	9

Эксперимент 2

№	Рецептура	В титрах (GMT)			Первичные заболевания						
		ELISA		NEUTRA	Животные	Охват	Охват	Индекс PI **	Серьезность повреждения	Средняя	n
		День 14 Postil	День 28 Postil	День 28 Postil	без повреждений %	Вагинальных повреждений %	Внешних повреждений %				
12	GD/QS21/SUV/MPL	47006	31574	449	58 33	33 33	8 33	37 50	94%	1 00	5
12	Необработанные	<400	<400	<50	16 67	8 33	75 00	587 50	-	11 50	10

* Сумма повреждений показывает для дней с 4-го по 12-й после инфицирования (животные без повреждений не учитываются)

Показатели повреждений: нет повреждений (0), вагинальные повреждения (0 5 или 1), внешние кожные пузырьки (2, 4, 8 или 16)

** Первичный инфекционный индекс = Сумма (Max показатель i) x (% заболевания), где i = 0,0 5,1,2,4,8 или 16

Таблица и график показывают, что в профилактической модели очень высокий уровень защиты против первичных заболеваний, как было выявлено во время иммунизации при помощи gD / MPL / QS21 / SUV. Оба вида заболеваний как внешние повреждения так и тяжесть повреждений оказываются высоко ослабленными в группе животных, иммунизированных при помощи gD / MPL / QS21/SUV

2.2.2 Терапевтическая Модель

В терапевтической модели самкам гвинейской свиньи Hartley сначала ввели 10^5 pfu профильтрованного HSV-2 MS. Животных с герпетическими повреждениями затем случайным

образом распределили в 16 групп

На 21 и 42 день, каждую из них иммунизировали при помощи следующей рецептуры

gD + MPL 50мкг + QS21 50мкг + SUV, содержащая 250мкг холестерина,

gD + A1(OH)3 + MPL 50мкг + QS21 50мкг + SUV, содержащая 250мкг холестерина или оставили неинфицированными

За ними ежедневно наблюдали с 22 по 75 день для оценки повторного заболевания. Показания были описаны, как для профилактической модели. Результаты показаны в нижеприведенной таблице

Терапевтическая Модель (Therapeutic Model)

№	РЕЦЕПТУРЫ	Тяжесть *		Продолжительность **		Количество событий ***	
		Медиана	% снижения относительно контроля	Медиана	% снижения относительно контроля	Медиана	% снижения относительно контроля
16	gD+MPL+QS21-SUV	9 00	43%	7 00	18%	3 00	14%
15	gD+AI(PH)3+MPL+QS21-SUV	8 50	46%	7 00	18%	3 00	14%
16	Неинфицированные	15 75	-	8 50	-	3 50	-

* Сумма повреждений отражает дни с 22-го по 75-й день после инфицирования

** Общее время наблюдения за повторяющимися повреждениями животных за период с 22-го по 75-й день после инфицирования

*** Число повторений событий за период с 22-го по 75-й день после инфицирования. Одному событию предшествует и за ним следует день без повреждений, который характеризуется, по крайней мере, двумя днями с эритемой (показательно=0,5) или одним днем с наружным пузырьком (показатель>=2). Иммунологическое лечение выполняли от 21 до 42 дней

Результаты показывают, что хороший уровень защиты был также стимулирован при помощи инфекции HSV-2. Иммунизация с gD/MPL/QS21/SUV с квасцом или без него отме-

чает эффект на повторяющихся заболеваниях средней тяжести. Это также незначительно ослабляет количество и продолжительность событий (Смотри Таблицу)