



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.25

(21) Номер заявки
201691638

(22) Дата подачи заявки
2015.04.02

(51) Int. Cl. **A61K 39/002** (2006.01)
A61K 39/015 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

(54) СПОСОБ ИНДУЦИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ МАЛЯРИИ

(31) **1405921.6**

(32) **2014.04.02**

(33) **GB**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/EP2015/057424**

(87) **WO 2015/150568 2015.10.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС С.А. (BE)**

(72) Изобретатель:
**Баллоу Уильям Рипли Мл.,
Дидьелорен Арно Мишель, Ван Дер
Мост Робберт Гэррит (BE)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) STOUTE J.A. ET AL.:
"A PRELIMINARY EVALUATION OF
A RECOMBINANT CIRCUMSPOROZOITE
PROTEIN VACCINE AGAINST PLASMODIUM
FALCIPARUM MALARIA", NEW ENGLAND
JOURNAL OF MEDICINE, MASSACHUSETTS
MEDICAL SOCIETY, US, vol. 336, no.
2, 9 January 1997 (1997-01-09), pages
86-91, XP000990284, ISSN: 0028-4793, DOI:
10.1056/NEJM199701093360202, cited in the
application, the whole document

HILL ADRIAN V.S.: "Vaccines against
malaria", PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF
THE ROYAL SOCIETY OF LONDON. SERIES
B: BIOLOGICAL SCIENCES, ROYAL SOCIETY
OF LONDON, LONDON, GB, vol. 366, no.

1579, 12 October 2011 (2011-10-12), pages
2806-2814, XP002700406, ISSN: 0080-4622, DOI:
10.1098/RSTB.2011.009, the whole document

W.R. BALLOU: "The development of the
RTS,S malaria vaccine candidate: challenges and
lessons", PARASITE IMMUNOLOGY, vol. 31, no.
9, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 492-500,
XP55208451, ISSN: 0141-9838, DOI: 10.1111/
j.1365-3024.2009.01143.x, the whole document

STOUTE J.A. ET AL.: "LONG-TERM
EFFICACY AND IMMUNE RESPONSES
FOLLOWING IMMUNIZATION WITH THE
RTS,S MALARIA VACCINE", JOURNAL OF
INFECTIOUS DISEASES. JID, UNIVERSITY OF
CHICAGO PRESS, CHICAGO, IL, vol. 178,
no. 4, 1 October 1998 (1998-10-01), pages
1139-1144, XP008046110, ISSN: 0022-1899, DOI:
10.1086/515657, the whole document

ELENA MATA ET AL.: "Malaria Vaccine
Adjuvants: Latest Update and Challenges in
Preclinical and Clinical Research", BIOMED
RESEARCH INTERNATIONAL, vol. 6, no. 5,
1 January 2013 (2013-01-01), pages 599-19,
XP55208483, ISSN: 2314-6133, DOI: 10.1016/
j.ijpharm.2008.08.039, the whole document

L.C. PAOLETTI ET AL.: "Effects of Alum
Adjuvant or a Booster Dose on Immunogenicity
during Clinical Trials of Group B Streptococcal
Type III Conjugate Vaccines", INFECTION AND
IMMUNITY, vol. 69, no. 11, 1 November 2001
(2001-11-01), pages 6696-6701, XP55208551, ISSN:
0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.69.11.6696-6701.2001

GIOVANNI GABUTTI ET AL.: "Booster
Vaccination: The Role of Reduced Antigen
Content Vaccines as a Preschool Booster",
BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL, vol.
60, no. 1, 1 January 2014 (2014-01-01), pages
13-10, XP55192849, ISSN: 2314-6133, DOI:
10.4103/0974-777X.77298, the whole document

(57) Предложен способ индуцирования иммунного ответа против малярии у субъекта-человека, включающий введение субъекту первой иммуногенной композиции, содержащей RTS,S и первый адъювант, с последующим введением этому субъекту второй иммуногенной композиции, содержащей RTS,S и второй адъювант, где первую иммуногенную композицию вводят дважды перед введением второй иммуногенной композиции и где промежуток времени между введением первой композиции и введением второй композиции составляет от 4 до 8 месяцев.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам индуцирования иммунного ответа, в частности к способам иммунизации, включающим по меньшей мере два введения адъювантированной иммуногенной композиции, где при втором введении дается более низкая доза, чем в первом введении.

Предшествующий уровень техники

Вакцинация представляет собой один из наиболее эффективных способов предупреждения инфекционных заболеваний. Однако однократное введение антигена часто является недостаточным для обеспечения полного иммунитета и/или длительного ответа. Подходы к созданию сильного и длительного иммунитета к конкретным патогенам включают добавление адъювантов к вакцинам и/или повторную вакцинацию, т.е. усиление иммунного ответа посредством введения одной или более дополнительных доз антигена. Такие дополнительные введения можно выполнять с одной и той же вакциной (гомологичная реиммунизация) или с другой вакциной (гетерологичная реиммунизация). Наиболее общий подход для гомологичной реиммунизации заключается не только во введении одной и той же вакцины, но также во введении ее в той же самой дозе, что и при более раннем введении.

Одним из заболеваний, для которых до настоящего времени требуется многодозовая вакцинация, является малярия. Малярия представляет собой одну из основных проблем здравоохранения в мире. В течение 2010 года Всемирной организацией здравоохранения сообщалось о примерно 219 миллионах случаев малярии в мировом масштабе. Малярия вызывается протозойными паразитами рода *Plasmodium*.

Жизненный цикл паразита является сложным, требующим для своего завершения двух хозяев, человека и комара. Инфицирование человека начинается с заражением спорозитами посредством слюны инфицированного комара. Стадия спорозитов идентифицирована в качестве единственной потенциальной мишени малярийной вакцины. Главный поверхностный белок спорозита известен как белок циркумспорозит (белок CS). RTS,S, антиген на основе малярийного белка CS и белка вирусной оболочки вируса гепатита В, находится в процессе разработки в течение более 25 лет и в настоящее время представляет собой наиболее усовершенствованную изучаемую малярийную вакцину-кандидат. Его структура и продуцирование описаны в US 5928902, выданном 27 июля 1999 г.

В ранней работе RTS,S тестировали в небольшом клиническом испытании в комбинации с адъювантом, содержащим QS21 и 3D-MPL в ассоциации с адъювантом на основе эмульсии масло-в-воде (Stoute et al., 1997 NEJM, 336:86). Для этого исследования был запланирован график трех введений полной дозы, но вследствие установленной путем наблюдения чрезмерной реактогенности третью дозу понижали до 1/5 и вводили позже, чем планировалось первоначально. В результате этого исследования шесть из семи субъектов становились защищенными. В последующей работе использовали график трех иммунизаций полной дозой и в более поздних исследованиях также использовали график трех иммунизаций полной дозой, где RTS,S адъювантировали липосомной композицией, содержащей QS21 и 3D-MPL. Этот адъювант обозначен как AS01 и описан, например, в WO 96/33739 и WO 2007/068907. Современные данные III фазы крупномасштабного клинического испытания, где RTS,S/AS01 вводили тремя идентичными дозами с интервалом один месяц, показали, что в течение 18 месяцев последующего наблюдения RTS,S/AS01 практически наполовину снизил число случаев малярии у маленьких детей (возраст 5-17 месяцев в момент первой вакцинации) и понижал примерно на четверть случаи малярии у младенцев (возраст 6-12 недель в момент первой вакцинации) в течение периода наблюдения 18 месяцев.

Несмотря на то, что в области исследования и разработки вакцин был достигнут значительный прогресс, по-прежнему существует потребность в новых иммуногенных композициях и способах иммунизирования против заболеваний, включая малярию, которые являются в высокой степени эффективными, безопасными, рентабельными, длительно действующими и индуцируют широкий спектр перекрестно-реактивных иммунных ответов.

Краткое изложение сущности изобретения

Неожиданно было обнаружено, что при многодозовом способе иммунизирования с использованием адъювантированной малярийной вакцины иммунизация была более эффективной, когда последующую дозу (бустерную дозу) понижали по сравнению с более ранней дозой (примирующей дозой), чем когда дозы были одинаковыми. Используемый адъювант содержал агонист TLR4, 3D-MPL и иммунологически активную сапониновую фракцию QS21.

Таким образом, в первом аспекте изобретения предлагается способ индуцирования иммунного ответа против малярии у субъекта-человека, включающий введение субъекту первой иммуногенной композиции, содержащей RTS,S и первый адъювант, с последующим введением этому субъекту второй иммуногенной композиции, содержащей RTS,S и второй адъювант, где первый и второй адъюванты содержат 3D-MPL (3-О-деацелированный монофосфорил-липид А) и QS21 в липосомальной композиции в виде эмульсии и где первый адъювант содержит от 25 до 75 мкг 3D-MPL и от 25 до 75 мкг QS21 и второй адъювант содержит от 5 до 15 мкг 3D-MPL и от 5 до 15 мкг QS21, где первая иммуногенная композиция содержит от 25 до 75 мкг RTS,S и вторая иммуногенная композиция содержит от 5 до 15 мкг RTS,S;

где первую иммуногенную композицию вводят дважды перед введением второй иммуногенной композиции,

где промежуток времени между введением первой композиции и введением второй композиции со-

ставляет от 4 до 8 месяцев.

В одном воплощении вторая иммуногенная композиция содержит по меньшей мере в три раза меньше, например по меньшей мере в четыре раза меньше, например по меньшей мере в пять раз меньше, например по меньшей мере в шесть раз меньше, например по меньшей мере в семь раз меньше, например по меньшей мере в восемь раз меньше, например по меньшей мере в девять раз меньше, например по меньшей мере в десять раз меньше, например по меньшей мере в 15 раз меньше количества указанного RTS,S и адьюванта.

В еще одном воплощении вторая иммуногенная композиция содержит в 2-15 раз меньше, например в 2-10 раз меньше, например в 3-7 раз меньше, например в 4-6 раз меньше количества указанного RTS,S и адьюванта.

В одном воплощении первый и второй адьюванты дополнительно содержат стерин.

В одном воплощении первый адьювант содержит 50 мкг 3D-MPL и 50 мкг QS21 и второй адьювант содержит 10 мкг 3D-MPL и 10 мкг QS21.

В еще одном воплощении промежуток времени между введением первой композиции и введением второй композиции составляет от 7 до 8 месяцев.

В еще одном воплощении через промежуток времени по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20 или более месяцев после введения второй композиции вводят вторую композицию еще один или более раз.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: Процент вакцинированных субъектов, у которых не развивалась паразитемия в течение 28 суток периода наблюдения после контрольного заражения. Fx означает группу с отсроченной неполной дозой; RRR означает группу 0, 1, 2 месяца; CTL означает контрольную группу.

Фиг. 2а-2в: Последовательность RTS,S согласно US 5928902, выданному 27 июля 1999 г.

Фиг. 3а, 3б: Последовательность антигена VZV.

Фиг. 4а: 4/30 субъектов в группе RRг с развившейся паразитемией (VE=87% [95% CI: 67, 95]); 6/16 субъектов в группе RRR с развившейся паразитемией (VE=63% [95% CI: 20, 80]).

Фиг. 4б: Анализ, сравнивающий результаты в группе исследования с отсроченной неполной дозой относительно пула данных для 95 субъектов, исследованных в пяти испытаниях с RTS,S/AS01 0, 1, 2 месяца, завершающихся в настоящее время.

Фиг. 5а, 5б: Исследование дробной бустер-иммунизации через 6 месяцев после завершающей дозы с последующим контрольным заражением спорозитами спустя месяц. Субъектам, которые не были защищены после первого контрольного заражения, предлагали неполную бустер-иммунизацию. Субъектов, которые были защищены после первого контрольного заражения, рандомизировали для получения или не получения неполной бустер-иммунизации с последующим контрольным заражением спорозитами спустя месяц.

Фиг. 5а: Субъекты не получали бустерную дозу в месяц 12.

Фиг. 6: CD4 Т-клеточные иммунные ответы у мышей, которым вводили M72 в стандартном и отсроченном режимах.

Фиг. 7: CD8 Т-клеточные иммунные ответы у мышей, которым вводили M72 в стандартном и отсроченном режимах.

Фиг. 8: Цитокиновый профиль CD4 Т-клеток у мышей, которым вводили M72 в стандартном и отсроченном режимах.

Фиг. 9: Цитокиновый профиль CD8 Т-клеток у мышей, которым вводили M72 в стандартном и отсроченном режимах.

Фиг. 10: Анти-M72 серология у мышей, которым вводили M72 в стандартном и отсроченном режимах.

Краткое описание идентификаторов последовательностей

SEQ ID NO: 1: Аминокислотная последовательность RTS,S, как раскрыто в данном описании изобретения.

SEQ ID NO: 2: Аминокислотная последовательность VZV, как раскрыто в данном описании изобретения.

SEQ ID NO: 3: Аминокислотная последовательность M72, как раскрыто в данном описании изобретения.

SEQ ID NO: 4: Аминокислотная последовательность белка M72 с двумя N-концевыми His-остатками, как раскрыто в данном описании изобретения.

Подробное описание изобретения

Как описано выше, в первом аспекте изобретения относится к способу индуцирования иммунного ответа против малярии у субъекта-человека, включающему введение субъекту первой иммуногенной композиции, содержащей RTS,S и первый адьювант, с последующим введением этому субъекту второй

иммуногенной композиции, содержащей RTS,S и второй адъювант, где первый и второй адъюванты содержат 3D-MPL (3-О-деацелированный монофосфорил-липид А) и QS21 в липосомальной композиции в виде эмульсии и где первый адъювант содержит от 25 до 75 мкг 3D-MPL и от 25 до 75 мкг QS21 и второй адъювант содержит от 5 до 15 мкг 3D-MPL и от 5 до 15 мкг QS21, где первая иммуногенная композиция содержит от 25 до 75 мкг RTS,S и вторая иммуногенная композиция содержит от 5 до 15 мкг RTS,S;

где первую иммуногенную композицию вводят дважды перед введением второй иммуногенной композиции, и

где промежуток времени между введением первой композиции и введением второй композиции составляет от 4 до 8 месяцев.

При использовании в данном описании изобретения введение первой композиции "с последующим" введением второй композиции указывает на то, что между введением первой композиции и введением второй композиции имеется определенный промежуток времени.

Общий антиген не представляет собой RTS,S, и вторая композиция содержит меньшее количество общего антигена, чем первая композиция.

Обычно цель способа по изобретению состоит в том, чтобы индуцировать защитный иммунный ответ, т.е. иммунизировать или вакцинировать субъекта против патогена, из которого происходит антиген. В одном воплощении эффективность вакцины способа по изобретению улучшена по сравнению со схемой лечения, в которой первая композиция и вторая композиция являются идентичными. Например, эффективность вакцины, как определено согласно Примеру в данном описании изобретения, может быть улучшена по меньшей мере на 10%, например на 25%. В одном воплощении достигается эффективность вакцины более чем 80%, такая как более 90%, как определено согласно Примеру в данном описании изобретения. Таким образом, способ можно применять для предупреждения (т.е. профилактики) инфекционных заболеваний. Альтернативно, способ можно применять в иммунотерапии, т.е. в лечении заболевания, такого как рак, посредством индукции или усиления иммунного ответа.

Адъюванты для применения в способе по изобретению.

Как описано выше, в одном аспекте изобретения первый адъювант и второй адъювант содержат агонист TLR и/или иммунологически активный сапонин, и у них по меньшей мере один из этих двух компонентов является общим.

Таким образом, в одном воплощении и первый адъювант и второй адъювант содержат агонист TLR. В другом воплощении и первый адъювант и второй адъювант содержат иммунологически активный сапонин. В еще одном воплощении и первый адъювант и второй адъювант содержат агонист TLR и иммунологически активный сапонин.

В одном воплощении первый адъювант и второй адъювант состоят из одних и тех же компонентов. Таким образом, в таком воплощении компоненты обоих адъювантов являются одинаковыми, хотя необязательно в одних и тех же относительных долях. Например, оба из первого адъюванта и второго адъюванта могут состоять из агониста TLR и сапонина в липосомальной композиции, но соотношение агониста TLR и сапонина может составлять 5:1 в первом адъюванте и 1:1 во втором адъюванте. Альтернативно, соотношение агониста TLR и сапонина может составлять 4:1 в первом адъюванте и 1:1 во втором адъюванте, 3:1 в первом адъюванте и 2:1 во втором адъюванте, 1:1 в первом адъюванте и 1:1 во втором адъюванте.

В другом воплощении первый адъювант и второй адъювант состоят из одних и тех же компонентов, и относительные доли этих компонентов являются одинаковыми. Однако в таком воплощении, хотя относительные доли компонентов адъюванта являются одинаковыми, абсолютные количества этих компонентов могут различаться между первой и второй иммуногенными композициями. Например, абсолютные количества всех компонентов во втором адъюванте могут, например, составлять одну пятую абсолютных количеств всех компонентов в первом адъюванте.

Как описано выше, в одном воплощении второй адъювант содержит меньшее количество общего компонента (т.е. меньшее количество агониста TLR, или меньшее количество сапонина, или меньшее количество того и другого), чем первый адъювант.

В одном воплощении меньшее количество общего компонента во втором адъюванте составляет на 10% меньше, например по меньшей мере на 25% меньше, например по меньшей мере в два раза меньше, например по меньшей мере в три раза меньше, например по меньшей мере в четыре раза меньше, например по меньшей мере в пять раз меньше, например по меньшей мере в шесть раз меньше, например по меньшей мере в семь раз меньше, например по меньшей мере в восемь раз меньше, например по меньшей мере в девять раз меньше, например по меньшей мере в десять раз меньше, например по меньшей мере в 15 раз меньше, например по меньшей мере в 20 раз меньшее количество, чем в первом адъюванте.

В другом воплощении меньшее количество общего компонента во втором адъюванте составляет меньше в 2-50 раз, например меньше в 2-20 раз, например меньше в 2-15 раз, например меньше в 2-10 раз, например меньше в 3-7 раз, например количество, меньше в 4-6 раз, чем в первом адъюванте.

Как описано выше, в одном воплощении первый адъювант и второй адъювант содержат агонист TLR (Toll-подобного рецептора). Применение агонистов TLR в адъювантах хорошо известно в данной области техники и было проанализировано, например, в Lahiri et al. (2008), Vaccine 26:6777. TLR, кото-

рые можно стимулировать для получения адьювантного эффекта, включают агонисты TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 и TLR9. Предпочтительными являются агонисты TLR2, TLR4, TLR7 и TLR8, особенно агонисты TLR4.

Подходящие агонисты TLR4 включают липополисахариды, например монофосфориллипид А (MPL) и 3-О-деацелированный монофосфориллипид А (3D-MPL). В патенте US 4436727 раскрыт MPL и его изготовление. В патенте US 4912094 и в свидетельстве о произведенной повторной экспертизе на патентоспособность В1 4912094 раскрыт 3D-MPL и способ его изготовления. Другой агонист TLR4 представляет собой глюкопиранозил-липидный адьювант (GLA), молекулу, подобную синтетическому липиду А (см., например, Fox et al. (2012), Clin. Vaccine Immunol. 19:1633). В еще одном воплощении агонист TLR4 может представлять собой синтетический агонист TLR4, такой как молекула синтетического дисахарида, подобного по структуре MPL и 3D-MPL, или может представлять собой молекулы синтетического моносахарида, такого как соединения аминоалкилглюкозаминидфосфата (AGP), раскрытые, например, в WO 98/50399, WO 01/34617, WO 02/12258, WO 03/65806, WO 04/62599, WO 06/16997, WO 06/12425, WO 03/66065 и WO 01/90129. Такие молекулы также были описаны в научной и патентной литературе как миметики липида А. Миметики липида А соответствующим образом имеют определенную общую функциональную и/или структурную активность с липидом А и в одном аспекте распознаются рецепторами TLR4. AGF, как они раскрыты в данном описании изобретения, иногда называются в данной области техники миметиками липида А. В предпочтительном воплощении агонист TLR4 представляет собой 3D-MPL. Агонисты TLR4, такие как 3-О-деацелированный монофосфориллипид А (3D-MPL), и их применение в качестве адьювантов в вакцинах было описано, например, в WO 96/33739 и WO 2007/068907 и рассмотрено в Alving et al. (2012), Curr Opin in Immunol 24:310.

В еще одном воплощении способа по изобретению первый адьювант и второй адьювант содержат иммунологически активный сапонин, такой как фракция иммунологически активного сапонина, такая как QS21.

Адьюванты, содержащие сапонины, были описаны в данной области техники. Сапонины описаны в Lacaille-Dubois and Wagner (1996), A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2:363. Сапонины известны в качестве адьювантов в вакцинах. Например, адьювантной активностью обладает Quil А (полученный из коры южно-американского дерева Quillaja Saponaria Molina), описанный в Dalsgaard et al. in 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, 243). Очищенные фракции Quil А, которые были выделены посредством ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография), сохраняют адьювантную активность без токсичности, ассоциированной с Quil А (Kensil et al. (1991), J. Immunol. 146:431). Фракции Quil А также описаны в US 5057540 и "Saponins vaccine adjuvants", Kensil, C.R., Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst., 1996, 12(1-2):1-55.

Две такие фракции, подходящие для применения в настоящем изобретении, представляют собой QS7 и QS21 (также известные как QA-7 и QA-21). QS21 представляет собой предпочтительную иммунологически активную сапониновую фракцию для применения в настоящем изобретении. QS21 была рассмотрена в Kensil (2000), In O'Hagan: Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey, Chapter 15. Адьювантные системы в виде частиц, содержащие фракции Quil А, такие как QS21 и QS7, описаны, например, в WO 96/33739, WO 96/11711 и WO 2007/068907.

В дополнение к другим компонентам, адьювант предпочтительно содержит стерин. Присутствие стерина может дополнительно снижать реактогенность композиций, содержащих сапонины, см., например, EP 0822831. Подходящие стеринны включают бета-ситостерин, стигмастерин, эргостерин, эргокальциферол и холестерин. Холестерин является особенно подходящим. Соответствующим образом, фракция иммунологически активного сапонина представляет собой QS21, и соотношение QS21:стерин составляет от 1:100 до 1:1 мас./мас., например от 1:10 до 1:1 мас./мас., например от 1:5 до 1:1 мас./мас..

В предпочтительном воплощении способа по изобретению агонист TLR4 представляет собой 3D-MP, и иммунологически активный сапонин представляет собой QS21.

В некоторых воплощениях адьювант представлен в форме эмульсии масло-в-воде, например, содержащей сквален, альфа-токоферол и поверхностно-активное вещество (см., например, WO 95/17210) или в форме липосомы. Представление в виде липосом является предпочтительным.

Термин "липосома" при использовании в данном описании изобретения относится к одно- или многослойным (конкретно к 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- или 10-слойным, в зависимости от числа образованных липидных мембран) липидным структурам, включающим водную внутреннюю область. Липосомы и липосомальные композиции хорошо известны в данной области техники. Липосомальные препараты описаны, например, в WO 96/33739 и WO 2007/068907. Липиды, которые способны к образованию липосом, включают все вещества, обладающие свойствами жиров или жироподобных веществ. Липиды, которые могут являться липидами в липосомах, можно выбирать из группы, содержащей глицериды, глицерофосфолипиды, глицерофосфинолипиды, глицерофосфонолипиды, сульфолипиды, сфинголипиды, фосфолипиды, изопренолипиды, стероиды, стеарины, стеринны, археолипиды, синтетические катионные липиды и липиды, содержащие углеводы. В конкретном воплощении изобретения липосомы содержат фосфолипид. Подходящие фосфолипиды включают (но без ограничения ими) фосфохолин (PC), который

является промежуточным соединением в синтезе фосфатидилхолина; натуральные фосфолипидные производные: яичный фосфохолин, соевый фосфохолин, гидрогенизированный соевый фосфохолин, сфингомиелин в качестве натуральных фосфолипидов; и синтетические фосфолипидные производные: фосфохолин (дидеканоил-L- α -фосфатидилхолин [DDPC], дилауроилфосфатидилхолин [DLPC], димиристоилфосфатидилхолин [DMPC], дипальмитоил-фосфатидилхолин [DPPC], дистеароил-фосфатидилхолин [DSPC], диолеил-фосфатидилхолин [DOPC], 1-пальмитоил, 2-олеоил-фосфатидилхолин [POPC], диэлаидоил-фосфатидилхолин [DEPC]), фосфоглицерин-(1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин [DMPG], 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин [DPPG], 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин [DSPG], 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфоглицерин [POPG]), фосфатидную кислоту (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидную кислоту [DMPA], дипальмитоилфосфатидную кислоту [DPPA], дистеароилфосфатидную кислоту [DSPA]), фосфоэтаноламин (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин [DMPE], 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин [DPPE], 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин [DSPE], 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин [DOPE]), фосфосерин, полиэтиленгликоль [PEG] фосфолипид.

Размер липосом может варьировать от 30 нм до нескольких микрометров в зависимости от состава фосфолипида и способа, используемого для их изготовления. В конкретных воплощениях изобретения размер липосом находится в диапазоне от 50 до 500 нм и в еще других воплощениях от 50 до 200 нм. Динамическое лазерное светорассеяние является способом, применяемым для измерения размера липосом, хорошо известным специалисту в данной области техники.

В особенно подходящем воплощении липосомы, применяемые в изобретении, содержат DOPC и стерин, в частности холестерин. Таким образом, в конкретном воплощении композиции по изобретению содержат QS21 в любом количестве, описанном в данном изобретении, в форме липосомы, где указанная липосома содержит DOPC и стерин, в частности холестерин.

Предпочтительно первый адъювант и второй адъювант содержат 3D-MPL и QS21 в липосомальной композиции.

В одном воплощении первый адъювант содержит от 25 до 75 мкг, например 50 мкг, 3D-MPL и от 25 до 75 мкг, например 50 мкг, QS21 в липосомной композиции и второй адъювант содержит от 5 до 15 мкг, например 10 мкг, 3D-MPL и от 5 до 15 мкг, например 10 мкг, QS21 в липосомальной композиции.

В другом воплощении первый адъювант содержит от 12,5 до 37,5 мкг, например 25 мкг, 3D-MPL и от 12,5 до 37,5 мкг, например 25 мкг, QS21 в липосомальной композиции и второй адъювант содержит от 2,5 до 7,5 мкг, например 5 мкг, 3D-MPL и от 2,5 до 7,5 мкг, например 5 мкг, QS21 в липосомальной композиции.

В другом воплощении первый адъювант содержит от 12,5 до 37,5 мкг, например от 20 до 30 мкг (например, примерно или точно 25 мкг) 3D-MPL и от 12,5 до 37,5 мкг, например от 20 до 30 мкг (например, примерно или точно 25 мкг) QS21 в липосомальной композиции, и второй адъювант содержит пониженное количество 3D-MPL или QS21, например от 2,5 до 20 мкг, например от 2,5 до 10 мкг (например, примерно или точно 5 мкг), 3D-MPL и например от 2,5 и 20 мкг, например от 2,5 до 10 мкг (например, примерно или точно 5 мкг), QS21 в липосомальной композиции. Соответствующим образом в первом и втором адъювантах количество 3D-MPL является таким же, как количество QS21.

Хорошо известно, что растворы для парентерального введения должны быть физиологически изотоническими (т.е. иметь фармацевтически приемлемую осмоляльность), чтобы избежать деформирования или лизиса клеток. Фармацевтически приемлемая осмоляльность обычно означает, что растворы имеют осмоляльность, которая является приблизительно изотонической или умеренно гипертонической. Соответствующим образом, иммуногенные композиции по настоящему изобретению имеют осмоляльность в диапазоне от 250 до 750 мОсм/кг, например, осмоляльность может находиться в диапазоне от 250 до 550 мОсм/кг, например в диапазоне от 280 до 500 мОсм/кг. Осмоляльность можно измерять согласно методикам, известным в данной области техники, например посредством использования имеющегося в продаже осмометра, например Advanced® Model 2020, выпускаемого Advanced Instruments Inc. (USA). "Изотонический агент" представляет собой соединение, которое переносимо физиологически и придает подходящую тоничность композиции (например, иммуногенным композициям по изобретению) для предупреждения истекания воды через клеточные мембраны, которые находятся в контакте с композицией. Известны водные адъювантные композиции, которые содержат 100 мМ хлорида натрия или более, например адъювантная система А (ASA) в WO 2005/112991 и WO 2008/142133, или липосомальные адъюванты, раскрытые в WO 2007/068907.

В некоторых воплощениях изотонический агент, используемый для композиции, представляет собой соль. В других воплощениях, однако, композиция содержит неионный изотонический агент, и концентрация хлорида натрия или ионная сила в композиции составляет менее 100 мМ, например менее 80 мМ, например менее 30 мМ, например менее 10 мМ или менее 5 мМ. В предпочтительном воплощении неионный изотонический агент представляет собой полиол, такой как сорбит. Концентрация сорбита может составлять, например, от примерно 3 до примерно 15 мас./об.%, например от примерно 4 до примерно 10 мас./об.%. Адъюванты, содержащие иммунологически активную сапониновую фракцию и аго-

нист TLR4, где изотонический агент представляет собой соль или полиол, были описаны в WO 2010/142685, см., например, примеры 1 и 2 в WO 2010/142685.

В еще одном воплощении первый адъювант и/или второй адъювант не содержат алюминий.

Антигены для применения в способах по изобретению.

В одном воплощении способа по изобретению вторая композиция содержит меньшее количество общего антигена, чем первая композиция.

В одном воплощении меньшее количество общего антигена во второй композиции по меньшей мере на 10% меньше, например по меньшей мере на 25% меньше, например по меньшей мере в два раза меньше, например по меньшей мере в три раза меньше, например по меньшей мере в четыре раза меньше, например по меньшей мере в пять раз меньше, например по меньшей мере в шесть раз меньше, например по меньшей мере в семь раз меньше, например по меньшей мере в восемь раз меньше, например по меньшей мере в девять раз меньше, например по меньшей мере в десять раз меньше, например по меньшей мере в 15 раз меньше, например по меньшей мере в 20 раз меньше, чем количество антигена в первой композиции.

В другом воплощении меньшее количество общего антигена во второй композиции в 2-50 раз меньше, например в 2-20 раз меньше, например в 2-15 раз меньше, например в 2-10 раз меньше, например в 3-7 раз меньше, например в 4-6 раз меньше, чем количество антигена в первой композиции.

Как описано выше, первая иммуногенная композиция и вторая иммуногенная композиция имеют по меньшей мере один общий антиген. В некоторых воплощениях все антигены в первой и второй композициях являются одними и теми же.

В одном воплощении общий антиген представляет собой антиген Plasmodium, такой как антиген *P. falciparum* или *P. vivax*. В одном воплощении общий антиген представляет собой белок циркумспорозит (CS) или его иммуногенный фрагмент или вариант, такой как белок CS *P. falciparum* или его иммуногенный фрагмент или вариант или белок CS *P. vivax* или его иммуногенный фрагмент или вариант.

В другом воплощении общий антиген представляет собой CelTOS (Genbank Accession number Q8I5P1: *P. falciparum* 3D7 CelTOS; также GenBank: AAN36249), TRAP (Genbank Accession: CAD52497.1 GL23615505) или Pfs25 (Genbank Accession number: AAN35500.1 GL23495169) или иммуногенный фрагмент или вариант CelTOS, TRAP и/или Pfs25.

В еще одном воплощении общий антиген представляет собой иммуногенный белок, состоящий из поверхностного антигена S из вируса гепатита В (HBsAg) или его иммуногенного фрагмента, или иммуногенный белок, содержащий HBsAg или его иммуногенный фрагмент, например слитый белок HBsAg с другим антигеном.

В еще одном воплощении общий антиген представляет собой антиген VZV (вирус Варицелла-Зостер). Один пример антигена VZV представляет собой гликопротеин gE (также известный как gp1) VZV или его иммуногенное производное. Белок gE дикого типа или полноразмерный белок gE состоит из 623 аминокислот, содержащих сигнальный пептид, основную часть белка, область гидрофобного якоря (остатки 546-558) и С-терминальный хвост. В одном аспекте используют gE с усеченным С-концом (также называющийся усеченный gE или gE-усечением), где путем усечения удаляется от 4 до 20 процентов от суммарных аминокислотных остатков на карбокси-терминальном конце. В еще одном аспекте усеченный gE не имеет карбокси-терминальной якорной области (соответствующим образом, приблизительно аминокислоты 547-623 последовательности дикого типа). В еще одном аспекте gE представляет собой усеченный gE, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2.

Антиген gE, его безъякорные производные (которые также являются иммуногенными производными) и их продуцирование описаны в EP 0405867 и в ссылках, приведенных в этом документе (см. также Vafai (1994), Vaccine, 12:1265). В EP 192902 также раскрыт gE и его продуцирование. Усеченный gE, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, также раскрыт Naumont et al. Virus Research (1996), 40:199, включено в данное описание изобретения полностью посредством ссылки.

В еще одном воплощении общий антиген представляет собой антиген цитомегаловируса (CMV), такой как gB или его иммуногенный фрагмент или вариант. Подходящие антигены, произведенные из gB, описаны в WO 2012/049317, которая опубликована в США в виде US 2013216613 и которая включена посредством ссылки для цели описания подходящих белков для применения в настоящем изобретении.

В еще одном воплощении общий антиген представляет собой антиген респираторно-синцитиального вируса (RSV), такой как F-белок RSV или его иммуногенный фрагмент или вариант. Подходящие антигены, произведенные из F-белка, описаны в WO 2010/149745, например варианты F-белка, представленные в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 22 в WO 2010/149745. Другие подходящие антигены RSV описаны в WO 2011/008974 и WO 2012/158613.

В еще одном воплощении общий антиген представляет собой антиген вируса денге, такой как инактивированный или живой ослабленный цельный вирус денге. Композиция может быть мультивалентной и содержать, например, четыре или более штамма денге.

В еще одном воплощении общий антиген представляет собой антиген *Haemophilus influenzae*, такой как белок E и/или Pilin A или их иммуногенные фрагменты или варианты, например, описанные в WO 2012/139225.

В еще одном воплощении общий антиген представляет собой антиген *M. tuberculosis*, такой как антиген M72, например антиген, описанный в WO 2006/117240, по которой выдан патент US 8470338 и которая включена посредством ссылки для цели описания подходящих белков для применения в настоящем изобретении.

Представляющие интерес антигены *M. tuberculosis* включают последовательности, содержащие (или состоящие из):

Rv0125, также известный как Mtb32a, такой как раскрыто в SEQ ID NO: 20 или 21 согласно WO 2010/0010177;

Rv0915, также известный как MTCC2 или Mtb41, такой как раскрыто в SEQ ID NO: 14 согласно WO 2010/0010177;

Rv1174, также известный как DPV, такой как раскрыто в SEQ ID NO: 8 согласно WO 2010/0010177;

Rv1196, также известный как Mtb39 или TbH9, такой как раскрыто в SEQ ID NO: 13 согласно WO 2010/0010177;

Rv1753, такой как раскрыто в SEQ ID NO: 1 и 2-7 согласно WO 2010/0010180;

Rv1793, также известный как MPT или Mtb9.9, такой как раскрыто в SEQ ID NO: 10 согласно WO 2010/0010177;

Rv2087, также известный как MSL или Mtb9.8, такой как раскрыто в SEQ ID NO: 9 согласно WO 2010/0010177;

Rv2386, такой как раскрыто в SEQ ID NO: 1 и 2-7 согласно WO 2010/0010179;

Rv3616, также известный как HTCC1 или Mtb40, такой как раскрыто в SEQ ID NO: 1 и 2-7 WO 2010/0010177 или SEQ ID NO: 161-169, 179 или 180 согласно WO 2011/092253;

или содержащие (или состоящие из) иммуногенные фрагменты меньшей мере из 20 (например, по меньшей мере 50) остатков любой из вышеупомянутых последовательностей или содержащие (или состоящие из) варианты, имеющие идентичность по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95 или 98%) с любой из вышеупомянутых последовательностей.

Представляющие интерес слитые антигены *M. tuberculosis* включают антигены, произведенные из Mtb72f, как представлено в SEQ ID NO: 23 согласно WO 2010/0010177; или M72, как представлено в SEQ ID NO: 3 в данном описании изобретения. Представляющие особый интерес антигены M72 представляют собой антигены, содержащие (или состоящие из) аминокислотную последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95 или 98%) с SEQ ID NO: 3 в данном описании изобретения, такие как последовательности, содержащие остатки со 2 по 723 из SEQ ID NO: 3 (например, SEQ ID NO: 4 в данном описании изобретения).

Другие представляющие интерес антигены *M. tuberculosis* включают последовательности, содержащие (или состоящие из):

ESAT-6 (также известный как esxA и Rv3875), полипептидная последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 103 согласно WO 97/09428 (кДНК в SEQ ID NO: 104) и в Sorensen et al Infection and Immunity, 1995, 63(5): 1710-1717. Полноразмерная полипептидная последовательность для ESAT-6 представлена в SEQ ID NO: 16 согласно WO 2010/010180;

комплексные антигены Ag85 (например, Ag85A, также известный как fbpA и Rv3804c; или Ag85B, также известный как fbpB и Rv1886c), которые рассматриваются, например, в Content et al., Infection and Immunity, 1991, 59:3205-3212 и в Huugen et al Nature Medicine, 1996, 2(8):893-898. Полноразмерная полипептидная последовательность для Ag85A представлена в SEQ ID NO: 17 согласно WO 2010/010180 (зрелый белок из остатков 43-338, т.е. не имеющий сигнального пептида, представляет особый интерес). Полноразмерная полипептидная последовательность для Ag85B представлена в SEQ ID NO: 18 согласно WO 2010/010180 (зрелый белок из остатков 41-325, т.е. не имеющий сигнального пептида, представляет особый интерес);

альфа-кристаллин (также известный как hspX и Rv2031c), который описан в Verbon et al., Journal of Bacteriology, 1992, 174:1352-1359 и Friscia et al., Clinical and Experimental Immunology, 1995, 102:53-57 (особый интерес представляют собой фрагменты, соответствующие остаткам 71-91, 21-40, 91-110 и 111-130). Полноразмерная полипептидная последовательность для альфа-кристаллина представлена в SEQ ID NO: 19 согласно WO 2010/010180;

MPT64 (также известный как Rv1980c), который описан в Roche et al., Scandinavian Journal of Immunology, 1996, 43:662-670. Полноразмерная полипептидная последовательность для MPT64 представлена в SEQ ID NO: 20 согласно WO 2010/010180 (зрелый белок из остатков 24-228, т.е. не имеющий сигнального пептида, представляет особый интерес);

TB 10.4, полноразмерная полипептидная последовательность для TB 10.4 представлена в SEQ ID NO: 23 согласно WO 2010/010180;

или содержащие (или состоящие из) иммуногенные фрагменты по меньшей мере из 20 (например, по меньшей мере 50) остатков любой из вышеупомянутых последовательностей, или содержащие (или состоящие из) вариантов, имеющих идентичность с любой из вышеупомянутых последовательностей по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95 или 98%).

Иммуногенный фрагмент может быть любой длины при условии, что он сохраняет иммуногенные

свойства. Например, фрагмент может содержать 5 или более следующих друг за другом аминокислот, например 10 или более следующих друг за другом аминокислот, например 20 или более следующих друг за другом аминокислот, например 50 или более следующих друг за другом аминокислот, например 100 или более следующих друг за другом аминокислот соответствующего белка.

В еще одном воплощении общий антиген содержит или состоит из вариант(а) соответствующий(его) белок(а).

Полипептид варианта может содержать ряд замен, предпочтительно консервативных замен (например, 1-50, например 1-25, в частности 1-10 и, главным образом, может быть изменен 1 аминокислотный остаток) по сравнению с эталонной последовательностью. Соответствующим образом такие замены не имеют место в области эпитопа и, следовательно, не оказывают значительного влияния на иммуногенные свойства антигена.

Варианты белка могут также включать те варианты, в которые по сравнению с референсной последовательностью вставлены дополнительные аминокислоты, например, такие вставки могут иметь место в 1-10 положениях (например, в 1-5 положениях, соответствующим образом в 1 или 2 положениях, в частности в 1 положении) и могут, например, включать добавление 50 или меньшего числа аминокислот в каждом положении (например, 20 или меньше, в частности 10 или меньше, главным образом 5 или меньше). Соответствующим образом такие вставки не имеют место в области эпитопа и, следовательно, не оказывают значительного влияния на иммуногенные свойства антигена. Один пример вставок включает короткий отрезок гистидиновых остатков (например, 2-6 остатков) для содействия экспрессии и/или очистке антигена, о котором идет речь.

Варианты также включают такие, где по сравнению с референсной последовательностью были удалены аминокислоты, например, такие делеции могут иметь место в 1-10 положениях (например, в 1-5 положениях, соответствующим образом в 1 или 2 положениях, в частности в 1 положении) и могут, например, включать удаление 50 или меньшего числа аминокислот в каждом положении (например, 20 или меньше, в частности 10 или меньше, главным образом 5 или меньше). Соответствующим образом такие делеции не имеют место в области эпитопа и, следовательно, не имеют значительного влияния на иммуногенные свойства антигена.

Специалисту будет понятно, что конкретный вариант белка может содержать замены, делеции и вставки (или их любую комбинацию).

Варианты предпочтительно проявляют идентичность по меньшей мере примерно 70%, более предпочтительно идентичность по меньшей мере примерно 80% и наиболее предпочтительно идентичность по меньшей мере примерно 90% (например, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 98% или по меньшей мере примерно 99%) с ассоциированной референсной последовательностью.

Примеры алгоритмов, которые являются подходящими для определения процента идентичности последовательностей и подобия последовательностей, представляют собой алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al., *Nuc. Acid Res.* 25:3389-3402 (1977) и Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990) соответственно.

Подходящий вариант белка CS может представлять собой вариант, где части белка CS находятся в форме гибридного белка с поверхностным антигеном S из вируса гепатита В (HBsAg). Антиген варианта CS может, например, находиться в форме гибридного белка, содержащего по существу всю С-концевую часть белка CS, четыре или более tandemных повторов иммунодоминантной области белка CS и HBsAg. Гибридный белок может содержать последовательность, которая содержит по меньшей мере 160 аминокислот и которая по существу является гомологичной С-концевой части белка CS, но лишена гидрофобной якорной последовательности. Белок CS может быть лишен последних 12 аминокислот с С-конца. Кроме того, он может содержать 4 или более, например 10 или более повторяющихся мотивов тетрапептида Asn-Ala-Asn-Pro (NANP).

Гибридный белок для применения в изобретении может представлять собой белок, который содержит часть белка CS P. *Falciparum*, по существу которая соответствует аминокислотам 207-395 клона 3D7 P. *falciparum*, произведенного из штамма NF54, слитую в рамке с N-концом HBsAg посредством линейного линкера. Линкер может содержать часть preS2 из HBsAg. Конструкты CS, подходящие для применения в настоящем изобретении, описаны в WO 93/10152, по которой были выданы патенты США US 5928902 и 6169171, которые оба включены посредством ссылки для цели описания подходящих белков для применения в настоящем изобретении.

Конкретный гибридный белок для применения в изобретении представляет собой гибридный белок, известный как RTS (фиг. 2 и SEQ ID NO: 1), описанный в WO 93/10152 (где он обозначается RTS*, и в WO 98/05355), который состоит из

остатка метионина трех аминокислотных остатков Met Ala Pro,

отрезка из 189 аминокислот, представляющих собой аминокислоты с 207 по 395 штамма 3D7 белка CS P. *falciparum*,

остатка глицина,

четырёх аминокислотных остатков Pro Val Thr Asn, представляющих собой четыре остатка карбокси-конца белка preS2 вируса гепатита В (серотип adw), и

отрезка из 226 аминокислот, кодированных нуклеотидами с 1653 по 2330, и определяющего белок S вируса гепатита В (серотип adw).

RTS может быть в форме смешанных частиц RTS,S. Частицы RTS,S содержат два полипептида, RTS и S, которые могут быть синтезированы одновременно и самопроизвольно образуют сложные структуры в виде частиц (RTS,S).

Белок RTS может быть экспрессирован в дрожжах, например *S. cerevisiae*. В таком хозяине RTS будет экспрессироваться в виде липопротеиновых частиц. Дрожжевой штамм-реципиент может уже нести в своем геноме несколько интегрированных копий кассеты экспрессии S гепатита В. Следовательно, полученный штамм синтезирует два полипептида, S и RTS, которые самопроизвольно собираются в смешанные (RTS,S) липопротеиновые частицы. Эти частицы могут презентировать последовательности белка CS гибрида на своей поверхности. RTS и S в этих смешанных частицах могут быть представлены в конкретном соотношении, например 1:4.

RTS,S рассматриваются, например, в Vekemans et al. (2009), *Vaccine*, 275:G67 и Regules et al. (2011), *Expert Rev. Vaccines*, 10:589.

В одном воплощении первая иммуногенная композиция содержит от 25 до 75 мкг, например 50 мкг, RTS,S, и вторая иммуногенная композиция содержит от 5 до 15 мкг, например 10 мкг, RTS,S.

В другом воплощении первая иммуногенная композиция содержит от 12,5 до 37,5 мкг, например 25 мкг, RTS,S, и вторая иммуногенная композиция содержит от 2,5 до 7,5 мкг, например 5 мкг, RTS,S.

В еще одном воплощении общий антиген получают из белка CS *P. vivax*. Были описаны подходящие варианты белка CS *P. vivax*. Например, в WO 2008/009652, которая опубликована в США как US 20100150998 и включена посредством ссылки для цели описания подходящих белков для применения в настоящем изобретении, описаны иммуногенные гибридные слитые белки, содержащие (а) по меньшей мере одну повторяющуюся единицу, полученную из повторяющейся области белка циркумспорозоита *P. vivax* типа I; (б) по меньшей мере одну повторяющуюся единицу, полученную из повторяющейся области белка циркумспорозоита *P. vivax* типа II; и (в) поверхностный антиген S, полученный из вируса гепатита В, или его фрагмент. SEQ ID NO: 17 из WO 2008/009652 описывает конкретный гибридный слитый белок, называемый CSV-S. При совместном экспрессировании с поверхностным антигеном S, полученным из вируса гепатита В, образуются частицы CSV-S,S (WO 2008/009652). Такие частицы также можно применять в настоящем изобретении.

В еще одном воплощении общий антиген представляет собой смешанную частицу, содержащую RTS и CSV-S. Такие частицы были описаны в WO 2008/009650, которая опубликована в США как US20100062028 и включена посредством ссылки для цели описания подходящих белков для применения в настоящем изобретении.

Графики иммунизации, целевые популяции и способы введения.

Как описано выше, способ по изобретению включает введение первой иммуногенной композиции, содержащей один или более антигенов и первый адьювант, с последующим введением второй иммуногенной композиции, содержащей один или более антигенов и второй адьювант.

В одном воплощении промежуток времени между первичным введением первой композиции и введением второй композиции составляет от 1 до 24 месяцев, например от 1 до 18 месяцев, например от 1 до 12 месяцев, например от 2 до 24 месяцев, например от 2 до 18 месяцев, например от 2 до 14 месяцев, например от 2 до 12 месяцев, от 2 до 10 месяцев, например от 3 до 9 месяцев, например от 4 до 8 месяцев, например от 7 до 8 месяцев.

В другом воплощении промежуток времени между первичным введением первой композиции и введением второй композиции сокращен, так что промежуток времени между первичным введением первой композиции и введением второй композиции составляет от 1 до 28 суток, например от 1 до 21 суток, например от 1 до 14 суток, например от 1 до 7 суток.

Способ по изобретению может включать одно или более дополнительных введений иммуногенных композиций в дополнение к первичному введению первой композиции и введению второй композиции. Например, субъект может получать многократные дозы первой композиции до введения второй композиции. Таким образом, например, в одном воплощении первую композицию вводят дважды до введения второй композиции. Альтернативно или сверх того, субъект может получать многократные дополнительные дозы второй композиции после первичного введения второй композиции. Таким образом, в одном воплощении способа по изобретению вторую композицию вводят еще один или более раз. Возможные схемы, таким образом, включают, но без ограничения ими, следующие:

- а) первая композиция, затем вторая композиция;
- б) первая композиция, затем первая композиция, затем вторая композиция;
- в) первая композиция, затем вторая композиция, затем вторая композиция;
- г) первая композиция, затем первая композиция, затем первая композиция, затем вторая композиция;
- д) первая композиция, затем первая композиция, затем вторая композиция, затем вторая композиция;
- е) первая композиция, затем вторая композиция, затем вторая композиция, затем вторая композиция;

ция.

Промежутки времени для схемы (б) могут, например, составлять 0, 1, 5 (т.е. 0, 1, 5 месяцев), или 0, 1, 6, или 0, 1, 7, или 0, 1, 8, или 0, 1, 12. Аналогичным образом, промежутки времени для схемы (в) могут, например, составлять 0, 1, 5, или 0, 1, 6, или 0, 1, 7, или 0, 1, 8, или 0, 1, 12. Укороченные промежутки для схем (б) и (в) могут, например, составлять 0, 7, 14 суток.

В еще одном воплощении вторая композиция может быть введена, например, в виде повторяющейся ежегодно бустер-инъекции, например в течение 1-5 лет или более. В одном воплощении с промежутком времени по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20 месяцев или более после введения второй композиции вводят вторую композицию еще один или более раз. В одном воплощении с промежутком времени по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 лет после введения второй композиции вводят вторую композицию еще один или более раз.

Субъект, подлежащий лечению с применением способа по изобретению, может быть любого возраста. В одном аспекте изобретения субъект представляет собой человека. Способ по изобретению можно применять в рамках программы искоренения малярии, при которой могла бы быть полезной иммунизация по существу целой популяции, т.е. всех или большинства возрастных групп. В одном воплощении, однако, при введении первой композиции субъект-человек имеет возраст старше 18 лет. В другом воплощении субъект-человек имеет возраст младше пяти лет при введении первой композиции. В еще одном воплощении субъект-человек имеет возраст 6-12 недель или 5-17 месяцев. Новая, особенно подходящая целевая популяция включает путешественников в регионы, эндемичные по малярии.

Первую и вторую композиции можно вводить при помощи различных подходящих путей, включая парентеральный, такой как внутримышечное или подкожное введение.

В одном особом воплощении вторую композицию вводят внутривенно. Термин "внутривенно" при использовании в данном описании изобретения предназначается для обозначения внесения антигенов в дерму и/или эпидермис кожи человека. Внутривенное внесение иммуногенной композиции можно выполнять с применением любого кожного способа, известного специалисту, включая, но без ограничения ими, доставку с использованием устройства с короткой иглой (устройства, содержащего микроиглу, которая имеет длину от примерно 0,2 до примерно 0,6 мм) или доставку с использованием кожного пластыря. Подходящие устройства для применения с кожными вакцинами, описанными в данном документе, включают устройства с короткой иглой, такие как описанные в US 4886499, US 5190521, US 5328483, US 5527288, US 4270537, US 5015235, US 5141496, US 5417662 и EP 1092444. Кожные вакцины также могут быть введены посредством устройств, которые ограничивают эффективную глубину проникновения иглы в кожу, такие как описанные в WO 99/34850. Также подходящими являются устройства безыгольного впрыскивания, которые доставляют жидкие вакцины в дерму при помощи безыгольного впрыскивателя жидкости или при помощи иглы. Также подходящими являются устройства для баллистической доставки порошка/частиц, в которых используется сжатый газ для увеличения скорости прохождения вакцины в порошковой форме через поверхностные слои кожи в дерму. Кожные пластыри обычно содержат подложку, которая включает твердый субстрат. Пластыри доставляют антиген и адъювант, применяемые в изобретении, в дерму или эпидермис. В особом воплощении пластыри, полезные в настоящем изобретении, содержат множество микровыступов. Микровыступы могут быть любой формы, подходящей для прокола рогового слоя, эпидермиса и/или дермы и доставки и антигена и адъюванта в эпидермис или дерму. В особом воплощении микровыступы являются биоразлагаемыми и содержат биоразлагаемый полимер.

Иммуногенные композиции, применяемые в изобретении, могут быть изготовлены путем смешивания антигена(ов) и адъюванта. Антиген(ы) может(гут) быть представлен(ы) в лиофилизированной форме или в жидкой композиции. Для каждой композиции может быть предложен набор, содержащий первый контейнер, содержащий антиген, и второй контейнер, содержащий адъювант.

Соответствующим образом, иммуногенные композиции по настоящему изобретению имеют объем дозы для человека от 0,05 до 1 мл, например от 0,1 до 0,5 мл, в частности объем дозы примерно 0,5 или 0,7 мл. Объем второй иммуногенной композиции может быть понижен и составляет, например, от 0,05 до 0,5 мл, например от 0,1 до 0,2 мл. Объемы применяемых композиций могут зависеть от пути доставки, причем меньшие дозы доставляются внутривенным путем.

Обычно при введении людям первая и вторая иммуногенные композиции содержат от 1 до 100 мкг антигена *M. tuberculosis* (например, полипептида, содержащего SEQ ID NO: 3), например от 1 до 50 мкг. Соответствующим образом первая иммуногенная композиция содержит от 1 до 50 мкг M72-родственного антигена (например, от 5 до 50 мкг), главным образом от 1 до 20 мкг (например, от 5 до 20 мкг) и, в частности, приблизительно или точно 10 мкг.

В некоторых воплощениях вторая иммуногенная композиция содержит то же самое количество M72-родственного антигена, что и первая иммуногенная композиция. Например, вторая иммуногенная

композиция содержит от 1 до 50 мкг M72-родственного антигена (например, от 5 до 50 мкг), главным образом от 1 до 20 мкг (например, от 5 до 20 мкг) и, в частности, приблизительно или точно 10 мкг.

В других воплощениях вторая иммуногенная композиция содержит пониженное количество M72-родственного антигена относительно первой иммуногенной композиции. Например, вторая иммуногенная композиция содержит от 1 до 40 мкг M72-родственного антигена (например, от 2 до 40 мкг), главным образом от 1 до 16 мкг (например, от 2 до 16 мкг) и, в частности, менее 10 мкг (например, от 1 до 8 мкг).

Идеи всех ссылок в данном документе, включая заявки на патент и выданные патенты, полностью включены в данное описание изобретения посредством ссылки. Понятно, что композиция, или способ, или процесс, определенные как "содержащие" некоторые элементы, охватывают композицию, способ или процесс (соответственно), состоящие из этих элементов. Изобретение будет дополнительно описано посредством ссылки на следующие неограничивающие примеры.

Пример 1. Вакцинация с применением RTS,S и адьюванта AS01 и экспериментального контрольного заражения малярией

Вакцина, применяемая в исследовании.

RTS,S продуцировали в дрожжах (*S. cerevisiae*) по существу так, как описано в WO 93/10152.

"Стандартная" доза RTS,S/AS01 содержит 50 мкг лиофилизированного антигена RTS,S, восстановленного в 500 мкл адьюванта AS01, содержащего иммуностимуляторы 3D-MPL® (GlaxoSmithKline Biologicals, Montana, USA) и QS21 (по 50 мкг каждого) в композиции с липосомами.

"Неполная" доза RTS,S/AS01 представляет собой 100 мкл вышеупомянутого раствора, т.е. содержит 10 мкг лиофилизированного антигена RTS,S и по 10 мкг каждого из 3D-MPL и QS21 с липосомами.

Терминология.

В данном описании изобретения стандартную дозу RTS,S/AS01 называют "R", а неполную дозу называют "r". Стандартную схему трех стандартных доз называют "RRR", а схему, в которой третья доза является неполной, называют "RRr." Схема с двумя стандартными дозами и с последующими двумя неполными дозами будет представлять собой "RRrr" и т.д.

Методика.

Клиническое испытание выполняли для оценки безопасности, реактогенности и эффективности против контрольного заражения спорозитами малярийной вакцины, содержащей антиген RTS,S, адьювантированный AS01, введенной внутримышечно здоровым, "наивным" в отношении малярии добровольцам в возрасте 18-50 лет. Группа "Отсроченной неполной дозы" получала две стандартные дозы в месяц 0 и 1 и неполную дозу (одну пятую (1/5) стандартной дозы) в месяц 7. Группа ("0, 1, 2-месяц") получала три стандартные дозы с интервалом один месяц.

Набирали 46 субъектов в две группы и случайным образом распределяли в вышеупомянутые группы "Отсроченной неполной дозы" (30 субъектов) и "0, 1, 2-месяц" (16 субъектов). 12 дополнительных субъектов представляли собой часть контроля "инфекционности", т.е. добровольцев, которые не получали никакой иммунизации, но подвергались контрольному заражению спорозитами.

В каждой группе добровольцам было необходимо подвергнуться стандартизированному первичному контрольному заражению малярией (Chulay et al. (1986), Am. J. Trop. Med. Hyg. 35:66), также обычно известному как "контрольное заражение спорозитами", примерно через 3 недели после третьей дозы любой из вышеупомянутых групп. Первичное контрольное заражение включало обеспечение возможности пяти комарам *Anopheles stephensi*, инфицированным спорозитами *P. falciparum*, питаться на каждом добровольце для контрольного заражения в течение пятиминутного периода.

После контрольного заражения за субъектами наблюдали ежедневно в течение периода времени по меньшей мере 30 суток, чтобы оценить, инфицированы ли они малярией. Основным способом обнаружения инфекции было оценивание окрашенных по Гимзе мазков периферической крови для обнаружения паразитов на бесполой стадии световой микроскопией. Присутствие паразитов на бесполой стадии указывает на то, что субъект претерпел продуктивное инфицирование с паразитами, высвободившимися из печени и развившимися до эритроцитарной стадии, и, таким образом, на то, что "стерильная" защита против контрольного заражения не была достигнута.

При первом признаке инфекции субъекты признавались положительными в отношении малярии и получали лечебную дозу хлорохина. Первичным индикатором эффективности была "стерильная" защита, т.е. у субъекта никогда не развивалась паразитемия с бесполой стадией. Кроме того, регистрировали время между контрольным заражением и проявлением паразитемии у тех, кто не был полностью защищен. Защиту оценивали по доле иммунизированных участников, которые остались свободными от инфекции *P. falciparum* после контрольного заражения спорозитами, и по отсрочке пре-патентного периода, приводящего к инфицированию.

Эффективность вакцины (VE) определяли как $100 \times (1 - \text{относительный риск})$. Точный критерий Фишера использовали для сравнения заболеваемости малярией между каждой из групп вакцинирования "Отсроченная неполная доза" и "0, 1, 2-месяц" и контролями "инфекционности".

Результаты.

Таблица 1

Эффективность вакцины			
Группы	Число вакцинированных субъектов	Число вакцинированных субъектов, у которых развилась паразитемия после контрольного заражения**	Оценка эффективности вакцины % (VE) *
Отсроченная неполная доза	30	4	87
0, 1, 2-месяц	16	6	63

*Логранк тест (время до паразитемии), Fx для RRR, $p=0,0455$.

**Паразитемию измеряли в сутки 28 после контрольного заражения.

Исследование не предназначалось для определения превосходства группы "Отсроченная неполная доза" по сравнению с группой "0, 1, 2 месяц", и различие между этими двумя группами не является вполне статистически значимым (VE повышение Fx для RRR=57,0%, [-7,9-88,3], $p=0,0741$, точный критерий Фишера). Однако анализ различия во времени выживания группы "Отсроченная неполная доза" по сравнению с группой "0, 1, 2 месяц", который учитывает отсрочку времени до инфицирования в группе "Отсроченная неполная доза", достигает статистической значимости ($p=0,0455$, логранк): у 4/30 субъектов в группе RRR развилась паразитемия (VE=87% [95% CI: 67, 95]); у 6/16 субъектов в группе RRR развилась паразитемия (VE=63% [95% CI: 20, 80]), фиг. 4а. Кроме того, анализ сравнения результатов группы исследования "Отсроченная неполная доза" против объединенных данных для 95 субъектов, исследованных в пяти испытаниях RTS,S/AS01 "0, 1, 2 месяц", завершенных к настоящему времени, показывает, что весьма маловероятно, что текущие результаты получились случайно ($p=0,0045$, точный критерий Фишера), фиг. 4б.

Продолжение исследования.

Исследование продолжали, и несколько субъектов получили бустер-иммунизацию неполной дозой через 6 месяцев после последней дозы с последующим контрольным заражением спорозитами спустя месяц. Субъектам, которые не были защищены после первого контрольного заражения, предлагали бустер-иммунизацию неполной дозой. Субъектов, которые были защищены после первого контрольного заражения, распределяли случайным образом для получения или не получения бустер-иммунизации неполной дозой с последующим контрольным заражением спорозитами спустя месяц. Результаты суммированы в табл. 2 и на фиг. 5а и 5б. NP означает "не защищенный во время первого контрольного заражения", P означает "защищенный во время первого контрольного заражения". Все бустер-иммунизации были с неполными дозами (пятая часть дозы RTS,S/AS01B).

Таблица 2

Бустер-иммунизация неполной дозой	
Схема	Защищено
RRr-NP-бустер-иммунизация	2/2
RRr-P- бустер-иммунизация	9/10
RRr-P- нет бустер-иммунизации	3/7
RRR-NP-бустер-иммунизация	2/3
RRR-P-бустер-иммунизация	1/5
RRR-P- нет бустер-иммунизации	¼
Контроль инфекционности	0/6

Большинство субъектов, не защищенных либо после Fx-схемы ($n=2$), либо после схемы со стандартной дозой RTS,S ($n=3$), может быть защищено последующей бустерной дозой (1/5 дозы) (данные не показаны).

Титры антител против-CS.

Титры анти-CS антител определяли путем стандартного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), разработанного в GSK Biologicals. Clement et al. (2012), Malar, J 11:384. Титры антител вычисляли, используя кривую эталонного стандарта, и выражали в ELISA-единицах (EU), как описано. Результаты приводятся в табл. 3.

Таблица 3
Титры анти-CS антител. Fx, RRR, NP, P, Fx NP, Fx P, RRR NP и RRR P,
как раскрыто в данном описании изобретения

КАТЕГОРИЯ	N	GMT	LL	UL
Fx	30	40545	32979	49847
RRR	16	55148	37072	82037
NP	10	39800	22368	70817
P	36	46725	38432	56808
Fx NP	4	34583	19060	62748
Fx P	26	41549	33231	51944
RRR NP	6	43708	17505	109133
RRR P	10	63403	44880	89570

Анализ avidности.

Оценивали индекс avidности (AI) анти-CS антител против повторяющейся области CSP. Для измерений avidности IgG образцы оценивали, как описано в Olotu et al. (2014). PLoS One 15; 9(12):e115126. doi: 10.1371/journal.pone.0115126, используя два разных планшета ELISA; один - обработанный хаотропным агентом планшет, а другой - необработанный планшет. В качестве хаотропного агента в планшет с обработкой добавляли 1 М раствор тиоцианата аммония (NH₄SCN), тогда как в необработанный планшет добавляли 0,05% Твин-20 в PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор), и оба планшета ELISA далее промывали и обрабатывали, как описано. Индекс avidности (AI) вычисляли как отношение концентрации анти-CSP IgG (EU/мл), который остался связанным с покрытым антигеном после обработки посредством NH₄SCN, к концентрации IgG (EU/мл), который остался связанным с покрытым антигеном в необработанном планшете. Результаты приводятся в табл. 4.

Таблица 4
Индекс avidности (AI). Fx, RRR, NP, P, Fx NP, Fx P, RRR NP и RRR P
такие, как раскрыто в данном описании изобретения

КАТЕГОРИЯ	N	GMT	LL	UL
Fx	30	0,68	0,65	0,72
RRR	16	0,55	0,51	0,58
NP	10	0,61	0,55	0,68
P	36	0,64	0,61	0,68
Fx NP	4	0,70	0,63	0,78
Fx P	26	0,68	0,64	0,72
RRR NP	6	0,55	0,50	0,60
RRR P	10	0,54	0,49	0,59

AI можно использовать для сравнения схем, но не для объяснения защиты на индивидуальном уровне.

Пример 2. Вакцинация с применением M72 и адъюванта AS01.

Влияние отсроченной и пониженной дозировок туберкулезного антигена M72 2-his (SEQ ID NO: 4) исследовали на мышинной модели.

Материалы и методы.

Животная модель.

6-недельным самкам мышей C57BL/6JO1aHsd, по 12 мышей в группе, инъецировали внутримышечно по 50 мкл в сутки 0-14 и 28 или 98, как указано в табл. 5.

Таблица 5

Группа	Доза 1 D0	Доза 2 D14	Доза 3 D28	Доза 3 D98
G1	0,25 мкг M72 AS01E	0,25 мкг M72 AS01E	0,25 мкг M72 AS01E	
G2			0,05 мкг M72 1/5 AS01E	
G3			0,01 мкг M72 1/25 AS01E	
G4				0,25 мкг M72 AS01E
G5				0,05 мкг M72 1/5 AS01E
G6				0,01 мкг M72 1/25 AS01E
G7				0,25 мкг M72 сам по себе

Адьювант AS01E содержит иммуностимуляторы 3D-MPL® (GlaxoSmithKline Biologicals, Montana, USA) и QS21 (по 2,5 мкг каждого) в композиции с липосомами. Разведения выполняли, используя адьювантный буфер. Регистрируемые данные:

Цельная кровь ICS в момент времени:

сутки 21-7 суток после II (Post-II) (G1-7);

сутки 35-7 суток после III (Post-III) (G1-3);

сутки 105-77 суток после III (Post-III) (G1-3) и

7 суток после III (Post-III) (G4-7).

Серология анти-M72 IgTot в момент времени:

сутки 28-14 суток после II (Post II) (G1-7);

сутки 42 -14 суток после III (Post III) (G1-3);

сутки 112-84 суток после III (Post III) (G1-3) и

14 суток после III (Post III) (G4-7.)

С целью получения достаточного объема цельную кровь 4 пулов от 3 мышей в группах собирали в сутки 21, 35 и 105. Индивидуальные сыворотки собирали в сутки 28, 42 и 112.

Мышей идентифицировали индивидуально, чтобы связывать результаты PII и PIII для ICS и серологии.

Описание регистрируемых данных.

Клеточный иммунный ответ - Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS).

Выделение лейкоцитов.

В каждый момент времени собирали кровь от каждой мыши и потом объединяли (5 пулов от 3 мышей). Кровь собирали в пробирки, содержащие RPMI/добавки (RPMI 1640, дополненная глутамином, пенициллином/стрептомицином, пируватом натрия, заменимыми аминокислотами и 2-меркаптоэтанолом), содержащие гепарин (1/10). 10 объемов лизирующего буфера добавляли к цельной крови и пробирки инкубировали при комнатной температуре (КТ) в течение 10 мин. После центрифугирования (335 g, 10 мин при КТ) осадок собирали в среду RPMI/добавки и фильтровали (клеточный фильтр 100 мкм). Клетки снова осаждали (335 g, 10 мин при КТ) и ресуспендировали в полной среде (RPMI 1640, дополненная глутамином, пенициллином/стрептомицином, пируватом натрия, заменимыми аминокислотами и 2-меркаптоэтанолом и 5% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки).

In vitro стимуляция свежих лейкоцитов.

Лейкоциты помещали в 96-луночные планшеты с круглодонными лунками в количестве приблизительно 1 миллион клеток в лунку. Затем лейкоциты стимулировали в течение 6 ч (37°C, 5% CO₂) антителами анти-CD28 (клон 9C10 (MFR4.B)) и анти-CD49d (клон 37.51) в концентрации 1 мкг/мл, в присутствии или в отсутствие 1 мкг/мл пептидов, охватывающих последовательность M72. После 2-часового стимулирования добавляли брэфелдин А, разбавленный 1/200 в полной среде, на 4 дополнительных часа. Затем планшеты помещали на 4°C в течение ночи.

ICS.

Клетки окрашивали и анализировали с помощью 5-цветного ICS анализа.

Клетки переносили в 96-луночные планшеты с V-образным дном, центрифугировали при 189 g в течение 5 мин при 4°C после промывания 200 мкл промывочного буфера (PBS 1X, 1% FCS), ресуспендировали клетки в 50 мкл промывочного буфера, содержащего анти-CD16/32 (клон 2.4G2), разведение 1/50,

в течение 10 мин при 4°C. Затем на 30 мин при 4°C добавляли 50 мкл промывочного буфера, содержащего антитела анти-CD4-V450 (клон RM4-5, разведение 1/50) и анти-CD8-PerCp-Cy5.5 (клон 53-6,7, разведение 1/50) и Live&Death PO (разведение 1/500). Клетки центрифугировали (189 г в течение 5 мин при 4°C) и промывали 200 мкл промывочного буфера.

Лейкоциты фиксировали и пермеабелизировали путем добавления 200 мкл раствора Cytofix/Cytoperm (имеющийся в продаже буфер Becton Dickinson) в течение 20 мин при 4°C. Клетки центрифугировали (189 г в течение 5 мин при 4°C) и промывали 200 мкл буфера Perm/Wash (имеющийся в продаже буфер Becton Dickinson, разбавленный 1:10 в дистиллированной воде). После дополнительной стадии центрифугирования клетки окрашивали в 50 мкл буфера Perm/Wash антителами анти-IL2-FITC (клон JES6-5H4, разведение 1/400), анти-IFN γ -APC (клон XMG1.2, разведение 1/50) и анти-TNF α -PE (клон MP6-XT22, разведение 1/700) в течение 1 ч при 4°C. Клетки промывали дважды буфером Perm/Wash, ресуспендировали в 220 мкл стабилизирующего фиксирующего раствора BD Stabilizing Fixative. Окрашенные клетки анализировали проточной цитометрией, используя LSRII и программное обеспечение FlowJo.

Гуморальный ответ - Серология анти-M72 Ig tot посредством Elisa.

96-луночные планшеты Elisa покрывали рекомбинантным антигеном M72 в концентрации 0,25 мкг/мл в PBS и инкубировали в течение ночи при 4°C. Сыворотки от вакцинированных мышей в Post-II и Post-III разбавляли 1/10000 в PBS (0,2%-BSA (бычий сывороточный альбумин) и затем выполняют 2-кратное серийное разведение из лунки 1 до 12 и инкубируют. Серийные разведения стандартного и контрольного материала использовали для вычисления стандартных титров анти-M72 антитела тестируемых сывороток и для гарантии обоснованности теста. Планшеты промывали PBS 0,1% Твин 20 после каждой стадии инкубации. Затем добавляют биотинилированное козье антитело, специфичное в отношении мышиного Ig, и комплекс антиген-антитело обнаруживают путем инкубирования с комплексом стрептавидин-пероксидаза и субстратом пероксидазы орто-фениллендиамин дигидрохлорид/H₂O₂. Оптические плотности (O.D.) регистрировали при 490-620 нм. Титр анти-M72 антитела каждой индивидуальной мышиной сыворотки определяют по стандартной кривой ELISA, используя регрессионную модель, и выражают в единицах ELISA (EU/мл). Затем вычисляют среднегеометрические титры (GMT) для каждой группы мышей.

Результаты.

T-клеточные ответы.

А. Кинетика M72-специфических CD4 T- & CD8 T-клеточных ответов.

Для оценки возможного положительного эффекта неполной и/или отсроченной третьей дозы на CD4 T- и CD8 T-клеточный иммунный ответ мышей иммунизировали максимальной дозой 0,25 мкг M72 в текущем исследовании для того, чтобы попасть в динамический диапазон CD4 T-клеточного иммунного ответа при индуцировании обнаруживаемого CD8 T-клеточного иммунного ответа.

Как показано на фиг. 6, введение неполной третьей дозы по стандартной схеме (D0-D14-D28) не обеспечило улучшенного CD4 T-клеточного иммунного ответа, поскольку сравнимое усиление наблюдали от 7PII до 7PIII в группах, получавших полную дозу, 1/5- и 1/25-ю дозы.

Однако, несмотря на некоторую вариабельность M72-специфического CD4 T-клеточного иммунного ответа среди пулов, через 7 суток после отсроченной третьей дозы 0,25 мкг M72 наблюдали большее усиление по сравнению со стандартной схемой. Кроме того, уровень M72-специфического CD4 T-клеточного иммунного ответа у мышей, получавших отсроченную и неполную третью дозу или отсроченную и неадьювантированную третью дозу, был сравнимым с уровнями, наблюдавшимися в группе, иммунизированной полной дозой по стандартной схеме. Это свидетельствует о положительном эффекте отсроченной схемы в отношении уровня CD4 T-клеточного ответа.

Низкие уровни M72-специфического CD8 T-клеточного ответа обнаруживали у мышей, которые получали дозу 0,25 мкг M72 по стандартной схеме, и третья иммунизирующая доза не усиливала M72-специфический CD8 T-клеточный ответ (фиг. 8).

Пониженный M72-специфический CD8 T-клеточный ответ наблюдали у мышей, которые получали неполную третью дозу по стандартной схеме. Это согласуется с предшествующими данным (не показаны), где на CD8 T-клеточный ответ в значительной степени влиял диапазон доз белка M72, применяемого для иммунизации мышей, и где более высокая доза M72 (1 или 8 мкг) индуцировала более высокий уровень ответа, чем 0,1 или 0,25 мкг M72.

У мышей, которые получали отсроченную третью дозу 0,25 мкг M72, усиление M72-специфического CD8 T-клеточного ответа наблюдали во всех тестируемых пулах от 7PII до 7PIII. Однако медианы CD8 T-клеточного ответа показывали вариабельность между группами в момент 7PII (от 0,231 до 0,817), несмотря на тот факт, что все группы получали 2 дозы 0,25 мкг M72/AS01E.

Б. Цитокиновый профиль M72-специфических CD4 и CD8 T-клеточных ответов.

Подобные профили CD4 T-цитокриновой экспрессии наблюдали в группах, получавших полную дозу, 1/5- и 1/25-ю дозы по стандартной схеме как в момент 7PII, так и 7PIII. M72-специфический CD4 T-клеточный ответ включал тройной (IL2/IFN γ /TNF α) и двойной (IFN γ /TNF α) после второй иммуниза-

ции. Третья иммунизирующая доза не поддерживала прогрессирование полифункциональных CD4 Th1 клеток и вместо этого увеличила дважды (IL2/IFN γ) и единожды (только IFN γ) продуцирующие CD4 Т-клетки (фиг. 7).

Введение отсроченной третьей дозы, по-видимому, поддерживает прогрессирование полифункциональных CD4 Th1 клеток, поскольку M72-специфический CD4 Т-клеточный ответ главным образом состоит из IL2/IFN γ /TNF α и IFN γ /TNF α продуцирующих CD4 Т-клеток (фиг. 7). AS01 дополнительно усиливал прогрессирование полифункциональных Т-клеток, поскольку у мышей, которые получали отсроченную и неадьювантированную третью дозу, наблюдали пониженные уровни IL2/IFN γ /TNF α и IFN γ /TNF α продуцирующих CD4 Т-клеток и повышенные уровни только IFN γ продуцирующих CD4 Т-клеток.

Даже хотя уровень M72-специфического CD4 Т-клеточного ответа у мышей, получавших отсроченную и неполную третью дозу, подобен тому, который наблюдают у стандарта, цитокиновый профиль незначительно отличается, и в совокупности эти данные свидетельствуют об улучшенной прогрессии полифункциональных CD4 Th1-клеток при схеме отсроченной иммунизации.

Величина и качество многофункциональных CD4 Т-клеток, как было показано, коррелируют с защитой у мышей (Deprick et al., 2011, *Vaccine*, 29:2902-2909).

Аналогичные профили M72-специфических CD8 Т-клеточных цитокинов наблюдали во всех группах как в 7PII, так и 7PIII (фиг. 8). M72-специфические CD8 Т-клеточные ответы главным образом состояли из дважды (IFN γ /TNF α) и единожды (только IFN γ) продуцирующих CD8 Т-клеток. Также обнаруживали очень низкие уровни IL2/IFN γ /TNF α и TNF α продуцирующих CD8 Т-клеток.

Образование антител.

А. Серология анти-M72 Ig tot.

Как показано на фиг. 10, повышение анти-M72 серологического ответа наблюдали между 14PII и 14PIII в группах, получавших полную дозу, 1/5- и 1/25-ю дозы при стандартной схеме. С самой высокой дозой, дававшей самый высокий M72-специфический серологический ответ, наблюдали тенденцию эффекта доза-диапазон.

Постоянство ответа снижалось с течением времени, как показано более низким серологическим ответом в 84PIII.

У мышей, которые получали отсроченную третью иммунизацию, наблюдали более высокую величину ответа. Подобные уровни M72-специфического Ig наблюдали в присутствии и в отсутствие AS01E, что свидетельствует о том, что M72 сам по себе является достаточным для индукции высокого серологического ответа после отсроченной третьей иммунизации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ индуцирования иммунного ответа против малярии у субъекта-человека, включающий введение субъекту первой иммуногенной композиции, содержащей RTS,S и первый адьювант, с последующим введением этому субъекту второй иммуногенной композиции, содержащей RTS,S и второй адьювант, где первый и второй адьюванты содержат 3D-MPL (3-О-деацелированный монофосфориллипид А) и QS21 в липосомальной композиции в виде эмульсии и где первый адьювант содержит от 25 до 75 мкг 3D-MPL и от 25 до 75 мкг QS21 и второй адьювант содержит от 5 до 15 мкг 3D-MPL и от 5 до 15 мкг QS21,

где первая иммуногенная композиция содержит от 25 до 75 мкг RTS,S и вторая иммуногенная композиция содержит от 5 до 15 мкг RTS,S;

где первую иммуногенную композицию вводят дважды перед введением второй иммуногенной композиции;

где промежуток времени между введением первой композиции и введением второй композиции составляет от 4 до 8 месяцев.

2. Способ по п.1, где вторая иммуногенная композиция содержит по меньшей мере в три раза меньше, например по меньшей мере в четыре раза меньше, например по меньшей мере в пять раз меньше, например по меньшей мере в шесть раз меньше, например по меньшей мере в семь раз меньше, например по меньшей мере в восемь раз меньше, например по меньшей мере в девять раз меньше, например по меньшей мере в десять раз меньше, например по меньшей мере в 15 раз меньше количества указанного RTS,S и адьюванта.

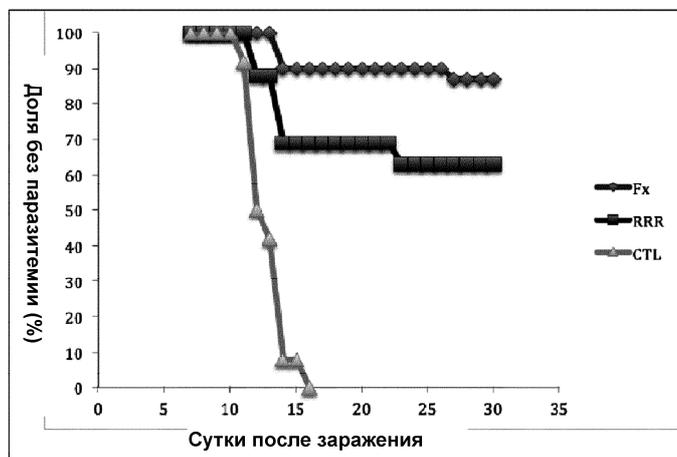
3. Способ по п.1 или 2, где вторая иммуногенная композиция содержит в 2-15 раз меньше, например в 2-10 раз меньше, например в 3-7 раз меньше, например в 4-6 раз меньше количества указанного RTS,S и адьюванта.

4. Способ по любому из пп.1-3, где первый и второй адьюванты дополнительно содержат стерин.

5. Способ по п.1, где первый адьювант содержит 50 мкг 3D-MPL и 50 мкг QS21 и второй адьювант содержит 10 мкг 3D-MPL и 10 мкг QS21.

6. Способ по любому из пп.1-5, где промежуток времени между введением первой композиции и введением второй композиции составляет от 7 до 8 месяцев.

7. Способ по любому из пп.1-6, где через промежуток времени по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20 месяцев или более после введения второй композиции вводят вторую композицию еще один или более раз.



Фиг. 1

Met Met Ala Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 1 5 10 15

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 20 25 30

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 35 40 45

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 50 55 60

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Lys
 65 70 75 80

Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn
 85 90 95

Arg Asn Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys Asn Asn
 100 105 110

Asn Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys
 115 120 125

Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys
 130 135 140

Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro
 145 150 155 160

Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys
 165 170 175

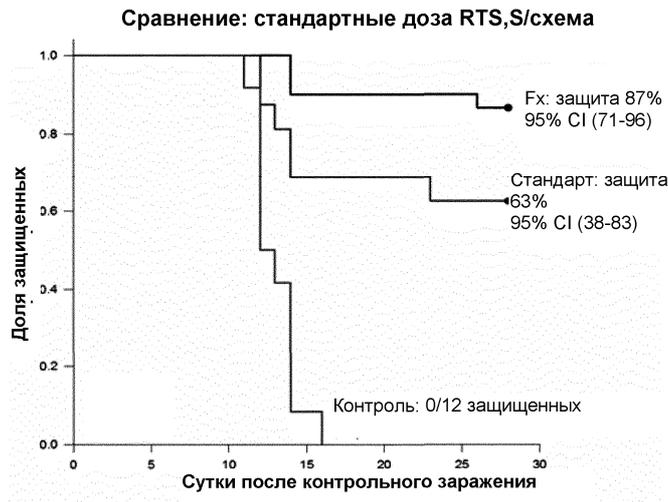
Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn Ser Ser Ile Gly
 180 185 190

Leu Gly Pro Val Thr Asn Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly

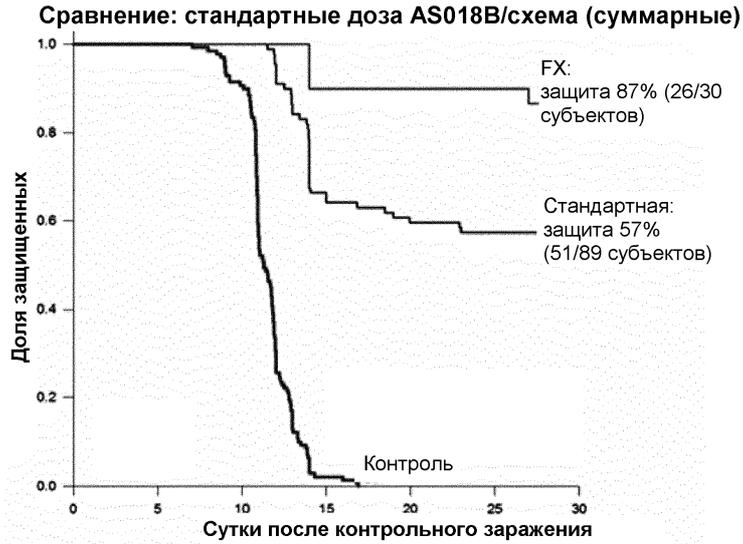
Фиг. 2a

Gly Ser Asp Gly Thr Ser Thr Tyr Ala Thr Phe Leu Val Thr Trp Lys
 305 310 315 320
 Gly Asp Glu Lys Thr Arg Asn Pro Thr Pro Ala Val Thr Pro Gln Pro
 325 330 335
 Arg Gly Ala Glu Phe His Met Trp Asn Tyr His Ser His Val Phe Ser
 340 345 350
 Val Gly Asp Thr Phe Ser Leu Ala Met His Leu Gln Tyr Lys Ile His
 355 360 365
 Glu Ala Pro Phe Asp Leu Leu Leu Glu Trp Leu Tyr Val Pro Ile Asp
 370 375 380
 Pro Thr Cys Gln Pro Met Arg Leu Tyr Ser Thr Cys Leu Tyr His Pro
 385 390 395 400
 Asn Ala Pro Gln Cys Leu Ser His Met Asn Ser Gly Cys Thr Phe Thr
 405 410 415
 Ser Pro His Leu Ala Gln Arg Val Ala Ser Thr Val Tyr Gln Asn Cys
 420 425 430
 Glu His Ala Asp Asn Tyr Thr Ala Tyr Cys Leu Gly Ile Ser His Met
 435 440 445
 Glu Pro Ser Phe Gly Leu Ile Leu His Asp Gly Gly Thr Thr Leu Lys
 450 455 460
 Phe Val Asp Thr Pro Glu Ser Leu Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Val
 465 470 475 480
 Tyr Phe Asn Gly His Val Glu Ala Val Ala Tyr Thr Val Val Ser Thr
 485 490 495
 Val Asp His Phe Val Asn Ala Ile Glu Glu Arg Gly Phe Pro Pro Thr
 500 505 510
 Ala Gly Gln Pro Pro Ala Thr Thr Lys Pro Lys Glu Ile Thr Pro Val
 515 520 525
 Asn Pro Gly Thr Ser Pro Leu Ile Arg Tyr Ala Ala Trp Thr Gly Gly
 530 535 540
 Leu Ala
 545

Фиг. 3б



Фиг. 4а

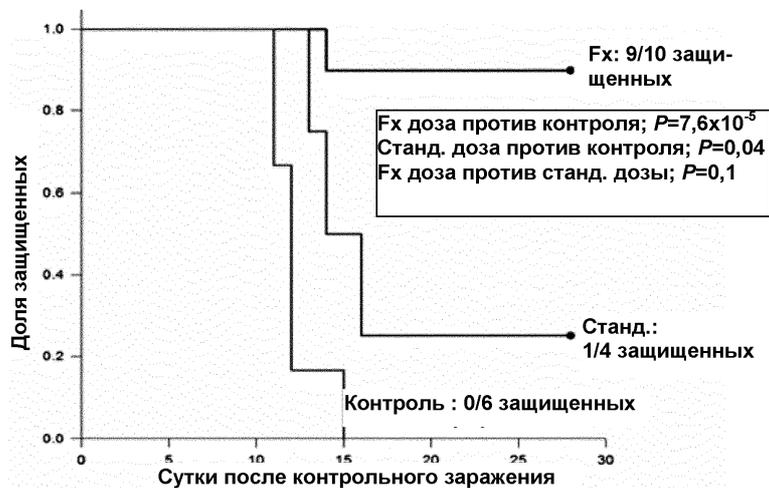


Фиг. 4б

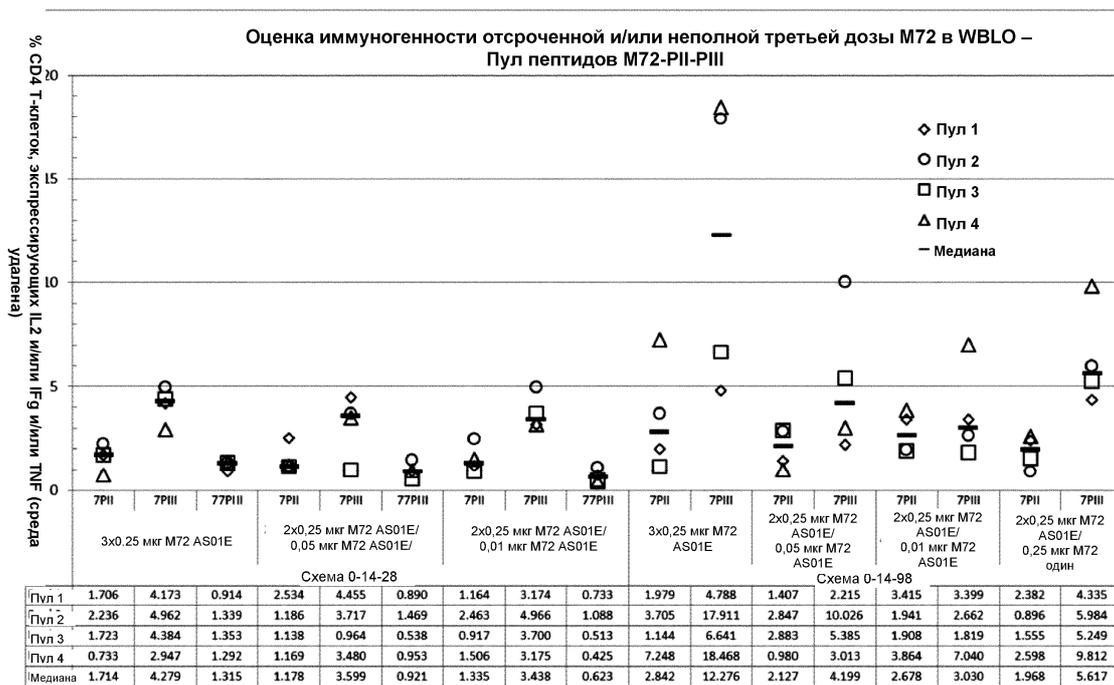


Фиг. 5а

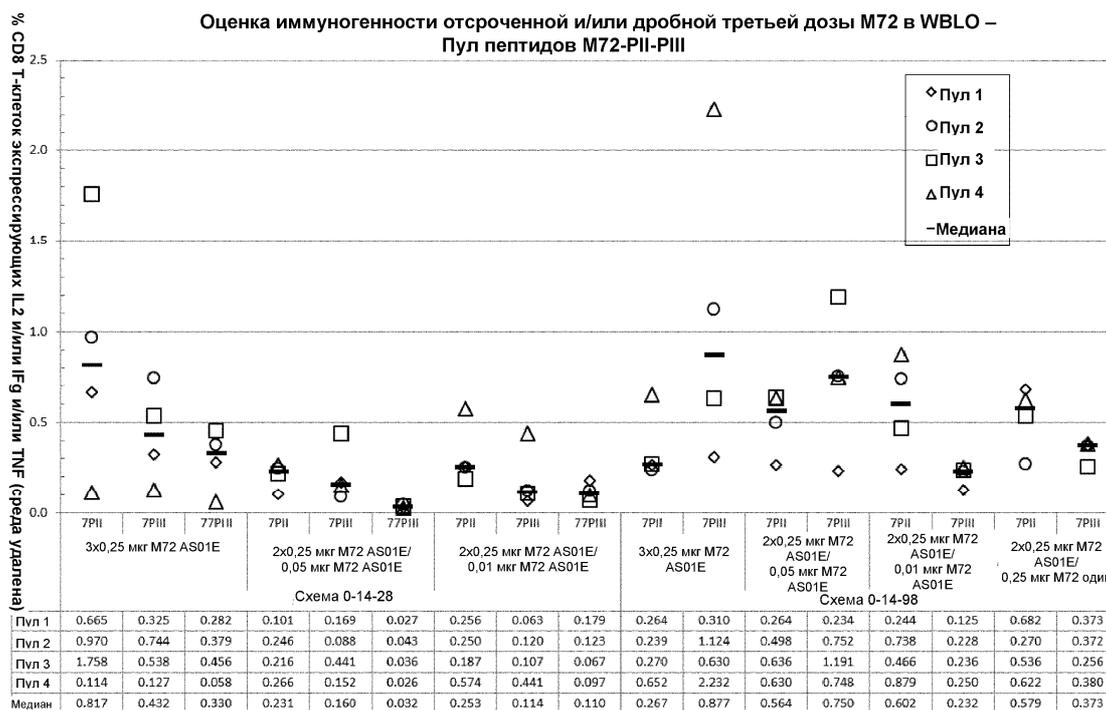
Субъекты, получившие бустер-дозу RTS,S (1/5-ая дозы) в месяц 12



Фиг. 5б

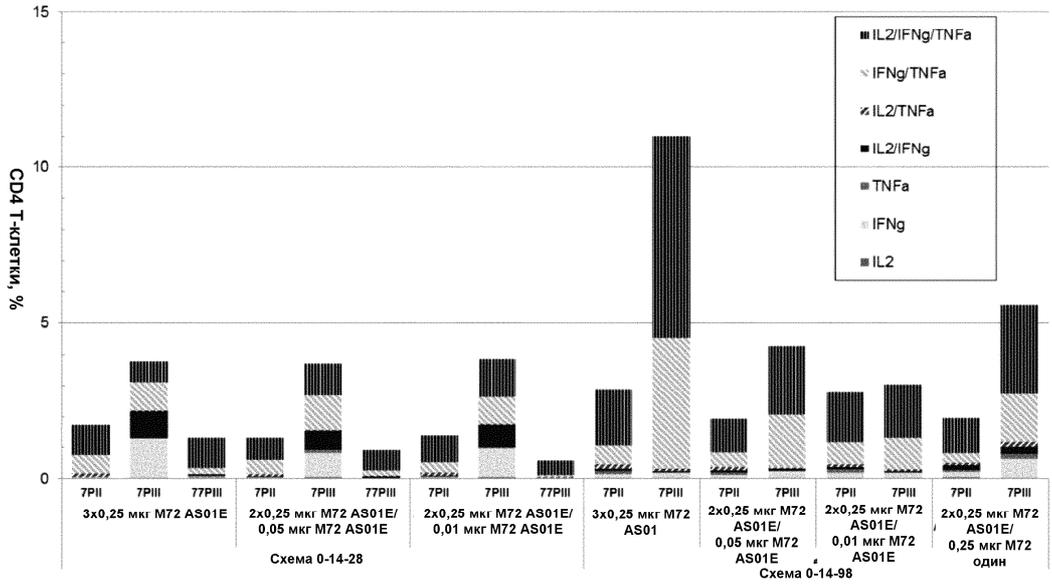


Фиг. 6



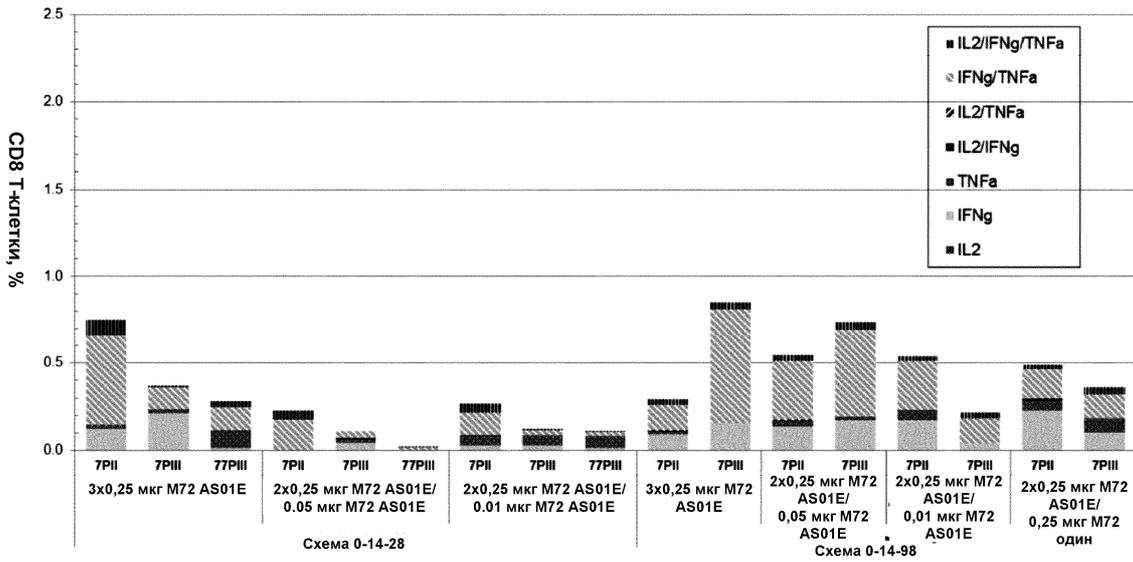
Фиг. 7

Цитокиновый профиль M72-специфического CD4 Т-клеточного ответа –
Пул пептидов M72 7dPII-7dPIII-77dPIII

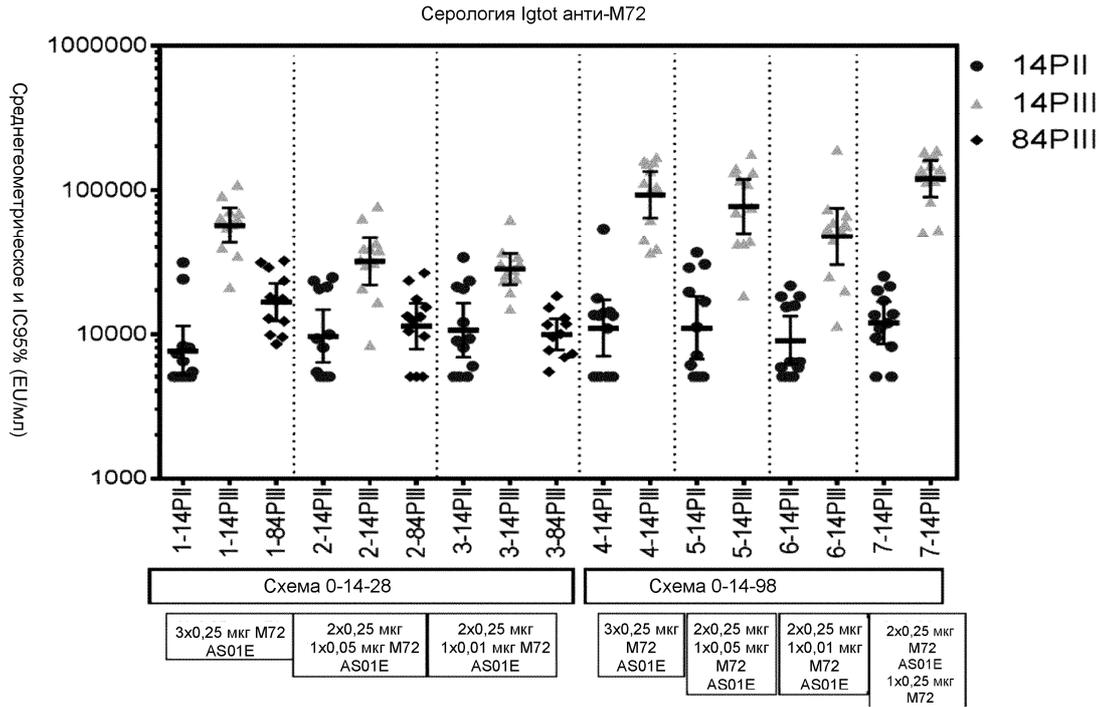


Фиг. 8

Цитокиновый профиль M72-специфического CD8 Тклеточного ответа –
Пул пептидов M72 7dPII-7dPIII-77dPIII



Фиг. 9



Фиг. 10

