



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118542** (13) **C2**
(51) МПК
A61K 39/21 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2014 12809	(72) Винахідник(и): Крузе Жоель (FR), Хо Тсон Фан Рафаель (FR), Дефонтен Домінік (FR)
(22) Дата подання заявки: 30.05.2013	(73) Власник(и): ІННАВІРВАКС, Genopole Entreprises, Campus 1, 4 rue Pierre Fontaine, F-91058 Evry Cedex, France (FR)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 11.02.2019	(74) Представник: Кислиця Тетяна Олегівна, реєстр. №425
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 12305602.0	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2010022740 A2, 04.03.2010 Zhang Hai-Long et al. A novel combined conjugate vaccine: Enhanced immunogenicity of bFGF with CRM197 as a carrier protein. Molecular medicine reports, 2011, Vol. 4, no. 5, P. 857 - 863 Vieillard Vincent et al. A vaccine strategy against AIDS: an HIV gp41 peptide immunization prevents NKp44L expression and CD4+ T cell depletion in SHIV-infected macaques. Proceedings of the national academy of sciences, National academy of sciences, US, 2008, Vol. 105, no. 6, P. 2100 - 2104
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 31.05.2012	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.04.2015, Бюл.№ 7	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.02.2019, Бюл.№ 3	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/IB2013/054482, 30.05.2013	

(54) ІМУНОГЕННА СПОЛУКА, ЩО ВКЛЮЧАЄ ПЕПТИД GP41 ВІЛ, ЗВ'ЯЗАНИЙ З БІЛКОМ-НОСІЄМ CRM197

(57) Реферат:

Винахід стосується імуногенної сполуки, що включає пептид GP41, ковалентно зв'язаний з білком-носієм, таким як білок CRM197, композиції, що містить вказану імуногенну сполуку, і застосування даної імуногенної сполуки і композиції для попередження і/або лікування стану, що викликаний інфікуванням індивідуума вірусом ВІЛ.

UA 118542 C2

ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід належить до галузі вакцин, які спрямовані проти вірусів сімейства ВІЛ (вірус імунодефіциту людини).

ПОПЕРЕДНІЙ РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

5 Приблизно 90% ВІЛ інфекцій людини викликані вірусом ВІЛ-1. Вірус імунодефіциту людини 1 (ВІЛ-1) характеризується вражаючою генетичною мінливістю, яка викликана накопиченням мутацій, що виникають у процесі реплікації вірусу, а також викликаною діями рекомбінації. Тривала відсутність успіху хіміотерапевтичних методів лікування ВІЛ, зокрема, пояснюється високою мутагенною активністю штамів вірусу ВІЛ-1. Раніше було показано, що резистентні

10 варіанти вірусу швидко виникли у пацієнтів після різних курсів антиретровірусної терапії, і навіть після мультилікарської терапії (ВААРВТ (високоактивна антиретровірусна терапія)). Дані резистентні віруси несуть специфічні зміни в конформації і структурі їх білків. Зазвичай такі мутації, відповідальні за формування стійкості ВІЛ-1 до сучасних терапій, зберігаються протягом наступних поколінь вірусу і накопичуються в результаті селекції в умовах терапії.

15 Лікування лікарськими засобами ВІЛ-1 повністю не блокує реплікацію вірусу, що дає можливість селекції і накопиченню передіснуючих мутацій резистентності, а також знову виникаючих мутацій, що, таким чином, надає нові можливості для продовження поширення вірусу. Існуючі антиретровірусні лікарські засоби (нуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази (НІЗТ), ненуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази (ННІЗТ), інгібітори протеази, інгібітори

20 злиття і їх суміші, такі як ВААРВТ) можуть тільки сповільнювати реплікацію ВІЛ-1 протягом більш-менш тривалого періоду часу, який триває до виникнення і розмноження резистентних штамів вірусу. Широке поширення резистентних варіантів ВІЛ-1 викликає серйозне занепокоєння і вимагає наявності додаткових терапевтичних методів, спрямованих проти ВІЛ-1.

25 Крім того, незважаючи на очевидні клінічно корисні ефекти ВААРВТ, вона має такі недоліки: множинні побічні ефекти (ліподистрофія, лактоацидоз, резистентність до інсуліну, хронічне захворювання нирок, гіперліпідемія і т.д.), довічне лікування, високі вимоги до дотримання режиму і схеми лікування, вірусні резистентності, персистенція патогенних ефектів ВІЛ інфекції, таких як когнітивні і рухові розлади, і активація імунної системи. Крім того, у зв'язку зі збільшенням тривалості життя пацієнти повинні стикатися з виникненням побічних ефектів,

30 лікарської резистентності, метаболічних розладів і пухлин, обумовлених інфекцією ВІЛ-1.

Крім того, від 20% до 30% пацієнтів, що проходять лікування, іноді відчують імунологічну недостатність, незважаючи на пригнічення вірусу. Дане означає, що число їх Т-клітин CD4⁺ зменшується, незважаючи на інгібування реплікації вірусу. Дане показує, що патогенні дії інфекції ВІЛ-1 у відношенні Т-клітин CD4⁺ все ще існують, незважаючи на інгібування реплікації вірусу.

35 Таким чином, необхідний безпечний і доступний терапевтичний метод, який міг би доповнювати антиретровірусні терапії, що захищає Т-клітини CD4⁺, і даний метод є невідкладною медичною необхідністю.

40 Розглянуто різні терапевтичні стратегії, спрямовані проти ВІЛ, що відрізняються від стратегій, що пов'язані із застосуванням хімічних антиретровірусних речовин, що включають такі стратегії: (i) застосування антитіл до ВІЛ, (ii) вакцини на основі зруйнованих частинок ВІЛ, (iii) вакцини на основі пептидів ВІЛ, і (iv) вакцини на основі плазмідних ДНК-векторів і вірусних векторів, кожна з яких має свої певні недоліки.

45 Як тільки був ідентифікований ВІЛ, як збудник СНІД в 1983 р, численні кандидати на вакцину для попередження ВІЛ інфекції і СНІД протестовані в клінічних випробуваннях у людей з вельми обмеженим успіхом. Міжнародна ініціатива по вакцині проти СНІД (IAVI - international AIDS vaccine initiative) підтримує базу даних зазначених вакцин і випробувань (www.IAVI.org). Майже всі зазначені випробування були дуже ранніми випробуваннями (фази I) безпечності вакцини і попередньої імунної відповіді. Тільки одна вакцина (два препарати однієї і тієї ж базової вакцини gr120) протестована в широкомасштабних дослідженнях фази III. Було виявлено, що білок VaxGen gr120 підтипу В неефективний у випробуванні фази III, яке було виконано в 2003 р. в США, Канаді та Нідерландах. Пізніше в 2003 р. було виконано друге випробування AIDSVAX в Таїланді. В обох випробуваннях виявлено, що кандидати неефективні. Раніше було важко

50 одержати білкові вакцини проти ВІЛ, що могло бути наслідком високої варіабельності в оболонковому білку, відмінностей між оболонковим білком, який використовує лабораторний штам і клінічними ізолятами, мономерної природи gr120 у вакцині і тримірної організації в вірусі, і, зокрема, у зв'язку з тим, що індукували тільки антитіла, але не клітинний імунітет. Комбінація білка AIDSVAX (з VAXGene) з генами, що доставляються вірусом віспи канарок (ALVAC від фірми Aventis Pasteur), також знаходиться у фазі III для одержання додаткової інформації, і

60 очікують, що в четвертому широкомасштабному випробуванні почнеться тестування кандидата

на основі аденовірусу фірми Merck. Цитотоксичні Т-лімфоцити (CTL - cytotoxic T-lymphocytes) вважають критичним компонентом імунного контролю вірусу, включаючи ВІЛ-1, і релевантні імуногени CTL розглядають як терапевтичні вакцини.

Оскільки пандемія ВІЛ продовжує інфікувати мільйони людей щорічно, зростає потреба в ефективній вакцині. Розробка вакцин проти ВІЛ в значній мірі обмежена, у зв'язку з труднощами при розробці імуногенного препарату, що здатен викликати нейтралізуючі антитіла до ВІЛ широкого спектру дії.

Індукція нейтралізуючих антитіл широкого спектру дії (NtAb - broadly neutralizing antibodies) до первинних ізолятів вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) залишається головною і популярною метою дослідження вакцини проти СНІД. Попередні спроби застосування вакцин на основі оболонки викликали антитіла, ефективні тільки проти лабораторних ізолятів. У даних випадках існує кореляція між захистом і високим титром NtAb, спрямованих на гіперваріабельну ділянку V3 gp120. Тим не менше, нейтралізуючі активності, що генеруються у високій ступені специфічні до ізолятів і мінімально ефективні проти більшості первинних ізолятів ВІЛ-1. Нездатність вакцин на основі субдиниці gp120 до захисту проти зараження ВІЛ-1 у клінічних випробуваннях фази III підкреслює труднощі завдання.

Тим не менше, NtAb часто можна виявити у ВІЛ-інфікованих індивідуумів. Відповіді, які генеруються на ранній стадії інфекції, зазвичай є вузькими за специфічністю, нейтралізуючими віруси, які передаються у господаря, але не нейтралізуючими існуючі. Такі відповіді розширюються в ході інфекції у деяких довгожителів, здатних контролювати їх інфекцію у відсутність антивірусної терапії. Тим не менше, природа перехресно нейтралізуючої відповіді антитіл і механізми, що ведуть до його генезису, незрозуміла.

Дійсно, NtAb до Env утворюються протягом декількох тижнів після інфекції, але дана рання відповідь ефективна тільки проти певного підтипу вірусу; тим не менше, bNtAb (перехресно-реактивні нейтралізуючі Ab) можуть розвиватися в ході ВІЛ. Нещодавно в декількох великих дослідженнях показано, що 25% ВІЛ-інфікованих суб'єктів (інфікованих протягом щонайменше 1 р) мають відповідь bNtAb, а 1% "вибраних нейтралізаторів" мають дуже стійку активність проти переважної більшості кладів. Важливо, що дані результати демонструють здатність імунної системи інфікованих осіб до збільшення вироблення NtAb in vivo до ВІЛ-1 в ході захворювання. Вони також дозволяють припустити, що активність NtAb широкого спектру дії, очевидно, розвивається з часом, і їй сприяє хронічний вплив антигену, але знання про те, який титр bNtAb є захисним, при цьому відсутні.

Персистентна реплікація вірусу при низькому фоні призводить до безперервної еволюції Env, яка спрямована на уникнення NtAb. На такій антигенній еволюції може бути зосереджена нова стратегія вакцини, що спрямована на більш консервативну ділянку білка Env, і припускають, що імуногени вакцини можуть бути сконструйовані таким чином, щоб імітувати ключові високі консервативні епітопи.

Одне із значних перешкод для розробки ефективних вакцин проти ВІЛ полягає в тому, що мішенню bNtAb є білок оболонки вірусу (Env), що є у високій ступені варіабельності, тоді як консервативні елементи, очевидно, є слабо імуногенними. Дане означає, що кінетика і спеціальні обмеження ускладнюють оцінку потенційно сприйнятливих сайтів bNtAb в процесі зв'язування рецептора і в процесах злиття. Дійсно, розкрито малу кількість NtAb. Наприклад, першим ідентифікованим bNtAb було антитіло b12, яке замикає сайт зв'язування CD4 на gp120 і запобігає приєднання CD4 вірусу до CD4⁺ Т-лімфоцитів. Субдиниця gp41, значно більш консервативна, ніж gp120, яка залучена в конформаційні перебудови, є спільною для всіх штамів. Проти консервативних структурних елементів gp41, які є захищеними, одержують дуже невеликі активності bNtAb, важкі для оцінки або перехідні; дані bNtAb, що включають 2F5 і 4E10, націлені на позаклітинний домен, проксимальний до мембрани (MPER-membrane-proximal ectodomain region) gp41. Тим не менше, незважаючи на багато років досліджень, імуногени NtAb, здатні викликати дані bNtAb, все ще невідомі, оскільки епітопи є конформаційними.

Незважаючи на численні труднощі, з якими стикаються при розробці безпечних і ефективних превентивних або терапевтичних стратегій вакцини проти інфекції вірусом ВІЛ, у концепції перспективних композицій вакцини проти ВІЛ зроблено значний прогрес. Ілюстративно не менше 576 клінічних досліджень вакцин проти ВІЛ було проведено на початку 2012 р в США, Канаді і Австралії. Заслугує на увагу те, що в 27 з даних клінічних досліджень завершено фазу IV дослідження. Дані досягнення показують, що з часом вакцини проти ВІЛ представляють все більш значні і надійні медичні інструменти для попередження і/або лікування індивідуумів, що володіють ризиком або вже зазнали інфекції вірусом ВІЛ. Всі зазначені вакцини, що знаходяться в розробці, націлені на зниження вірусної реплікації даного вірусу.

Одна з перспективних попереджувальних, а також терапевтичних стратегій вакцини проти

ВІЛ, розкрита в даній галузі техніки, належить до збільшення вироблення антитіл до високо консервативного мотиву білка оболонки ВІЛ gp41, який був названий "3S". У даній галузі техніки показано, що імуногенна композиція, яка складається з пептиду 3S, який зв'язаний з білком-носієм, що є гемоціаніном моллюска фісурелі KLH (KLH - keyhole limpet hemocyanin) (названий KLH-3S), в комбінації з неповним ад'ювантом Фрейнда (НАФ) була здатна індукувати антитіла до 3S у макак. Також показано, що антитіла до 3S мають захисний ефект проти зниження числа Т-клітин CD4⁺ у імунізованих макак. Дані результати відкрили шлях для додаткових стратегій втручання в імунітет, орієнтований на контроль розвитку захворювання ВІЛ (Vieillard et al., 2008, PNAS, Vol. 105 (6): 2100-2104).

Дана стратегія є першою стратегією, яка націлена на вірусну детермінанту патогенності ВІЛ-1, а не на реплікацію вірусу.

У даній галузі техніки все ще існує необхідність у терапевтичних засобах, які націлено на попередження або лікування інфекції, яку викликано вірусом ВІЛ-1.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід належить до імуногенної сполуки, що включає пептид наступної формули (I) $\text{NH}_2\text{--[Nt]}_y\text{--P--W--N--X}_1\text{--S--X}_2\text{--S--N--X}_3\text{--X}_4\text{--X}_5\text{--X}_6\text{--X}_7\text{--I--W--[Ct]}_z\text{--COOH}$ (I), де:

- y є цілим числом, що означає 0 або 1,
 - z є цілим числом, що означає 0 або 1,
 - Nt складається з пептиду, що має від 1 до 100 амінокислот у довжину,
 - Ct складається з пептиду, що має від 1 до 100 амінокислот у довжину,
 - X₁ є амінокислотою, що вибрана з групи, яка складається з А (аланіну), Т (треоніну), S (серину) і N (аспарагіну),
 - X₂ є амінокислотою, що вибрана з групи, яка складається з W (триптофану) і А (аланіну),
 - X₃ є амінокислотою, що вибрана з групи, яка складається з К (лізину) і R (аргініну),
 - X₄ є амінокислотою, що вибрана з групи, яка складається з S (серину) і Т (треоніну),
 - X₅ є амінокислотою, що вибрана з групи, яка складається з L (лейцину), Y (тирозину) і Q (глутаміну),
 - X₆ є амінокислотою, що вибрана з групи, яка складається з D (аспарагінової кислоти), N (аспарагіну), Е (глутамінової кислоти), S (серину), G (гліцину) і К (лізину),
 - X₇ є амінокислотою, що вибрана з групи, яка складається з D (аспарагінової кислоти), Q (глутаміну), L (лейцину), А (аланіну), К (лізину) і Е (глутамінової кислоти),
- при цьому пептид формули (I) ковалентно зв'язаний з білком-носієм, що складається з білка CRM197.

У деяких втіленнях винаходу імуногенна сполука включає пептид SEQ ID N°2 $[\text{NH}_2\text{--PWNASWSNKSLLDIW--COOH}]$, ковалентно зв'язаний з білком-носієм, який складається з білка CRM197.

Переважно, даний винахід належить до імуногенної сполуки, що включає пептид наступної формули (V):

$\text{NH}_2\text{--(A1)}_m\text{--SEQ ID N°2--(A2)}_n\text{--COOH}$ (V),

- де:
- m є цілим числом, що означає 0 або 1,
 - n є цілим числом, що означає 0 або 1,
 - A1 є амінокислотним залишком, і
 - A2 є амінокислотним залишком,

при цьому пептид формули (I) ковалентно зв'язаний з білком-носієм, що складається з білка CRM197.

У деяких втіленнях винаходу імуногенна сполука відповідно до винаходу, що є пептидом формули (I), включає пептид SEQ ID N°5 або складається з нього.

У деяких інших втіленнях винаходу імуногенна сполука згідно з винаходом, що є пептидом формули (I), включає пептид SEQ ID N°6 або складається з нього.

У деяких втіленнях винаходу дана імуногенна сполука ковалентно зв'язана з зазначеним білком-носієм за допомогою його N-кінцевого амінокислотного залишку, безпосередньо або за допомогою лінкерного угруповання.

Таким чином, в деяких втіленнях винаходу дана імуногенна сполука ковалентно зв'язана з зазначеним білком-носієм за допомогою лінкерного угруповання, переважно лінкерного угруповання, що включає дві функціональні сукцинімідильні групи.

Даний винахід також належить до композиції, що містить імуногенну сполуку, як визначено вище, в комбінації з однією або більше імуноад'ювантною речовиною.

Переважно, одна або більше імуноад'ювантна речовина включає гідроксид алюмінію

(Al(OH)₃) або складається з нього.

Даний винахід також належить до композиції вакцини, що містить імуногенну сполуку або композицію, як визначено вище, в комбінації з одним або більше фармацевтично прийнятним носієм.

5 Даний винахід також стосується імуногенної сполуки або композиції, як визначено вище, для застосування як лікарський засіб, або альтернативно, для застосування для попередження і/або лікування стану, що викликаний інфікуванням індивідуума вірусом ВІЛ.

10 Винахід також належить до застосування імуногенної сполуки або композиції, як визначено вище, для одержання композиції вакцини для попередження і/або лікування стану, що викликаний інфікуванням індивідуума вірусом ВІЛ.

Даний винахід також належить до способу для попередження і/або лікування стану, викликаного інфікуванням індивідуума вірусом ВІЛ, що включає стадію введення індивідууму, який потребує цього, ефективної кількості композиції вакцини, як визначено вище.

ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

15 На фіг. 1 показано збільшення вироблення антитіл до пептиду 3S при імунізації пептидом 3S16Nter, що кон'югований з KLH (гемоціанін моллюска фісурелі) або CRM197. Кожен символ представляє результати, одержані від однієї миші. Кожен стовпчик представляє геометричне середнє значення результатів, одержаних від відповідного пулу мишей. Абсциса: тип композиції, яка використовується; Ордината: титри антитіл IgG (імуноглобулін G - immunoglobulin G) до 3S, що виражені в довільних одиницях (AU - arbitrary units). Одна довільна
20 одиниця відповідає сигналу, який генерується розчином моноклонального антитіла 15C8f2 миші до 3S при кінцевій концентрації 1 нг/мкл. Фіг. 1A: результати на 21 добу після першої ін'єкції; фіг. 1B: результати на 35 добу після першої ін'єкції; фіг. 1C: результати на 49 добу після першої ін'єкції.

25 На фіг. 2 показаний оптимальний діапазон дози вакцини імунокон'югата 3S-пептид-CRM197 (лікарська речовина 3S), у мишей. Абсциса: доза імунокон'югата, що виражена у вигляді кількості еквівалента антигену (відповідно 0 ("ад'ювант"), 0,02 мкг, 0,2 мкг, 1 мкг, 2 мкг і 4 мкг). Ордината: титри IgG до 3S16Nter, виражені у вигляді 1/середня точка розведення. Середня точка розведення є точкою розведення антисироватки, що дає половину максимального
30 сигналу. На осі X представлені різні групи мишей, які вакциновані зростаючими дозами, що виражені в мікрограмах (мкг) пептидного еквівалента 3S16Nter лікарської речовини 3S. Кожен символ представляє одну мишу. Пул сироваток від мишей, що вакциновані імунокон'югатом CRM197-3S, використовують для нормалізації твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА). Представлені статистично значущі величини, які розраховані за допомогою непараметричного
35 критерію Манна-Уїтні.

*: 0,5>p>0,1; **: 0,1>p>0,01; ***: P<0,01.

На фіг. 3 показаний оптимальний діапазон дози вакцини 3S-пептид-CRM197 у щурів. Абсциса: доза імунокон'югата (лікарська речовина 3S), виражена у вигляді кількості пептиду, що кон'югований з носієм, без урахування маси носія і маси лінкера (пептидний еквівалент)
40 (відповідно 0 ("ад'ювант"), 0,02 мкг, 0,2 мкг, 1 мкг, 2 мкг і 4 мкг). Ордината: титри IgG до 3S16Nter, виражені у вигляді 1/середня точка розведення). Середня точка розведення є точкою розведення антисироватки, що дає половину максимального сигналу. На вісі X представлені різні групи щурів, які вакциновані зростаючими дозами (мкг) пептидного еквівалента лікарської речовини 3S. Кожен символ представляє одного щура. Пул сироваток від щурів, які вакциновані
45 20 мкг і 50 мкг імунокон'югата CRM197-3S, що включений в препарат з гідроксидом алюмінію, використовують для нормалізації ІФА. Представлені статистично значущі величини, що обчислені за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні. *: 0,5>p>0,1; **: 0,1>p>0,01; ***: P<0,01.

На фіг. 4 і 5 показана здатність антитіл до 3S16Nter, які одержано після імунізації тварин, включаючи приматів, з 3S16Nter, що кон'югований з білками-носіями (KLH або CRM197), як розкрито в даному винаході.

На фіг. 4 показано середнє значення флуоресценції фікоеритрину (ФЕ) контрольних лунок.

Виміряне середнє значення флуоресценції ФЕ, що є густиною NKp44L (ліганди, що активують рецептори натуральних кілерів (NK)) на поверхні Т-клітин CD4⁺, виміряне за
55 допомогою цитофлуорометрії клітин з лунок від номера 4 до номера 1. На вісі Y представлено Х-середнє флуоресценції. На вісі X представлені різні контролі: з пептидами (3S) або без пептидів (-) 3S16Nter, і без сироватки (-) або з сироваткою кроликів, негативних (нег. кролик) або позитивних (поз. кролик) по IgG до 3S16Nter, при розведенні 1/50. Контролі протестовані в двох повторях, і наведені стандартні відхилення ("вуса").

60 На фіг. 5 показано Х-середнє флуоресценції лунок тестованих сполук.

Виміряне середнє значення флуоресценції ФЕ, що є густиною NKp44L на поверхні Т-клітин CD4⁺, виміряна за допомогою цитофлюорометрії клітин з лунок від номера 16 до номера 45. На вісі Y представлено X-середнє флуоресценції. На вісі X представлені різні умови тестування. Всі лунки тестували в присутності пептидів 3S16Nter. Тестували сироватку щура, що вакцинована ад'ювантованим імунокон'югатом CRM197-3S16Nter (R122 d49). Кожне розведення тестували у трьох повторях, представлено стандартне відхилення ("вуса"). Сироватку, негативну по IgG до 3S16Nter (негативний контроль), тестували при розведенні 1/50. Сироватку, позитивну по IgG до 3S16Nter, тестували при розведеннях 1/100, 1/400, 1/1600 та 1/6400.

На фіг. 6 показано збільшення вироблення антитіл до пептиду 3S після імунізації пептидом m3S16Nter, що кон'югований з CRM197. Кожен символ представляє результати, одержані від однієї миші, і, таким чином, були імунізовані шість мишей. Мишей ін'єктували на 0, 14, 28, 169 і 212 добу, відповідно, як показано відповідними стрілками. Абсциса: період часу після першої ін'єкції імунокон'югата, що виражений у добах. Ордината: титри антитіла до 3S, виражені у вигляді 1/середня точка розведення.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У даному винаході, насамперед, запропонована нова імуногенна сполука, для застосування для одержання композицій, і, зокрема, композицій вакцини проти ВІЛ.

Автори винаходу провели ретельну дослідницьку роботу в світлі розробки імуногенної сполуки, якій надано здатність до індукції високої і ефективної відповіді антитіл до пептиду 3S. Як використано в даному винаході, пептид 3S в цілому визначають в даному описі як пептид формули (I), що розкритий нижче. Пептид 3S включає пептид 3S SEQ ID N°5 (NH₂-CPWNASWSNKSLLDIW-COOH), відомий в даній галузі техніки.

Як використано в даному винаході, антитіла до 3S складаються з антитіл, що спрямовані проти пептиду формули (I), і включають антитіла, спрямовані проти пептиду 3S SEQ ID N°5.

Пептид 3S послідовності SEQ ID N°5 був ідентифікований раніше як антиген-кандидат проти ВІЛ авторами Vieillard et al. (Vieillard et al., 2008, PNAS, Vol. 105 (6): 2100-2104). Слід нагадати, що Vieillard et al. індукували антитіла до 3S шляхом використання амінокон'югатної сполуки, що складається з пептидів 3S послідовності SEQ ID N°5, ковалентно зв'язаний з відомим білком-носієм KLN.

Тут слід нагадати, що KLN є майже єдиним білком-носієм, що застосовується в даний час в композиціях вакцини, що містять імуногенні речовини у формі кон'югатів антигену з білком-носієм. Крім того, KLN широко застосовували для збільшення вироблення антитіл (Lee, Huang, Lasanthi, Jayathilaka, Lateef and Gupta, 2010. Production of antipeptide antibodies, Methods in Molecular Biology, 657: 93-108, SD Schwartzbach and T. Osafune (eds.), Springer; Ragupathi, Gathuru and Livingston, 2005, Antibody inducing polyvalent cancer vaccines, Cancer Treat Res, 123: 157-150; Harris and Markl, 1999, Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review, Micron, 30: 597-623).

Несподівано автори винаходу виявили, що білок KLN, що є традиційним носієм, який розкритий Vieillard et al., не підходить для розробки імуногенної сполуки, що генерує ефективну відповідь антитіл до 3S, націлений на індукцію захисного ефекту проти імунологічних захворювань, викликаних інфікуванням індивідуума вірусом сімейства ВІЛ і, зокрема, вірусом ВІЛ-1. Переважно, автори винаходу несподівано виявили, що молекули KLN, щеплені на молекули 3S (KLN-3S), утворюють агрегати, що призводить до гетерогенної кінцевої імуногенної сполуки, що містить асоційовані групування, які мають різні уявні молекулярні маси. Таким чином, автори винаходу виявили, що імуногенна сполука, яка містить кон'югати KLN-3S, не може бути відтвореною одержана з метою одержання хімічно визначеного продукту, корисного як лікарський засіб, і, переважно, лікарський засіб для медичного застосування.

Автори винаходу також несподівано виявили, що ефективна відповідь антитіл до 3S може бути одержаною шляхом використання специфічної імуногенної сполуки, що складається з кон'югату антигену з носієм, де молекула-носії складається з білка CRM197. Зокрема, виявлено, що приблизно 100-кратне збільшення кількості антитіла до 3S одержують в результаті використання CRM197 як білок-носії в порівнянні з імуногенною сполукою, де один і той же антигенний пептид ковалентно зв'язаний з традиційним білком-носієм KLN.

Білок CRM197 складається з нетоксичного мутанта добре відомого як дифтерійний токсин, який вперше описаний Uchida et al. (1973, J. Biol. Chem., Vol. 248: 3838-3844). Мутантний білок CRM197 вперше описаний як продукт трансляції мутантного гену tox97, де транзиція G→A привела до заміни залишку гліцину (G) в положенні 52 дифтерійного токсину дикого типу залишком глутамінової кислоти (E).

Згідно із знаннями авторів винаходу, CRM197 досі мало застосовувався як молекула-носії для одержання імуногенних сполук, зокрема, для пептидної кон'югації. Згідно із знаннями

авторів винаходу, CRM197 застосовувався як речовина-носії винятково для олігосахаридних антигенів, тобто для збільшення вироблення антитіл проти небілкових структур, добре відомих в даній галузі техніки як такі, що володіють вельми специфічними імунотенніми властивостями. Навіть точніше, виявилось, що CRM197 застосовувався як молекула-носії винятково для наступних речовин: (i) олігозида, похідні від капсулярних антигенів *Streptococcus pneumoniae*, (ii) олігозидів з *Neisseria meningitidis* і (iii) для капсулярного полісахариду *Haemophilus influenza* типу В.

Даний винахід стосується імунотенної сполуки, що включає пептид наступної формули (I):

$\text{NH}_2\text{-[Nt]}_y\text{-P-W-N-X}_1\text{-S-X}_2\text{-S-N-X}_3\text{-X}_4\text{-X}_5\text{-X}_6\text{-X}_7\text{-I-W-[Ct]}_z\text{-COOH}$ (I), де:

- y є цілим числом, що означає 0 або 1,
 - z є цілим числом, що означає 0 або 1,
 - Nt складається з пептиду, що має від 1 до 100 амінокислот у довжину,
 - Ct складається з пептиду, що має від 1 до 100 амінокислот у довжину,
 - X₁ є амінокислотою, яка вибрана з групи, що складається з А (аланіну), Т (треоніну), S (серину) і N (аспарагіну),
 - X₂ є амінокислотою, яка вибрана з групи, що складається з W (триптофану) і А (аланіну),
 - X₃ є амінокислотою, яка вибрана з групи, що складається з К (лізину) і R (аргініну),
 - X₄ є амінокислотою, яка вибрана з групи, що складається з S (серину) і Т (треоніну),
 - X₅ є амінокислотою, яка вибрана з групи, що складається з L (лейцину), Y (тирозину) і Q (глутаміну),
 - X₆ є амінокислотою, яка вибрана з групи, що складається з D (аспарагінової кислоти), N (аспарагіну), E (глутамінової кислоти), S (серину), G (гліцину) і К (лізину),
 - X₇ є амінокислотою, яка вибрана з групи, що складається з D (аспарагінової кислоти), Q (глутаміну), L (лейцину), А (аланіну), К (лізину) і E (глутамінової кислоти),
- при цьому пептид формули (I) ковалентно зв'язаний з білком-носієм, що складається з білка CRM197.

Для цілей даного опису імунотенну сполуку формули (I) може бути також названо в даному винаході $\text{NH}_2\text{-[Nt]}_y\text{-SEQ ID N}^\circ 1\text{-[Ct]}_z\text{-COOH}$ (I).

У деяких втіленнях імунотенної сполуки формули (I) X₁ переважно означає А,

У деяких втіленнях імунотенної сполуки формули (I) X₂ переважно означає W,

У деяких втіленнях імунотенної сполуки формули (I) X₃ переважно означає К,

У деяких втіленнях імунотенної сполуки формули (I) X₄ переважно означає S,

У деяких втіленнях імунотенної сполуки формули (I) X₅ переважно означає L,

У деяких втіленнях імунотенної сполуки формули (I) X₆ переважно означає D, і

У деяких втіленнях імунотенної сполуки формули (I) X₇ переважно означає D.

У деяких втіленнях імунотенної сполуки формули (I) одна або більше з амінокислот, які вибрано з групи, що складається з X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ і X₇, має своє відповідне переважне значення, вказане вище. У деяких втіленнях винаходу 1, 2, 3, 4, 5, 6 або 7 з амінокислот, які вибрано з групи, що складається з X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ і X₇, має своє відповідне переважне значення, вказане вище.

У втіленнях винаходу, де сім амінокислот, які вибрано з групи, що складається з X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ і X₇, мають своє відповідне переважне значення, вказане вище, імунотенний пептид складається з пептиду формули (IIa):

$\text{NH}_2\text{-[Nt]}_y\text{-P-W-N-A-S-W-S-N-K-S-L-D-D-I-W-[Ct]}_z\text{-COOH}$ (IIa),

який може бути також позначений:

$\text{NH}_2\text{-[Nt]}_y\text{-SEQ ID N}^\circ 2\text{-[Ct]}_z\text{-COOH}$ (IIa).

У втіленнях винаходу, де шість амінокислот, які вибрано з групи, що складається з X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ і X₇, мають своє відповідне переважне значення, вказане вище, і при цьому амінокислота X₂ означає А (аланін), а імунотенний пептид складається з пептиду формули (IIb):

$\text{NH}_2\text{-[Nt]}_y\text{-P-W-N-A-S-A-S-N-K-S-L-D-D-I-W-[Ct]}_z\text{-COOH}$ (IIb),

який може бути також позначений:

$\text{NH}_2\text{-[Nt]}_y\text{-SEQ ID N}^\circ 6\text{-[Ct]}_z\text{-COOH}$ (IIb)

Пептид Nt, має від 1 до 100 амінокислотних залишків у довжину, включає пептиди, що мають 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 і 100 амінокислотних залишків у довжину.

У деяких втіленнях винаходу пептид Nt має 10 амінокислотних залишків у довжину або менше, що включає довжину амінокислот, яка складає 5 амінокислотних залишків або менше.

У деяких втіленнях винаходу N-кінцевий залишок пептиду Nt складається з залишку C (цистеїну).

У деяких втіленнях винаходу пептид Nt має таку формулу (III):

$\text{NH}_2\text{-C-Y}_1\text{-T-Y}_2\text{-V}$ -(III) SEQ ID N°3, де:

- 5 - Y_1 є амінокислотою, яка вибрана з групи, що складається з T (треоніну) і P (проліну),
- Y_2 є амінокислотою, яка вибрана з групи, що складається з A (аланіну), T (треоніну) і N (аспарагіну).

У деяких інших втіленнях пептид Nt складається з одного залишку цистеїну (також названий "C").

- 10 Пептид Ct, має від 1 до 100 амінокислотних залишків у довжину, включає пептиди, що мають 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 і 100 амінокислотних залишків у довжину.

У деяких втіленнях винаходу пептид Ct має 10 амінокислотних залишків у довжину або менше, який включає довжину амінокислот, що становить 5 амінокислотних залишків або менше.

- 20 У деяких втіленнях винаходу C-кінцевий залишок пептиду Ct складається з C (залишку цистеїну).

У деяких втіленнях винаходу пептид Nt має таку формулу (IV):

$\text{-Y}_3\text{-Y}_4\text{-M-T-W-COOH}$ (III) SEQ ID N°4, де:

- Y_3 є амінокислотою, яка вибрана з групи, що складається з D (аспарагінової кислоти), Q (глутаміну), E (глутамінової кислоти) і N (аспарагіну), і
- 25 - Y_4 є амінокислотою, яка вибрана з групи, що складається з N (аспарагіну), H (гістидину), S (серину) і K (лізину).

У деяких інших втіленнях винаходу пептид Ct складається з одного залишку цистеїну (також названий "C").

У деяких інших втіленнях винаходу пептид Ct відсутній в імуногенній сполуці за винаходом.

- 30 У деяких конкретних втіленнях імуногенної сполуки згідно з винаходом пептид має формулу (V), яка описана нижче.

Таким чином, даний винахід належить до імуногенної сполуки, що включає пептид наступної формули (V):

$\text{NH}_2\text{-(A1)}_m\text{-SEQ ID N°1-(A2)}_n\text{-COOH}$ (V), де:

- 35 - m є цілим числом, що означає 0 або 1,
- n є цілим числом, що означає 0 або 1,
- A1 є амінокислотним залишком, і
- A2 є амінокислотним залишком,
- де пептид формули (V) ковалентно зв'язаний з білком-носієм, що складається з білка CRM197.
- 40

У деяких втіленнях пептиду формули (V) m дорівнює 1, n дорівнює 0, і A1 означає залишок цистеїну (C).

Даний винахід також належить до імуногенної сполуки, що включає пептид наступної формули (VIa):

- 45 $\text{NH}_2\text{-(A1)}_m\text{-SEQ ID N°2-(A2)}_n\text{-COOH}$ (VIa), де:

- m є цілим числом, що означає 0 або 1,
- n є цілим числом, що означає 0 або 1,
- A1 є амінокислотним залишком, і
- A2 є амінокислотним залишком,

- 50 де пептид формули (VIa) ковалентно зв'язаний з білком-носієм, що складається з білка CRM197.

Даний винахід також належить до імуногенної сполуки, що включає пептид наступної формули (VIb):

$\text{NH}_2\text{-(A1)}_m\text{-SEQ ID N°6-(A2)}_n\text{-COOH}$ (VIb), де:

- 55 - m є цілим числом, що означає 0 або 1,
- n є цілим числом, що означає 0 або 1,
- A1 є амінокислотним залишком, і
- A2 є амінокислотним залишком,
- при цьому пептид формули (VIb) ковалентно зв'язаний з білком-носієм, що складається з білка CRM197.
- 60

У деяких втіленнях пептиду формули (VIa) або (VIb) $m \in 1$, $n \in 0$, і $A1$ є залишком цистеїну (C).

Дійсно очевидно, пептиди формул (V), (VIa) або (VIb) є конкретними втіленнями пептиду формули (I) згідно з винаходом. Таким чином, кожне втілення імуногенної сполуки за винаходом, розкрите з посиланням на пептид формули (I), включає таке ж втілення, при цьому пептид формули (I) складається з пептиду формули (V) або з пептиду формули (VIa) або (VIb), якщо не вказано інше.

Дійсно також очевидно, пептиди формул (VIa) або (VIb) є конкретними втіленнями пептиду формули (V) відповідно до винаходу. Таким чином, кожне втілення імуногенної сполуки за винаходом, що розкрито з посиланням на пептид формули (I) або формули (V), включає таке ж втілення, де пептид формули (I) або формули (V) складається з пептиду формули (VIa) або (VIb), якщо не вказано інше.

Як використано в даному винаході, амінокислотні залишки включають аланін (також позначений "A" або "Ala"), аргінін (також позначений "R" або "Arg"), аспарагін (також позначений "N" або "Asn"), аспарагінову кислоту (також позначену "D" або "Asp"), цистеїн (також позначений "C" або "Cys"), глутамін (також позначений "Q" або "Gln"), глутамінову кислоту (також позначену "E" або "Glu"), гліцин (також позначений "G" або "Gly"), гістидин (також позначений "H" або "His"), ізолейцин (також позначений "I" або "Ile"), лейцин (також позначений "L" або "Leu"), лізин (також позначений "K" або "Lys"), метіонін (також позначений "M" або "Met"), фенілаланін (також позначений "F" або "Phe"), пролін (також позначений "P" або "Pro"), серин (також позначений "S" або "Ser"), треонін (також позначений "T" або "Thr"), триптофан (також позначений "W" або "Trp"), тирозин (також позначений "Y" або "Tyr") і валін (також позначений "V" або "Val").

Як зазначено вище, CRM197 є нетрадиційним молекуло-носієм для презентування білкового антигену на клітинах імунної системи. CRM197 легко доступний спеціалістам у даній галузі техніки. CRM197, переважно, є у продажі під назвою CRM197 (рекомбінантна ДНК (рДНК)) від фірми Company Pfenex Inc. (San Diego, USA). CRM197 в даному винаході позначений як білок SEQ ID N°8.

Пептид формули (I), включаючи його конкретні втілення формули (V) і формул (VIa) або (VIb), як розкрито в даному винаході, може бути одержаний за допомогою відомої технології клонування або шляхом хімічного синтезу.

Наприклад, ДНК, що кодує білок формули (I), одержують шляхом застосування технології клонування і вбудовують в автономно реплікуючий вектор з одержанням рекомбінантної ДНК. Рекомбінантний ДНК вводять в підходящого господаря, такого як *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Actinomyces*, дріжджі, ниткоподібні гриби, клітина рослини, клітина комахи і клітина тварини, з одержанням трансформанта. З продукту культивування трансформанта може бути одержаний пептид, що містить пептид формули (I). Альтернативно ДНК, що кодує пептид формули (I), одержують і поміщають в систему безклітинного синтезу білка, використовуючи зародок пшениці і клітинний екстракт з *Escherichia coli*, для синтезу пептиду винаходу. У деяких втіленнях винаходу, де пептид формули (I) зшитий з білком-носієм, імуногенний продукт, що складається зі злитого білка, що містить і пептид формули (I), і бажаний білок-носіє, можна синтезувати методами рекомбінантних ДНК.

Крім того, використовуючи звичайний спосіб хімічного синтезу для пептиду формули (I), такий як "твердофазний спосіб" або "рідиннофазний спосіб", амінокислоти послідовно з'єднують і подовжують шляхом дегідратації/конденсації.

Для одержання імуногенної сполуки, як визначено вище, можна використовувати будь-яку відповідну реакцію кон'югації з будь-яким підходящим лінкером при необхідності, які відомі спеціалістам у даній галузі техніки.

У певних втіленнях пептиду формули (V), (VIa) або (VIb) амінокислотні залишки $A1$ і/або $A2$ відсутні, коли цілі числа m і/або n дорівнюють (дорівнює) 0, відповідно.

У деяких втіленнях пептиду формули (V), (VIa) або (VIb) $A1$ присутня (тобто ціле число m дорівнює 1), а $A2$ відсутня (тобто ціле число n дорівнює 0).

У деяких втіленнях пептиду формули (V), (VIa) або (VIb) $A1$ відсутня (тобто ціле число m дорівнює 0), а $A2$ присутня (тобто ціле число n дорівнює 1).

У деяких переважних втіленнях пептиду формули (V), (VIa) або (VIb) $A1$ і/або $A2$, якщо вони присутні, складається (складаються) із залишку цистеїну.

У деяких переважних втіленнях пептиду формули (V), (VIa) або (VIb) $A1$ присутня і складається з N-кінцевого залишку цистеїну, а $A2$ відсутня, тобто ціле число n дорівнює 0. У таких переважних втіленнях пептид формули (V) або (VIa) складається з пептиду SEQ ID N°5. У таких переважних втіленнях пептид формули (V) або (VIb) складається з пептиду SEQ ID N°7.

З технічної точки зору пептиди формули (I), включаючи пептиди формули (V) або формули

(VI), вище можуть бути ковалентно зшиті з CRM197, або безпосередньо, або за допомогою лінкерного групування, за допомогою його N-кінцевого амінокислотного залишку, або за допомогою його C-кінцевого амінокислотного залишку. У даних загальних втіленнях винаходу в ковалентний зв'язок може бути залучена доступна альфа-аміногрупа або альфа-карбоксигрупи зазначеного амінокислотного залишку з пептиду формули (I). Альтернативно в ковалентний зв'язок може бути залучена доступна аміногрупа, карбоксигрупа або тіольна група, що розташована в бічному ланцюзі зазначеного амінокислотного залишку із пептиду формули (I).

Тим не менше, в даному винаході виявлено, що імуногенна сполука, як визначено вище, де пептиди формули (I) ковалентно зв'язані з CRM197 за допомогою їх C-кінця, не є оптимальною, оскільки імуногенний пептид має схильність до утворення агрегатів, що може становити значний недолік для одержання хімічно визначеної і легко відтворюваної фармацевтичної композиції.

Таким чином, в деяких переважних втіленнях імуногенної сполуки, як визначено вище, пептиди формули (I) ковалентно зв'язані з CRM197 за допомогою їх N-кінця.

Крім того, в імуногенній сполуці, як визначено вище, пептиди формули (I) ковалентно зв'язані з CRM197 найбільш переважно за допомогою відповідного лінкерного агента. У даному винаході виявлено, що присутність лінкерного агента, який утворює містковий зв'язок між пептидами формули (I) і CRM197, вносить деяку гнучкість в молекулу, що, таким чином, дає можливість для кращої доступності релевантних епітопів, що містяться в пептидах формули (I), для відповідних рецепторів, які присутні на поверхні клітин імунної системи, тобто, в основному, Т-клітин і В-клітин.

Таким чином, в деяких переважних втіленнях імуногенної сполуки, як визначено вище, пептиди формули (I) ковалентно зв'язані з CRM197 за допомогою лінкерного групування.

У деяких переважних втіленнях пептиди формули (I) ковалентно зв'язані з CRM197 їх N-кінцем за допомогою лінкерного групування.

Лінкерне групування одержують шляхом взаємодії лінкерного агента як з CRM197, так і з пептидами формули (I).

У переважних втіленнях лінкерний агент володіє двома різними функціональними групами: (i) сукцинімідильною групою і (ii) малеїмідною групою, відповідно. Кожна з даних функціональних груп доступна для взаємодії з аміногрупою або з тіольною групою (i) CRM197 і (ii) пептидом формули (I), відповідно.

Такий вид лінкерного агента добре відомий в даній галузі техніки і легко доступний з комерційних джерел.

Тим не менше, в даному винаході виявлено, що деякі з даних гетеробіфункціональних лінкерних агентів не є оптимальними, зокрема, коли передбачають одержання композиції вакцини. Ілюстративно автори винаходу виявили, що використання гетеробіфункціонального лінкерного агента, такого як МБС (мета-малеїмідобензоїл-N-гідроксисукцинімідилловий ефір), привело до кінцевого продукту, котрий володіє дуже низькою розчинністю у воді. Низька розчинність у воді імуногенної сполуки може становити істотний технічний недолік враховуючи одержання композиції вакцини, оскільки кінцеві форми композицій вакцини, які повинні бути легко введені, зазвичай складаються з рідких фізіологічних розчинів або суспензій на водній основі, які можуть, в кінцевому рахунку, також містити один або більше фармацевтично прийнятних водорозчинних розчинників. Як проілюстровано в прикладах, наведених у даному винаході, імунокон'югат, де CRM197 ковалентно зв'язаний з пептидами формули (I) за допомогою МБС, залишається імуногенним, тобто здатним генерувати релевантні антитіла до 3S при ін'єкції in vivo, незважаючи на неможливість його застосування як активний інгредієнт композиції вакцини внаслідок його схильності до утворення агрегатів.

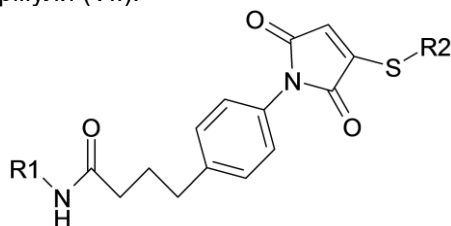
Автори винаходу несподівано визначили, що обмежене сімейство лінкерних агентів є найбільш підходящим для одержання імуногенної сполуки, як визначено в даному винаході, яке має бути повністю розчинним у воді, і яке, отже, має гомогенно розподілятися по всьому об'єму рідкої композиції враховуючи його придатність як імуногенний активний інгредієнт композиції вакцини. Дане обмежене сімейство лінкерних агентів включає лінкерні агенти, названі СМФБ і сульфо-СМФБ, відповідно, або навіть складається з них.

Таким чином, в деяких переважних втіленнях імуногенної сполуки, як визначено вище, лінкерний агент вибраний з групи, що складається з СМФБ (сукцинімідил-4-[пара-малеїмідифеніл]бутирата) і сульфо-СМФБ (сульфосукцинімідил-4-[пара-малеїмідифеніл]бутирата).

Способи кон'югації двох білків з лінкерним агентом взагалі, і більш конкретно з лінкерним агентом, що вибраний з групи, яка складається з СМФБ і сульфо-СМФБ, добре відомі спеціалістам у даній галузі техніки. Ілюстративно такі протоколи описані в анотаціях, які опубліковано фірмою Pierce Company (Illinois, Etats-Unis).

СМФБ і сульфо-СМФБ складаються з гетеробіфункціональних лінкерних агентів, що містять як N-гідроксисукцинімідну (NHS) складноєфірну групу, так і малеїмідну групу. Кон'югацію з використанням СМФБ або сульфо-СМФБ зазвичай виконують двоохстадійним методом. На першій стадії аміновмісний білок (наприклад, CRM197) піддають взаємодії з багаторазовим молярним надлишком лінкерного агента при рН від 7 до 9 з утворенням амідних зв'язків, після чого видаляють надлишок непрореагованого лінкерного агента, зазвичай шляхом знесолювання або діалізу. На другій стадії додають сульфгідрило-вмісну молекулу (наприклад, пептид формули (I)) для взаємодії з малеїмідними групами, які вже приєднані до першого білка (наприклад, з вільними малеїмідними групами лінкерного ланцюга, який вже ковалентно зв'язаний з CRM197) при рН від 6,5 до 7,5 з утворенням стабільних тіоефірних зв'язків.

Використання СМФБ або сульфо-СМФБ як лінкерні агенти для ковалентного зв'язування пептидів формули (I) з білком-носієм CRM197 призводить до кон'югату наведеної нижче формули (VII):



(VII), де:

- R1 складається з однієї функціональної групи CRM197, і де NH група, приєднана до неї, має походження від (i) альфа-аміногрупи, що розташована на N-кінці CRM197, або (ii) аміногрупи бічного ланцюга від залишку амінокислоти лізину (K) амінокислотного залишку CRM197.

- R2 складається з пептиду формули (I), і де приєднаний до нього атом сірки (S) має походження від сульфгідрильної групи (SH) залишку цистеїну, що розташований на N-кінці або на C-кінці пептиду формули (I). У деяких втіленнях винаходу сульфгідрильне угруповання може складати частину неприродної амінокислоти або будь-якої іншої молекули, яка присутня на кінці пептиду формули (I).

Як відомо в даній галузі техніки, білок CRM197 містить безліч функціональних груп R1, так що безліч пептидів (I) можуть бути зв'язаними з CRM197 в кон'югаті формули (VII).

Таким чином, найбільш переважні втілення імуногенної сполуки, як визначено вище, є сполуками, де безліч функціональних груп CRM197 ковалентно зв'язані з пептидом формули (I), що мають SEQ ID N°5 або SEQ ID N°7, при цьому зазначений пептид має залишок цистеїну на його N-кінці відповідно з ковалентним зв'язком, що представлений формулою (VII) вище.

У деяких втіленнях винаходу імуногенна сполука, як визначено вище, середнє число пептидів формули (I), що знаходиться в діапазоні від 2 до 20, ковалентно зв'язані з однією молекулою CRM197. У переважних втіленнях середнє число від 5 до 10 пептидів формули (I), що включає середнє число від 7 до 8 пептидів формули (I), ковалентно зв'язані з однією молекулою CRM197.

Даний винахід також належить до композицій, що містить імуногенну сполуку, як визначено вище, в комбінації з однією або більше імуноад'ювантною речовиною.

Композиція, як визначено в даному винаході, що містить імуногенну сполуку, як визначено вище, і яка додатково містить одну або більше імуноад'ювантну речовину, може бути також названа в даному описі "імуногенною композицією" або як альтернатива "композицією вакцини".

У деяких втіленнях винаходу неможливо зробити істотну відмінність між імуногенною композицією згідно з винаходом і композицією вакцини згідно з винаходом, за межами термінів, які використовуються для позначення таких композицій, за винятком того, що ознаки композиції вакцини повинні задовольняти технічним вимогам різних агентств з контролю за лікарськими засобами для видачі дозволів на реалізацію фармацевтичних препаратів для медичного або ветеринарного застосування. На відміну від цього, імуногенна композиція за винаходом може не задовольняти вимоги агентств з контролю за лікарськими засобами, будучи, в той же час, придатною для введення тваринам, наприклад, для одержання антитіл до 3S, які можуть мати подальше застосування, включаючи подальше застосування як ідентифікуючий або діагностичний реагент.

Точніше, імуногенна композиція націлена на збільшення вироблення антитіл, що спрямовані проти пептиду формули (I), при введенні їх в організм ссавця, наприклад, в організм миші, кролика, вівці, коня або кози, в ситуаціях, де не очікують, що одержані антитіла не надають превентивну або терапевтичну дію в організмі імунованого ссавця. Імуногенні композиції за винаходом можна застосовувати для продукування антитіл, що спрямовані проти пептиду

формули (I), для подальшого нетерапевтичного застосування даних антитіл, наприклад, як ідентифікуючий реагент вірусу ВІЛ-1 або ідентифікуючий реагент пептиду, похідний від ВІЛ-1.

З іншої сторони, композиція вакцини згідно з винаходом націлена на збільшення вироблення антитіл, що спрямовані проти пептиду формули (I), в організм ссавця, якому вводять дану композицію вакцини, в ситуаціях, де очікують, що одержані антитіла надають превентивну або терапевтичну дію в організмі імунізованого ссавця.

Таким чином, композиції за винаходом включають як (i) імуногенні композиції, так і (ii) композиції вакцини. Крім того, імуногенні композиції і композиції вакцини можуть відрізнятися за типом допоміжних речовин, включаючи імуноад'ювантні речовини і ексципієнти, які містяться в них. Імуногенна композиція згідно винаходу може викликати продукування антитіла до 3S у тварини, включаючи тварин, що не володіють ризиком відносно інфекції вірусу ВІЛ, для яких не передбачають ні превентивного, ні терапевтичного ефекту. Композиція вакцини згідно винаходу націлена на те, щоб викликати продукування у індивідуума, якому вона введена, антитіл до 3S, що виявляє застережливий або терапевтичний ефект проти інфекції вірусу ВІЛ, зокрема, захисного ефекту проти зниження числа Т-клітин CD4⁺ у ВІЛ-інфікованих індивідуумів, що викликає зниження патогенності вірусу.

У деяких втіленнях імуногенної композиції або композиції вакцини, як визначено в даному винаході, імуноад'ювант може бути вибраний з групи, що складається з наступних речовин: (i) мінеральних солей, (ii) емульсій, (iii) природних або синтетичних похідних мікроорганізмів, (iv) комбінованих ад'ювантів, (v) ад'ювантів на основі цитокінів або допоміжних молекул, і (vi) препаратів у вигляді частинок.

Перелік відповідних імуноад'ювантів представлений у наведеній нижче таблиці.

<u>Ад'юванти/препарати</u>	
<u>Мінеральні солі</u>	
Солі алюмінію (гідроксид, фосфат) (Alum)	
Фосфат кальцію	
<u>Емульсії</u>	
MF59 (мікрофлюїдизована детергентна стабілізована емульсія масло-в-воді сквалена)	
Неповний ад'ювант Фрейнда (НАФ, стабілізований водою/маслом Drakeol)	
Montanide ISA-51 (стабілізована емульсія вода-в-маслі) і ISA-720 (стабілізована вода/сквален)	
<u>Похідні мікроорганізмів (природні і синтетичні)</u>	
Монофосфорилліпід А (МФЛ)	
Detox (МФЛ + CWS)	
ОМ-174 (похідна ліпіда А, E. coli), ОМ-тріацил	
Модифікований LT, СТ (генетично модифіковані бактеріальні токсини [термолабільний ентеротоксин, холерний токсин] для одержання нетоксичного ад'ювантного ефекту)	
CpG ODN (синтетичні олігонуклеотиди, що містять імуностимулюючі мотиви CpG)	
<u>Комбіновані ад'юванти</u>	
AS04 (Alum + МФЛ)	
AS02 (Емульсія масло-в-воді + МФЛ+QS-21)	
AS01(Ліпосоми+МФЛ + QS21)	
<u>Імуноад'юванти</u>	
Цитокіни: ІЛ-2 (інтерлейкін), ІЛ-12, GM-CSF, Flt3)	
Допоміжні молекули (B7.1)	
<u>Препарати у вигляді частинок</u>	
Ліпосоми (DNPC/Chol)	
DC Chol (ліпоїдні імуномодулятори, здатні до самоорганізації в ліпосоми)	
Віросоми™ (моношарові ліпосомні везикули, імуностимулюючі відновлені віросоми вірусу грипу [IRIV - immunostimulating reconstituted influenza virosomes])	
ISCOMS® (структурований комплекс сапонінів і ліпідів)	
ПМК (полімер молочної кислоти)	
ПЛГ (мікрочастинки сополімера лактиду і гліколіду)	
Протеосоми™	

Імуноад'юванти, що містять мінеральні солі, переважно вибрані із групи, яка складається з наступних речовин: (1) солей алюмінію, переважно формули $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, і (2) фосфату кальцію.

5 Імуноад'юванти на основі емульсії переважно вибрані з групи, яка складається з наступних речовин: (1) MF59, що є мікрофлюїдизованою детергентною стабілізованою емульсією масло-у-воді сквалена, (2) неповного ад'юванта Фрейнда, також позначений НАФ, (3) Montanide ISA 51, є стабілізованою емульсією вода-в-маслі, (4) і (4) ISA-720, що є стабілізованою композицією, яка містить воду і сквален.

10 Імуноад'юванти, що містять природні або синтетичні похідні мікроорганізмів, переважно вибрані з групи, що складається з наступних речовин: (1) монофосфорилліпіда А (МФЛ) (наприклад, від фірми Corixa, Hamilton, Mont., USA) (2) Detox (МФЛ+CWS), що складається з масляної крапельної емульсії монофосфорилліпіда А і цитоскелета клітинної стінки мікобактерій, (3) OM-174, що є розчинним ад'ювантом, одержаний з ліпіду А *Escherichia coli*, (4) нетоксичних бактеріальних токсинів, переважно модифікованих токсинів, таких як термолабільний токсин *E. coli*, холерний токсин, і, зокрема, їх субодиниці В (названі LTB і CTB, відповідно), і (5) CpG ODN, що є синтетичними олігонуклеотидами, які містять імуностимулюючі мотиви CpG.

20 Комбіновані ад'юванти переважно вибрані з групи, що складається з наступних речовин: (1) AS04, що є комбінацією $alum$ і монофосфорилліпіда А (МФЛ), (2) AS02, що є емульсією масло-у-воді, яка містить комбінацію монофосфорилліпіда А (МФЛ) і QS-21 (наприклад, від фірми Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, Mass., USA), і (3) AS01, що складається з ліпідної суспензії ліпосом з двома імуностимулюючими компонентами: 3'-О-дезаціл-4'-монофосфорилліпідом А (МФЛ) і Quilaja saponaria 21 (QS-21).

25 Ад'юванти на основі цитокінів або допоміжних молекул переважно вибрані з групи, що складається з наступних речовин: (1) цитокінів, таких як ІЛ-2, ІЛ-12 (наприклад, від Genetics Institute, Cambridge, Mass., USA), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF - granulocyte macrophage colony-stimulating factor) (наприклад, від Hoffman La-Roche, Basel, Switzerland) та Flt3; і (2) допоміжних молекул, таких як B7.1.

30 Препарати у вигляді частинок переважно вибрані з групи, що складається з наступних речовин: (1) ліпосом, таких як ліпосоми DNPC/Chol або DC Chol, де останні складаються з ліпоїдних імуномодуляторів, що здатні до самоорганізації в ліпосоми, (2) ВіросомиTM, що є моношаровими ліпосомними везикули, імуностимулюючі відновлені ліпосоми вірусу грипу [IRIV], (3) ISCOMS®, що є структурованим комплексом сапонінів і ліпідів, (4) полімер молочної кислоти (ПМК) і сополімер лактид і гліколід (мікрочастинки ПЛГ), і (5) ПротеосомиTM.

35 Імуноад'ювантна сполука або композиція, які розкрито вище, легко доступні спеціалістам у даній галузі техніки, зокрема, оскільки вони є у продажу.

Тим не менше, автори винаходу виявили, що при застосуванні конкретної імуногенної сполуки, як визначено в даному винаході, одержують ефективну відповідь антитіл, тобто
40 відповідь антитіл, що має порядок величини, що задовольняє захисному або терапевтичному ефекту у індивідуумів-людей, при об'єднанні зазначеної імуногенної сполуки з гідроксидом алюмінію ($Al(OH)_3$) як імуноад'ювантна речовина. Імуноад'ювантна речовина на основі гідроксиду алюмінію складається з матеріалу у вигляді частинок у формі колоїдної суспензії, що має розподіл розміру часток приблизно від 1 до 10 мкм, де середній розмір часток становить
45 приблизно від 2 до 3 мкм (Lindblad, 2004, Immunology and Cell Biology, Vol. 82: 497-505).

Цікаво, що автори винаходу виявили, що інші, найвищою мірою традиційні імуноад'ювантні речовини, які включають, зокрема, добре відомий імуноад'ювант фосфат алюмінію, дають можливість індукції більш низького титру антитіла до пептиду 3S в порівнянні з гідроксидом алюмінію, де зазначені рівні титру антитіл можуть бути корисні для одержання антитіл як
50 лабораторних реагентів, але занадто низькі для ендогенного одержання антитіл до 3S, що здатні здійснювати захисний або терапевтичний медичний ефект.

Таким чином, в переважних втіленнях композиції згідно з винаходом імуноад'ювантна речовина складається з гідроксиду алюмінію.

Крім того, автори винаходу виявили, що для одержання оптимальної відповіді антитіл до 3S, гідроксид алюмінію слід використовувати в кращих умовах, щоб уникнути агрегації частинок $Al(OH)_3$ і забезпечити гомогенний розподіл даних частинок в кінцевій рідкій суспензії.

Згідно з винаходом, виявлено, що утворення агрегатів часток гідроксиду алюмінію можна уникнути або щонайменше істотно уповільнити або зменшити, коли кінцева готова до застосування композиція містить від 100 до 200 mM NaCl і від 0,5 до 2,0 mM фосфату натрію, і
60 найбільш переважно 150 mM NaCl і 1 mM фосфату натрію. Відповідно до даного втілення

винаходу швидкість агрегації частинок гідроксиду алюмінію значно зводиться до мінімуму без зміни здатності частинок до адсорбції імуногенної сполуки, де певні умови посилюють здатність композиції викликати ефективне вироблення антитіл до пептиду 3S.

Таким чином, в деяких втіленнях композиції згідно з винаходом дана композиція адаптована до утворення готової до застосування композиції вакцини, що містить гідроксид алюмінію в кінцевій концентрації від 0,1 мг/мл до 5 мг/мл, переважно від 0,05 мг/мл до 2 мг/мл, і найбільш переважно приблизно 1 мг/мл, виражену у вмісті іонів Al^{3+} . Відповідно до Європейської фармакопеї, кількість алюмінієвого ад'юванта повинно бути менше 1,25 мг алюмінію на дозу, і 850 мкг алюмінію на дозу в США (відповідно до Зводу федеральних нормативів).

Відповідно до визначених втілень композиції згідно з винаходом, дана композиція також адаптована до утворення готової до застосування композиції вакцини, що містить фосфат натрію у кінцевій концентрації від 0,1 мм до 50 мм, переважно від 0,5 мМ до 15 мМ фосфату натрію, і найбільш переважно приблизно 1 мМ фосфату натрію.

У конкретному аспекті композиція згідно з винаходом адаптована до утворення готової до застосування композиції вакцини, що містить кількість імуногенної сполуки в діапазоні від 0,01 мкг до 200 мкг на стандартну дозу, яка виражена в еквіваленті антигенного пептиду, переважно від 0,05 мкг до 50 мкг на стандартну дозу, і найбільш переважно від 0,1 мкг до 20 мкг на стандартну дозу.

Як використовують в даному винаході, кількість імуногенної сполуки, виражена в "еквіваленті антигенного пептиду", становить кількість пептидів формули (I), що міститься в розглянутому матеріалі імуногенної сполуки. Згідно з винаходом, кількість пептидів формули (I), що зв'язані з однією молекулою CRM197, переважно вимірюють шляхом аналізу амінокислот. Даний спосіб є методологією, що традиційно використовується для визначення амінокислотного складу білків. Білки є макромолекулами, що складаються з ковалентно зв'язаних амінокислотних залишків, які організовано у вигляді лінійного полімеру. Пептидні зв'язки руйнуються при інкубації в кислих умовах, що призводить до вивільнення амінокислот. Потім проводять аналіз амінокислот на продукті гідролізу.

Згідно з даним винаходом аналіз амінокислот переважно використовують для визначення частки зв'язування пептиду формули (I) на CRM197. Дане було можливим, оскільки деякі амінокислоти присутні і на CRM197, і на прищеплених пептидах, а інші, такі як F (фенілаланін) присутні тільки в CRM197. На основі результатів обчислення кількості амінокислот, що присутні в CRM197, і тих, що присутні і в CRM197, і в кон'югованому з ним пептиді формули (I) дає можливість визначити коефіцієнт зв'язування пептиду формули (I) в CRM197.

У характерному випадку після гідролізу кон'югату між CRM197 і пептидами формули (I) амінокислоти, що присутні в тестованих зразках, розділяють за допомогою рідинної хроматографії високого тиску з оберненою фазою (високоєфективної рідинної хроматографії з оберненою фазою, ОФ-ВЕРХ). Зазвичай даний прилад має здатність до дериватизації до і після колонки, і детектор є детектором в ультрафіолетовій і видимій області спектру або флуоресцентним детектором в залежності від способу дериватизації, який використовується. Інтегруючий пристрій використовують для перетворення аналогового сигналу від детектора і кількісного визначення кожної амінокислоти. (Amino acid analysis of peptide loading ratios in conjugate vaccines: a comparison of electrochemical detection and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate pre-column derivatization methods Nahas DD et al Bioconj Chem 2008 Jan 19 (1) 322-6 Epub 2007 dec 12). Кількість пептидів формули (I), що зв'язані з однією молекулою CRM197, можна також виміряти за допомогою мас-спектрометричного аналізу.

Композиція згідно винаходу може перебувати в рідкій або у твердій формі.

У деяких втіленнях винаходу композиція згідно винаходу складається з рідкої суспензії, або у вигляді концентрату рідкої суспензії, або у вигляді готової до застосування рідкої суспензії.

В інших втіленнях винаходу композиція за винаходом складається з твердої речовини у вигляді частинок (тобто кон'югату), що включає, зокрема, ліофілізовану речовину, яку потрібно приводити в контакт з ад'ювантом і іншими ексципієнтами перед ін'єкцією.

Даний винахід також належить до композиції вакцини, що містить імуногенну сполуку, як визначено вище, або до композиції, як визначено вище, з одним або більше фармацевтично прийнятних носіїв.

Одержання препаратів таких імуногенних композицій добре відоме спеціалістам у даній галузі техніки. Імуногенні композиції винаходу переважно включають фармацевтично прийнятний носій. Відповідні фармацевтично прийнятні носії і/або розріджувачі включають всі і будь-які з традиційних розчинників, дисперсійних середовищ, наповнювачів, твердих носіїв, водних розчинів, покриттів, антибактеріальних і протигрибкових агентів, ізотонічних агентів і агентів, що уповільнюють абсорбцію, і тому подібне. Відповідні фармацевтично прийнятні носії

включають, наприклад, одне або більше з таких речовин: воду, фізіологічний розчин, фосфатно-сольовий буферний розчин, декстрозу, гліцерин, етанол тощо, а також їх комбінації. Фармацевтично прийнятні носії можуть також включати мінорну кількість допоміжних речовин, таких як зволожуючі або емульгуючі агенти, консерванти або буфери, що збільшують термін зберігання або ефективність антитіла. Одержання і застосування фармацевтично прийнятних носіїв добре відомі в даній галузі техніки. За винятком випадків, коли будь-яке традиційне середовище або агент несумісні з активним інгредієнтом, розглядають їх застосування в імуногенних композиціях даного винаходу.

Такі імуногенні композиції можна вводити парентерально, наприклад, шляхом ін'єкції, або підшкірної, або внутрішньом'язової, а також перорально або інтраназально та іншими шляхами введення в слизову оболонку. В інших способах введення застосовують, як приклад і без обмеження, пероральні препарати, легеневі препарати, супозиторії і черезшкірні способи застосування. Пероральні препарати, наприклад, включають без обмеження такі ексципієнти, які зазвичай використовуються, наприклад, маніт, лактоза, крохмаль, стеарат магнію, сахарин натрію, целюлоза, карбонат магнію тощо, фармацевтичного ступеня чистоти.

У прикладах, які наведено у даному винаході, показано, що композиція, яка містить імуногенну сполуку, як визначено вище, в комбінації з відповідною імуноад'ювантною речовиною і з відповідним фармацевтичним прийнятним ексципієнтом (ексципієнтами) індукує при введенні індивідууму вироблення високих титрів антитіл IgG до пептиду 3S.

Важливо, що в прикладах, які наведено у даному винаході, показано, що антитіла до пептиду 3S, які виявлено в сироватці індивідуумів, що були імунізовані композицією згідно винаходу, дозозалежно інгібують експресію NKp44L на поверхні Т-клітин CD4⁺.

Як відомо в даній галузі техніки, інгібування експресії NKp44L на поверхні Т-клітин CD4⁺ викликає захисний ефект щодо зниження числа Т-клітин CD4⁺ за рахунок зниження активації NK клітин (натуральні кілери - Natural killer) і цитотоксичності NK клітин по відношенню до Т-клітинам CD4⁺ у ВІЛ-інфікованих індивідуумів.

Даний винахід також належить до імуногенної сполуки, як визначено вище, або до композиції, як визначено вище, для застосування як лікарський засіб.

Даний винахід також належить до імуногенної сполуки, як визначено вище, або до композиції, як визначено вище, для застосування попередження і/або лікування патологічного стану, що викликаний інфекцією індивідуума вірусом ВІЛ.

Як використовують в даному винаході, попередження або лікування інфекції індивідуума з вірусом ВІЛ-1 включає (i) попередження або лікування захворювання, яке пов'язане з інфекцією даного індивідуума вірусом ВІЛ-1, що включає СНІД, і (ii) попередження прогресування захворювання ВІЛ-1.

Як використовують в даному винаході, термін "ВІЛ інфекція" в цілому включає інфекцію тварини-господаря, зокрема, людини-господаря, вірусом імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1). "ВІЛ-1" можна використовувати в даному описі для віднесення до будь-яких штамів, форм, підтипів, кладів і варіацій в сімействі ВІЛ-1. Таким чином, лікування інфекції ВІЛ-1 включає лікування людини, яка є носієм будь-якого члена з сімейства ретровірусів ВІЛ-1, або людини, у якої діагностовано активний СНІД, а також лікуванню або профілактику станів, що обумовлені СНІД, у таких людей. Носій ВІЛ-1 може бути ідентифікований будь-якими способами, які відомі в даній галузі техніки. Наприклад, людину можна ідентифікувати як носій ВІЛ-1 на основі того, що дана людина є позитивною за антитілами проти ВІЛ-1, або є позитивною на ВІЛ-1, або страждає симптомами СНІД. Таким чином, "лікування інфекції ВІЛ-1" слід розуміти як лікування пацієнта, що має будь-яку з стадій прогресування інфекції ВІЛ-1, що включає, наприклад, гострий синдром первинної інфекції (яка може бути безсимптомною або пов'язаною із захворюванням, що подібні до грипу, з лихоманками, дискомфортом, діареєю і неврологічними симптомами, такими як головний біль), безсимптомну інфекцію (що є тривалим безсимптомним періодом з поступовим зниженням числа циркулюючих Т-клітин CD4⁺) і СНІД (який визначається більш серйозними захворюваннями, що визначають СНІД, і/або зниженням кількості циркулюючих клітин CD4⁺ до більш низького рівня, ніж рівень, що сумісний з ефективним функціонуванням імунітету). Крім того, "лікування або попередження інфекції ВІЛ-1" також включає лікування підозрюваної інфекції ВІЛ-1 після підозрюваного впливу ВІЛ-1 в минулому в результаті, наприклад, контакту з кров'ю, зараженої ВІЛ-1, переливання крові, заміни рідин організму, "небезпечного" статевого контакту з інфікованою людиною, випадкового проколу голкою, одержання татуювання або акупунктури зараженими інструментами або передачі вірусу від матері дитині під час вагітності, годування або в наступний період.

Термін "лікування інфекції ВІЛ-1" слід також розуміти в контексті антиретровірусних терапій, де пацієнти є повністю відповідаючими або частково відповідаючими на такі терапії щодо

вірусного навантаження і/або підрахунку Т-клітин CD4⁺.

Термін "попередження інфекції ВІЛ-1" може включати людину, не заражену інфекцією ВІЛ-1, але вважається такою, що має ризик інфекції ВІЛ-1 рано чи пізно.

Термін "лікування СНІД" означає лікування пацієнта, у якого виявляються більш серйозні захворювання, що визначають СНІД, і/або зниження кількості циркулюючих Т-клітин CD4⁺ до більш низького рівня, ніж рівень, сумісний з ефективним функціонуванням імунітету. Термін "лікування СНІД" також включає лікування станів, що обумовлені СНІД, які означають розлади і захворювання, що характерні для СНІД або обумовлені СНІД або інфекцією ВІЛ-1, такого як СНІД-асоційований комплекс (ARC - AIDS-related complex), прогресуюча генералізована лімфаденопатія (ПГЛ), стану позитивних антитіл проти ВІЛ і ВІЛ-позитивні стани, СНІД-асоційовані неврологічні стани (такі як деменція або тропічний парапарез), саркома Капоші, тромбоцитопенічна пурпура і асоційовані опортуністичні інфекції, такі як пневмонія, що викликана *Pneumocystis carinii*, мікобактеріальний туберкульоз, кандидоз стравоходу, токсоплазмоз головного мозку, цитомегаловірусний (CMV) ретиніт, ВІЛ-асоційована енцефалопатія, ВІЛ-1-асоційована кахексія і т.д.

Таким чином, термін "попередження СНІД", як використовують в даному винаході, означає попередження у пацієнта, що має інфекцію ВІЛ-1, або який підозрюється на інфекцію ВІЛ-1, або має ризик інфекції ВІЛ-1, розвитку СНІД (характеризується більш серйозними захворюваннями, які визначають СНІД, і/або зниженням кількості циркулюючих клітин CD4⁺ до більш низького рівня, ніж рівень, що сумісний з ефективним функціонуванням імунітету) і/або СНІД-асоційованих станів.

Таким чином, терміни "попередження прогресування ВІЛ-1", як використовують в даному винаході, означає попередження у пацієнта, що має інфекцію ВІЛ-1, двох основних маркерів, що пов'язані з ускладненням захворювання і зі збільшенням тяжкості захворювання: зниження у нього кількості Т-клітин CD4⁺ і/або збільшення у нього вірусного навантаження.

Винахід також належить до застосування імуногенної сполуки, як визначено вище, або композиції, як визначено вище, для одержання композиції вакцини для попередження і/або лікування стану, що викликаний інфекцією індивідуума вірусом ВІЛ.

Даний винахід також стосується способу попередження і/або лікування стану, викликаного інфекцій індивідуума вірусом ВІЛ, що включає стадію введення індивідууму, що потребує цього, ефективною кількістю композиції вакцини, як визначено в даному описі.

Даний винахід додатково проілюстровано наведеними нижче прикладами, але не обмежений ними.

ПРИКЛАДИ

35 Приклад 1: Одержання імуногенної сполуки і визначення деяких з її властивостей

А. Одержання імуногенної сполуки

Були синтезовані наведені нижче імуногенні сполуки або кон'югати. Дані кон'югати були утворені з KLH і CRM197, використовуючи або МБС, або СМФБ як зшиваючі молекули. Пептид, який використовується є пептидом 3S, що складається з SEQ ID N°2, який містить додатковий залишок цистеїну або на його аміно-кінці, або на його карбокси-кінці.

- CRM197-МБС-Nter (Cys) -3S
- CRM197-СМФБ-Nter (Cys) -3S
- CRM197-СМФБ-Cter (Cys) -3S
- KLH-МБС-Nter (Cys) -3S

45 З метою роз'яснення пептид, позначений вище як "Nter (Cys) -3S", складається з пептиду 3S SEQ ID N°5 за даним винаходом.

Було протестовано два гетеробіфункціональних зшиваючих лінкерів: сульфо-СМФБ (сульфо-(сукциніміди-4-(p-малеїмідофеніл)бутират) і сульфо-МБС (сульфо-(m-малеїмідобензоїл-N-гідроксисукцинімід)ефір). Дані молекули складаються з maleimidного групування, яке зшито ланцюгом поліетилену з ефіром N-гідроксисукциніміду (Cross-linking of protein by w-maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimido esters. Partis MD and al. Journal of Protein Chemistry, vol.2, No 3, 1983). Сукцинімідне групування може взаємодіяти з аміногрупами білка. Як тільки дана реакція відбувається, maleimidне групування взаємодіє з сульфгідрильними групами пептидів 3S. Дані лінкери розрізняються за довжиною, 7,3 Å для сульфо-МБС і 11,6 Å для сульфо-СМФБ. Видалення лінкера і заміну буфера проводили за допомогою ексклюзійної хроматографії (EX).

Реакція поєднання була двухстадійною реакцією. Перша стадія є активацією CRM197 зшиваючим лінкером. 15 міліграмів лінкера, що розведений в диметилсульфоксиді, додавали до 20 міліграмів CRM197 в об'ємі від 5 до 20 мл буфера кон'югації (фосфатно-сольовий буфер (PBS) 10 mM pH7-pH7,4) і м'яко перемішували протягом від 30 до 90 хв при кімнатній

температурі (Protective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of Bordetella pertussis toxin subunit S1. Askelöf P. and al. PNAS, vol.87, pp 1347-1351, February 1990). Після даної реакції слідує очистка активованого CRM197 за допомогою EX (колонка PD10 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles United Kingdom) або колонка Bio-Gel P2 (Biorad Marnes-la-Coquette, France)). По-друге, активований CRM197 і пептид, що утворений від 3S, змішували протягом від 30 хвилин до 2 годин при кімнатній температурі, що дає можливість ковалентного зв'язування пептиду на активованому CRM197. Для блокування непрореагованих малеїмідогруп активованого CRM197 після реакції кон'югації до розчину додають в надлишку цистеїн-HCl (SIGMA, Missouri, USA) (A practical approach to crosslinking. Mattson G. and al. Molecular Biology Reports 17: 167-183, 1993). Дана стадія обмежена утворенням мультимерів. Потім імунокон'югати очищали за допомогою ексклюзійною хроматографії. Імунокон'югати аналізували, використовуючи аналіз амінокислот (ААК) для визначення відношення пептид/CRM197. CRM197-пептид 3S ліофілізували з ліопротектором (Lyophilisation and development of solid protein pharmaceuticals. Wang W. International Journal of Pharmaceutics 203 (2000) 1-60; Fundamentals of freeze-drying. Nail SL and al. Pharm Biotechnol. 2002; 14: 281-360).

В. Властивості даних імуногенних сполук

Несподівано всі одержані імунокон'югати, що відповідають пептиду 3S SEQ ID N°2 з Cys на його С-кінці, носію CRM197 і СМФБ або МБС як лінкер, були нерозчинними у воді або в 0,9% розчині NaCl, навіть після тривалого часу, при нагріванні або струшуванні. Оскільки дані імунокон'югати не підходили для одержання гомогенної і відтворюваної речовини, дані сполуки не тестували на тваринах.

Несподівано імунокон'югати, в яких використовували пептид 3S SEQ ID N°2 з Cys на його N-кінці, носієм CRM197 і МБС як лінкер, були нерозчинними у воді або в 0,9% розчині NaCl, навіть після тривалого часу, при нагріванні або струшуванні. Навіть, незважаючи на те, що дані імунокон'югати не підходили для одержання гомогенної і відтворюваної сполуки, дані сполуки були протестовані на мишах.

Несподівано було виявлено, що імунокон'югат, який відповідає пептиду 3S SEQ ID N°2 з Cys на N-кінці, носію CRM197 і СМФБ як лінкер, був спонтанно розчинений у воді або в 0,9% розчині NaCl. Такі імунокон'югати були досліджені додатково.

Приклад 2: Порівняльні аналізи

А. Матеріали і методи

А.1. Різні імунокон'югатні сполуки, які протестовані в Прикладі 2, що отримані, як описано в Прикладі 1.

А.2. Різні протестовані композиції розкриті нижче в таблиці 1.

Таблиця 1

Групи	A	B	C	D	E	F	G	H	I
N=	10	10	10	10	10	10	10	5	5
Носій	CRM197	CRM197	CRM197	CRM197	KLH	KLH	KLH	-	-
Пептид	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	-	-
Лінкер	СМФБ	МБС	СМФБ	МБС	МБС	МБС	МБС	-	-
Ад'ювант	Adjuphos	Adjuphos	Alhydrogel	Alhydrogel	НАФ	Alhydrogel	Adjuphos	Alhydrogel	Adjuphos

Пептиди SEQ ID N°5 також названі пептидами до 3S16Nter.

- СМФБ і МБС придбали у фірми PIERCE (Illinois, USA) або SIGMA (Missouri, USA)

- Adjuphos® 2% (гель фосфат алюмінію) придбали у фірми Brenntag (Frederikssund, Denmark). Adjuphos® використовували при кінцевій концентрації 3 мг/мл іонів Al³⁺, кінцева концентрація яких була адаптована до введення 300 мкг іонів Al³⁺ на ін'єкцію.

- Alhydrogel® 2% (гель гідроксид алюмінію) придбали у фірми Brenntag (Frederikssund, Denmark). Alhydrogel® використовували при кінцевій концентрації 3 мг/мл іонів Al³⁺, кінцева концентрація яких була адаптована до введення 300 мкг іонів Al³⁺ на ін'єкцію.

- Неповний ад'ювант Фрейнда (НАФ) придбали у фірми SIGMA (Missouri, USA). НАФ емульгували з імунокон'югатною сполукою шляхом перемішування на вортексі протягом однієї години суміші 50 мкл НАФ з 50 мкл водного розчину імунокон'югата.

А.3. Тварини

Тварини були самками мишей BALB/cJ, що одержані від Charles River Laboratories (Lyon, France), які знаходились у 8-тижневому віці на 0 добу експерименту.

А.4. Спосіб введення

Кожну з композицій, яку описано у таблиці 1, ін'єктували мишам підшкірним шляхом у дозі 40 мкг, яку виражено у вигляді кількості еквівалента антигенного пептиду.

Мишам ін'єктували підшкірно 100 мкл кожній тестуючу композицію на 0 добу, 14 добу і 28 добу, відповідно.

За масою кожної миші стежили на 0, 14, 35 і 49 добу, відповідно.

A.5. Аналіз ІФА (твердофазний імуноферментний аналіз)

5 Аналіз ІФА був розроблений для проведення вимірювань антитіл IgG, які будуть розпізнаватися пептидами SEQ ID N°2, також, що називаються пептидами до 3S16Nter.

10 Титри антитіл IgG до 3S16Nter визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА). Пул сироваток від щурів, які вакциновані 20 або 50 г на вакцинацію пептидного еквівалента 3S16Nter імунокон'югатів, які представлено у таблиці 1, на 0 добу, 14 добу і 28 добу, використовували для нормалізації значень між різними 96-лунковими планшетами.

15 Тестували вісім розведень сироватки 49 діб (від 1/50 до 1/150, 1/450, 1/1350, 1/4050, 1/12150, 1/36450 та 1/109350). Антиген, нанесений на мікропланшети Nunc Maxisorp, є пептидом 3S16Nter, кон'югований з бичачим сироватковим альбуміном (BSA) з лінкером, що відрізняється від використовуваного для синтезу імунокон'югатів: CMLCK (сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат) (одержаний з набору Imject® Maleimide Activated BSA Protein Kits, який придбано у фірми Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Антитіла IgG до 3S16Nter виявляли за допомогою колориметричної реакції, використовуючи IgG (Fc) кози до антигенів щура, кон'югований з пероксидазою хрину (HRP - Horseradish peroxydase) (Jackson Immunoresearch, West Grove, USA), і субстрат HRP: тетраметилбензидин (ТМБ) (Sigma, Missouri, USA).

20 B. Результати

Титри IgG антитіл до 3S вимірювали за допомогою аналізу ІФА, який описано в розділі Матеріали і методи.

Результати зображені на фіг. 1.

25 Результати на фіг. 1 показують, що імунокон'югатні сполуки, які містять KLH як білок-носії (E, F і G), індуюють дуже низьке вироблення антитіла до 3S в порівнянні з імунокон'югатними сполуками, що містять CRM197 як білок-носії (A, B, C і D) на 21 добу (фіг. 1A), 35 добу (фіг. 1B) і 49 добу (фіг. 1C), відповідно.

30 Результати на фіг. 1 також показують, що імунокон'югатні сполуки, які одержано шляхом використання МБС (B і D) як лінкерний агент, володіють хорошими імуногенними властивостями, але, незважаючи на це, вони слабо застосовуються у зв'язку з їх здатністю до утворення гетерогенної суспензії, що містить підвищену кількість агрегатів, зі збільшеним терміном зберігання. Імунокон'югат, що присутній в сполуці A і C, також представляє хороші імуногенні властивості. Для очевидності, з даного моменту і далі його називають "лікарською речовиною 3S".

35 Результати на фіг. 1 також показують, що композиції, які містять Adjuphos® як імуноад'ювантна речовина (A, B), володіють імуногенними властивостями такого ж порядку, як і композиції, що містять Adjuphos® як імуноад'ювантна речовина, незважаючи на той факт, що композиції з Adjuphos® схильні до утворення агрегатів і, отже, складають кінцевий продукт, що володіє властивостями складного поведіння.

40 Приклад 3: Оптимізація препарату імунокон'югата

Адсорбція антигену на солях алюмінію є критичною для ад'ювантних ефектів, і препарат антигенів вакцини, зокрема, солі, є важливим елементом потенційної взаємодії між алюмінієм і антигеном. Поверхня гідроксиду алюмінію складається з гідроксильних груп, що скоординовані з алюмінієм. Поверхневий заряд фосфату алюмінію складається як з гідроксильних, так і з фосфатних груп. Адсорбція білків алюмінієвим ад'ювантом є складним процесом, в який залучений вклад електростатичних, гідрофобних та інших сил тяжіння.

50 Мета даних досліджень приготування препарату полягала в одержанні препарату вакцини гомогенного і опалесцюючого зовнішнього вигляду, без видимих агрегатів після м'якого струшування. Мета дослідження полягала в одержанні препарату, який адсорбував би щонайменше 95% лікарської речовини 3S на частинках алюмінію після однієї години інкубації.

55 У перших пошукових дослідженнях лікарську речовину 3S змішували з ад'ювантом, що є гідроксидом алюмінію, в 135 мМ хлориду натрію і 0,5 мМ фосфату натрію. Агрегати спостерігали, але майже 100% лікарської речовини 3S було адсорбовано на солях алюмінію. При використанні фосфату алюмінію змішування призводило до гомогенного розчину, але тільки 80% лікарської речовини 3S було адсорбовано на солях алюмінію.

60 Був проведений скринінг препаратів. Тестували різні фізико-хімічні параметри: pH, концентрація хлориду натрію і концентрація фосфату. Були проведені дослідження адсорбції в суспензіях, що містять 1 мг/мл іонів алюмінію. 37,5 мкг білків (що відповідає 12,5 мкг пептидного еквівалента) змішували з суспензією ад'юванта з одержанням кінцевого об'єму 0,250 мл,

використовуючи пробірки низької адсорбції. У препараті з гідроксидом алюмінію рН доводили до рН 7,2 фосфат-аніонами. Препарат м'яко перемішували. Попередні експерименти показали, що адсорбція була завершена за декілька хвилин. Суспензію центрифугували, і прозорий супернатант аналізували на білок. Концентрацію антигену супернатанта визначали, використовуючи мікропротоколи аналізу білка за допомогою біцинхонінової кислоти (Pierce, Rockford, IL, USA). Слідували методу аналізу в мікропланшеті. Поглинання вимірювали при 562 нм.

Ефект додавання в препарат іонів фосфату досліджували в цілях уникнення утворення агрегатів. Може бути можливим оптимізувати поверхневий заряд алюмінію відносно антигену шляхом попередньої обробки ад'юванта іонами фосфату. Дана обробка може привести в результаті до адсорбції основних білків за рахунок сил електростатичного притягання. Фосфат-аніони також включають в препарат вакцини для контролю рН.

Був також досліджений ефект іонної сили. Додавання хлориду натрію для збільшення іонної сили до 250 мМ підвищувало коефіцієнт адсорбції.

Використовуючи гідроксид алюмінію, зовнішній вигляд препарату поліпшувався шляхом додавання фосфат-аніонів в препарат.

Було одержано два препарати, які постійно дають гомогенний і опалесцюючий зовнішній вигляд:

Препарат 1: 7 мМ фосфат натрію, 135 мМ хлорид натрію, гідроксид алюмінію в кількості 1 мг/мл іонів Al^{3+} рН 7

Препарат 2: 15 мМ фосфат натрію, 135 мМ хлорид натрію, гідроксид алюмінію в кількості 1 мг/мл іонів Al^{3+} рН 7

При використанні фосфату алюмінію дані препарати були гомогенними і опалесцючими, але адсорбційна здатність не досягала цільового значення 95%. На противагу фосфату алюмінію, додаткові фосфат-аніони підвищували негативний поверхневий заряд. Таким чином, не очікували, що обробка фосфатом алюмінію з фосфат-аніонами змінять тип адсорбуючого білка, тобто його основний тип. Автори винаходу модифікували поверхневий заряд ад'юванта, що є фосфатом алюмінію, шляхом зниження рН попередньою обробкою HCl ад'юванта, що є фосфатом алюмінію. Коли рН ад'ювантного препарату був знижений до 5,5, була одержана адсорбція 100%. Таким чином, був вибраний наведений нижче препарат 3:

Препарат 3: 150 мМ хлорид натрію, фосфат алюмінію в кількості 1 мг/мл іонів Al^{3+} рН 5,5

Три препарати виявляли аналогічну імуногенність у мишей. Був вибраний препарат 1 в кількості 1 мг/мл іонів Al^{3+} , 7 мМ фосфат натрію, 135 мМ хлорид натрію, рН 7, щоб обмежити дію фосфат-аніонів на адсорбцію в процесі витримки.

Оптимізація препарату була продовжена. Концентрації фосфату натрію і хлориду натрію змінювали, щоб одержати препарат, прийнятний згідно з двома критеріями: адсорбція, близька до 100%, і гомогенний/опалесцюючий зовнішній вигляд. Щоб одержати ізотонічний препарат, концентрацію хлориду натрію збільшували до 150 мМ. Оскільки фосфат-аніони можуть впливати на адсорбцію на поверхні гідроксиду алюмінію, концентрацію в препараті знижували до 1 мМ. Був вибраний препарат з гідроксидом алюмінію при концентрації 1 мг/мл іонів Al^{3+} з 1 мМ фосфатом натрію і 150 мМ хлоридом натрію рН 7,2 (препарат 4: 1 мМ фосфат натрію, 150 мМ хлорид натрію, гідроксид алюмінію в кількості 1 мг/мл іонів Al^{3+} рН 7,2). Нарешті, після різних експериментів (тестування препарату і стабільності) був вибраний рН 6,8, сумісний з рН ад'юванта і лікарською речовиною 3S (препарат 5: 1 мМ фосфат натрію, 150 мМ хлорид натрію, гідроксид алюмінію в кількості 1 мг/мл іонів Al^{3+} рН 6,8).

Препарат 5 вибраний на основі описаних вище міркувань, таких як імуногенність, хороша адсорбція імунокон'югата на гідроксиді алюмінію, опалесцюючий зовнішній вигляд, відповідність для застосування на людях - рН - ізотонічність, вибрані для застосування на людях.

Лікарська речовина 3S, яка включена в препарат 5, з цього моменту позначена як "VAC-3S".

Приклад 4: Визначення оптимальних діапазонів дози

У даному прикладі описано кількість лікарської речовини 3S, яку можна ін'єктувати людям, відповідно до імунної відповіді на лікарську речовину-кандидат 3S у мишей і щурів.

А. Методи

Два дослідження з пошуку діапазонів дози проведено у мишей BalB/CByJ (Charles River Laboratories, Lyon, France) і у щурів CD[®] IGS (Charles River Laboratories, Lyon, France) з лікарською речовиною 3S або CRM197-3S16Nter з метою визначення максимальної дози для людей для застосування в клінічному випробуванні, яке пов'язано з першим введенням препарату в організм людини. Тестований препарат знаходиться в гідроксиді алюмінію (1 мг/мл іонів Al^{3+} , 150 мМ хлорид натрію і 3,6 мМ фосфат натрію). В описаних експериментах лікарська речовина 3S протестована з 3,6 мМ фосфатом натрію у зв'язку із занадто високою

концентрацією фосфату натрію в тестованій партії лікарської речовини 3S. Лікарський препарат, зокрема, "VAC-3S", включений в 1 мМ фосфат натрію замість 3,6 мМ фосфату натрію. Адсорбція лікарської речовини 3S на гідроксиді алюмінію еквівалентна від 1 до 3,6 мМ фосфату. Крім того, сполучний експеримент по імуногенності буде проведено між VAC-3S і лікарською речовиною 3S, які включено в препарат з 3,6 мМ фосфату натрію. У клінічних випробуваннях режим введення є трьома вакцинаціями з інтервалом в один місяць. У мишей і щурів був виконаний такий же режим з трьома вакцинаціями, але з інтервалом в чотирнадцять діб. Титр IgG до 3S16Nter вимірювали як біологічна відповідь на лікарську речовину 3S. Відомо, що такі антитіла інгібують взаємодію між пептидом 3S і його рецептором на Т-клітинах CD4⁺ людини.

В. Визначення оптимального діапазону дози у мишей

Шість груп по 9 мишей вакцинували зростаючими дозами лікарського препарату 3S: 0,02, 0,2, 1, 2 і 4 мкг пептидного еквівалента 3S16Nter-лікарської речовини 3S, що включений в препарат 150 мМ хлорид натрію, 3,6 мМ фосфат натрію і 1 мг/мл гідроксиду алюмінію як ад'ювант, в об'ємі 0,05 мл. Одну групу з 6 мишей вакцинували тільки ад'ювантом.

Дози 4, 2 і 1 мкг пептидного еквівалента індують титри антитіл IgG до 3S16Nter, що не мають значних відмінностей.

Отже, плато імунної відповіді (титри циркулюючих антитіл IgG до 3S16Nter), що індуковане лікарською речовиною 3S, починається зі значення, що становить від 0,2 до 1 мкг пептидного еквівалента 3S16Nter у миші після трьох вакцинацій в одному сайті по 0,05 мл ад'ювантованої лікарської речовини 3S з інтервалом у два тижні.

С. Визначення оптимального діапазону дози у щурів

П'ять груп по 6 щурів вакцинували зростаючими дозами лікарської речовини 3S: 0,02, 0,2, 2, 20 і 40 мкг пептидного еквівалента 3S16Nter лікарської речовини, яку включено в препарат 150 мМ хлорид натрію, 3,6 мМ фосфат натрію і 1 мг/мл гідроксиду алюмінію як ад'ювант, в об'ємі 0,5 мл на вакцинацію. Одну групу з 6 щурів не вакцинували як негативний контроль.

Вакцинація 40 мкг пептидного еквівалента призводить в результаті до значно більш високого титру антитіл IgG до 3S16Nter (геометричне середнє=1/5776), ніж 2 мкг пептидного еквівалента (геометричне середнє=1/1413, $p=0,03$), ніж 0,2 мкг пептидного еквівалента (геометричне середнє=1/1736, $p=0,02$) і ніж 0,02 мкг пептидного еквівалента (геометричне середнє=1/861, $p=0,009$).

Вакцинація 40 мкг пептидного еквівалента призводить в результаті до недостовірно відрізняючого титру антитіл IgG до 3S16Nter в порівнянні з вакцинацією 20 мкг пептидного еквівалента (геометричні середні: 1/5776 і 1/4284 відповідно, $p = 0,70$).

Отже, плато імунної відповіді (титрів циркулюючих антитіл IgG до 3S16Nter), яку індуковано лікарською речовиною, починається зі значення, що становить від 2 до 20 мкг пептидного еквівалента 3S16Nter у щурів після трьох ін'єкцій ад'ювантованої лікарської речовини 3S з інтервалом два тижні.

Д. Визначення оптимального діапазону дози у людини

Обґрунтування, що використане авторами винаходу, полягає в тому, що доза ад'ювантованої лікарської речовини 3S, необхідна для одержання плато титру антитіл IgG до 3S16Nter у миші, повинна відповідати десятиразовій дозі, що необхідна для одержання плато титру антитіл IgG до 3S16Nter у людей. Дане означає, що плато титру IgG до S16Nter має бути досягнуто у людини при введенні від 2 (10-кратну кількість 0,2 мкг) до 10 мкг (10-кратне кількість 1 мкг) пептидного еквівалента 3S16Nter.

Автори винаходу вважали, що доза ад'ювантованої лікарської речовини 3S, необхідна для одержання плато титру антитіл IgG до 3S16Nter у пацюка, повинна відповідати такій же дозі, що необхідна для одержання плато титру антитіл IgG до 3S16Nter у людей.

Отже, відповідно з пошуком діапазону дози, який проведено у миші, можна очікувати, що плато імунної відповіді у людей досягається при мінімальній дозі ад'ювантованої лікарської речовини 3S, що становить від 2 до 10 мкг пептидного еквівалента 3S16Nter.

Відповідно з пошуком діапазону дози, який проведено у пацюка, можна очікувати, що плато імунної відповіді у людей досягається при мінімальній дозі ад'ювантованої лікарської речовини 3S, що становить від 2 до 20 мкг пептидного еквівалента 3S16Nter.

Максимальна доза ад'ювантованої лікарської речовини 3S для людини, яку потрібно ін'єкувати людям, була встановлена як 10 мкг пептидного еквівалента 3S16Nter на вакцинацію при включенні в препарат 1 мг/мл гідроксиду алюмінію, 150 мМ хлорид натрію і 0,5 мл PBS.

Таким чином, доза для застосування у людини повинна становити, наприклад, 10 мкг пептидного еквівалента 3S16Nter на вакцинацію, і переважно може перебувати в діапазоні від 0,1 до 20 мкг пептидного еквівалента 3S16Nter на вакцинацію.

Приклад 5: Захисний ефект композиції вакцини

Мета Приклада 5 полягала в тестуванні здатності антисироваток щура, яку вакциновано ад'ювантованою лікарською речовиною 3S, до інгібування експресії NKp44L на поверхні активованих Т-клітин CD4⁺ людини, які індуковано пептидом 3S, а саме пептидом 3S16Nter.

Т-клітини CD4⁺ сортували із моноклеарних клітин периферичної крові (МКПК) людини і активували протягом 3 діб фітогемагглютиніном (ФГА) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), потім збагачували протягом трьох діб рекомбінантним інтерлейкіном (ІЛ)-2 (Novartis, Horsham, United Kingdom). Клітини висівали в присутності пептидів 3S16Nter (Covalab, Villeurbanne, France) з метою індукції експресії NKp44L на їх поверхні.

Експресію NKp44L на поверхні клітин вимірювали, використовуючи інтенсивність специфічного флуоресцентного фарбування, вимірюваного за допомогою цитофлуориметрії.

Було досліджено інгібування експресії NKp44L антисироватками вакцинованого щура.

Антисироватки тестували при різних розведеннях у трьох повторях.

А. Матеріали та методи

Клітини:

Т-клітини CD4⁺ людини були одержані шляхом магнітного поділу з контейнера лейко-тромбоцитарного осаду, який замовляли у фірми EFS ("Etablissement Français du Sang").

Т-клітини CD4⁺ людини сортували з контейнера згідно з наступним протоколом:

1. Вміст контейнера розподіляють за чотирма пробірках Falcon на 50 мл: 4×15 мл.
2. Доповнюють до 50 мл середовищем RPMI1640+глутамакс (ref 72400-054, GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA).

3. Розподіляють розбавлену кров у вісім пробірок на 50 мл на 15 мл фікола (Ref 17-829E, Eurobio, Les Ulis, France)).

4. Центрифугують при 2800 об/хв протягом 20 хвилин без перерви при кімнатній температурі.

5. Збирають лейкоцитарні кільця і збирають в чотири пробірки на 50 мл, максимум по 25 мл на пробірку.

6. Доповнюють пробірку до 50 мл середовищем RPMI1640.

7. Центрифугують при 2000 об/хв, 7 хвилин, кімнатна температура.

8. Відокремлюють супернатант.

9. Об'єднують осад і промивають у 50 мл середовища RPMI1640, центрифугують при 1500 об/хв протягом 5 хвилин при кімнатній температурі.

10. Рахують клітини в трипановому синьому.

11. Сортують 400 млн МКПК (моноклеарні клітини периферичної крові).

12. Промивають клітини в 15 мл в сортувальному буфері (фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS) без Mg і Ca, 0,5% бичачий сироватковий альбумін (БСА), 2 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА)). З цього моменту клітини тримають при 4°C або в льоду, щоб уникнути фагоцитозу магнітних гранул.

13. Додають 10 мкл магнітних гранул на 20x10⁶ МКПК=200 мкл суспензії магнітних гранул на 400 млн. МКПК (MACS CD4 microbeads, Miltenyi Biotec, Paris, France).

14. Інкубують протягом 30 хвилин при 4°C.

15. Ресуспендують клітини в 1 мл сортувального буфера.

16. Поміщають дві колонки LS (Miltenyi Biotec, Paris, France) на магніт quadroMACS (Miltenyi Biotec, Paris, France).

17. Врівноважують кожну з двох колонок LS 3 мл сортувального буфера.

18. Пропускають клітинну суспензію через колонки (0,5 мл в кожній колонці) за допомогою гравітації.

19. Промивають два рази кожну колонку 5 мл сортувального буфера.

20. Видаляють колонки з магніту.

21. Елюїрують кожну колонку два рази 5 мл сортувального буфера, перший раз за допомогою гравітації, другий раз, використовуючи поршень.

22. Відмивають елюйровані клітини з кожної колонки в 15 мл повного середовища (RPMI1640+глутамакс, 10% декомплементованої SVF Gibco, заміні амінокислоти 100X (ref GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA), антибіотики/протигрибкові засоби (ref 15240-112, GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA).

23. Рахують клітини в оцтовокислому синьому.

Т-клітини CD4⁺ людини активували і збагачували відповідно до наступного протоколу:

1. 50 млн Т-клітин CD4⁺ поміщають в культуру в 30 мл повного середовища у флаконі 75 см² (Ref 353136, Falcon, Lieu, Pays), вертикально поміщений у зволожений вентильований термостат при 37°C, 5% CO₂.

2. Додають фітогемагглютинін (ФГА) при кінцевій концентрації 1 мкг/мл: 1 мкл аліквоти при

концентрації 1 мг/мл на мл середовища (ФГА від Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

3. Після 3 доби активації ФГА додають ІЛ-2 (Aldesleukine, Lieu, Pays) у кількості 100 од./мл.

4. У процесі активації ФГА і збагачення ІЛ-2 середовище замінюють наполовину кожен раз, коли воно стає жовтуватим.

5 Досліджувані препарати

Тестували сироватки від щура (*Rattus norvegicus*) CrI/CD (SD): Дану тварину вакцинували 2 мкг пептидного еквівалента 3S16Nter/вакцинація лікарської речовини 3S, ад'ювантованим гідроксидом алюмінію, на 0 добу, 14 добу і 28 добу. Дана сироватка на 49 добу була позитивною на антитіла до 3S16Nter.

10 Як негативний контроль тестували неімунну сироватку від щура 482.

Контролі

Позитивний контроль: Антисироватку від новозеландського кролика (*Oryctolagus cuniculus*) з Charles River Laboratories, Lyon, France, яку взято на добу 49, використовували як позитивний контроль при розведенні 1/50. Даного кролика вакцинували на 0 добу, 14 добу і 28 добу імунокон'югатом CRM197-(3S16Nter), ад'ювантованим гідроксидом алюмінію, і дана сироватка на 49 добу була позитивною за IgG до 3S16Nter.

Негативний контроль: Антисироватку від кролика, що вакцинований нерелевантною вакциною, використовували як негативний контроль при розведенні 1/50.

20 Контролі тестували у двох повторах без пептидів або з пептидами 3S16Nter. Ідентифікаційні номери лунок і пробірок вказані в таблиці 2 нижче.

Таблиця 2

Ідентифікаційний номер лунок контролю експерименту

	Без сироватки	Без сироватки	Контроль (-)	Контроль (-)	Контроль (+)	Контроль (+)
Без 3S16Nter	4	5	8	9	12	13
3 3S16Nter	6	7	10	11	14	15

Оскільки стан активації Т-клітин CD4⁺, що дає можливість експресії NKp44L у відповідь на вплив пептидів 3S16Nter in vitro невідомо, всі контролі необхідно перевіряти.

25 3 метою перевірки експерименту NKp44L повинен експресуватися на поверхні клітин лунок 6, 7, 10 і 11 і не повинен експресуватися на поверхні клітин лунок 4, 5, 8, 9, 12, 13, 14 і 15.

Протокол

1. Сироватки, що підлягають тестуванню, тестували у трьох повторах,

30 2. 20 мкл розведення 1/40 розчину пептиду 3S16Nter в концентрації 2 мг/мл: 25 мкл IVV-B122 + 975 мкл повного середовища RPMI1640. Таким чином, пептиди 3S16Nter перебували при кінцевій концентрації 5 мкг/мл.

3. 180 мкл клітинної суспензії Т-клітин CD4⁺ з флакона.

Для розведення сироваток 1/50 додають 4 мкл сироваток на лунку.

Для розведення сироваток 1/100 додають 8 мкл розведення сироваток 1/4.

35 Для розведення сироваток 1/400 додають 8 мкл розведення сироваток 1/16.

Для розведення сироваток 1/1600 додають 8 мкл розведення сироваток 1/64.

Сироватки щура тестували у трьох повторах у присутності пептидів 3S16Nter. Ідентифікаційні номери лунок і пробірок вказані в таблиці 3.

Таблиця 3

Ідентифікаційний номер лунок сироваток щура

Сироватка	482 0 добу	R122 48 добу	R122 48 добу	R122 48 добу	R122 48 добу
Розведення	1/50	1/50	1/100	1/400	1/1600
С 3S16Nter	31	34	37	40	43
С 3S16Nter	32	35	38	41	44
С 3S16Nter	33	36	39	42	45

40

3 лунки використовують як контроль для цитофлуориметричного аналізу.

У лунці 1 клітини не фарбували; в лунку 2 клітини поміщали в присутності тільки антитіла до IgM-ФЕ для оцінки фону; в лунці 3 клітини фарбували тільки антитілом до CD4-APC.

Таблиця 4

Ідентифікаційний номер лунок контролю цитофлуориметрії

Антитіло	Не фарбували	Тільки антитіло до IgM PE	Тільки антитіло до CD4-APC
3 3S16Nter	1	2	3

4. Мікропланшет інкубують протягом 4 годин на термостаті для культур клітин (37°C, зволожена атмосфера, 5% CO₂).

5. Центрифугують мікропланшет протягом 5 хв при 400 об/хв.

6. Видаляють супернатант.

7. Додають 10 мкл/лунка мишачого антитіла до NKp44L IgM 7,1 + 30 мкл/лунка PBS, 0,5% БСА (500 мкл розчину антитіла + 1500 мкл PBS, БСА 0,5%)

8. Інкубують протягом 1 години при 4°C.

10. Додають 150 мкл/лунка PBS, БСА 0,5%.

10. Центрифугують мікропланшет протягом 5 хвилин при 400 об/хв.

11. Видаляють супернатант.

12. Додають 50 мкл/лунка розведення 1/25 в PBS, 0,5% БСА другого антитіла IgM-PE до миші.

15. 13. Інкубують протягом 30 хвилин при 4°C.

14. Додають 150 мкл/лунка PBS, БСА 0,5%.

15. Центрифугують мікропланшет протягом 5 хвилин при 400 об/хв.

16. Додають 50 мкл розведення 1/25 в PBS, 0,5% БСА антитіла CD4-APC проти людини.

20. 17. Переносять клітинні суспензії в пробірки для сортування флуоресцентно-активованих клітин (FACS-fluorescence activated cell sorting).

18. Інкубують протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.

19. Додають 2 мл PBS 1X на пробірку.

20. Центрифугують протягом 5 хвилин при 400 об/хв.

21. Додають 300 мкл PBS 1X.

25. 22. Знімають дані пробірок в цитофлуориметрі.

Прилад SN: AN52257, програмне забезпечення: Gallios

Число, яке виділено напівжирним шрифтом, відповідає ідентифікаційному номеру лунки.

Дані аналізують на добу аналізу за допомогою програми Gallios і друкують.

У результатах вказано X-середнє флуоресценції маркера PE клітин

30. - Точкова діаграма інтенсивності/пряме світлорозсіювання пропускаючих Т-клітин CD4⁺ на APC

- Точкова діаграма інтенсивності/пряме світлорозсіювання пропускаючих лімфоцитів на SSC Дане X-середнє значення є густиною маркерів NKp44L на поверхні Т-клітин CD4⁺.

В. Результати

35

Таблиця 5

Ідентифікаційний номер лунки (див., таблиця 2 і 3)	Сироватка	Розведення	3S16Nter	X-середнє флуоресценції PE
1	Hi	не визначалось	+	не визначалось
2	Hi	не визначалось	+	не визначалось
3	Hi	не визначалось	+	0,4
4	Hi	не визначалось	-	1,1
5	Hi	не визначалось	-	1,1
6	Hi	не визначалось	+	59,6
7	Hi	не визначалось	+	64,7
8	Ig кролика до 3S16Nter Негативний	1/50	-	0,7
9	Ig кролика до 3S16Nter Негативний	1/50	-	0,8

Таблиця 5

Ідентифікаційний номер лунки (див., таблиця 2 і 3)	Сироватка	Розведення	3S16Nter	Х-середнє флуоресценції PE
10	Ig кролика до 3S16Nter Негативний	1/50	+	65,1
11	Ig кролика до 3S16Nter Негативний	1/50	+	61,3
12	Ig кролика до 3S16Nter Позитивний	1/50	-	0,8
13	Ig кролика до 3S16Nter Позитивний	1/50	-	1,1
14	Ig кролика до 3S16Nter Позитивний	1/50	+	0,8
15	Ig кролика до 3S16Nter Позитивний	1/50	+	0,8
31	482-d0	1/50	+	56,7
32	482-d0	1/50	+	58,6
33	482-d0	1/50	+	45,0
34	R122-d49	1/50	+	0,6
35	R122-d49	1/50	+	0,7
36	R122-d49	1/50	+	0,7
37	R122-d49	1/100	+	8,7
38	R122-d49	1/100	+	13,6
39	R122-d49	1/100	+	19,9
40	R122-d49	1/400	+	57,7
41	R122-d49	1/400	+	53,5
42	R122-d49	1/400	+	27,3
43	R122-d49	1/1600	+	56,4
44	R122-d49	1/1600	+	49,4
45	R122-d49	1/1600	+	56,0

На фіг. 4 зображено середнє флуоресценції PE контрольних лунок.

Одержані результати показують наступне:

- 5 - У лунках без сироватки, без пептидів 3S16Nter активовані Т-клітини CD4⁺ не експресували NKp44L.
- У лунках без сироватки, у присутності пептидів активовані Т-клітини CD4⁺ експресували NKp44L на середньому рівні 62.
- У лунках з сироваткою кролика, яка негативна за антитілом до 3S16Nter, при розведенні 1/50, без пептидів 3S16Nter активовані Т-клітини CD4⁺ не експресували NKp44L.
- 10 - У лунках з сироваткою кролика, яка негативна за антитілом до 3S16Nter, при розведенні 1/50, у присутності пептидів 3S16Nter активовані Т-клітини CD4⁺ експресували NKp44L на середньому рівні 63.
- У лунках з сироваткою кролика, яка позитивна за антитілом до 3S16Nter, при розведенні 1/50, з пептидами 3S16Nter або без пептидів активовані Т-клітини CD4⁺ не експресували NKp44L.
- 15 Дані результати показують, що *in vitro* активовані Т-клітини CD4⁺, які використано в даному експерименті,
 - Спонтанно не експресують NKp44L на їх поверхні,
 - Мають здатність до експресії NKp44L на їх поверхні у відповідь на вплив пептидів
- 20 3S16Nter,
 - Дана експресія не була ні індукована, ні інгібована нерелевантною антисироваткою,
 - Поверхня NKp44L була повністю інгібована позитивною сироваткою за IgG до 3S16Nter.

Крім того, на фіг. 5 зображені результати X-середнього флуоресценції лунок тестованих препаратів.

Одержані результати показують наступне:

- У лунках з сироватками щура, які негативні за антитілом до 3S16Nter при розведенні 1/50, у присутності пептидів 3S16Nter активовані Т-клітини CD4⁺ експресували NKp44L на середньому рівні флуоресценції 53.
- У лунках з сироватками щура, які позитивні за антитілом до 3S16Nter при розведенні 1/50, у присутності пептидів 3S16Nter поверхнева експресія NKp44L на активованих Т-клітинах CD4⁺ була повністю інгібована.
- У лунках з сироватками щура, які позитивні за антитілом до 3S16Nter при розведенні 1/100, у присутності пептидів 3S16Nter активовані Т-клітини CD4⁺ експресували NKp44L на середньому рівні флуоресценції 14.
- У лунках з сироватками щура, які позитивні за антитілом до 3S16Nter при розведеннях 1/400 і 1/1600 в присутності пептидів 3S16Nter поверхнева експресія NKp44L на активованих Т-клітинах CD4⁺ була інгібована.

Як висновок Приклада 5, одержані результати показують, що в моделі клітин людини *in vitro* активованих Т-лімфоцитів CD4⁺ антисироватки щурів, які вакциновано лікарською речовиною 3S, що ад'ювантована Alhydrogel у високій ступені дозозалежно інгібували експресію NKp44L на поверхні Т-лімфоцитів CD4⁺. Зазначені дані відображають здатність даних препаратів вакцини до індукції антитіл, які можуть функціонально блокувати дію пептиду 3S на експресію NKp44L на Т-лімфоцитах CD4⁺.

Приклад 6: Одержання ін'єкційних композицій і спосіб введення для медичного застосування

Одержання препарату вакцини:

VAC-3S є стерильною суспензією для внутрішньом'язової ін'єкції, що містить лікарську речовину 3S, адсорбована на гідроксиді алюмінію в забуференому ізотонічному фізіологічному розчині. Одержання VAC-3S було виконано відповідно до належної медичної практики (НМП).

Для одержання VAC-3S лікарську речовину 3S включають в препарат при концентрації 0,02 мг/мл пептидного еквівалента 3S16Nter в 0,5 мл гідроксиді алюмінію (1 мг/мл іонів Al³⁺), яку одержано від фірми Brenntag (Alhydrogel 85 2% - Ph Eur), 150 мМ хлорид натрію (Європейська фармакопея) і 1 мМ фосфат натрію (Європейська фармакопея). Препарати для ін'єкції застосовують для одержання препарату вакцини. Кінцевий рН становить 6,8. VAC-3S не містить консервант.

Ін'єкції:

Після перемішування вакцина є гомогенною білою суспензією, готову до застосування. Дану вакцину можна ін'єкувати внутрішньом'язово в дельтоподібний м'яз. Для ін'єкції використовують стерильний шприц зі стерильною голкою. Пацієнти повинні одержувати 3 дози по 0,5 мл кожна, з інтервалом 4 тижні між вакцинаціями.

Приклад 7: Одержання імуногенної сполуки

А. Одержання імуногенних сполук

Синтезували наступну імуногенну сполуку або кон'югат. Дану сполуку одержувати з CRM197, використовуючи СМФБ як зшиваючу молекулу (як показано в прикладі 1). Пептид, який використовується є мутованим пептидом 3S (m3S), що складається з SEQ ID N°6 (NH₂-PWNASASNKSLDDIW-COOH) з додатковим залишком цистеїну на його аміно-кінці, щоб дати можливість для хімічного зв'язування лінкера з одержанням CRM197-СМФБ-Nter (Cys) -m3S.

Для очевидності пептид, позначений вище "Nter (Cys) -m3S", в даному винаході складається з пептиду 3S SEQ ID N°7.

Використовували гетеробіфункціональний лінкер сульфо-СМФБ (сульфо-(сукцинімідил-4-(пара-малеїдофеніл)бутират). Дані молекули складаються з maleimidного групування, яке зшито ланцюгом поліетилену з ефіром N-гідроксисукцинімідом (Cross-linking of protein by w-maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimido esters. Partis MD and al. Journal of Protein Chemistry, vol.2, No 3, 1983). Сукцинімідне групування може взаємодіяти з аміногрупами білка. Як тільки дана реакція відбулася, maleimidне групування взаємодіє з сульфгідрильними групами пептидів 3S. Вони розрізняються за довжиною, 7,3 Å для сульфо-МБС і 11,6 Å для сульфо-СМФБ. Видалення лінкера і заміну буфера виконували за допомогою ексклюзійної хроматографії (EX).

Реакція поєднання була двухстадійною реакцією. Перша стадія є активацією CRM197 з лінкером. 15 міліграмів лінкера, який розведено в диметилсульфоксиді, додавали до 20 міліграмів CRM197 в об'ємі від 5 до 20 мл буфера кон'югації (PBS 10 мМ рН 7 - рН 7,4) і м'яко перемішували від 30 до 90 хв при кімнатній температурі (Protective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of Bordetella pertussis toxin subunit S1. Askelöf P. and al. PNAS, vol.87, pp 1347-1351, February 1990). Дану реакцію виконували шляхом

очищення активованого CRM197 за допомогою EX (колонка PD10 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles United Kingdom) або колонка Bio-Gel P2 (Biorad Marnes-la-Coquette, France)). Потім активований CRM197 і пептид 3S-походження перемішували від 30 хв до 2 годин при кімнатній температурі, що дає можливість ковалентного зв'язування пептиду на активованому CRM197.

Для блокування непрореагованих малеїмідогруп активованого CRM197 додають цистеїн-HCl (SIGMA, Missouri, USA) в надлишку по відношенню до розчину після реакції кон'югації (A practical approach to crosslinking. Mattson G. and al. Molecular Biology Reports 17: 167-183, 1993). Дана стадія обмежувала утворення мультимерів. Потім імунокон'югати очищали за допомогою ексклюзійної хроматографії. Імунокон'югати аналізували, використовуючи аналіз амінокислот (ААК) для визначення відношення пептид/CRM197.

В. Властивості даних імуногенних сполук

Було виявлено, що одержаний імунокон'югат, який відповідає пептиду m3S SEQ ID N°7, що містить залишок Cys на N-кінці, носій CRM197 і СМФБ як лінкер, спонтанно розчинний у воді або в 0,9% розчині NaCl. Імуногенність таких імунокон'югатів була додатково досліджена в Прикладі 10 нижче.

Приклад 8: Імуногенність імуногенної сполуки Прикладу 9

А. Матеріали і методи

А.1. Імунокон'югатні сполуки, які протестовано в Прикладі 10, що одержані, як описано в Прикладі 9.

Препарати готували, як описано в Прикладі 3. З даною метою Alhydrogel® 2% (гель гідроксиду алюмінію) використовували як ад'ювант і придбали у фірми Brenntag (Frederikssund, Denmark). Alhydrogel® використовували при кінцевій концентрації 1 мг/мл іонів Al^{3+} , де дана кінцева концентрація адаптована для введення 50 мкг іонів Al^{3+} на ін'єкцію.

А.2. Тварини

Тварини були самками мишей BALB/cByJ, які одержано з Charles River Laboratories (Lyon, France), у 8-тижневого віці на 0 добу експерименту.

А.3. Спосіб введення

Препарат вакцини, описаний в Прикладі 5, ін'єктували мишам внутрішньом'язовим шляхом в дозі 2 мкг, яку виражено у вигляді кількості еквівалента антигенного пептиду.

Мишам ін'єктували внутрішньом'язово 50 мкл кожної протестованої композиції на 0 добу, 14 добу, 28 добу, 169 добу і 212 добу, відповідно.

А.5. Аналіз ІФА

Аналіз ІФА був розроблений для проведення вимірювання антитіл IgG, які повинні розпізнавати пептиди SEQ ID N°6, також названі антитілами до пептиду m3S.

Титри антитіл IgG до пептиду m3S визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА).

Було протестовано вісім розведень сироваток 169 діб, 204 діб і 260 діб (1/3000, 1/6000, 1/12000, 1/24000, 1/48000, 1/96000, 1/192000 і 1/384000). Антиген, яким покривали мікропланшети Nunc Maxisorp, є пептидом m3S, кон'югований з бичачим сироватковим альбуміном (BSA) за допомогою лінкера, що відрізняється від лінкера, що використаний для синтезу імунокон'югатів: SMCC (сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат - succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) (що одержаний з набору Imject® Maleimide Activated BSA Protein Kits, що придбаний у фірми Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Антитіла IgG до m3S виявляли за допомогою колориметричної реакції, використовуючи IgG (Fc) кози до антигенів миші, кон'югований з пероксидазою хрону (HRP - Horseradish peroxidase) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA), і субстрат HRP: тетраметилбензидин (ТМБ) (Sigma, Missouri, USA).

В. Результати

Титри антитіл IgG до 3S вимірювали за допомогою аналізу ІФА, описано в розділі Матеріали і методи.

Результати зображені на фіг. 6.

Результати на фіг. 6 показують, що імунокон'югатна сполука, яка містить CRM197 як білок-носії, індукує високе продукування антитіла до m3S на добу 169 після 3 вакцинацій на 0 добу, 14 добу і 28 добу.

Результати на фіг. 6 показують, що імунокон'югатна сполука, яка містить CRM197 як білок-носії, індукує високе продукування антитіла до m3S на добу 169 після 4 вакцинацій на 0 добу, 14 добу, 28 добу і 169 добу.

Таблиця 7

SEQ ID	Тип	Опис
1	Пептид	Центральна частина пептиду формули (I)
2	Пептид	Центральна частина пептиду формули (IIa)
3	Пептид	Nt пептид
4	Пептид	Ct пептид
5	Пептид	Cys(Nter) 3S
6	Пептид	Центральна частина пептиду формули (IIb)
7	Пептид	Cys(Nter) m3S
8	Пептид	CRM197

34058-seq-listing
ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ІННАВІРВАКС
<120> Композиція вакцини
<130> PR98282
<150> EP12305602.0
<151> 2012-05-31
<160> 8
<170> Версія, що патентується 3.5
<210> 1
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> пептид

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X є Аланіном, Треоніном, Серином або Аспарагіном

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X є Триптофаном або Аланіном

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X є Лізином або Аргініном

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X є Серином або Треоніном

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X є Лейцином, Тирозином або Глутаміном

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X є аспарагіною кислотою, Аспарагіном, глутаміною кислотою, Серином, Гліцином, або Лізином

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X є аспарагіною кислотою, Глутаміном, Лейцином, Аланіном, Лізином і глутаміною кислотою

<400> 1
Pro Trp Asn Xaa Ser Xaa Ser Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Trp
1 5 10 15

<210> 2

34058-seq-listing

<211> 15
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> пептид

<400> 2

Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Asp Ile Trp
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> пептид

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X є Треоніном або Проліном

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X є Аланіном, Треоніном або Аспарагіном

<400> 3

Cys Xaa Thr Xaa Val
 1 5

<210> 4
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> пептид

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X є аспарагіноюю кислотою, Глутаміном, глутаміноюю кислотою або Аспарагіном

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X є Аспарагіном, Гістидином, Серином або Лізином

<400> 4

Xaa Xaa Met Thr Trp
 1 5

<210> 5
 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> Штучна послідовність

34058-seq-listing

<220>

<223> пептид

<400> 5

Cys Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Asp Ile Trp
1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> пептид

<400> 6

Pro Trp Asn Ala Ser Ala Ser Asn Lys Ser Leu Asp Asp Ile Trp
1 5 10 15

<210> 7

<211> 16

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> пептид

<400> 7

Cys Pro Trp Asn Ala Ser Ala Ser Asn Lys Ser Leu Asp Asp Ile Trp
1 5 10 15

<210> 8

<211> 535

<212> ПРТ

<213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 8

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

34058-seq-listing

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
355 360 365

34058-seq-listing

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510

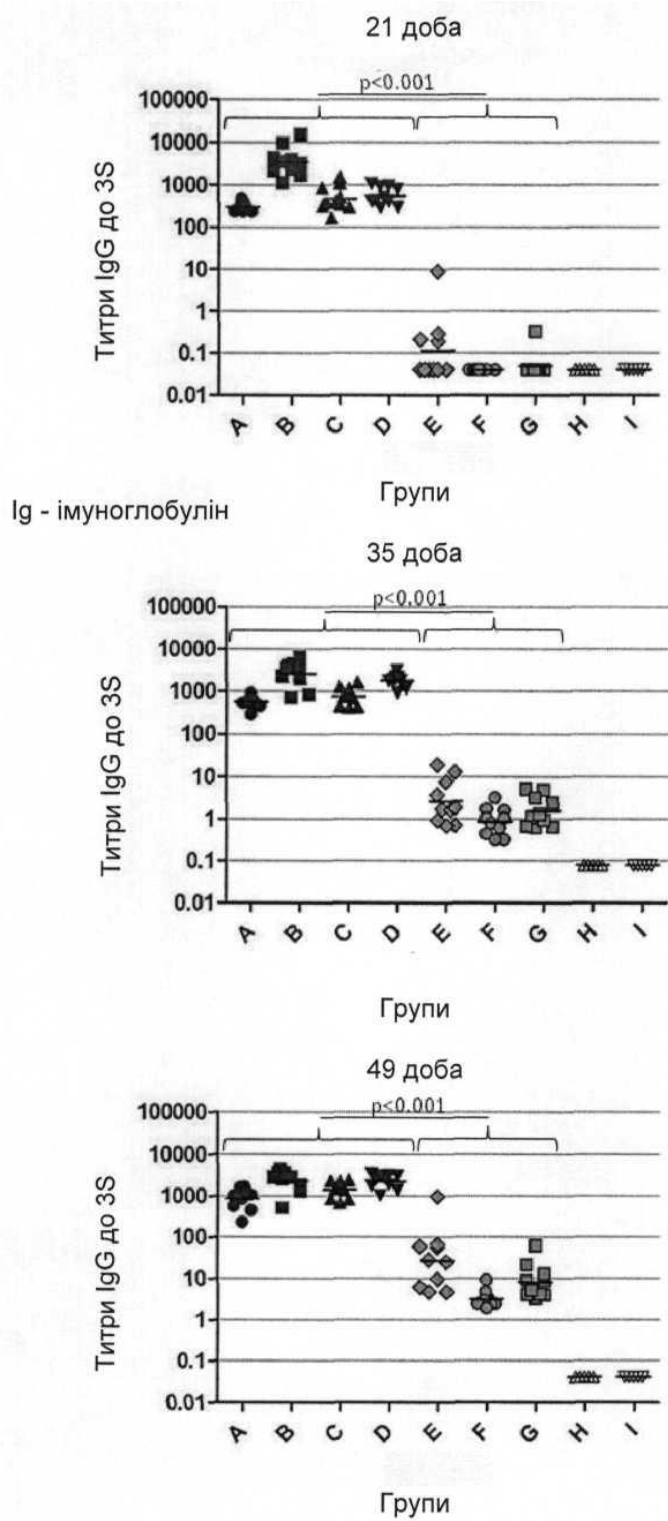
Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535

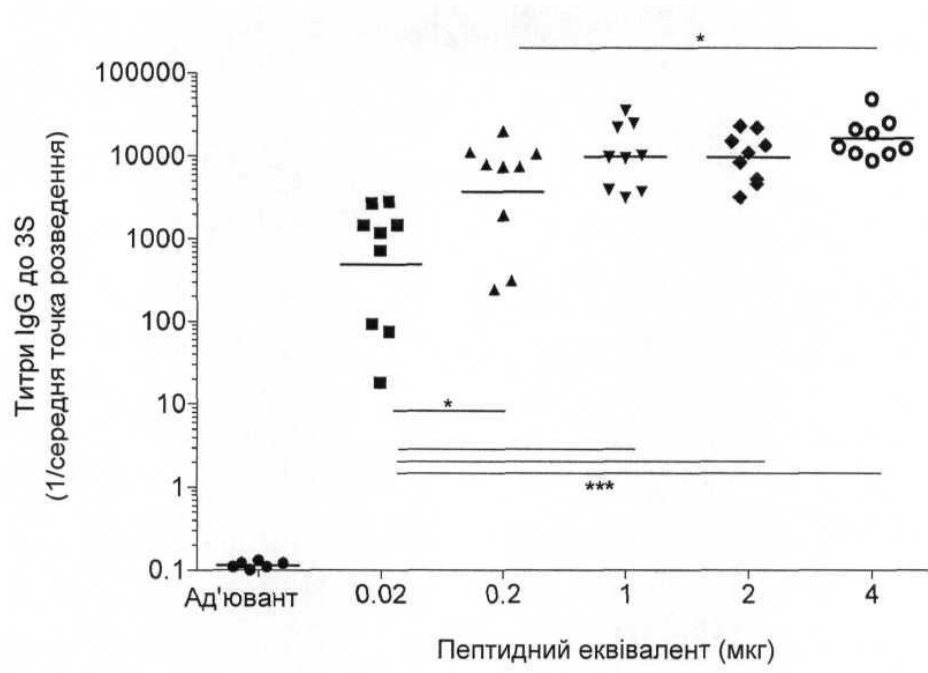
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Імуногенна сполука, яка містить пептид, який вибраний з групи, що складається з наступних формул (VIa) і (VIb):
 $\text{NH}_2\text{-(A1)}_m\text{-SEQ ID NO: 2-(A2)}_n\text{-COOH (VIa),}$
 $\text{NH}_2\text{-(A1)}_m\text{-SEQ ID NO: 6-(A2)}_n\text{-COOH (VIb),}$
 де:
 - 10 - m є цілим числом, що означає 0 або 1,
 - n є цілим числом, що означає 0 або 1,
 - A1 є амінокислотним залишком, і
 - A2 є амінокислотним залишком,
 при цьому пептид формули (VIa) або (VIb) ковалентно зв'язаний шляхом кон'югування з білком-носієм, що складається з білка CRM197.
- 15 2. Імуногенна сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вибрана з групи, що складається з SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 7.
3. Імуногенна сполука за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що ковалентно зв'язана з білком CRM197 за допомогою його N-кінцевого амінокислотного залишку.
- 20 4. Імуногенна сполука за будь-яким з пп. 1-3, яка **відрізняється** тим, що ковалентно зв'язана з білком CRM197 за допомогою лінкерного групування.
5. Імуногенна сполука за п. 4, яка **відрізняється** тим, що зазначене лінкерне групування є продуктом взаємодії лінкерного агента, що має дві функціональні групи, як з CRM197, так і з пептидом формули (I).
- 25 6. Імуногенна сполука за п. 5, яка **відрізняється** тим, що зазначене лінкерне групування складається з сукцинімідил-4-[p-малеїмідифеніл]бутирату (СМФБ) і сульфо-СМФБ.

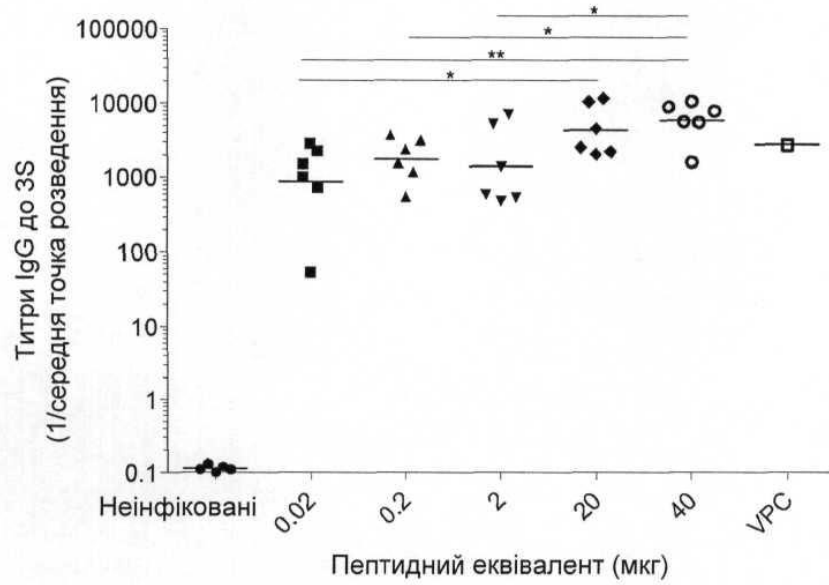
7. Композиція, що містить імуногенну сполуку за будь-яким з пп. 1-6 в комбінації з однією або більше імуноад'ювантними речовинами.
8. Композиція за п. 7, яка **відрізняється** тим, що адаптована для одержання готової до застосування композиції вакцини, що містить вказану імуногенну сполуку в кількості від 0,01 мкг до 200 мкг на одиницю дозування, що виражене в еквіваленті антигенного пептиду, переважно від 0,05 мкг до 50 мкг на одиницю дозування, і найбільш переважно від 0,1 мкг до 20 мкг на одиницю дозування.
9. Композиція за п. 7 або п. 8, яка **відрізняється** тим, що вказана імуноад'ювантна речовина складається з гідроксиду алюмінію ($Al(OH)_3$).
10. Композиція за п. 9, яка **відрізняється** тим, що адаптована для одержання готової до застосування композиції вакцини, що містить гідроксид алюмінію в кінцевій концентрації від 0,1 мг/мл до 5 мг/мл, переважно від 0,05 мг/мл до 2 мг/мл, і найбільш переважно приблизно 1 мг/мл, що виражена у вигляді вмісту іонів Al^{3+} .
11. Композиція за будь-яким з пп. 8-10, яка **відрізняється** тим, що адаптована для одержання готової до застосування композиції вакцини, що містить фосфат натрію у кінцевій концентрації від 0,1 мМ до 50 мМ, переважно від 0,5 мМ до 15 мМ фосфату натрію, і найбільш переважно приблизно 1 мМ фосфату натрію.
12. Композиція за будь-яким з пп. 8-11, яка **відрізняється** тим, що знаходиться в рідкій формі або у твердій формі, включаючи ліофілізовану форму.
13. Композиція вакцини, яка містить імуногенну сполуку за будь-яким з пп. 1-5 або композицію за будь-яким з пп. 7-12 з одним або більше фармацевтично прийнятним носієм.
14. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 1-6 для виготовлення композиції вакцини для профілактики і/або лікування стану, що викликаний інфекцією індивідуума вірусом ВІЛ.



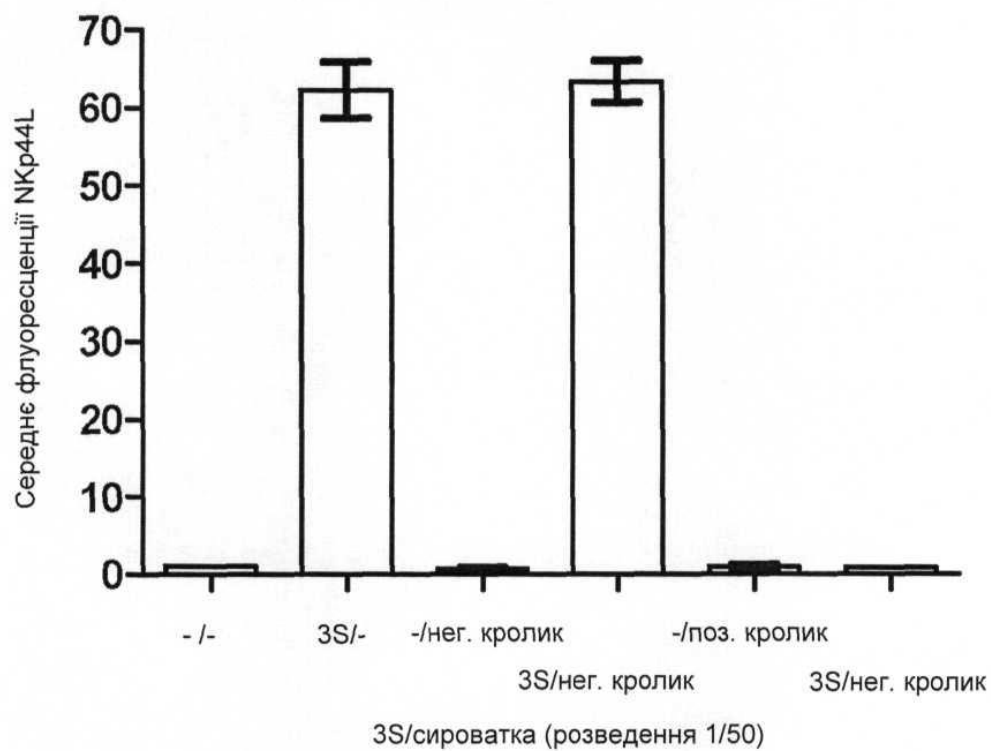
ФІГ. 1



ФІГ. 2



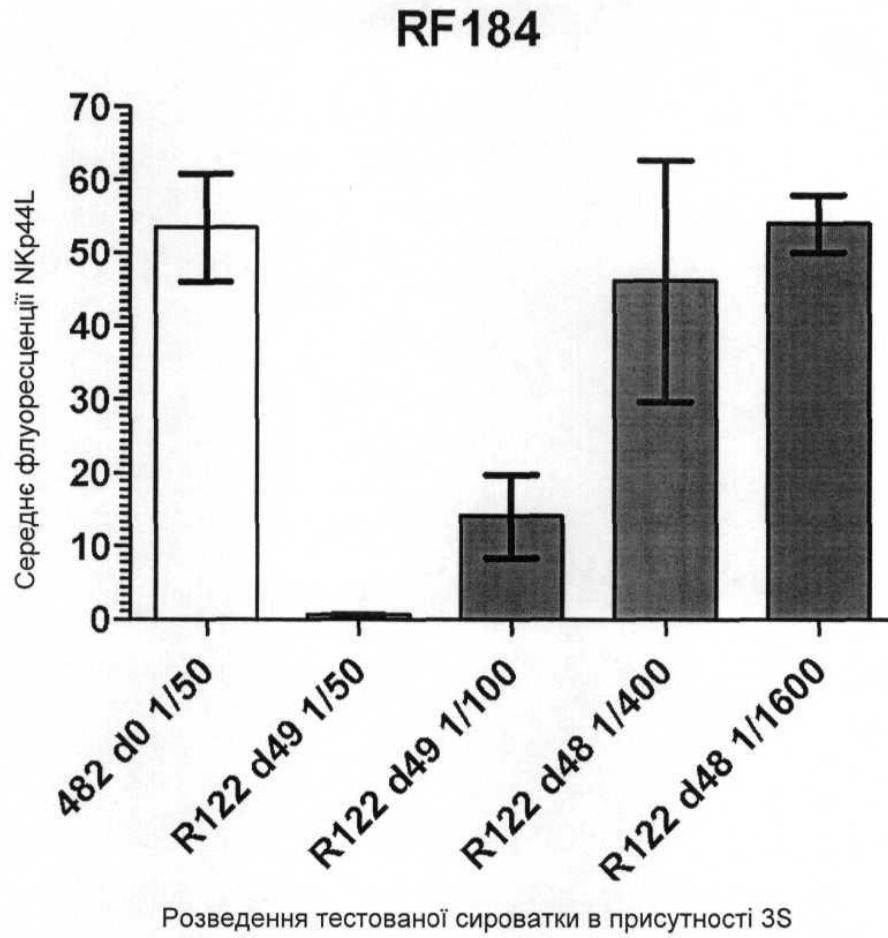
ФІГ. 3



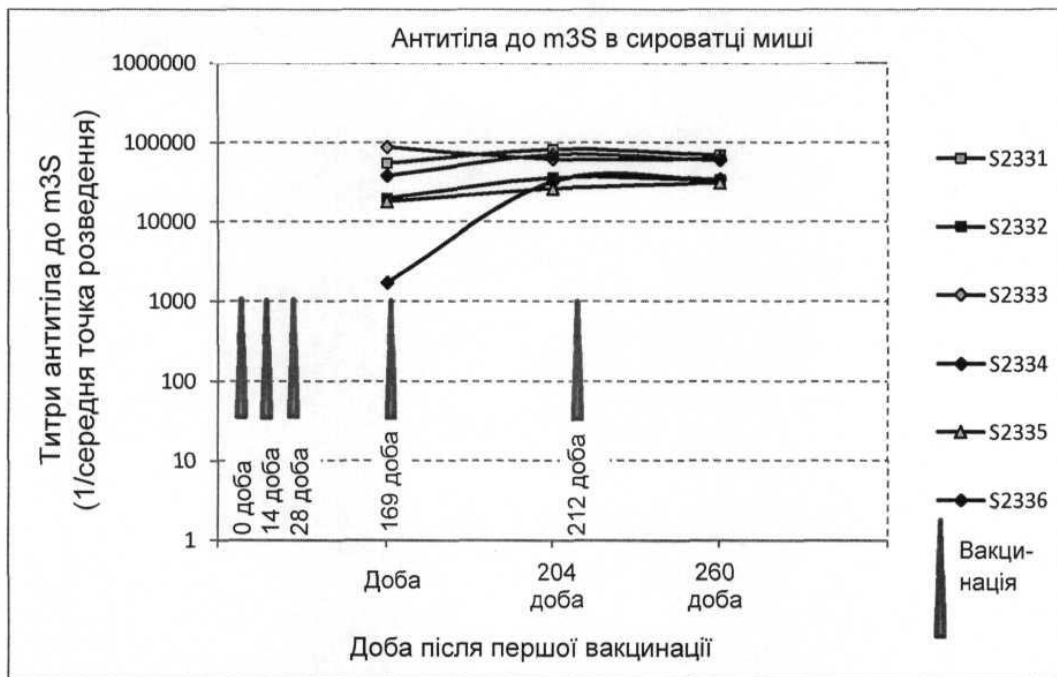
ФІГ. 4

нег. - негативний

поз. - позитивний



ФІГ. 5



ФІГ. 6

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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