



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006117427/10, 25.10.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.10.2004(30) Конвенционный приоритет:
23.10.2003 US 60/513,827

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2007

(45) Опубликовано: 20.10.2010 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 6328968, 11.12.2001. SAIFUDDIN M. et al., "Human immunodeficiency virus type 1 incorporates both glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD55 and CD59 and integral membrane CD46 at levels that protect from complement-mediated destruction", J Gen Virol. 1997 Aug; 78(Pt8): 1907-11. STOIBER H. et al., "Role of complement in HIV infection", Annu Rev Immunol. 1997; 15:649-74.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 23.05.2006

(86) Заявка РСТ:
US 2004/035316 (25.10.2004)(87) Публикация РСТ:
WO 2005/040353 (06.05.2005)

Адрес для переписки:
123242, Москва, Кудринская пл., 1, а/я 35,
"Михайлюк, Сороколат и партнеры-
патентные поверенные", пат.пов.
Е.Л.Носыревой, рег.№ 886

(72) Автор(ы):

КАРП Нелсон М. (US)

(73) Патентообладатель(и):

КАРП Нелсон М. (US)

(54) ИММУНОГЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИНЫ, ОСНОВАННОЙ НА ВИЧ, ИНАКТИВИРОВАННОМ ПСОРАЛЕНОМ

(57) Реферат:

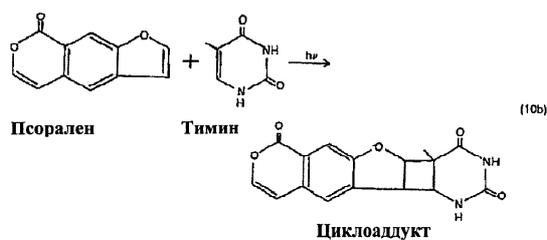
Изобретение относится к области биотехнологии, вирусологии и медицины. Раскрыта иммуногенная композиция предварительно определенных инактивированных штаммов вируса

иммунодефицита человека (ВИЧ). Инактивацию проводят с помощью псоралена и ультрафиолетового излучения. Композицию делают более эффективной удалением структурных особенностей ВИЧ, которые мешают иммунному ответу. В частности,

сиаловую кислоту удаляют для усиления иммунного распознавания композиции и для ослабления связывания комплиментарного Фактора Н. Также для предотвращения связывания комплиментарного Фактора Н удаляют CD55 и CD59. Определение штаммов для инактивации можно осуществлять с помощью иммунотерапевтического генотипирования или вероятностной оценки риска заражения. Изобретение может быть

использовано в медицине. 3 н. и 27 з.п. ф-лы, 3 ил.

Циклоприсоединение



Фиг. 1

RU 2401665 C2

RU 2401665 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006117427/10, 25.10.2004**(24) Effective date for property rights:
25.10.2004(30) Priority:
23.10.2003 US 60/513,827(43) Application published: **10.12.2007**(45) Date of publication: **20.10.2010 Bull. 29**(85) Commencement of national phase: **23.05.2006**(86) PCT application:
US 2004/035316 (25.10.2004)(87) PCT publication:
WO 2005/040353 (06.05.2005)

Mail address:
**123242, Moskva, Kudrinskaja pl., 1, a/ja 35,
"Mikhajljuk, Sorokolat i partnery-patentnye
poverennye", pat.pov. E.L.Nosyrevoj, reg.№ 886**

(72) Inventor(s):
KARP Nelson M. (US)(73) Proprietor(s):
KARP Nelson M. (US)(54) **IMMUNOGENIC COMPOSITION AND METHOD OF ELABORATION OF VACCINE BASED ON PSORALEN-INACTIVATED HIV**

(57) Abstract:

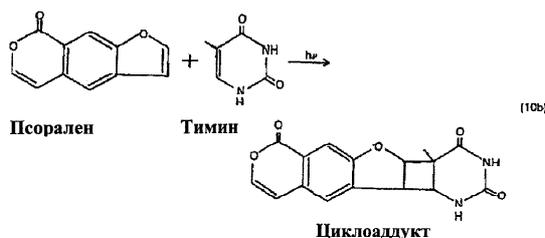
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to field of biotechnology, virology and medicine. Described is immunogenic composition of preliminarily determined inactivated strains of human immunodeficiency virus (HIV). Inactivation is carried out by means of psoralen and ultrasonic radiation. Composition is made more efficient by removal of structural HIV peculiarities, which prevent immune response. In particular, sialic acid is removed in order to enhance immune recognition of composition and for weakening of complimentary H factor binding. Also for prevention of complimentary H factor binding CD55 and CD59 are

removed. Determination of strains for inactivation can be realised by means of immunotherapeutic genotyping or probabilistic assessment of infection risk.

EFFECT: invention can be used in medicine.

30 cl, 3 dwg

Циклоприсоединение

Фиг. 1

ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по заявке США с временным номером 60/513827, дата подачи 23.10.2003.

ПРЕДПОСЫЛКИ ДАННОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Область данного изобретения

[0002] Данное изобретение касается области вирусологии и иммунологии. В частности, но не исключительно, оно касается способа индуцирования иммунного ответа на ВИЧ с использованием композиции инактивированного псораленом ВИЧ и субстанции для достижения этого.

Описание известного уровня техники

Вирус Иммунодефицита человека

[0003] Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является ретровирусом медленной или лентивирусной группы и вызывает Синдром Приобретенного Иммунного Дефицита (СПИД). Некоторые ретровирусы, которые поражают иммунную систему, такие как ВИЧ-1, являются вариabельными и быстро мутируют, образуя много штаммов варьирующей генетической композиции, что затрудняет попытки разработать эффективное лечение. Эти штаммы, которые можно разделить на группы или подтипы, обладают индивидуальными биологическими свойствами.

Последовательности в подтипе можно разделить на генетические кластеры или сходства, которые иногда показывают их общее происхождение. Однако вариации в скорости эволюции могут вызвать различия среди мутаций даже в пределах подтипа. Кроме того, тенденция ретровирусов рекомбинироваться с родственными ретровирусами усложняет вирусный геном.

[0004] ВИЧ использует свою РНК как матрицу для образования вирусной ДНК в клетках-мишенях путем обратной транскрипции, затем вирусная ДНК может объединиться с ДНК инфицированного хозяина. ВИЧ инфицирует клетки, имеющие поверхностный CD4, такие как лимфоциты, моноциты, дендритные клетки и макрофаги, и разрушает CD4+ хелперные Т-лимфоциты. Этот процесс, в частности, касается двух гликопротеинов ВИЧ. Этими гликопротеинами являются gp120 (Env гликопротеин, компонент связывания внешнего рецептора) и связанный нековалентной связью партнер gp41 (Env трансмембранный гликопротеин). Gp120 и gp41 объединены в трехмерную единицу, причем три молекулы gp120 выступают на поверхности вириона и соединены с тремя молекулами gp41 в вирусной липидной мембране. Gp 120 связывается с рецептором CD4 на поверхности хелперных Т-клеток. Это связывание обычно является высокоаффинным и может также усиливаться высоким содержанием сиаловой кислоты на поверхности вируса; сиаловая кислота снижает пороговое значение энергии связывания, необходимое для преодоления отталкивающих электростатических сил. Затем вирус начинает сливаться с Т-клеткой, производя структуральные или конформационные изменения и оголяя другие рецепторы. При слиянии фрагмент gp120 отшелушивается, оголяя эктодомен gp41 в процессе, который также изменяет конформацию. Тогда Gp41 становится доступным для построения пептидных доменов слияния для связывания с клеткой-мишенью. Это приводит к проникновению ВИЧ и инфицированию клетки-мишени.

[0005] Оболочка ВИЧ начинает формирование с плазматической мембраны клетки хозяина, когда вирус прорастает сквозь клеточную мембрану. Таким образом, оболочка включает липидные и белковые компоненты клетки-хозяина (Frank, Ines, Heribert Stoiber, et al., Vol.10, pp.1611-20 (1996); Stoiber, Heribert, et al., Vol.15, pp.649-74 (1997)). Некоторые вирусы с оболочкой используют белки шипов для имитации

молекул хозяина для связывания с рецепторами клетки хозяина и проникновения в другие клетки-мишени. Однако эти шипы могут также являться антигенными поверхностями для распознавания иммунной системой. Однако ВИЧ пытается защититься. В дополнение к вариабельности конформационных изменений gp120

5 обеспечивает другие особенности поверхности, которые маскируют его от иммунного выявления и разрушения, такие как покрытие гликопротеинов, ковалентно связанные остатки сиаловой кислоты или пространственная помеха (Haurum, John, Treffen Thiel, et al., Vol.7(10), pp.1307-13 (Oct. 1993); Sande, Merle, et al.. The Medical Management of Aids,

10 (6th ed. 1999); Cohen, P.T., The AIDS Knowledge Base, (3rd ed. Feb 1999)).

[0006] Ядро вириона ВИЧ функционирует как руководящий центр. Внутри вирион ВИЧ представляет собой капсидную комбинацию вирусных белков p24 (CA). Капсид также имеет две отдельные цепи РНК, каждая цепь обеспечивает копирование девяти

15 генов ВИЧ, которые кодируют 15 белков. Три гена из девяти (gag, pol и env) считаются основными. В геноме из 9 тысяч пар нуклеотидов РНК обнаружены шесть дополнительных генов (vif, vpr, vpr, tat, rev и nef). Более детально, ген env содержит информацию или код об образовании gp160, который распадается на gp120 и gp41. Подобным образом, ген gag кодирует матрицу (p17 или MA), капсид (p24 или CA),

20 нуклеокапсид (p9 или NC) и p6. Ген pol обеспечивает генетическую информацию о продуцировании вирусом фермента обратной транскриптазы, а также интегразы и фермента RNaseH. Остальные шесть генов (vif, vpr, vpr, tat, rev и nef) являются регуляторными и управляют механизмами инфицирования и репликации. Среди

25 прочих, ген nef содержит информацию об эффективной репликации, в то время как vpr содержит информацию о регулировании высвобождения новых вирусных частиц из инфицированной клетки хозяина. В конце концов, для того чтобы ВИЧ инфицировал клетку-мишень, он должен ввести генетический материал в цитоплазму клеток-мишеней.

[0007] Как отмечено выше, полагают, что ген nef помогает эффективной репликации ВИЧ. Образование новой вирусной частицы происходит в мембране

30 клетки хозяина. Обнаружили, что nef воздействует на среду инфицированной клетки путем, который оптимизирует репликацию. Вирусные белки собираются около мембраны клеток хозяина, прорастают наружу из мембраны и отслаиваются. Эти

35 белки являются тремя структуральными белками (gp160, gp120, gp41), плюс два других внутренних предшествующих полипротеина (Gag и Gag-Pol). Белок Gag-Pol несет две цепочки положительной РНК в выпячивании, тогда как протеаза вырезается свободно. После прорастания вируса протеаза свободно вырезается и разрезает

40 остальные белки Gag или Gag-Pol, высвобождая различные структуральные белки и обратную транскриптазу. Вирусные белки не являются функциональными до тех пор, пока они не отделятся протеазой. Таким образом, протеаза отвечает за расщепление Gag-Pol и меньшего полипротеина Gag на структуральные белки. Высвобожденные белки p24, p7 и p6 образуют новый капсид, в то время как основой

45 липидной мембраны является p24. В этом процессе gp160 распадается на gp120 и gp41 действием фермента хозяина.

[0008] Большинство вакцин ВИЧ используют части гликопротеинов оболочки (gp160, gp120 и gp41) при попытке индуцировать образование

50 нейтрализующих антител против шипов оболочки вируса (Johnston, et al., 2001). Некоторые попытки в продуцировании высокого титра нейтрализующих антитела были успешны. Идея этого подхода заключается в том, что антитела, которые связываются с этими гликопротеинами, нейтрализовали бы вирус и предотвратили

инфекцию. Затем функционирующая иммунная система могла бы активировать систему комплемента, которая каскадно лизировала бы и разрушала вирус. Система комплемента представляет собой ряд циркулирующих белков, который "комплементирует" роль антител. Компоненты системы комплемента последовательно активируются или разворачиваются, что является каскадом комплемента. Завершением комплемента является протеиновый мембраноатакующий комплекс (МАК), который стремится прикрепиться к поверхности проникающего организма и разрушить его прокалыванием клеточной мембраны.

[0009] Однако ВИЧ предусматривает дополнительную защиту от гуморального иммунного ответа. ВИЧ будет активировать системы комплемента человека даже при отсутствии специфических антител. Эта активация была бы вредной для вируса, если бы комплемент оставался свободным для достижения МАК, запускающего лизис вируса. Однако ВИЧ избегает лизис вируса, включая в свою структуру различные молекулы (например, CD55, CD59), которые регулируют комплемент. ВИЧ включает эти молекулы клеточной мембраны в вирусную мембрану при прорастании из инфекционных клеток или присоединением к gp41 и gp120. Комплементарный Фактор Н может включаться в структуры gp41 и gp120. Фактор Н ингибирует активность С3b молекулы, которая является центральной для каскада комплемента. Это взаимодействие с компонентами комплемента позволяет ВИЧ использовать активацию комплемента для усиления инфективности, фолликулярной локализации и расширения диапазона клеток-мишеней.

Вакцинная терапия и предшествующий уровень техники

[0010] Иммунотерапия включает использование или стимулирование иммунной системы в отношении условия или чувствительности. Вакцины являются формой иммунотерапии. В 1955 году доктор Солк ввел полиовирусную вакцину; для того чтобы эту вакцину ввести пациентам, вирус убивали или делали его неинфективным или неактивным путем химической обработки формальдегидом (формалином). В 1961 году доктор Сэбин ввел вакцину живого аттенюированного относительно авирулентного полиовируса. Вакцина Сэбина в основном составлена из вирусных мутантов, способных элиситировать иммунный ответ, но не способных к значительной активной репликации или вирулентности, и поэтому считалась относительно безопасной при использовании для человека.

[0011] Существовали эффективные вакцины против ретровирусов у животных. Одна вакцина предпочтительна против ретровируса иммунодефицита кошачьих (или FIV) (т.е. Fel-O-Vax); вторым примером является вакцина против вируса инфекционной анемии у лошадей (или EIAV, т.е. EIAV(UK)deltaS2), серьезной ретровирусной инфекции лошадей. Эти вакцины надежно свидетельствуют о том, что вакцины могут работать против ретровирусов, хотя ни одна болезнь не является идеальной моделью ВИЧ у людей (Beyer, 2003).

[0012] Однако трудно получить вакцину против ВИЧ. Подавляющее большинство вакцин при исследовании, изучении или опытах включает или "живые" аттенюированные вирусные частицы, или целые инактивированные вирусные частицы. Использование и изучение рекомбинантной технологии, аденовирусные векторы, вакцины на основе ДНК или их комбинации установили границы иммунологии, возлагая некоторые надежды на применение к ВИЧ. Такие иммуногенные композиции применяют в следующих целях:

- для усиления иммунной системы индивидуума, который уже инфицирован системным заболеванием;

- для предупреждения заражения индивидуума болезнью после воздействия;
- для предупреждения заражения индивидуума болезнью до воздействия; на сегодня это наиболее общее применение вакцины;
- 5 - для предупреждения заражения пациента различными штаммами ВИЧ, особенно у пациентов, не поддающихся лечению, или иммуносупрессивных;
- для предотвращения вертикальной передачи от матери плоду или от матери новорожденному; для облегчения протекания ВИЧ заболевания у ВИЧ-отрицательного пациента, если он впоследствии заразится этой болезнью;
- 10 - для изучения потенциальных композиций и способов для достижения любой определенной выше цели.

К сожалению, медицина нуждается в определении иммунности к ВИЧ (Gonsalves, Gregg, Basic Science (2000); Cohen, 1999). Это фундаментальная проблема с важным последствием: не известно ни одного коррелята защиты от ВИЧ. Однако существуют
15 хорошо охарактеризованные корреляты развития болезни, такие как вирусные нагрузки и подсчет CD4. Кроме того, нет доказательства, что любая из современных кандидатных вакцин может вызывать ответы у ВИЧ-положительных пациентов, которые улучшили бы эти параметры (вирусные нагрузки и подсчеты CD4) в течение
20 длительного периода (Beyrer, Chris, "The HIV/AIDS Vaccine Research: An Update." The Hopkins Report (Jan. 2003)). Кроме того, в то время как наблюдали улучшение у некоторых животных моделей, не существует подтвержденной системы животной модели для испытания вакцин-кандидатов, очевидно ограничение при работе с высоколетальным патогеном, таким как ВИЧ (Beyrer, 2003). Обычная
25 продолжительность жизни после заражения ВИЧ составляет приблизительно 10-15 лет. Усовершенствованием была бы даже вакцина, которая не в состоянии предотвратить передачу, но удлиняющая продолжительность жизни зараженного пациента.

[0013] В исследовании и медицинской практике применяются инактивированные вирусы. Фактически, большинство успешных ранее созданных вакцин основывались на инактивированном вирусе. Инактивация делает вирус неинфективным, но который
30 все же индуцирует иммунный ответ, основанный на его остаточных свойствах. Инактивированный вирус обычно образуется из групп вирулентного штамма, выращенных в культуре клеток или в животных. Затем потенциально вирулентный штамм делают неинфективным или инактивированным химической обработкой.
35 Вирусы по определению являются нежизнеспособными объектами; они не потребляют кислород и питательные вещества, не образуют продукты обмена веществ; они реплицируются с помощью их хозяина, как описано выше для ВИЧ. Вирусам не
40 присуща метаболическая активность, и они не образуют аденозин трифосфат (АТФ). Однако вакцина из живых вирусов способна к репродукции, в то время как вакцина из убитых вирусов не способна. В общем, "живые" вакцины более эффективны, чем "убитые" вакцины.

[0014] Если вирус инактивирован, иммуногенная композиция, основанная на инактивированном вирусе, чтобы быть полезной, должна сохранять его антигенность. Процесс инактивации должен сохранить пространственную структуру вируса, в то же
45 время устраняя его вирулентность. Для инактивации или "убивания" вируса подходят многие способы, но большинство разрушают или изменяют пространственную структуру вириона, нарушая его антигенные свойства. Первоначально использовали
50 обработку формальдегидом (формалином); например, полиовирусная вакцина Солка была получена инактивированием формалином трех вирусных серотипов. Несмотря

на широкое применение в ранних вакцинах, формалин тяжело удаляется и поэтому создается опасность остаточной токсичности. В последнее время для химической инактивации вируса обычно применяют β -проприолактон, так как остаточные количества реагента можно легко гидролизовать в нетоксичный продукт. Hearst и др. в патенте США №4169204 для инактивации вирусов при производстве вакцин предложили использовать псоралены с облучением. Псоралены привлекают из-за их способности инактивировать вирус без повреждения структуры и без вредного остатка (Hanson, C.V., Bloodcells, Vol.18(1), pp.7-25 (1992)). Псоралены в природе встречаются в растениях, включая липу и сельдерей, которые используют псоралены для защиты от насекомых и грибов.

[0015] Как отмечено выше, известно общее понятие использования псоралена для инактивации вируса. Например, в патенте США №5106619 раскрыта псораленовая инактивация живого вируса для получения вакцин. Это изобретение касается обработки или инактивации вирионов с помощью фурукумаринов, включая 4'-аминометил-4,5',8'-триметилпсоралена гидрохлорид (АМТ), и ультрафиолета в среде с ограниченным кислородом. Инактивация направлена на вирусы с двойной и одинарной цепочкой ДНК, вирусы с двойной и одинарной цепочкой РНК и вирусы с оболочкой и без оболочки. Это описание было общим, и конкретно не рассматривало ВИЧ.

[0016] Некоторые изобретатели рассматривают применение псоралена в ВИЧ вакцине или композиции. В патенте США №6107543 раскрыт иммуноген целой частицы ВИЧ, который предпочтительно инактивирован гамма-радиацией; также раскрыты, однако являются разновидностью альтернативной инактивации, способы, включающие псорален, формалин, β -проприолактон и т.д. Целую частицу обрабатывают для удаления внешних белков оболочки gp120 или gp160, сохраняя остаток структуры. В альтернативном варианте осуществления редуцированный иммуноген, включающий оставшиеся очищенные продукты гена, такие как кодируемые генами gag, генами pol, трансмембранный белок gp41 или оставшиеся гены генома ВИЧ.

[0017] Патенты США №6383806 и №6503753 раскрывают композицию и способ разработки ВИЧ вакцины, основанной на псораленовой фотоинактивации обратной транскриптазы (РТ). Другими словами, целью этого изобретения является создание условий для иммунного ответа, основанного на инактивации отдельного фермента ВИЧ. Сохранение остатка частицы, как считают, усиливает иммунный ответ на композицию.

[0018] Хотя псорален описывается изобретателями для использования в иммуногене ВИЧ или вакцине, ни один не рассматривал определенное структурное сохранение продуктов, присущих псораленовой инактивации ВИЧ. Например, ВИЧ является высокоиммуногенным, часто изменяющим структуры в процессе обратной транскрипции. Мутация может предусматривать средства для избежания штаммом ВИЧ иммунного ответа, вызванного вакциной (Cohen, 1999). Кроме того, сохранение структуры ВИЧ может привести к сохранению компонентов, которые нарушают иммунный ответ.

[0019] Последние попытки не сосредотачивали внимание на проблемах мутации. ВИЧ является высокомутагенным ретровирусом, который с помощью обратной транскриптазы преобразовывает свою РНК в ДНК. Обратная транскриптаза склонна к ошибкам, что приводит к мутации. Кроме того, быстрая репликация усиливает мутацию. Высокий уровень геномного разнообразия у ВИЧ усложняет диагноз,

лечение и санитарный контроль развития болезни. В частности, это разнообразие проявляется в биологических особенностях, характеризующих инфективность, заразность и иммуногенность. Дивергенция вирусных генотипов ВИЧ внесла свой вклад в полиморфизм, эффективность передачи и историческое эпидемиологическое развитие ВИЧ. Разнообразие подтипов и под-подтипов, каждый из которых имеет специфическую пространственную структуру, может привести к тому, что вакцина из подтипа неэффективна для пациента, инфицированного другим подтипом. Высокая скорость мутации ВИЧ, как полагают, усложняет селекцию соответствующего иммуногена.

[0020] Сохранение структурных компонентов ВИЧ может представлять сложность. Как и в патенте США №5106619, в патентах №№6383806 и 6503753 сохраняются целые частицы. Более поздние изобретения направлены на инактивацию только RT.

Сохранение антигенной структуры предназначается для использования преимущества широкого диапазона иммуногенов. Это сохранение корректной антигенной конформации считается важным для проникновения в цитоплазму посредством микропиноцитоза или поглощения дендритными клетками, опосредованного маннозным рецептором. Патент США №6107543 раскрывает способ с инактивацией псораленом, для которого, наоборот, необходимо удаление гликопротеинов оболочки gp120 и gp160 (а не gp41), потому что антитела к этим гликопротеинам могут облегчить поглощение вируса клетками. Фактически, известно, что ВИЧ может связывать и использовать С3b как лиганды, чтобы позволить инфекционным иммунным комплексам связываться с дендритными клетками и В-лимфоцитами. Антитела к gp160 или gp120 иногда приводят к накоплению вируса в лимфатических узлах и селезенке. Подход патента '543, как и других патентов, сохраняет трансмембранный белок gp41 и часть или всю вирусную мембрану.

[0021] Во всяком случае, эта сохраненная вирусная структура может привести к непредусмотренным последствиям. Во-первых, как описано выше, gp160, gp120 и gp41 обеспечивают участки связывания комплементарного Фактора Н (Pinter, Claudia et al. Aids Research and Human Retroviruses, Vol.11(5), pp.577-88 (1995); Pinter, Claudia, et al., Aids Research and Human Retroviruses, Vol.11(8) (1995); Stoiber, Heribert, et al., Immunobiology. Vol.193, pp 98-113 (1995)). Следовательно, сохранение этих структур означает, что Фактор Н будет мешать гуморальному иммунному ответу после вакцинации. Удаление gp120 и gp160 в патенте США №6107543 может до некоторой степени смягчить этот эффект; однако сохранение участка связывания Фактора Н на gp41 работало бы против иммуногенности композиции. Во-вторых, оба подхода молчат относительно клеточной плазматической мембраны и сохраняют часть или всю вирусную мембрану, включая определенные связанные белки, которые мешают иммунному ответу. Как и собирающаяся, реплицирующаяся частица ВИЧ прорастает сквозь плазматическую мембрану инфицированной клетки, мембрана обогащена CD55 (фактором ускорения диссоциации) и CD59 (гомологичным фактором рестрикции), которые регулируют комплемент. Эти молекулы включаются в вирусную мембрану при прорастании из инфицированных клеток. Сохранение некоторых или всех этих особенностей или структур могло мешать активации комплемента и гуморальному ответу (Saifuddin, 1995). В-третьих, компоненты поверхности ВИЧ несут сиаловую кислоту, которая могла остаться на сохраненной структуре инактивированного ВИЧ. Сиаловые кислоты обычно находят на белках хозяина и клеточных структурах; высокое содержание сиаловой кислоты у вируса, даже если вирус был инактивирован, ограничило бы способность хозяина распознавать вирус и должным образом

отвечать. Важно, что остатки сиаловой кислоты также используются в связывании Фактора Н (Meri, Seppo, et al., "Discrimination Between Activator and Nonactivators of the Alternative Pathway of complement Regulation: Regulation Via a Sialic acid/Polyanion binding site on Factor H." Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol.87(10), pp.3982-6 (May 1990); Blackmore, T.K., et al., J. of Immunology, Vol.157(12), pp.5422-7 (Dec. 1997); Kuhn, S., et al., Eur. J. Immunol., Vol.26 (10), pp.2383-7 (Oct 1996); Pangbum, M.K., et al., J. of Immunology, Vol.164 (9) (May 2000)). [0022] Данное изобретение направлено на иммуногенную композицию, которая обращена на эти проблемы. Предполагают, что создание композиций, предназначенных для различных подтипов и аспектов ВИЧ, продвинет вперед лечение и исследование. В конечном счете, существует надежда увеличить выживаемость и улучшить качество жизни инфицированных индивидуумов.

[0023] ВИЧ относится к вирусам, чувствительным к инактивации псораленом. Во время процесса инактивации псораленом сохраняется вирусная структура. Это сохранение выгодно для образования обширного ответа, основанного на антигене. В данном изобретении структура инактивированного вируса модифицирована для удаления или нейтрализации выбранных особенностей, которые мешали бы иммунному ответу. В частности, сиаловая кислота и определенные участки связывания комплементарного Фактора Н нейтрализованы; в некоторых случаях может быть удалена внешняя клеточная плазматическая мембрана. Первичный эффект этой обработки должен устранить помеху иммунному гуморальному ответу комплементарным Фактором Н человека и другими регуляторами активности комплемента (RCA). Кроме того, удаление сиаловой кислоты показывает иммунной системе, что компоненты вируса отличны от компонентов хозяина

[0024] Данное изобретение приспособлено к генотипу представленного вируса. ВИЧ легко реплицируется и легко мутирует с помощью обратной транскриптазы и рекомбинации. Каждая группа, подтип, под-подтип и циркулирующий рекомбинант ВИЧ-1 и ВИЧ-2 уникальны по строению. Отсутствие подтипа может нести серьезные последствия. Для того чтобы иммуногенная композиция была эффективной, необходимо принимать во внимание не только вмешательство сохраненной структуры, но и каждой вирусной группы, подтипа, под-подтипа и т.д., представляющих интерес при данных обстоятельствах. Таким образом, вакцина может быть приспособлена к вирусному штамму (штаммам), имеющемуся у хозяина. Соответственно композиция предпочтительно может быть получена из генетически релевантного образца; например, в случае композиции, предназначенной для вакцинации инфицированного хозяина, релевантный образец может быть выделен из индивидуума-хозяина или подобран ему. В случае композиции, предназначенной для вакцинации неинфицированного человека или животного, релевантный образец может основываться на вероятностной оценке риска контакта с источником заражения для этого человека или животного.

[0025] Соответственно данное изобретение является композицией, способной вызывать иммунный ответ, в которой предварительно определенные штаммы ВИЧ, релевантные для применения в композиции, выделены и инактивированы с помощью псоралена и воздействия ультрафиолета. Кроме того, данное изобретение характеризуется удалением из инактивированного ВИЧ определенных особенностей, которые ослабляют иммунный ответ. Композиция также может включать фармакологические носители, стабилизаторы или наполнители.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0026] На Фиг.1 показано образование фотопродукта псоралена с нуклеиновой

кислотой после облучения ультрафиолетом.

[0027] На Фиг.2 показана зависимость усиления иммуногенности от увеличения длины полисахарида максимум до 16 моносахаридов.

[0028] Фиг.3 представляет схематический рисунок, на котором показаны структуры цепей C3, CVF и их взаимосвязь.

ОПИСАНИЕ ДАННОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0029] Как отмечено выше, известно общее использование псоралена в инактивации ВИЧ для получения композиции или вакцины. Однако изменчивость ВИЧ и его способность мешать иммунному ответу могут снижать эффективность предшествующих мероприятий. Данное изобретение является иммуногенной композицией и способом, направленными на решение проблем, возникших в связи с сохраненными особенностями вирусной структуры, высокой скоростью мутации ВИЧ и устойчивости ВИЧ к иммунному ответу. Данное изобретение относится к иммунотерапии, в которую включено использование или стимулирование иммунной системы при определенном условии или чувствительности. Интересующая иммунная система может быть иммунной системой человека или любого животного, такого как шимпанзе или мышь. Как используется в данном описании, иммунотерапия охватывает приспособление иммуногенной композиции к оптимальной эффективности в условиях высокоизменчивого генотипа совместно с активным влиянием вируса на иммунный ответ. Подразумевается, что улучшения диагностических методик и исследований по данному изобретению вызывают иммунный ответ у животных. Предполагают, что, учитывая разработку эффективной иммуногенной композиции, вакцину можно разработать и ввести с помощью композиции для продуцирования иммунозащитных факторов у пациента.

[0030] Соответственно одним из аспектов данного изобретения является композиция, способная вызывать иммунный ответ, в которой предварительно определенные штаммы ВИЧ, релевантные для применения в композиции, выделены и инактивированы псораленом и воздействием света, а также в которой особенности ВИЧ, ослабляющие иммунный ответ, удалены из инактивированного ВИЧ. Композиция также может включать фармакологически приемлемые носитель, стабилизатор или наполнитель.

[0031] В дополнительном варианте осуществления, предназначенном для применения в качестве вакцины для инфицированного животного, вакцина может включать штаммы, присутствующие у животного на время выделения образца, согласуясь с генотипом вакцины, к той же инфекции. В противном случае профилактическая вакцина может включать интересующие штаммы, основываясь на вероятности заражения. Вакцину можно обработать для удаления особенностей ВИЧ, которые ослабляют иммунный ответ.

[0032] Другим аспектом данного изобретения является способ приготовления иммуногенной композиции, включающий определение штаммов ВИЧ, релевантных для использования в композиции, при инактивировании штаммов используют псорален и воздействие светом, удаляя или модифицируя особенности ВИЧ, которые ослабляют иммунный ответ. В частности, эти особенности или компоненты могут включать участки связывания комплементарного Фактора Н gp160, gp120 и gp41, удаление остатков сиаловой кислоты и необязательно, внешнюю клеточную плазматическую мембрану. Следовательно, способ по данному изобретению получения иммуногенной композиции включает:

1. определение штаммов ВИЧ, вызывающих беспокойство;

2. выделение и культивирование штаммов, вызывающих беспокойство;
3. отделение вируса от культуральной среды;
4. необязательное удаление внешней клеточной плазматической мембраны;
5. добавление псоралена и агента, блокирующего ферменты, репарирующие ДНК;
6. облучение ультрафиолетом;
7. удаление или нейтрализация CD55 и CD59;
8. десиалирование инактивированного вируса.

[0033] Таким образом, данное изобретение является иммуногенной композицией, содержащей подобранную комбинацию подтипов инактивированных псораленом ВИЧ, и способом получения и применения данной композиции.

Определение релевантных штаммов

[0034] Определение штаммов ВИЧ будет зависеть от варианта осуществления и применения данного изобретения. Существует широкий спектр применений для иммуногенных композиций; следовательно, следующее следует рассматривать как пример, а не как ограничение. Определение релевантных штаммов ВИЧ можно разделить на три категории примеров: (i) исследовательские, связанные с разработкой, аналитические; (ii) терапевтические; и (iii) профилактические.

[0035] В одной категории вариантов осуществления иммуногенную композицию можно рассматривать для использования в исследовании или клиническом анализе. Для исследования интересующие штаммы будут определены целями научного поиска. Таким образом, получение, выделение и культивирование вируса ВИЧ будут согласовываться с исследовательским проектом и целями. Определение релевантных штаммов для медицинского исследования может, вероятно, проводиться параллельно какой-либо предусмотренной терапевтической или профилактической потребности, такой как разработка вакцины. Чисто теоретическое исследование может охватить аспекты, такие как разработка исследовательских инструментов или расширение сведений о штаммах, не вызывающих эпидемию ВИЧ. Иммуногенная композиция может также применяться в изучении иммунного ответа, эволюции вируса, эпидемиологии и анализе поведения вируса.

[0036] В следующей категории вариантов осуществления иммуногенная композиция может быть предназначена для введения ВИЧ-инфицированному человеку (или животному или хозяину) возможно как терапевтическая вакцина. В общем, мультивалентные иммуногенные композиции должны быть способны индуцировать иммунный ответ против различных вирусных изолятов; ранее эта мультивалентность включала комбинацию инактивированных вирусных частиц от различных интересующих штаммов. Однако ВИЧ у отдельного хозяина редко является статическим и продолжает эволюционировать посредством генетической мутации и рекомбинации. Прошлые попытки выявить известные штаммы или варианты в мультивалентной вакцине ВИЧ опираются на макроскопические показатели здравоохранения и консервативные образцы штаммов ВИЧ. В данном изобретении штаммы ВИЧ могут быть генотипированы и выделены из образца, полученного у инфицированного человека или животного. То есть моноклеары периферической крови (РВМС) или другой образец можно выделить для идентификации присутствия ВИЧ у инфицированного человека или животного. Можно использовать любой способ типирования, соответствующий обстоятельствам, включая диагностическое типирование на основании последовательности, анализ гетеродуплексной изменчивости (НМА), генотипирование с помощью реактивов для качественного анализа, молекулярные диагностики, определение продуктов гена и определение

продуктов на основании пробы ДНК. Затем вакцину можно составить из штаммов, присутствующих у человека во время выделения образца. Таким образом, в одном варианте осуществления ВИЧ у человека (или животной модели) генотипировали, а информацию использовали для создания сложной вакцины, составленной из исходных
5 компонентов, полученных от инактивированного вируса для каждого из идентифицированных штаммов. Как описано ниже, эта альтернатива может включать вакцину, полученную из вируса, культивированного в человеке РВМС in vitro, или другого образца, выделенного из индивидуума (или животного), который затем
10 подвергается процессу псораленовой инактивации перед повторным введением этому индивидууму или животному в качестве иммуногена. Таким образом, иммунотерапия приспособлена к генотипу вируса данного хозяина. Методика данного изобретения рассматривает множество образцов для идентификации и направленных изменений в доминировании штамма или композиции в течение длительного времени и, в ответ,
15 облегчает изменения при лечении. После разрушения доминирующего штамма может появиться непохожий, но относительно устойчивый вариант, что потребует дальнейшей иммунотерапии.

[0037] В следующей категории вариантов осуществления иммуногенная композиция
20 может быть предназначена для введения неинфицированному человеку возможно как профилактическая вакцина. В прошлом профилактическая композиция и введение были подобны используемым терапевтическим мультивалентным композициям; такие композиции могли быть основаны на комбинированном использовании вирусных частиц из широкого спектра штаммов, предназначенных для индуцирования
25 обширного иммунного ответа. Такой подход описан как один вариант осуществления данного изобретения в форме профилактики.

[0038] Альтернативно данное изобретение в профилактическом варианте осуществления может также основываться на вероятностной оценке риска заражения
30 для данного индивидуума. Примечательно, что патент США №6503753 описывает персональные профилактические вакцины в случаях, когда риск передачи, прежде всего, исходил из определенного индивидуума; следовательно, инактивированные штаммы можно получать из образца, выделенного от данного инфицированного индивидуума. Такие персональные вакцины могли использоваться как вариант
35 осуществления данного изобретения. Аналогично, лаборанты или работники здравоохранения могут подвергаться усиленному риску профессионального заражения определенными известными штаммами и могут воспользоваться усиленным иммунным ответом на эти определенные штаммы. Альтернативно
40 определение штамма для персональных вакцин может основываться на поведенческих и демографических факторах риска инфекции ВИЧ в интересующих географических областях. Такой анализ мог учитывать поведенческие модели в рамках исторических, эпидемиологических и географических данных, подтверждающих анализ вероятности заражения. В географических областях, где эпидемия распространялась вне групп с
45 поддающимися учету факторами риска, мультивалентная профилактика могла отразить все известные штаммы интересующей географической области.

Получение и приготовление для облучения

[0039] Следующие варианты осуществления считаются примерами, а не
50 ограничениями, поскольку являются признанными способами получения, выделения и культивирования вирусов. Фактически, существующий вирус можно получить различными способами. Можно выбрать индивидуумы, зараженные штаммами ВИЧ, и ВИЧ можно выделить, очистить, культивировать и типировать, используя методики,

известные в данной области и частично раскрытые ниже. Такие образцы можно выделить из РВМС или других жидкостей, таких как слюна, или тканей, таких как релевантные слизистые оболочки; однако, как известно в данной области, РВМС будет предпочтительной для включения иммунных компонентов в зависимости от нанесения. Альтернативно, ВИЧ можно приобрести в виде существующих образцов известных коммерческих вирусных стандартов или лабораторных изолятов. Вирусные частицы можно также получить преобразованием клеток вирусными кодирующими векторами, которые поглощаются клеткой как чужеродный генетический материал. Преобразование обычно достигается физическими средствами, такими как совместное осаждение ДНК с нерастворимым хлоридом кальция (Nicholls, Desmond, An Introduction of Genetic Engineering (2nd ed. Feb 2002)). Преобразованная ДНК может находиться в клетке как эписомальный (экстра хромосомный) элемент или объединиться с ядерным геномом. Эффективность переноса ДНК в клетки зависит от используемых специальных методов. Нижеприведенные описания могут быть общими для различных категорий вариантов осуществления, если не указано обратное.

[0040] Данное изобретение рассматривает различные предпочтительные культуральные среды. Первой культуральной средой является РВМС, выделенные из ВИЧ инфицированного хозяина. В этом варианте осуществления клетки реплицировали бы ВИЧ в сохраненной *in vitro* среде хозяина. Такая среда может быть более безопасной и более простой для последующего введения хозяину. Однако многие культуральные среды, такие как клетки человека или дрожжей, включают ферменты, репарирующие ДНК, которые могут обратить действие псоралена. Эти ферменты могут репарировать ДНК или РНК с помощью транскрипции и глобальной геномной репарации. Таким образом, культивирование в РВМС или дрожжевых клетках можно улучшить ингибированием каких-либо ферментов, имеющих тенденцию восстанавливать ДНК и РНК после обработки псораленом и ультрафиолетом. В предпочтительном варианте осуществления такую среду можно обработать ингибиторами репарирующих ферментов, такими как новобиоцин, афидиколин или тем, и другим (Brenneisen, Peter, et al., J. of Biological Chemistry, Vol.275 (6), pp.4336-44 (Feb 11 2000); Niggli, H.J., Mutation Research, Vol.295(3), pp.125-33 (Aug 1993); Cleaver, J.E., J. of Cancer Research, Vol.47(9), pp.2393-6 (May 1987); Rosentein, B.S., et al., Environmental Mutagenis, Vol.8(3), pp.335-43 (1986)). В другом предпочтительном варианте осуществления культуральной средой является какая-либо среда, лишенная таких ферментов, репарирующих ДНК, или имеющая низкий уровень их содержания, как при анемии Фанкони типа С. При анемии Фанкони типа С клетки дефицитны по ферментам, репарирующим ДНК, снижают рекомбинацию, что делает их предпочтительными для применения с псораленовой инактивацией. Как известно, в некоторых мутантных культурах нарушена репарация путем вырезания пиримидиновых димеров, индуцированных ультрафиолетом, и они являются гиперчувствительными к облучению совместно с моно- и бифункциональными псораленами. Примеры включают мутантов *Escherichia coli*, облученных ультрафиолетовыми лучами А, В или С, *Saccharomyces cerevisiae*, облученные RAD3 типом, группы 1 и 4 комплементации раковых клеток яичника китайского хомячка, группы А и D пигментной ксеродермы. Другая культуральная среда может быть функционально эквивалентной, пока ингибированы поврежденные ультрафиолетом ферменты, репарирующие ДНК.

[0041] Для ВИЧ-отрицательного человека (или животного) приемлемую вакцину/иммуноген можно получить культивированием вируса *in vitro* до инактивации

псораленом. Доступно много культуральных сред, но предпочтительным вариантом осуществления были бы собственные моноклеары периферической крови (РВМС) человека. Это подвергло бы вирус избирательному давлению собственной иммунной системы человека. Штамм (штаммы) ВИЧ, который реплицируется *in vitro* в такой культуре, является штаммом, который человек наиболее вероятно будет реплицировать *in vivo* при активной инфекции. Поэтому для каждого ВИЧ-отрицательного и ВИЧ-положительного человека можно подобрать и изготовить вакцину.

[0042] Отделение вируса от культуры клеток можно выполнить центрифугированием клеток в течение 10 минут при 2000 оборотов в минуту и при 4°C. Затем супернатанты можно дважды отфильтровать через 22 миллимикронный микропористый фильтр.

[0043] В некоторых случаях желательно удалить внешнюю мембрану клеток хозяина или мембранные частицы, которые мешают доступу к вирусным компонентам. В этом случае разрушение или удаление наружной мембраны можно выполнить средствами, известными в данной области, такими как обработка этанолом, детергентами, фенолами или другими растворителями. Важно, чтобы удаление наружной мембраны, так или иначе, не изменяло вирусную структуру или не денатурировало какие-либо вирусные белки (Levinson, Warren, *Medical Microbiology & Immunology: Examination and Board Review* (7th ed. July 2002)). В первом варианте осуществления такое удаление можно выполнить детергентами; детергенты являются поверхностно-активными агентами, состоящими из липидной, с длинной цепочкой, растворимой гидрофобной части и полярной гидрофильной части. Гидрофильная группа может быть катионом, амином, неионной или мультивалентной группой. Сурфактанты взаимодействуют с липидом наружной клеточной мембраны своей гидрофобной частью и с окружающей водой своей полярной группой и, таким образом, дезорганизуют наружную мембрану. Для применения по данному изобретению были бы предпочтительными четвертичные соединения аммония, такие как бензалкониума хлорид, которые являются катионными детергентами, широко применяемыми для кожной антисептики. Альтернативно этанол будет нарушать липидную структуру во внешней мембране; без контроля он может денатурировать белки, которые могут являться лимитирующим фактором. При растворении в воде этанол более эффективен, например, 70% этанол предпочтительнее 100%-ного. В-третьих, для некоторых вариантов осуществления могут быть приемлемыми фенолы, такие как гексахлорофен или крезол. Применение каких-либо из этих веществ должно осуществляться при условиях, которые сохраняют антигенную природу инактивированного вируса, сохраняют вирусную структуру и не денатурируют вирусные белки.

[0044] Агент инактивации предпочтительно является псораленом, поскольку он способен сохранить антигенные свойства вирусной структуры, тогда как инактивирует РНК и ДНК. Псоралены представляют класс фотомутагенных и фотохемотерапевтических соединений, которые ковалентно модифицируют нуклеиновые кислоты. Они принадлежат семейству небольших молекул, которые интеркалируют и фотоалкилируют ДНК и РНК (одноцепочечные и двухцепочечные). Первичными целями псораленов являются тимидиновые остатки в ДНК и урациловые остатки в РНК; эти молекулы образуют и моноаддукты, и межцепочечные поперечные межмолекулярные связи. Реакция происходит между 3,4 (пирон) или 4',5' (фуран) двойными связями псоралена и 5,6 двойной связью у пиримидинов.

Фотоприсоединение псораленов к двухцепочечной ДНК (дцДНК) приводит к существенному нарушению структуры нормальной двойной спирали ДНК (Spikes, John D., Photosensitization in Mammalian Cells, Ch. 2 (1983); Averbek, D., et al., Mutagenic Effects of Psoralen-Induced Photo adducts and Their Repair in Eukaryotic Cells, pp.933-59 (1988)).

[0045] Иммуногенную композицию для одного или более предварительно определенных подтипов ВИЧ можно подготовить к облучению следующим образом. Интересующие вирионы ВИЧ в культуре можно поместить в раствор, содержащий 4'-аминометил-4,5',8-триметилпсорален (АМТ). Производные псоралена легко проходят сквозь клеточные стенки и сквозь вирусные оболочки и затем после облучения ультрафиолетом могут реагировать с нуклеиновыми кислотами внутри, продуцируя пиримидиновые димеры. АМТ сшивает межмолекулярными поперечными связями вирусную РНК и ДНК. Все псоралены являются фотоактивными.

Облучение

[0046] После облучения ультрафиолетом псоралены образуют с нуклеиновыми кислотами фотоаддукты. Для этого процесса не нужен кислород, и предпочтительно кислород должен быть удален. Псоралены можно облучать перед добавлением нуклеиновых кислот, и при этом фотоаддукты будут образовываться. Затем вирус ВИЧ можно инактивировать АМТ и ультрафиолетом. После этого вирус не способен реплицировать свою нуклеиновую кислоту, потому что поперечно сшитая ДНК или РНК не может копироваться. Таким образом, вирус "убит" инактивацией своей ДНК или РНК. Поскольку фотореакция блокирует репликацию и экспрессию нуклеиновой кислоты, она составляет основу методики элиминирования инфективности и вирулентности вирусов. Поверхность вируса остается в значительной степени немодифицированной, делая инактивацию вируса потенциально полезной для вакцин.

[0047] Оказывается, что фотоинактивация псоралена превосходит традиционные методики инактивации, такие как обработка формальдегидом, для сохранения антигенности и иммуногенности в экспериментальных инактивированных вакцинах (Hanson (1992)). Фотореакция с АМТ показана для устранения инфективности ВИЧ у ВИЧ-инфицированных клеток без изменения свойств поверхности антигена; эти инактивированные клетки сохраняют нормальную способность реагировать с моноклональными антителами на различные клеточные и вирусные антигены (Hanson, 1992).

[0048] В культурах ВИЧ-инфицированных клеток происходят многочисленные транскрипции ДНК вирусного генома в инфицированной клетке и могут, в конечном итоге, вытекать из лизированных клеток в культуральную среду. Поскольку не известно, представляет ли такая ДНК или РНК опасность трансфекции или трансформации, фотореакция псоралена вероятно будет инактивировать эту свободную ДНК, и в любом случае, даже быстрее, чем он инактивирует содержащие РНК вирионы, таким образом, обеспечивая фактор безопасности, которого нет в традиционных методиках инактивирования, таких, при которых применяют нагревание, спирт или детергент. Кроме того, нагревание, спирт или детергент не могут полностью инактивировать РНК и ДНК вирусов (Hanson, 1992).

[0049] Кинетика псораленовой инактивации часто нелинейная и может проявлять "затухающий" эффект. Это затухание, вероятно, происходит из-за потери активности псоралена вследствие разрушения светом во время облучения вируса. Предпочтительно, периодическое добавление псоралена во время инактивации вируса будет поддерживать линейную кинетику. Потеря активности псоралена параллельна

инактивации вируса. Два последовательных этапа облучения предпочтительны для эффективности и для создания более высоких границ безопасности для вакцины. Например, первое воздействие длиной волны 405 нм, за которым следует воздействие длиной волны 365 нм, предпочтительно для более высокого уровня образования поперечных межмолекулярных связей, способного нарушить молекулу ДНК или РНК. В вариантах осуществления, где необходимо единичное воздействие, затем предпочтительно воздействие длиной волны 365 нм. Норма дозы будет соответствовать поглощению псоралена при данных условиях; избыток дозы после вирусной инактивации может привести к разрушению светом вирусных белков.

[0050] Предпочтительно образец облученных вирусных клеток затем можно культивировать и анализировать для гарантии инактивации и для устранения возможности остаточной инфективности.

Обработка структуральных особенностей, которые могли ослабить иммунный ответ

[0051] Регуляторы активности комплемента, такие как CD55 и CD59, предпочтительно должны быть удалены из композиции. Эти поверхностные гликопротеины ингибируют комплемент. CD55 дестабилизирует C3 конвертазы (C4b, 2b и C3b, Bb) и C5 конвертазы (C4b, 2b, 3b и C3b, Bb, C3b). CD59 и другие гомологичные факторы рестрикции являются белками, экспрессированными на клеточной поверхности, ингибирующими интеркаляцию C9 в плазматическую мембрану, защищая клетки крови, васкулярные эндотелиальные клетки и другие ткани от лизиса каскадом комплемента (Hoffman, 1999). CD55 и CD59 связаны с мембраной и предпочтительно могут быть селективно удалены обработкой фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазой C (PI-PLC). Удаляются все белки, связанные с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI), включая CD55 и CD59. Такое селективное ферментативное расщепление является известным способом обработки.

[0052] Удаление сиаловой кислоты из инактивированной композиции является полезным этапом. Предпочтительно остаток сиаловой кислоты из ВИЧ можно удалить обработкой ферментом нейраминидазой. Нейраминидаза расщепляет сиаловую кислоту (Hart, Melanie L, et al., AIDS Res Hum Retroviruses, Vol.18(17), pp.1311-7 (2002); Men, 1990). Многие из компонентов маннозы защищаются от иммунной системы, покрываясь остатком сиаловой кислоты. Сиаловая кислота, обнаруженная в нормальных клетках и тканях человека, используется иммунной системой для "узнавания хозяина". При этом иммунологический ответ против структур "хозяина" ограничен. Остатки сиаловой кислоты также обнаружены на сильно гликозилированной оболочке ВИЧ (Hart, 2002). Если удалить остатки сиаловой кислоты, тогда Фактор Н не будет связываться с ВИЧ, и вакцина тогда будет идентифицирована иммунной системой как "чужеродная", так что произойдет устойчивый иммунный ответ (Hart, 2002). Совместно с данным изобретением могут также использоваться другие методы нейтрализации или десиализации, такие как обработка трипсином.

[0053] В общем, обработку структурных особенностей можно проводить при различных проблемах приготовления композиции. Десиализация предпочтительна после воздействия псораленом и облучения ультрафиолетом, причем десиализация активного ВИЧ может усиливать вирусную репликацию и инфективность (Hart, 2002).

Приготовление и введение

[0054] Данную иммуногенную композицию можно смешать с соответствующим стимулятором иммунитета или адъювантом, включая нижеописанные альтернативные варианты осуществления. Такие композиции можно использовать как приемлемые для

аппликации. Традиционные стимуляторы или адъюванты, известные в данной области, включают неполный адъювант Фрэйнда, липосомы и т.д. Предпочтительный вариант осуществления включает один или более стимулятор, выбранный из традиционных адъювантов и/или композиций, также приведенных в данном описании.

5 [0055] Также иммуногенную композицию можно смешать с фармацевтическими или лабораторными композициями, приемлемыми для ожидаемого способа применения или введения, такими как носители или наполнители, например минеральное масло.

Штаммы ВИЧ и подтипизация

10 [0056] Как описано выше, ВИЧ имеет разнообразный генотип. Высокий уровень геномного разнообразия у ВИЧ усложняет диагноз и обработку штаммов, которые могут варьировать по инфективности, заразности и иммуногенности. Исследование мультивалентных иммуногенных композиций будет неизбежно включать множественность штаммов. Филогенетический анализ можно выполнять, используя ресурсы баз данных последовательности ВИЧ, известных в данной области и
15 приведенных в данном описании.

[0057] Получение, выделение и идентификация подтипов и под-подтипов ВИЧ хорошо описаны в данной области (Robinson, D.L, et al., HIV-1 Nomenclature Proposal: A
20 Reference Guide to HIV-1 Classification (Sep 1999)). Для данного изобретения подтипирование ВИЧ можно выполнить, используя любые, приемлемые в медицине, средства, известные специалистам в данной области. Генотипирование является прямым средством для идентификации подтипов ВИЧ-1. Следующим, непрямым средством является серотипирование или анализ подтипов ответом антител
25 инфицированного пациента. Предпочтительно использование наборов секвенирования или генотипирования ДНК и РНК, если они включают филогенетический анализ для уточнения интересующих подтипов. Пробы подтипов и испытания env и gag (анализы подвижности гетеродуплексов или НМА) являются
30 альтернативными, но, возможно, ограниченными методиками (Salminen, Mika, Nat'l Pub. Health fast. (1994); Buonaguro, Luigi, J. of Virology, Vol.69, No. 12 pp.7971-7981 (1995)). В общем, более высокий объем подтипирования может быть ограничен для распознавания меньшего количества подтипов.

35 [0058] Индивидуальные группы ВИЧ-1 М (major), О (outlier) и N (ни major/ни outlier) могут возникать при отдельных случаях передачи; ВИЧ-1 несколько подобен SIV (вирусу иммунодефицита обезьяны). Филогенетическое разнообразие в каждой из этих групп в подтипах или клэдах происходит из-за генетических мутаций. Штаммы группы М прежде всего ответственны за большинство инфекций ВИЧ, в то время как
40 штаммы групп О и N выделены, главным образом, у индивидуумов из Камеруна.

[0059] Подтипы и под-подтипы группы М ВИЧ-1, кажется, генетически различаются у людей общего происхождения. Члены группы М разделены на девять эквидистантных филогенетических подтипов. Они обозначены А1, А2, В, С, D, F1, F2, G, H, J и К. Последовательности в каком-либо одном подтипе или под-подтипе имеют
45 большее генетическое сходство между собой, чем с последовательностями из других подтипов по их геномам. Подтипы составляют различные линии ВИЧ и могут быть статистически связаны с социальными или географическими факторами. Таким образом, система подтипирования идентифицирует генетические кластеры; это можно
50 использовать для определения для локализации специфических для подтипа биологических различий или сходств в компонентах ВИЧ, таких как белки. В качестве дополнительной трудности вирусы в подтипе могут эволюционировать с различными скоростями, в то время как различаться по скоростям эволюции могут также и

подтипы.

[0060] Ретровирусы имеют тенденцию рекомбинироваться с родственными ретровирусами. Эта рекомбинация вносит свой вклад в генетическое разнообразие. Процесс рекомбинации создает варианты, устойчивость к лекарственным препаратам и модификационную экспрессию антигенных свойств. Циркулирующие рекомбинантные формы (CRF) ВИЧ являются рекомбинантными геномами ВИЧ-1, которые проявляют эпидемиологически релевантный эффект при эпидемии ВИЧ-1. CRF ВИЧ охарактеризованы идентичными мозаичными структурами. Рекомбинация может происходить во время обратной транскрипции, когда существует дополнительное переключение матриц между обеими цепями геномной РНК, совместно упакованными в каждом вирионе. Если две цепи принадлежат различным подтипам группы М ВИЧ-1, то результатом является мозаичный геном, составленный из областей от каждого из двух подтипов; то есть вирусная обратная транскриптаза переключает матрицы от одного упакованного генома РНК на другой во время обратной транскрипции после попадания совместно упакованных геномов в новую клетку.

[0061] Эти межподтипные мозаики обычно обнаруживают у многократно инфицированных отдельных пациентов. Если существует передача межподтипно рекомбинирующегося вируса, то она может создать в эпидемии ВИЧ циркулирующий штамм. CRF обозначают номерами, под которыми они впервые описаны. На 2002 год было почти 3 миллиона CRF инфекций; инфекции CRF становятся более вероятными, добавляя геномное разнообразие.

[0062] Хотя ВИЧ-2 и ВИЧ-1 являются генетически и антигенно родственными, ВИЧ-2 отличается от ВИЧ-1 по биологическим и эпидемическим свойствам. Различные группы ВИЧ-1 обнаруживаются по всему миру, в то время как ВИЧ-2 обнаружен преимущественно в Африке, Европе и Индии. ВИЧ-2 родственной SIV, выделенному у *Sooty mangabeu*. Последовательности клэдов А, В, С, F или G ВИЧ-2 отличаются от последовательностей в клэдах D и E, из чего следует, что каждая группа ВИЧ-2 представляет отдельный случай передачи. Полагают, что ВИЧ-2 имеет более низкую инфективность и патогенность.

Описание дополнительных вариантов осуществления

[0063] В следующем варианте осуществления композиция может быть связанной ковалентными или другими связями с полисахаридами, состоящими из маннозы или маннана. Связывание или соединение можно осуществить способами, известными в данной области. Манноза является сахаром, обнаруженным только у микроорганизмов и патогенов, который обычно не находят в организме человека. Белок, связывающий маннозу (МСБ), является коллектином, лектином С-типа, который имеет области коллагеновой структуры. Он присутствует в нормальной сыворотке человека и состоит из субъединиц, каждая из которых имеет три полипептидных цепи, образующих подобно коллагену тройную спираль и три С-концевых глобулярных домена, распознающих углеводы (CRD). Шесть субъединиц вместе образуют полную структуру, напоминающую структуру С1q классического пути комплемента, подобную букету тюльпанов. Связывание МСБ с углеводом инициирует классический путь комплемента для активации C1r₂ C1s₂. Это может привести к комплементу, убивающему или непосредственно через вставку концевой мембраноатакующего комплекса, или через опсонизацию отложением комплемента на поверхности микроорганизма. МСБ может также активировать С2 и С4 через другие, недавно описанные сериновые протеазы, называемые МАСП (1 и 2) сериновые

протеазы. Таким образом, МСБ также проявляет независимую от комплемента опсонизирующую активность, вероятно опосредованную связыванием коллагеновых стеблей с коллектиновым рецептором фагоцитарных клеток (Prodinge, W.M., et al., *Fundamental Immunology*, Ch. 29, pp.967-95 (4th ed. 1999); Speth, Cornelia, et al., *The Middle Eu. J. of Medicine*, Vol.111 (10) pp 378-391 (1999)). Любой организм, несущий маннозу или маннан на своей поверхности, будет стимулировать лектиновый путь активации комплемента. Композиция, связанная с такими полисахаридами, в сыворотке свяжется с пектином, связывающим маннозу, активируя лектиновый путь системы комплемента. Таким образом, данный альтернативный вариант осуществления усилит, таким образом, полный иммунологический ответ на вакцину.

[0064] В другом варианте осуществления композицию можно скомбинировать с веществами, стимулирующими или активирующими альтернативный путь комплемента. Например, известно, что определенные формы теихоевой кислоты являются мощными активаторами альтернативного пути комплемента (Winkelstein J.A., *J.ofImmun.*, Vol.120, pp 174-178 (1978)). Кроме того, зимозан, который можно получить из клеток дрожжей, может индуцировать цитокины и стимулировать иммунный ответ совместно с альтернативным путем системы комплемента. Зимозан фагоцитируется макрофагами с опсонизацией или без опсонизации и поэтому обладает полезным иммунологическим качеством активации альтернативного пути комплемента. Взаимодействие зимозана и макрофага, как полагают, усиливает Th-1 ответ. Клетки CD4 можно разделить на клетки Th-1 и Th-2. Клетки Th-1, продуцируя IL-2, активируют цитотоксические Т-клетки; в свою очередь, клетки Th-2 активируют В-клетки, первично продуцируя IL-4 и IL-5. Уровень Th-1 ответа, произведенного зимозаном, регулируется фрагментами C3b и iC3b расщепленной C3.

Аmplифицированный C3b откладывается на соответствующей поверхности зимозана и собирает макрофаги, дендритные клетки или другие антигенпрезентирующие клетки. Макрофаги, дендритные клетки или другие антигенпрезентирующие клетки представляют антиген Th-1 клеткам после опсонизации зимозана и после того, как происходит активация антигенспецифических макрофагов (Ara, Yuki, et al., *Immun.* Vol.103(1), pp.98-105 (May 2001)). Поэтому зимозан можно использовать как иммунный стимулятор; он усиливает гуморальный и клеточно-опосредованный иммунные ответы на ВИЧ-заболевание. Таким образом, композиция может быть связана ковалентной или другими связями с веществами, стимулирующими альтернативный путь комплемента, такими как теихоевая кислота или зимозан.

[0065] Следовательно, для усиления иммуногенности композиции манноза теихоевая кислота, зимозан или какая-либо их комбинация могут связываться с белковыми компонентами композиции. Предпочтительно, полисахариды будут состоять из шестнадцати отдельных сахаридных единиц (Pangbura, M.K, 1989). Предпочтительным источником для углеводного/стимулирующего компонента композиции будет капсульный полисахарид дрожжевой клетки *Cryptococcus neoformans* серотипа C (Sahu Arvind, et al., *Biochem. J.*, Vol 302, pp 429-436 (1994)). Эта дрожжевая клетка представляет четыре разветвленных ксилозных сахара от каждой повторяющейся триманнозной единицы. На Фиг.2 показано снижение активности Фактора Н и Фактора I на C3b при увеличении длины полисахарида максимум до 16. Если такие дрожжи подходят для введения ферментов, репарирующих ДНК, то ферменты предпочтительно должны быть инактивированы с применением описанных выше методов.

[0066] Кроме того, все молекулы глюкозы и полисахаридов должны быть удалены

из композиции. Глюкоза ингибирует скорость и степень отложения C3b (Sahu, 1994). Глюкозу можно удалить добавлением инсулина в культуры клеток.

[0067] В дополнительном варианте осуществления можно ингибировать действие гепарина. Гепарин является кофактором, необходимым для эффективной функции Фактора Н (Linhardt, Robert J., et al., *Biology Chemistry*, Vol.263(26), pp.13090-6 (Sep.18 1988); Mailliet, Francoise, et al., *Mol. Immun.*, Vol.25(9), pp.917-23 (1998); Blackmore, 1996; Blackmore, 1998; Giannakis, Eleni, *Immunopharmacology*, Vol.1(3), pp.433-43 (Oct 2001)). Фактор Н является главным лимитирующим белком в альтернативном пути комплемента. Альтернативный путь комплемента является первым звеном иммунной системы, отвечающей на микроорганизмы или вакцины. Протамин связывает гепарин и используется для снижения действия гепарина у пациентов, подвергающихся антикоагуляции (Mailliet, Francoise, et al., *Molecular Immun.*, Vol.20 (12), pp.1401-4 (Dec 1983); Weiler, John, et al., *J. Exp. Med.*, Vol.147 (2), pp.409-21 (Feb 1978)). Недавно стал доступным протамин с низкой молекулярной массой (LMWP), который является менее токсичным антагонистом гепарина. Протамин, или предпочтительно LMWP для данного варианта осуществления, может включаться как компонент для снижения активности Фактора Н в ограничении альтернативного пути комплемента (Liang, J.F., et al., *Biochemistry*, Vol.68(1), pp.116-20 (2003)). Альтернативно, гепариназа, как известно, ферментативно разрушает гепарин.

[0068] В другом варианте осуществления в вакцину могут быть включены сульфатированные полианионы. Сульфатированные полианионы абсорбируют Фактор Н, эффективно удаляя его из обращения. Другие полианионы, такие как сульфат декстрана и ДНК, активируют Фактор Н. Эти полианионы должны быть удалены из вакцины. Разветвленные частично гидролизованные глюкозные полисахариды, известные как декстраны, применяются как эффективные плазматические расширители (Hoffman, 1999). Сульфат декстрана представляет собой натриевую соль серноокислотных эфиров полисахарида декстрана.

[0069] Растворимый сульфат декстрана с молекулярной массой более чем 5×10^3 является индуктором альтернативного пути комплемента. Число сульфатных групп на сто глюкозных остатков в декстране определяет потенциал активации декстрана в альтернативном пути. Оптимальная степень сульфатирования составляла 50-60 $\text{SO}_4/100$ молекул глюкозы (Burger, R., et al., *Immunology*, Vol.29(3), pp.549-54 (1975)).

[0070] Сульфат сефадекса (СС) является перекрестно сшитой нерастворимой формой декстрана. Подобно растворимому сульфату декстрана СС активирует альтернативный путь комплемента, а также классический путь. Активность СС в обоих путях активации комплемента зависит от трех показателей: (1) количество сульфатов; более высокое содержание сульфатов вплоть до 15,6% по весу приводит к более сильной активации комплемента; при содержании сульфатов менее чем 2,43% активация комплемента не отмечена; (2) концентрация СС; более высокие концентрации приводят к активации комплемента с максимальной интенсивностью С3 при 40-50 мкг/мл; (3) температура; максимальная интенсивность С3 отмечена при 37°C с общей потерей активности при 4°C (Burger, R., et al., *Immunology*, Vol.33(6), pp.827-37 (Dec 1977)).

[0071] Растворимая и нерастворимая формы декстрана (с молекулярной массой >5000) активируют альтернативный путь комплемента. Это достигается блокированием действия Фактора Н (Bitter-Suermann, D, et al., *European J. of Immun.*, Vol.11(4), pp.291-5 (Apr 1981)).

[0072] Низкомолекулярный сульфат декстрана (<5000) усиливает связывание

Фактора Н, следовательно, он лимитирует активность альтернативного пути комплемента (Men, 1990). ДНК, подобно гепарину, также увеличивает связывание Фактора Н (Gardner, William D., Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.94, pp 61-67 (1980)).

5 [0073] Следовательно, для усиления иммуногенности в композицию можно включать сульфат декстрана с молекулярной массой >5000 при 50-60 SO₄/100 молекул глюкозы. Аналогично СС усилил бы иммуногенность композиции с 15,6% SO₄ по весу при концентрации 40-50 мкг/мл при температуре 37°С. Декстран с низкой
10 молекулярной массой не был бы включен в композицию, поскольку он увеличивает связывание Фактора Н и уменьшает активацию комплемента. Наконец, ДНК усиливает активность комплемента и, следовательно, этот иммуноген может использоваться одновременно с вакциной из ДНК. (КДС вакцина (вакцина для профилактики коклюша, дифтерии и столбняка) состоит из трех отдельных вакцинных
15 компонентов. Коклюшный компонент действует как адъювант для двух других (Parham, Peter, The Immune System, Ch. 12 (2nd ed. 2004)). Аналогичная ситуация существует в данном изобретении, где вакцина из ДНК против ВИЧ заболевания действует как адъювант для псораленовой вакцины).

20 [0074] В следующем варианте осуществления данного изобретения могут использоваться вещества, стабилизирующие конвертазу С3. Все три пути комплемента ведут к продуцированию С3b, который ковалентной связью соединяется с поверхностью микроорганизмов или с компонентами микроорганизмов, представленными в такой иммуногенной композиции. С3b образуется ферментами,
25 известными как С3 конвертаза. Фактор яда кобры (CVF), полученный от змеи *Naja kaouthia*, стабилизирует этот фермент (Alper, C.A. and D. Balavitch, Science, Vol.191(4233), pp.1275-6 (Mar 1976)). Период полужизни CVFC3b, Bb С3/С5 конвертазы составляет семь часов в отличие от эндогенно образованной в альтернативном пути
30 комплемента С3 конвертазы (С3b, Bb), период полужизни которой составляет 1,5 минуты. С2b, Bb дезассемблирован Фактором Н, а С3b инактивирован комбинированным действием Фактора Н и Фактора I. Напротив, Фактор CVFC3, Bb устойчив ко всем белкам, регулирующим комплемент (Kock, Michael A., et al., J. of Biol. Chemistry, Vol.279(29), pp.30836-43 (July 2004)). Для воздействия на С5 для С3b, Bb
35 необходим дополнительный СЗЬ, тогда как CVF, Bb может расщеплять С5 непосредственно. Поэтому фермент CVF, Bb непрерывно активирует С3 и С5 (Kock, 2004).

[0075] Полагают, что биологическая функция CVF в яде кобры облегчает
40 проникновение токсических компонентов яда в кровяное русло. Это достигается за счет активации комплемента, вызывающей высвобождение анафилотоксинов С3а, С5а и Bb, которые увеличивают проницаемость сосудов (Vogel, Carl, Immunoconjugates, Ch. 9 (1987)). CVF, несмотря на его происхождение из яда кобры, является нетоксичным белком; CVF можно выделить из других ферментов, полипептидов и т.д. из яда кобры,
45 который включает токсины.

[0076] Таким образом, введение CVF приводит к взрывному продуцированию С3b (Vogel, 1987; Kock, 2004). На Фиг.3 показана структуральная гомологичность между С3 и CVF. С3b на поверхности микроорганизмов распознается фолликулярными
50 дендритными клетками в лимфатических узлах, а также Т-клетками и В-клетками в периферическом кровотоке и в зародышевых центрах лимфатических узлов. С3b является мощным опсоином. Опсоины запускают одновременно несколько звеньев иммунной системы (Hoffman, 1999). Таким образом, в альтернативном варианте

осуществления CVF можно использовать как компонент композиции.

[0077] Предпочтительной формой CVF является dCVF (де-α-галактозилированная CVF) (Gowda, D.C, et al., J. of Immunology, Vol.152(6), pp.2977-86 (Mar 1994)). CVF, природного происхождения, характеризуется несвойственным полисахаридом, который является фукозилированной цепочкой сложного типа, состоящей из двух ветвей со связью через атом азота, содержащий α-галактозилированный Le^x антигенный эпитоп, Galα1-3Galβ1-4 (Fucα1-3) GlcNAcβ1. Удалить этот полисахарид можно инкубированием CVF с пептид-N-глюкозидазой F (N-глюконазой) при 37°C в течение 18-23 часов при pH 8,0. Удалить этот новый полисахарид из CVF необходимо, поскольку 1% IgG человека реагирует с концевой последовательностью Galα1-3Galβ1 CVF. Однако удаление этого полисахарида не влияет на характер фиксации комплемента молекулы и не приводит к сокращению периода полужизни молекулы. dCVF будет связан ковалентной связью с полисахаридной единицей (единицами), включающей иммуногенную композицию.

[0078] В другом варианте осуществления к композиции могут быть добавлены соединения никеля. Показано, что никель эффективен в усилении активности C3 конвертазы при лектиновом и альтернативном путях комплемента (Fishelson, Z., et al., J. of Immun., Vol.129(6), pp.2603-7 (Dec 1982)). Оценивают, что среднее потребление никеля для среднестатистического взрослого человека составляет 60-260 мкг в день, со стандартной дозой 0,02 мг на кг веса тела в день (мг/кг/день) (США. Ассоциация охраны окружающей среды (EPA), 2003). Предполагается, что данное изобретение будет включать никель предпочтительно в форме хлорида никеля согласно среднему суточному потреблению значительно ниже стандартной дозы. Следовательно, данное изобретение можно осуществить с использованием никеля для усиления иммунного ответа.

Краткое изложение

[0079] В заключение данное изобретение является иммуногенной композицией и вакциной из целых частиц, основанной на инактивации псораленом предварительно определенных штаммов ВИЧ, где определенные особенности, которые мешают иммунному ответу, обработаны. Индивидуальные или компонентные вакцины можно создать для подтипов ВИЧ или интересующих циркулирующих рекомбинантных форм, упомянутых выше или возможно идентифицированных в будущем.

[0080] Процесс определения, какой штамм ВИЧ нужно включить в иммуногенную композицию, зависит от рассматриваемого применения. В качестве терапевтического примера образец РВМС можно выделить у ВИЧ-положительного пациента; а из них можно выделить, амплифицировать и секвенировать соответствующие области образца (например, env gp41, gag p24) генома ВИЧ для определения подтипа ВИЧ. Филогенетический анализ можно провести, используя ресурсы базы данных последовательностей ВИЧ. В то же время можно оценить вирусную нагрузку.

[0081] Способ получения иммуногенной композиции по данному изобретению включает:

1. определение и выделение интересующих штаммов ВИЧ;
2. культивирование штаммов необязательно в культуре, дефицитной по ферменту, репарирующему ДНК;
3. отделение вируса от культуральной среды;
4. необязательное удаление внешней клеточной плазматической мембраны;
5. добавление псоралена и необязательно агента, блокирующего фермент, репарирующий ДНК;

6. облучение ультрафиолетом;
7. удаление или нейтрализация CD55 и CD59;
8. десиалирование инактивированного вируса.
9. необязательно добавление приемлемых иммунных стимуляторов и адьювантов.

5 [0082] Для приготовления композиции, которая основывается на вакцинном агенте по данному изобретению, возможно применение известных способов очистки, синтеза или генной инженерии для каждого компонента. Специалисты в данной области при
10 приготовлении вакцины могут выделить и инактивировать вирусные штаммы. Они могут быть включены в фармацевтические композиции, приемлемые для предполагаемого способа введения, как носители или наполнители. Композицию по данному изобретению можно вводить пациенту, нуждающемуся в лечении, в количествах, достаточных для усиления иммунного ответа; то есть терапевтически эффективная доза будет включать количество, необходимое для отмены супрессии
15 специфического иммунитета у ВИЧ-положительного пациента до желательной степени, и определяться с помощью стандартных способов, таких как анализ с радиоактивным хромом, внутриклеточный анализ цитокинов, лимфо-пролиферативный анализ (LPA), ELISpot анализы гамма-интерферона (IFN- γ) и анализы связывания тетрамера МНС. Эти же лабораторные анализы можно было бы
20 применять для измерения иммунного ответа у ВИЧ-отрицательного пациента. Терапевтически действенное или эффективное дозирование и режим дозирования будет зависеть от возраста пациента, пола и сопутствующих болезней. Кроме того, потенциальная беременность является фактором лечения женщин, способных к
25 деторождению.

[0083] Анализ и разработка иммуногенной композиции должны включать оценивание широкого диапазона доз инактивированной частицы. Опыты на животных
30 должны учитывать различия в размере, видовые различия и иммунологические особенности; ожидается, что иммунологические различия между людьми и животными могут снизить значение опытов на животных при анализе токсичности. Клинические испытания будут включать, по меньшей мере, стандартную трехфазную модель, включающую в первой фазе анализ безопасности и дозировки на небольшой группе, во второй фазе анализ безопасности и иммуногенности на нескольких сотнях
35 добровольцев, в третьей фазе крупномасштабный анализ эффективности. Стартовая доза для опытов может составлять 10 мкг/штамм для подростков и 20 мкг/штамм для взрослых. Во время испытания необходимо рассмотреть концентрацию частиц в широком диапазоне 10-10²⁰. Как принято, клинические опыты должны включать
40 приемлемые исключаяющие критерии, такие как исключение других условий, супрессирующих иммунитет, беременность, активное применение лекарственного препарата и т.д.

[0084] Введение можно осуществлять различными способами, например, орально, трансбуккально, трансмукозально, подъязычно, назально, ректально, вагинально,
45 внутрь глаза, внутримышечно, внутрь лимфатического узла, внутривенно, подкожно, трансдермально, внутрикожно, внутрь опухоли, местным применением, через легкие, ингаляцией, инъекцией или имплантацией и т.д. Различные формы композиции могут включать, без ограничения, капсулу, гелевую капсулу, таблетку, кишечную капсулу,
50 капсулированную частицу, порошок, суппозиторий, инъекцию, мазь, крем, имплантат, пластырь, жидкость, средство для ингаляции или спрей, системное, местное или другое оральное средство, растворы, суспензии, инфузии и т.д. Кроме того, данное изобретение можно комбинировать с другими терапевтическими агентами, такими как

цитокнины, включая цитокнины природного происхождения, рекомбинантные и мутирующие формы, фрагменты, сшитые белки и другие аналоги и производные цитокинов, смеси, другие биологически активные агенты, композиционные добавки и т.д. Специалистам в данной области известно, что для инъекции приемлемым является состав в водных растворах, таких как раствор Рингера или солевой буфер. Липосомы, эмульсии и растворители являются следующими примерами доставляющих носителей. Для орального введения необходимы носители, приемлемые для капсул, таблеток, жидкостей, гранул и т.д., такие как сахароза, целлюлоза и т.д. Так как одними из первых мишеней инфицирования ВИЧ являются эпителиальные клетки и макрофаги дермы в коже, ректальная и вагинальная слизистая оболочка, то предпочтительным вариантом осуществления доставки является дермальный в комбинации с ректальным и/или вагинальным суппозиторием. ВИЧ передается, главным образом, контактом с ректальной и вагинальной слизистыми оболочками. Следовательно, способ введения вакцины ректальным и/или вагинальным суппозиторием будет предпочтительным способом введения. Данное изобретение также может применяться в "прайм-буст" протоколе.

[0085] В то время как приведенное выше описание рассматривает специфические варианты осуществления данного изобретения, будет понятно, что может быть сделано множество модификаций без отступления от его содержания. Приведенная формула изобретения охватывает такие модификации, которые находятся в пределах сущности и объема данного изобретения.

25

Формула изобретения

1. Композиция для индуцирования иммунного ответа на ВИЧ, включающая в фармацевтически приемлемом носителе инактивированный целый вирус, по меньшей мере, одного предварительно выбранного штамма ВИЧ, где указанная инактивация вируса осуществляется воздействием ультрафиолетового излучения и псоралена, при этом композиция является десИАлированной, а также при этом из указанного вируса удалены CD55 и CD59.

2. Композиция по п.1, где CD55 и CD59 удалены обработкой фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазой.

3. Композиция по п.1, где сиаловая кислота удаляется путем обработки нейраминидазой, трипсином или другим соответствующим ферментом для удаления сиаловой кислоты.

4. Композиция по п.1, где CD55 и CD59 удалены путем обработки фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазой и где сиаловая кислота удаляется путем обработки нейраминидазой.

5. Композиция по п.1, где указанный, по меньшей мере, один штамм ВИЧ предварительно определен для ВИЧ-положительного хозяина путем определения генотипа ВИЧ у ВИЧ-положительного хозяина.

6. Композиция по п.1, где полианионы в иммуногенной композиции, способные потенцировать Фактор Н, в значительной степени удалены из композиции.

7. Композиция по п.1, где добавлены сульфатированные полианионы, способные абсорбировать Фактор Н.

8. Композиция по п.1, где указанная композиция комбинирована со стимулятором иммунитета.

9. Композиция по п.8, где указанный стимулятор иммунитета включает полисахариды, состоящие из, по меньшей мере, одной маннозы, в форме, способной

связываться с указанной композицией.

10. Композиция по п.8, где указанный стимулятор иммунитета включает тейхоевую кислоту в форме, способной связываться с указанной композицией.

11. Композиция по п.8, где указанный стимулятор иммунитета включает зимозан в форме, способной связываться с указанной композицией.

12. Композиция по п.8, где указанный стимулятор иммунитета включает *Cryptococcus neoformans* серотипа C, имеющий полисахаридную капсулу в форме, способной связываться с указанной композицией.

13. Композиция по п.8, где указанный стимулятор иммунитета включает протамин в форме, способной связываться с гепарином.

14. Композиция по п.8, где указанный стимулятор иммунитета включает гепариназу.

15. Композиция по п.8, где указанный стимулятор иммунитета включает фактор яда кобры в форме, адаптированной к усилению продуцирования C3b.

16. Композиция по п.15, где указанным фактором яда кобры является dCVF.

17. Композиция по п.8, где указанный стимулятор иммунитета включает никель в форме, адаптированной к усилению активности C3 конвертазы.

18. Способ активирования иммунного ответа у индивидуума, при котором вводят композицию, включающую инактивированный полный вирус, по меньшей мере, одного предварительно определенного штамма ВИЧ, где указанная инактивация вируса осуществляется воздействием ультрафиолетового излучения и псоралена, а также где указанный вирус обработан фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазой для удаления CD55 и CD59 и нейраминидазой для удаления сиаловой кислоты.

19. Способ по п.18, при котором указанную композицию вводят капсулой, гелевой капсулой, таблеткой, кишечной капсулой, капсулированной частицей, порошком, суппозиторием, инъекцией, мазью, кремом, имплантатом, пластырем, жидкостью, средством для ингаляции или спреем.

20. Способ по п.18, при котором указанную композицию вводят орально, трансбукально, трансмукозально, подъязычно, назально, ректально, вагинально, внутрь глаза, внутримышечно, внутрь лимфатического узла, внутривенно, подкожно, трансдермально, внутрикожно, внутрь опухоли, местным применением, через легкие, ингаляцией, инъекцией или имплантацией.

21. Способ по п.18, где указанный, по меньшей мере, один штамм ВИЧ предварительно определен для ВИЧ-положительного индивидуума путем определения генотипа ВИЧ у ВИЧ-положительного индивидуума.

22. Способ по п.18, где для указанного, по меньшей мере, одного штамма ВИЧ предварительно определена вероятностная оценка риска воздействия на индивидуума.

23. Способ приготовления композиции, при котором проводят следующие этапы: выделение и культивирование, по меньшей мере, одного предварительно определенного штамма вируса иммунодефицита человека;

добавление псоралена к вирусу и облучение вируса ультрафиолетом для инактивации ДНК и РНК;

удаление CD55 и CD59 и

удаление сиаловой кислоты.

24. Способ по п.23, где указанный, по меньшей мере, один штамм вируса предварительно определяют для ВИЧ-положительного хозяина путем определения генотипа ВИЧ у ВИЧ-положительного хозяина.

25. Способ по п.23, где для указанного, по меньшей мере, одного штамма вируса

предварительно определяют вероятностную оценку риска воздействия.

26. Способ по п.23, при котором включают дополнительный этап удаления внешней плазматической мембраны клетки.

5 27. Способ по п.23, при котором включают дополнительный этап ингибирования ферментов, репарирующих ДНК, в композиции.

28. Способ по п.23, где культивирование, по меньшей мере, одного предварительно определенного штамма вируса иммунодефицита человека проводят в культуре, дефицитной по ферменту, репарирующему ДНК.

10 29. Способ по п.23, где культивирование, по меньшей мере, одного предварительно определенного штамма вируса иммунодефицита человека проводят в РВМС индивидуума.

15 30. Способ по п.23, при котором, кроме того, включают дополнительный этап добавления, по меньшей мере, одного стимулятора иммунитета.

20

25

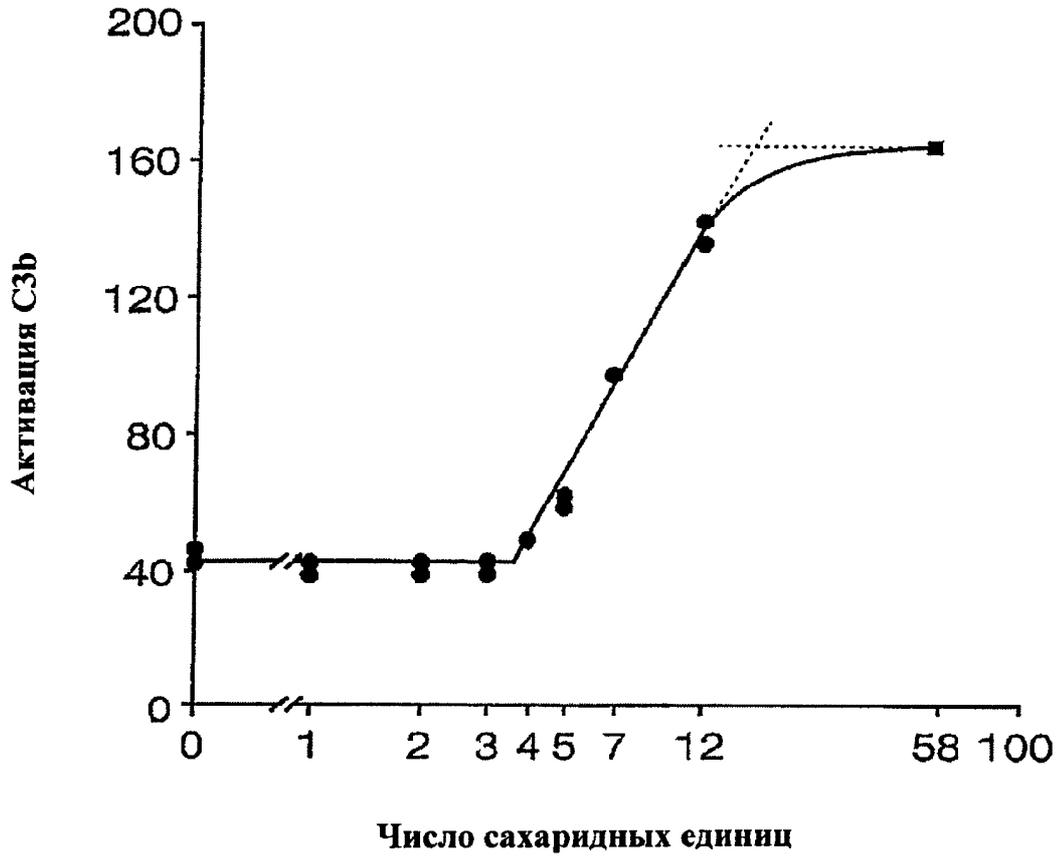
30

35

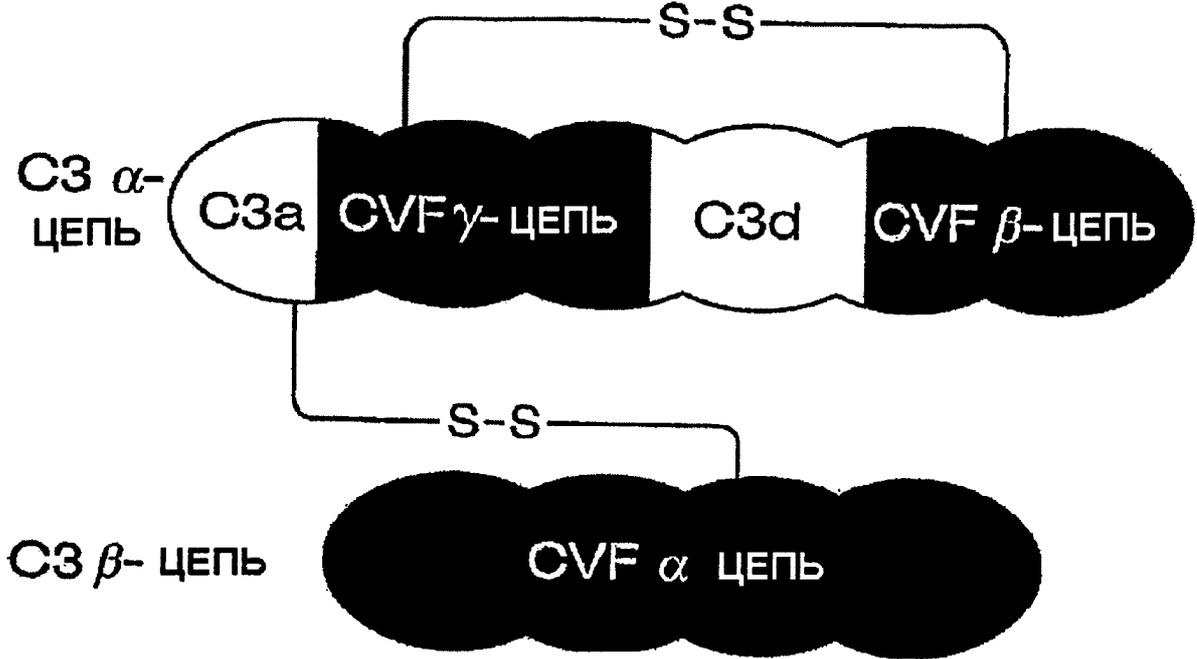
40

45

50



Фиг. 2



Фиг. 3