



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80859** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**
A61K 39/00
A61K 39/095
A61K 39/385
A61K 47/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ВАКЦИННА КОМПОЗИЦІЯ НА ОСНОВІ ГАНГЛІОЗИДІВ ДЛЯ ПІДШКІРНОГО ВВЕДЕННЯ БЕЗ ІМУНОЛОГІЧНИХ АД'ЮВАНТІВ

1

2

(21) a200508381
(22) 27.02.2004
(24) 12.11.2007
(86) PCT/CU2004/000003, 27.02.2004
(31) 47-2003
(32) 27.02.2003
(33) CU
(72) ФЕРНАНДЕС МОЛІНА ЛУІС ЕНРІКЕ, МЕСА ПАРДІЛЬО СІРКЕ
(73) ЦЕНТРО ДЕ ІМУНОЛОГІЯ МОЛЕКУЛАР
(56) US A 6149921, 21.11.2000.
EP B1 0661061, 07.11.2001.
CA A1 2399325, 21.02.2003.
Estevez F. Et al: "Enhancement of the immune response to poorly immunogenic gangliosides after incorporation into very small size proteoliposomes (VSSP). Vaccine. 1999 Aug 20, 18(1-2):190-7 (ABSTRACT).
(57) 1. Вакцинна композиція, яка містить розчин або водну дисперсію одного або декількох включених до VSSP гангліозидів, вибраних з-поміж

N-AcGM3 і N-GcGM3, здатна до стимулювання імунної реакції при підшкірному введенні без імунологічних ад'ювантів.

2. Вакцинна композиція за п. 1, яка відрізняється тим, що гангліозидом, включеним до VSSP, є N-AcGM3.

3. Вакцинна композиція за п. 1, яка відрізняється тим, що композиція не містить інших антигенів, окрім гангліозидів.

4. Вакцинна композиція за п. 1 або 3, яка відрізняється тим, що як імунологічні складові містить лише N-AcGM3/VSSP та/або N-GcGM3/VSSP.

5. Вакцинна композиція за п. 4, яка відрізняється тим, що як імунологічну складову містить лише N-AcGM3/VSSP.

6. Спосіб лікування хворих, що потребують підсилення імунологічної реакції, який передбачає підшкірне введення вакцинної композиції за одним з пп. 1-5.

Цей винахід стосується вакцинних композицій для підшкірного введення, що містять гангліозиди, придатних для імунологічного лікування автоімунних захворювань, інфекційних захворювань та пухлин без жодного додаткового ад'юванту.

Тривалий час відомим є намір застосування гангліозидів для імунологічного лікування автоімунних захворювань і раку. Наприклад, [патент США №4,965,198] описує застосування гангліозиду GM2 для запобігання та лікування таких захворювань. [Заявка на європейський патент EP-A-661061 та патент США №6,149,921] описують вакцинні композиції, призначені для стимулювання або підсилення гуморальної імунної відповіді на гангліозиди, що містять імуноген та імунологічний ад'ювант.

Імуногенами, що описуються, є VSSP (протеоліпосоми дуже малого розміру), що являють собою комбінацію гангліозидів N-ацетил-GM3 і N-гліколіл-GM3 (у подальшому N-AcGM3 і N-GcGM3, відповідно) із зовнішнім білковим комплексом мембрани (OMP) *Neisseria meningitidis*.

Такі імуногени у подальшому будуть позначатись, як N-AcGM3/VSSP і N-GcGM3/VSSP. Вони мають дуже малий розмір, і є практично невидимими для електронного мікроскопа, водорозчинними і мають підвищену флотаційну здатність.

Для вакцинних композицій, описаних [у заявці на європейський патент EP-A-661061 та патенті США №6,149,921], необхідним було застосування ад'юванту, наприклад, добре відомого неповного ад'юванту Фрейнда.

(13) **C2**(11) **80859**(19) **UA**

[У заявці WO02/145746] описуються вакцинні композиції, що містять: (А) один або декілька антигенів із низькою імуногенністю, (В) VSSP, що містять гангліозиди, головним чином, N-AcGM3/VSSP і N-GcGM3/VSSP, та (С) можливо, один або декілька ад'ювантів.

[У роботі Karp A (Carr A) та інших, опублікованій у Melanoma Research, 2001, том 11, стор.219-227], описується протипухлинна активність вакцини, що містить гангліозид N-AcGM3, у мишей з меланою B16.

У цій статті розглядається також ефект присутності імунологічного ад'юванту, зокрема, повного ад'юванту Фрейнда або ад'юванту Монтанід (Montanide) ISA 51, подібного неповному ад'юванту Фрейнда. Вакцини вводили внутрішньом'язовим шляхом і дійшли висновку, що миші, імунізовані N-AcGM3/VSSP із(будь-яким з ад'ювантів, ад'ювантом Фрейнда або ад'ювантом Монтанід ISA 51, демонстрували IgM та IgG відповідь проти N-AcGM3 на восьмому тижні (Таблиця 1). У протилежність до цього вакцина N-AcGM3/VSSP без будь-якого ад'юванту не демонструвала жодної імуногенної відповіді [стор.223, правий стовпчик].

Таким чином, відомий рівень техніки вказує на те, що до складу вакцин, що містять VSSP, кон'юговані з гангліозидами, повинні вводитись ад'юванти, головним чином, ад'юванти Фрейнда (повний або неповний) або ад'ювант Монтанід ISA 51.

Добре відомо, однак, що такі ад'юванти, зокрема, повний ад'ювант Фрейнда, у разі парентерального введення викликають деякі негативні побічні ефекти, наприклад, хронічне запалення на ділянці ін'єкції, можливі гранульоми, стерильний абсцес або виразковий некроз у тканинах. Монтанід ISA 51 є менш агресивним, але також може викликати деякі запальні розлади.

З точки зору застосування при імунологічному лікуванні аутоімунних, інфекційних та онкологічних захворювань, було б дуже бажаним мати нові вакцинні композиції на основі гангліозидів, які були б менш агресивними на ділянці ін'єкції, могли б застосовуватись із більшою легкістю і були б більш зручними для хворих.

Автори цього винаходу відкрили, що вакцини на основі гангліозидів, до складу яких входять VSSP, у разі підшкірного введення, можуть застосовуватись без будь-яких ад'ювантів з одночасним збереженням відповідних імунологічних властивостей.

Ціллю цього винаходу є нові вакцинні композиції, що містять VSSP, за варіантом, якому віддають перевагу, N-AcGM3/VSSP і N-GcGM3/VSSP, які не містять жодного імунологічного ад'юванту і вводяться підшкірним шляхом.

Предметом цього винаходу є також спосіб лікування хворого, який потребує підсилення імунологічної реакції, який полягає у підшкірному введенні вакцинних композицій на основі гангліозидів, за варіантом, якому віддають перевагу, N-AcGM3/VSSP та N-GcGM3/VSSP, що не містять жодного імунологічного ад'юванту.

Предметом цього винаходу є також вакцинні композиції на основі N-AcGM3/VSSP та/або N-GcGM3/VSSP, які не включають інших антигенних компонентів, що відрізняються від гангліозидів, або будь-яких інших імунологічних ад'ювантів, і вводяться підшкірним шляхом.

Вакцинні композиції, що є ціллю цього винаходу, являють собою розчин або водну дисперсію одного або декількох гангліозидів з їх включенням до складу OMP *Neisseria meningitidis* (VSSP), здатні до стимулювання імунологічної реакції у разі підшкірного введення без жодного додаткового імунологічного ад'юванту.

VSSP являють собою високостійкі гідрофобні асоціації гангліозидів із зовнішнім білковим комплексом мембрани *Neisseria meningitidis*, що не потребують ковалентних зв'язків. Такі системи гангліозидів-білків докладно описуються [у заявці на європейський патент EP-A-661061 та патенті США №6,149,921, а також у різних публікаціях, наприклад, Естевес (Estevez) та інші, Vaccine, 1999; том 18 (1-2), стор.190-197]. У цих документах описують також методику їх одержання.

З-посеред гангліозидів, що належать до VSSP, перевагу, за цим винаходом, віддають N-AcGM3 та N-GcGM3, причому особливу перевагу віддають N-AcGM3.

Докладний опис імуногенності обох кон'югованих гангліозидів, а також їх застосування як протиракових засобів та стимуляторів набутого імунітету можна знайти у вищезгаданих документах і [у оглядовій статті Біттон Р. (Bitton R.) та інших, Oncology Reports (2202), том 9, стор.267-276, та у недавніх публікаціях і повідомленнях із наукових нарад, наприклад, Шостого латиноамериканського конгресу з імунології, який відбувся у Гавані 9 грудня 2002 року, повідомленні Саурес Г. (Saurez G.) та інших, "Phase I clinical trial of the ganglioside cancer vaccine N-AcGM3/VSSP/Montanide ISA 51 in advanced breast cancer patients"].

Вакцинні композиції, що не містять інших антигенних компонентів, окрім гангліозидів, є предметом цього винаходу, якому віддають перевагу, причому особливу перевагу віддають вакцинним композиціям, що містять, як єдиний імуногенний компонент, N-AcGM3 (N-AcGM3/VSSP) та/або N-GcGM3 (N-GcGM3/VSSP), де особливу перевагу віддають вакцинним композиціям, що містять лише N-AcGM3/VSSP.

Вакцинні композиції, що є предметом цього винаходу, являють собою розчини або водні дисперсії VSSP, що можуть містити інші нетоксичні, водосумісні розчинники, що не викликають подразнення, які, як правило, застосовуються у фармацевтиці для парентерального вживання, наприклад, поліетиленгліколь.

Концентрація кон'югованих гангліозидів у розчинах, або водних дисперсіях не є критичною і може бути у межах 0,03%-3% (у відношенні маси до об'єму), за варіантом, якому віддають перевагу, у межах 0,04-2,5% (у відношенні маси до об'єму). Діапазон доз, призначених для підшкірного введення, що застосовуються для згаданих вакцин

за цим винаходом, знаходиться у межах від 50мкг до 2,4мг, за варіантом, якому віддають перевагу, він знаходиться у межах від 200мкг до 2мг.

Суттєва особливість вакцинних композицій, що є предметом цього винаходу, полягає у тому, що вони призначені для підшкірного введення без жодного додаткового імунологічного ад'юванту.

Імунологічні ад'юванти часто застосовують у вакцинних композиціях. Такі ад'юванти сприяють імуногенній дії різними шляхами:

- створюють запас антигена на ділянці ін'єкції з постійним і систематичним вивільненням або виділенням антигена;

- надають допомогу антигену у досягненні селезінки та лімфатичних вузлів шляхом утворення масляних мікрокраплин, які легко захоплюються макрофагами;

- безпосередньо або опосередковано активують клітини, залучені до імуногенної відповіді.

Найвідомішими імунологічними ад'ювантами є такі: ад'юванти Фрейнда, повний та неповний, Монтанід ISA, ад'юванти Рібі (Ribi), TiterMax Хантера (Hunter), солі алюмінію, ад'ювант Гербу (Gerbu), QS-21 тощо.

Неочікувано і з подивом автори цього винаходу встановили, що у разі підшкірного введення вакцин на основі гангліозидів/VSSP, ад'юванти можуть повністю виключатись. Така можливість, за відомим станом техніки, майже повністю виключалася у разі внутрішньом'язового введення.

Таким чином, цей винахід надає незаперечні переваги, передусім щодо згаданих місцевих запальних проблем, що виникають унаслідок застосування ад'ювантів. Цей винахід пропонує простий, ефективний і менш агресивний для хворих спосіб вакцинації гангліозидами.

До наведених нижче прикладів включені порівнянні експериментальні подробиці, які дозволяють продемонструвати імунологічну ефективність вакцинної композиції, яка не містить імунологічних ад'ювантів.

Приклад 1

За методикою, опис якої наведено [у прикладі з патенту США №6,149,921], одержали водну вакцинну композицію (буфер трис-HCl), що містить 2,4мг/мл N-AcGM3/VSSP. До аліквоти такої імуногенної композиції додавали однаковий об'єм ад'юванту Монтанід ISA 51 (фірма Seppic, Париж, Франція). Одночасно до іншої аліквоти додавали ідентичний об'єм трис-HCl.

Одержали дві вакцинні композиції:

А. Водний розчин, що містить 1,2мг/мл N-AcGM3/VSSP.

В. Емульсію води у маслі, що містить 1,2мг/мл N-AcGM3/VSSP.

Відібрали 50 мишей-самиць лінії C57BL/6 з масою тіла 18-20г, які розділили на 5 експериментальних груп по 10 тварин у кожній.

Тваринам групи 1 (контроль) у дні 0, 14, 28 та 42 внутрішньом'язово вводили 0,1мл забуференого фосфатом фізрозчину (PBS).

Тваринам групи 2 у дні 0, 14, 28 та 42 внутрішньом'язово вводили 0,1мл вакцинної композиції В (120мкг N-AcGM3/VSSP).

Тваринам групи 3 (контроль) у дні 0, 14, 28 та 42 підшкірно вводили 0,1мл забуференого фосфатом фізрозчину (PBS).

Тваринам групи 4 у дні 0, 14, 28 та 42 підшкірно вводили 0,1мл вакцинної композиції В (120мкг N-AcGM3/VSSP).

Тваринам групи 5 у дні 0, 14, 28 та 42 підшкірно вводили 0,1мл вакцинної композиції А (120мкг N-AcGM3/VSSP).

Мишам усіх груп на 63 день підшкірно вводили клітини (5×10^3) меланоми MB16F10 (0,2мл).

Тварин з дня 0 утримували роздільно і двічі на тиждень визначали такі параметри: об'єм пухлин, виживаність і період розвитку.

Одержали такі результати:

Об'єм пухлин

На Фіг.1 показана кінетика росту пухлин у кожній експериментальній групі. Для оцінки статистичної значущості у парних групах значень об'єму пухлин роздільно утримуваних тварин на 33 день після експериментального зараження раковими клітинами застосовували U-критерій (двобічний) Манна-Уїтні.

Цей статистичний метод є особливо придатним для оцінки експериментів подібного роду, що мають природний розкид даних, пов'язаних із біологічним явищем.

Значення р означає ймовірність, пов'язану з практичним значенням, обчисленим зі зразка, і надає можливість визначення наближення величини альфа (значення), обчисленої за статистичними даними, і реальних даних, що дозволяють оцінити нульову гіпотезу ($p > 0,05$).

Результати подані на Фіг.1 та у Таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив вакцинації на об'єм пухлин

Групи	Об'єм пухлини (см)	
	День 33	
	Середнє	U-критерій (двобічний) (значення р) Манна-Уїтні
Група 1	6,53	-
Група 2	3,99	0,46 ^a
Група 3	6,63	-
Група 4	4,11	0,12 ^b
Група 5	1,89	0,01 ^c

a: значення р як результат порівняння Групи 2 з Групою 1

b: значення р як результат порівняння Групи 4 з Групою 3

c: значення р як результат порівняння Групи 5 з Групою 3

З Фіг.1 та Таблиці 1 можна бачити, що миші у Групі 5, підшкірно вакциновані композицією, що є предметом цього винаходу, демонструють значне зменшення об'єму пухлин порівняно з іншими експериментальними і відповідними контрольними групами.

Вживаність

Цим параметром оцінюють здатність вакцинації до подовження тривалості життя імунізованих тварин у разі такої летальної пухлини, як МВ 16. Цей параметр вимірюється днями, порівняно з виживаністю у тварин, що не піддавались лікуванню. Для визначення статистичної значущості застосовують логарифмічний ранговий критерій.

Одержані значення наведені на Фіг.2 і у Таблиці 2. Словосполучення "еталонна група Х" у Таблиці 2 означає групу, яка порівнюється з кожним стовпчиком.

Таблиця 2

Статистика часу виживаності
за логарифмічним ранговим критерієм

Групи	Виживаність (дні)		р (еталонна група 1)	р (еталонна група 3)	р (еталонна група 5)
	Меді-ана	Меді-ана			
Група 1	35	33	-	-	-
Група 2	43	36	0,06	-	0,26
Група 3	40	40	-	-	0,002
Група 4	42	40	-	0,53	0,13
Група 5	52	53	-	0,002	-

Ці результати демонструють, що миші, включені до Групи 5, підшкірно вакциновані композицією, що є предметом цього винаходу, продемонстрували найдовшу виживаність після інюкації пухлини.

Період розвитку

Період розвитку є параметром, яким оцінюється період, необхідний для появи пухлини у кожної тварини індивідуально, що вимірюється з моменту інюкації. Результати подані у Таблиці 3.

Таблиця 3

Статистика періоду розвитку
за логарифмічним ранговим критерієм

Групи	Період розвитку (дні)		р (еталонна група 1)	р (еталонна група 3)	р (еталонна група 5)
	Меді-ана	Меді-ана			
Група 1	19	19	-	-	-
Група 2	32	19	0,02	-	0,5
Група 3	19	19	-	-	0,004
Група 4	23	19	-	0,5	0,06
Група 5	37	26	-	0,004	-

У мишей, у яких на момент завершення експерименту не з'являлось жодних пухлин, тривалість розвитку приймалась такою, що дорівнювала 60 дням.

Ефект подовження періоду розвитку є, очевидно, дуже бажаним параметром для протираксової вакцини і, відповідно до результатів, наведених у Таблиці 3, тварини Групи 5, підшкірно вакциновані композицією на основі VSSP, що є предметом цього винаходу, продемонстрували більш відповідні позитивні результати.

Зворотний розвиток пухлин

У Групі 4 і Групі 5, що відповідають підшкірній вакцинації з/без ад'юванту, спостерігали тварин зі зворотним розвитком пухлин. У тварини з Групи 4 пухлина, що піддавалась вимірюванню на 19 день, не демонструвала, практично, жодного росту до 35 дня, коли було встановлено, що ця тварина дала негативний результат. У миші з Групи 5 на 26 день пальпацією була виявлена присутність пухлини; на 29 день ця тварина дала негативний результат.

Загальна оцінка

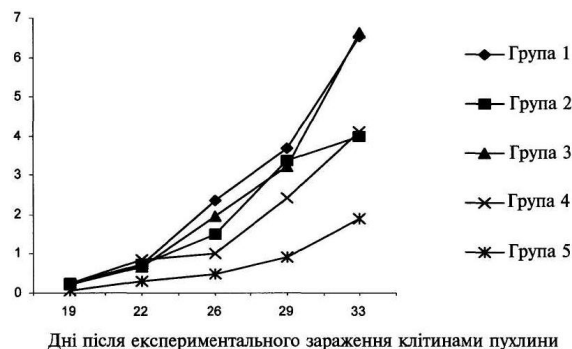
Результати експериментів показали, що вакцинна композиція, що є предметом цього винаходу, подовжила період виживаності і період розвитку з одночасним значним зниженням швидкості росту пухлин, порівняно з контрольною групою, яка одержувала PBS.

З іншого боку, вакцинна композиція, що містила ад'ювант Монтанід ISA 51, забезпечувала захист лише у разі внутрішньом'язового введення, і була абсолютно неефективною у разі підшкірного введення.

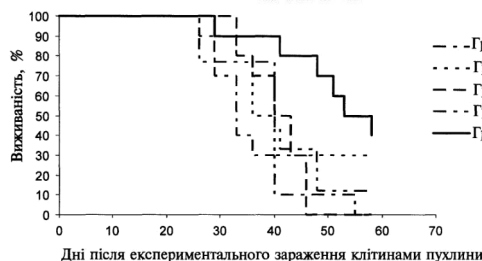
У цілому, підшкірна вакцинація вакцинними композиціями, що є предметом цього винаходу, продемонструвала кращі результати, порівняно з результатами, які одержали при внутрішньом'язовому введенні вакцинної композиції, що містила ад'ювант типу Монтаніду.

Фіг.1 - графік, що показує розвиток об'єму пухлин у 5 групах тварин, що вакцинувались різними шляхами і піддавались експериментальному зараженню клітинами злоякісних пухлин.

Фіг.2 - графік, що надає можливість оцінки параметрів виживаності у 5 групах експериментальних тварин.



ФІГ. 1



ФІГ. 2