



УКРАЇНА

(19) UA (11) 13734 (13) C1

(51)5 A 61 K 39/12

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДМОВСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОГЕНУ, ЯКИЙ СТИМУЛЮЄ ІМУННУ СИСТЕМУ ЛЮДИНИ, ЗАРАЖЕНОЇ HIV

1

(20) 96240071, 28.10.93
(21) 4613460/SU
(22) 08.02.89
(24) 25.04.97
(31) 200752
(32) 31.05.88
(33) US
(86) US 88/01955, 09.06.88
(46) 25.04.97, Бюл. № 2
(72) Джонас Салк (US), Денніс Дж. Карло (US)
(73) Дзе Імьюн Респонс Корпорейшн Інк. (US)
(57) Спосіб отримання імуногену, стимулюючого імунну систему людини, зараженої HIV, що включає в себе, що заражені HIV клітини вирощують в сре-

2

де RPMI 1640 в присутстві ембріональної сироватки великого рогатого скоту, 5-7-денний супернатант фільтрують, к фільтрату додають β -пропіолактон і інкубують в течение 5 ч при 37°C і pH середовища, 7,2-7,4, після чого заморожують, облучають гамма-лучами, разморожують, концентрують, пропускаючи через миллиметрові полісульфонові фільтри, очищають внаслідок центрифугування з 30%-ною сахарозою, потім центрифугуванням в градієнті 30-45%-ною сахарозою, а цільовий продукт отримують ресуспендируванням отриманого осадку в PBS буфері при концентрації 1 мл на 10 л вихідного речовини.

Настоящее изобретение относится к борьбе с ретровирусами, более конкретно к способу получения иммуногена, стимулирующего иммунную систему человека, зараженного HIV.

На дату приоритета данного изобретения патентная и научно-техническая литература не содержит сведений о получении высокоэффективного средства для борьбы с ретровирусами, преимущественно ретровирусом HIV.

Задачей изобретения является создание высокоэффективного средства для борьбы с ретровирусами, преимущественно ретровирусом HIV.

Поставленная задача решается предлагаемым способом получения стимулирующего иммунную систему человека, зараженного HIV, заключающимся в том, что зараженные HIV клетки выращивают в сре-

де RPMI 1640 в присутствии эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 5-7-дневный супернатант фильтруют, к фильтрату добавляют β -пропиолактон и инкубируют в течение 5 часов при 37°C и pH среды 7,2-7,4, после чего замораживают, облучают гамма-лучами, размораживают, концентрируют, пропускают через миллиметровые полисульфоновые фильтры, очищают вначале центрифугированием с 30%-ной сахарозой, затем центрифугированием в градиенте 30-45%-ной сахарозы, а целевой продукт получают ресуспендированием полученного осадка в PBS буфере при концентрации 1 мл на 10 л исходного вещества.

Для пояснения изобретения приводятся фиг. 1-4, причем на фиг. 1 представлена схематическая модель HIV.

Как показано на фиг. 2, геном РНК HIV кодирует три основных структурных гена:

(19) UA (11) 13734 (13) C1

генов *pol* и *env*, которые фланкированы на обоих концах длинными концевыми дупликациями (LTR). Ген *gag* кодирует специфические белки ядра, р55, р39, р24, р17 и р15. Гены *pol* кодируют обратную транскриптазу р65/р51 и протеазу р31. Гены *env* кодируют гликопротеин наружной мембраны *gp120* и его предшественник *gp160*, а также трансмембранный гликопротеин *gp41*. Некоторые из генов являются чрезвычайно вариабельными, в частности, гены *env*. Кроме того, существуют пять других генов, не присутствующих в других ретровирусах, которые либо вовлечены в транскрипционную или трансляционную регуляцию, либо кодируют другие структурные белки. Структура гена HIV известна. Она описана Ратнером и др. *Nature*, 313, стр. 277 (1985).

HIV присоединяется к клеткам хозяина путем взаимодействия мембранных гликопротеинов с поверхностным рецептором клетки. Оказывается, что при контакте HIV с клеткой T4 протеин *gp120* взаимодействует с рецептором CD4. Вирусная оболочка затем сливается с клеточной мембраной и внутреннее ядро вируса входит в зараженную клетку, где транскрипция РНК в вирус ДНК катализируется обратной транскриптазой. Провирус может оставаться в клетке в латентной форме в течение нескольких месяцев или лет, и все это время зараженный индивидуум является бессимптомным. Однако, если вирус позднее активизируется, вызывая вирусную репликацию и иммуносупрессию, индивидуум будет затем восприимчивым к условно-патогенным заражениям, включая рак, ассоциируемым со СПИДом.

На фиг.3 представлено схематическое воспроизведение уровня некоторых антител и антигенов, присутствующих в развитии из бессимптомного состояния до состояния ARC (связанный со СПИДом комплекс) и до СПИДа у HIV - сероположительных пациентов, зараженных HIV.

На фиг.1 представлены результаты анализа по Вестерну иммуногена по примеру 1, которые показывают, что он свободен от белков наружной оболочки при скрининге гомологичными и гетерологичными сыворотками, которые содержат высокие титры антитела против белков наружной оболочки. А: Коммерческие полоски по Вестерну с пятнами HIV в результате скрининга гетерологичными сыворотками шимпанзе; Б: Полоски по Вестерну с пятнами иммуногена в результате скрининга гетерологичными сыворотками шимпанзе; В: Коммерческие полоски с HIV-пятнами по Вестерну в результате скрининга гомологичными сыворотками человека; Г:

Полоски по Вестерну с пятнами иммуногена в результате скрининга гомологичными сыворотками человека.

Как показано схематически на фиг.3, высокие уровни антитела против *gp160/120* (наружная оболочка), которые присутствуют в бессимптомной фазе заражения HIV, также продолжают существовать в симптомной фазе. Уровень антитела *p24* в бессимптомной фазе является высоким, но, по-видимому, снижается в симптомной фазе. Аналогично, HIV-сероположительные сыворотки содержат антитело, которое ингибирует функцию обратной транскриптазы. У пациентов, в которых антитело против обратной транскриптазы присутствует на высоких уровнях, попытки относительно выделения вируса менее часто положительны, нежели у тех, в которых оно отсутствует. Поэтому следует, что уменьшение клеточных и гуморальных иммунозащитных факторов, таких, как T4-клетки и антитела против GAG, включая анти-*p24*, и антитела против *pol*, включая антитело против обратной транскриптазы, связано с развитием HIL до СПИДа.

Используемый в данном описании термин "HIV" включает типы 1 и 2 и является синонимом HTLV-III, LAV-1 и LAV-2. HIV относится к вирусу в общем смысле и включает все формы, подтипы и вариации.

Используемый в данном описании термин "белок наружной оболочки" относится к той части мембранного гликопротеина ретровируса, которая выступает за пределы мембраны, в противоположность трансмембранному белку, *gp41*. Белок наружной оболочки HIV является синонимом *gp120* и его предшественника *gp160*.

Используемый в данном описании термин "*gp120*" или "*gp160/120*" относится к гликопротеинам, имеющим либо антигенную специфичность, либо биологическую функцию белка наружной оболочки: *gp160*, как полагают, является предшественником *gp120*.

Используемый в данном описании термин "генный продукт" относится к полипептиду или белку, который кодируется геном. Термин, как предполагают, включает в себя белковые производные, такие, как гликопротеины. Понятно, что в аминокислотную последовательность генного продукта могут быть внесены ограниченные модификации без нарушения биологической функции или иммуногенности генного продукта, и только часть первичной последовательности может потребоваться для иммуногенности.

Идентификация HIV-специфических генов и генных продуктов основана на терминологии HIV типа 1, представленной на

фиг.1. Предполагается, однако, что ссыла на специфический ген или генный продукт HIV типа 1, на основе его молекулярной массы, будет также включать соответствующий ген или генный продукт HIV типа 2 и, когда присутствует гомологичный ген, другие ретровирусы. Генные продукты других типов и родов могут иметь незначительно отличающиеся молекулярные массы. Например, gp41 HIV типа 1 эквивалентен gp36 типа 2, тогда как gp120 типа 1 соответствует gh130 типа 2.

HIV можно культивировать из пробы периферической крови зараженных индивидуумов. Например, одноклеточные клетки из периферической крови, такие, как лимфоциты, могут быть получены путем наложения пробы гепаринизированной венозной крови по градиенту плотности Ficoll-Нугае и центрифугирование пробы. Одноклеточные клетки затем собирают, активируют, например, фитогемагглютинином, в течение двух-трех дней и культивируют в подходящей среде, предпочтительно заполненной интерлейкином 2. Вирус может быть обнаружен либо анализом на обратную транскриптазу, анализом с захватом антигена для p24, иммунофлуоресценцией, либо электронной микроскопией для обнаружения присутствия вирусных частиц в клетках. Все эти методы хорошо известны специалистам в данной области. После выделения вирус может быть включен в другие клетки.

Важно использовать неинфекционную вакцину с тем, чтобы избежать проникновения инфекции в хозяина. Различные методы хорошо известны для придания болезнетворному организму неинфекционности. Вирус можно инактивировать или сделать репликационно-недостаточным. Предпочтительно, однако, обрабатывать его комбинацией бета-пропиолактона и гамма-излучения. При этом β -пропиолактон должен находиться в контакте с вирусом, как минимум, 2,5 ч. С тем, чтобы полностью удалить какой-либо остаточный бета-пропиолактон, бета-пропиолактон должен оставаться в растворе в течение, как минимум, пяти часов при температуре 37°C.

Выделенный вирус затем обрабатывают так, чтобы удалить белки наружной оболочки. Таков удаление предпочтительно осуществляют неоднократными замораживанием и оттаиванием вируса в сочетании с физическими методами, которые вызывают набухание и сокращение вирусных частиц, хотя также можно использовать другие физические и нефизические методы, такие, как разрушение ультразвуком, в отдельности или в сочетании друг с другом.

Для иммунизации человека или животного получаемый предлагаемым способом иммуноген применяется вместе со вспомогательными веществами. Но он может также применяться в своей водной форме без вспомогательного вещества. При этом дозу выбирают так, чтобы она была иммунологически эффективной, и она, как правило, составляет от 1 до 100 мкг белка, предпочтительно, около 30 мкг белка.

Активную иммунизацию осуществляют и, предпочтительно, повторяют раз с минимальным интервалом, по меньшей мере, 90 дней, хотя дополнительные ревакцинации могут подходить в соответствии с изменениями в уровне иммунной активности на основе, например, уменьшения количества антител против HIV-генным продуктом, другим, нежели белки наружной оболочки. Такую иммунизацию предпочтительно осуществляют первоначально путем внутримышечной инъекции с последующей внутрикожной инъекцией, хотя может быть использована любая комбинация внутрикожной и внутримышечной инъекции.

Предпочтительно, иммунокомпетентность или иммунную активность серологического индивидуума определяют перед иммунизацией с тем, чтобы определить подходящий путь лечения. В качестве метода такого определения сыворотки пациентов подвергают скринингу на присутствие антител против p24 (например, при помощи иммуноферментного твердофазного анализа), антитела против обратной транскриптазы и/или уровня клеток T4 при помощи хорошо известных методов. Пациенты, проявляющие индикаторы низкой иммунокомпетентности, например, низкие титры p24 или антитела против обратной транскриптазы или низкие количества клеток T4, являются подходящими кандидатами для пассивной иммунотерапии, предпочтительно, в сочетании (проводимой перед или совместно) с активной иммунизацией.

Серонегативные индивидуумы могут быть вакцинированы с тем, чтобы вызвать иммунозащитные факторы для предотвращения инфекции. Предпочтительно, вакцину вводят первоначально путем внутримышечной инъекции с последующим введением бустера, осуществляемым либо внутримышечно, либо внутрикожно. Физиологически эффективная доза содержит предпочтительно от 1 до 100 мкг, от 1 до 100 мкг, и более предпочтительно, около 30 мкг иммуногена. Вакцину предпочтительно вводят в сочетании с адъювантом, т.е. вспомогательным веществом, наиболее предпочтительно, адъювантом для обеспечения

получения препарата типа "вода в масле". Различные подходящие адъюванты хорошо известны в данной области.

Кроме того, поскольку антитела против gp 160/120 могут содействовать вирусной абсорбции клетками, эти специфические антитела могут быть удалены из пациента, зараженного HIV, перед иммунотерапией. Иммуносорбентные колонки, выполненные из полых целлюлозных волокон, модифицируют с тем, чтобы ковалентно связать лиганды, реакционноспособные с антителами против gp 160/120. Такие лиганды включают антигены gp 160/120, полученные из очищенных гликопротеинов, которые в свою очередь получены из только что собранных вирусных частиц или из культурального супернатанта HIV-продуцирующих T4-лимфоцитов. Альтернативно, такие лиганды могут быть получены методами рекомбинантной ДНК с использованием трансфицированных клеток. Альтернативно, идиотипы, реакционноспособные с антителами против gp 160/120 могут быть использованы для этих целей.

Такие антиидиотипные антитела могут быть получены методами, хорошо известными в данной области.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Получение вирусных частиц, свободных от белков наружной оболочки.

Клетки, зараженные штаммом HIV No. Hz 321 (выделившимся из плазмы 26-летней африканской женщины из Заира) выращивают в среде А, состоящей из RPMI 1640 с 10%-ной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 25 мМ буфера HEPES, 50 мкг/мл гентамицина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Культуры увеличивают в объеме путем подачи исходных клеток в центрифужные пробирки и доведения объема приблизительно до 8 л добавкой предварительно нагретой среды А. При этом степень разведения составляет приблизительно 1:5. Затем осуществляют второе разведение в соотношении 1:3. Супернатант от 5-7-дневной суспензии HIV-зараженных клеток фильтруют через фильтр размером 0,45 мкм. Свежеприготовленный раствор 1:40 бета-пропиолактона прибавляют к супернатанту до конечной концентрации 1:4000. Раствор инкубируют в течение 5 ч при температуре 37°C и pH поддерживают на уровне 7,2-7,4.

Через 5 ч 20 мл раствора супернатанта удаляют с тем, чтобы определить уровень инфективности и количество оставшегося бета-пропиолактона. Затем супернатант за-

мораживают при температуре -70°C. Замороженный супернатант затем подвергают гамма-облучению кобальтом⁶⁰ мощностью 45 мР.

5 Раствор супернатанта затем оттаивают и концентрируют путем 40-кратной фильтрации через выполненные с молярной массой 100 000 фильтры. Концентрат подают в снабженные мешалкой колбы Т-21, предварительно обработанные 70%-ным изопропанолом, и центрифугируют при 28000 об/мин в течение часа. Супернатант удаляют и осадок повторно суспендируют в содержащем ЭТУК натриевом буфере до общего конечного объема приблизительно 24 15 мл. 4 мл этой суспензии расслаивают над 8 мл 30%-ной сахарозы в полиалломерных пробирках, предварительно обработанных 70%-ным изопропанолом, и центрифугируют в течение одного часа при 28000 об/мин. 20 Супернатант сливают из 30%-ной сахарозы и осадок ресуспенсируют в указанном натриевом буфере.

Градиент в ультрасветлых центрифужных пробирках, предварительно обработанных 70%-ным изопропанолом, устанавливают путем прибавления 3 мл 45%-й сахарозы в пробирку и наложения сверху 6 мл 30%-й сахарозы. 3 мл вышеописанной суспензии наслаивают на раствор. 30 Пробирки центрифугируют в течение 60 мин при 28000 об/мин.

Раствор над слоями при 35%-м переходе отсасывают пипеткой и сливают. Слои из всех пробирок соединяют в одной конической пробирке и разбавляют в соотношении 1:10 фосфатсодержащим буферным солевым раствором. Раствор центрифугируют в полиалломерных пробирках, предварительно обработанных 70%-ным изопропанолом, в течение 1 ч при 28000 об/мин. Супернатант удаляют и осадки в пробирках ресуспенсируют в указанном фосфатсодержащем буферном растворе при концентрации 1 мл 40 на 10 л исходного вещества.

Альтернативно, особенно, когда иммуноген получают в больших количествах, стадию облучения можно осуществлять после объединения слоев. Затем вирус расслаивают на градиенте 15-50%-й сахарозы. Вирусные слои объединяют и ресуспенсируют в вышеуказанном фосфатсодержащем буферном растворе. Вирус центрифугируют при 28000 об/мин в течение 1 ч и ресуспенсируют в упомянутом буферном растворе до конечной концентрации, равной 1,0 мг/мл. 55

Количество имеющегося белка определяют в соответствии с методом Бредфорда (см. Anal. Biochem. 72 стр. 248, 1976 г).

Белок разбавляют вышеуказанным фосфатсодержащим буферным раствором до концентрации, равной 1,0 мг/мл.

Уровень остаточного бета-пропиолактона в иммуногене определяют с использованием капиллярного газо-жидкостного хроматографа. При этом готовят стандартные растворы бета-пропиолактона и масляной кислоты, имеющие концентрации между 1 и 500 частями на миллион. Пробу объемом 2 мкл вводят в капиллярный хроматограф в соответствии с рекомендацией изготовителя. Предел обнаружения составляет 0,1 ч/милл. Иммуноген содержит менее, чем 0,05 ч/милл, бета-пропиолактона.

Восемь проб иммуногена анализируют на содержание бета-пропиолактона капиллярной газовой хроматографией, используя масляную кислоту в качестве внутреннего стандарта. Используют следующие хроматографические условия: колонка: 30 м x 0,25 мм, кварцевое стекло, открытая, трубчатая; стационарная фаза: 100%-ный цианопропил-кремний; температура ввода пробы 140°C; рабочая температура: 70° С/1 мин, 20° С/мин до 130°C; методика ввода пробы: нерасщепляющая. При вышеприведенных условиях время удерживания бета-пропиолактона и масляной кислоты соответствует 7,52 мин и 6,70 мин, соответственно. Ввод 2 мкл 1 ч/милл, раствора бета-пропиолактона приводит к получению пика, который может быть измерен количественно. Концентрация 1 ч/милл раствора до 1/10 его объема упариванием растворителя при температуре 40°C при пониженном давлении не приводит к ощутимой потере бета-пропиолактона. Предел обнаружения после концентрации составляет 0,1 ч/милл./0,1 мкг/мл.

С тем, чтобы подтвердить то, что иммуноген свободен от белков наружной оболочки, иммуноген вначале разделяют на 11,0%-ных полиариламидных гелях с применением додецилсульфата натрия в соответствии со способом Лэммли, см. Nature 227, стр. 680, 1970 г). Очищенный материал затем переносят на нитроцеллюлозную бумагу в соответствии с методом, предложенным Таубином и др. (см. Proc. Nature. Acad. Sci., 76, стр. 4350, 1979 г.) и иммуноокрашивают в соответствии с методом, предложенным Цанг и др. (см. Meth. Enzymology, 92, стр. 377, 1983 г.). Как можно видеть на фиг.4, пятна полученного таким образом иммуногена не имеют полосу, соответствующую гр 120/160, как указано в контрольных испытаниях, при взаимодействии с сыворотками, содержащими высокие титры анти-гр 160/120.

Как показано на фиг.4, коммерческие полоски с имеющимися на них белками HIV подвергнутые скринингу с гетерологичной сывороткой (шимпанзе A86-C и A-3) и содержащие высокие титры антител против белков наружной оболочки, гр 160/120 являются негативными (нереакционноспособными) на полосках, полученных при анализе полученного вышеописанным образом иммуногена, свободного от наружной оболочки. Гомологические человеческие сыворотки (003 и 010), содержащие высоко-титры антител против белков наружной оболочки, гр 160/120, являются реакционноспособными с коммерческими полосками но негативными с полосками, полученными из иммуногена, свободного от наружной оболочки. Как гомологические, так и гетерологические сыворотки вступают во взаимодействие с другими генными продуктами HIV.

Отсутствие белков наружной оболочки на предлагаемом иммуногене подтверждают электронной микроскопией. К иммуногенному препарату последовательно добавляют 2,5%-ный глутаральдегид и осмиевый ангидрид, дегидратируют с помощью растворов этанола разных концентраций и заливают в EPON-812. Тонкие шлифы получают с помощью прибора LKB Microtome (фирма LKB, Упсала, Швеция) с использованием алмазного скальпеля. Толщина шлифов составляет 60 нм. Шлифы окрашивают уранилацетатом и лимоннокислым свинцом, наблюдают и фотографируют с использованием электронного микроскопа марки Цейс 109. Служащие в качестве контроля клетки, зараженные HIV, готовят с использованием той же методики. При этом обнаруживают, что иммуноген не имеет темно-окрашенную наружную оболочку, которая присуща контрольным пробам и которая отражает гр 160/120 на вирусной поверхности.

Пример 2. Иммуноterapia сероположительных индивидуумов.

Девять пациентов, сероположительных к HIV, лечат иммунотерапией при даче иммуногена по примеру 1. При этом иммуноген эмульгируют в соотношении 1:1 в неполном адьюванте Фройнда в эмульсификаторе марки Spex 8000 Mixer Mill инофирмы Спекс Индастриз Инк., США. 1,0 мл раствора, содержащего 100 мкг белка, вводят внутримышечно. Бустер 100 мкг белка без адьюванта вводят через 90 дней путем внутривенной инъекции.

Присутствие вируса HIV в лимфоцитах периферической крови пациентов определяют как до, так и после иммунизации путем

сокультивирования вместе со свежеприготовленными лимфоцитами периферической крови, стимулированными фитогемагглютинином и интерлекином-2 в соответствии с методом Галло и др. (см J Clin Microb, 25, стр. 1291, 1987 г.) Оборудование для обнаружения присутствия антигенов HIV, таких, как p24, коммерчески доступно (например, от иофирмы Е И. Дю-Пон энд Де-Немурс Ко., Инк, США). Каждого пациента обследуют три раза перед иммунизацией и через 2,4,6,8,12 и 14 недель после иммунизации.

В следующей таблице представлены результаты исследований. Пациенты 010 и 003,

из которых HIV выделен перед иммунизацией, не проявляют выделяемый вирус вплоть до 12 недели после иммунизации. Пациенты 008 и 009 не являются переносчиками вируса вплоть до 8 недели после иммунизации. Все четыре этих пациента проявляют высокие титры анти-p24 (>1:5000) и антитела против обратной транскриптазы (>1:1000) перед иммунизацией. Остальные пять пациентов, которые проявляют низкие титры анти-p24 и антитела против обратной транскриптазы перед иммунизацией, продолжают проявлять выделяемый вирус после иммунизации.

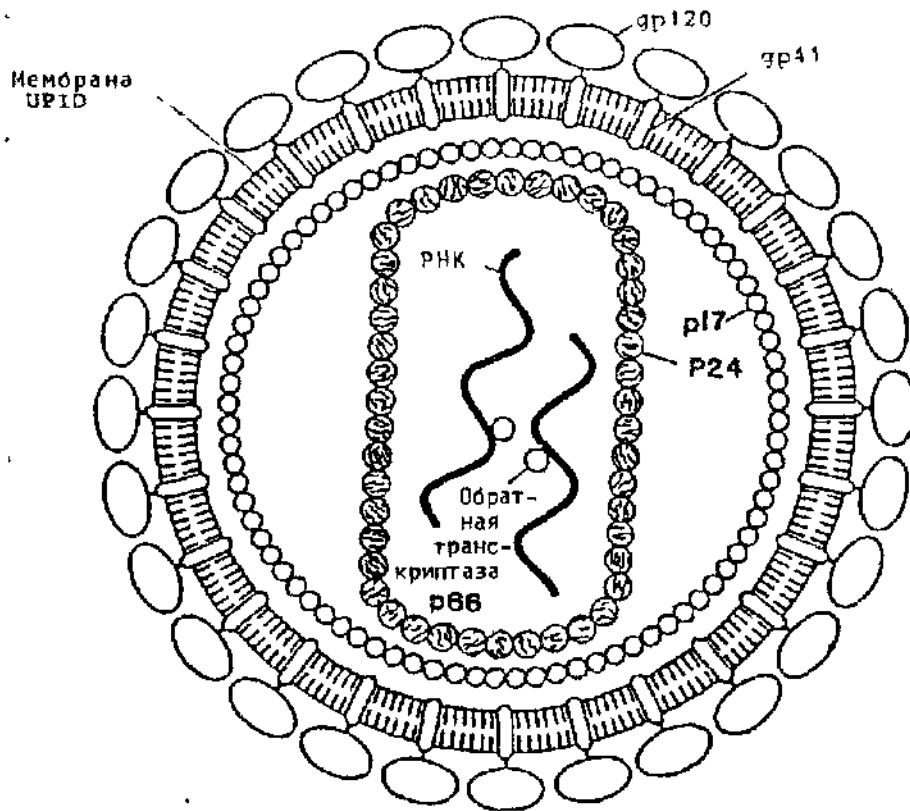
15

Иммунологические и вирусологические профили у сероположительных к HIV пациентов перед и после иммунизации

Пациент	Цитологический анализ		Иммунологический анализ			Вирусологический анализ					
	T-4		Анти-p24	АОТ ¹⁾	НА ²⁾	Перед	После (недели)				
	Перед	После					2	4	6	8	12
003	518	671	250000	2560	40	+ - -	-	-	-	-	-
010	229	297	500000	10240	80	+ - +	-	-	-	-	-
008	288	371	16000	2560	80	- + -	-	-	-	-	+
009	219	261	8000	2560	80	- + -	-	-	-	-	+
001	296	280	3200	640	40	+ - ++	+	+	-	-	+
004	237	198	3200	20	40	+ + +	-	-	+	-	+
007	261	277	400	20	20	- - +	+	-	-	+	+
005	180	259	200	80	10	+ + +	+	+	-	+	+
	228	98	170	20	14	- - ++	+	+	+	+	+

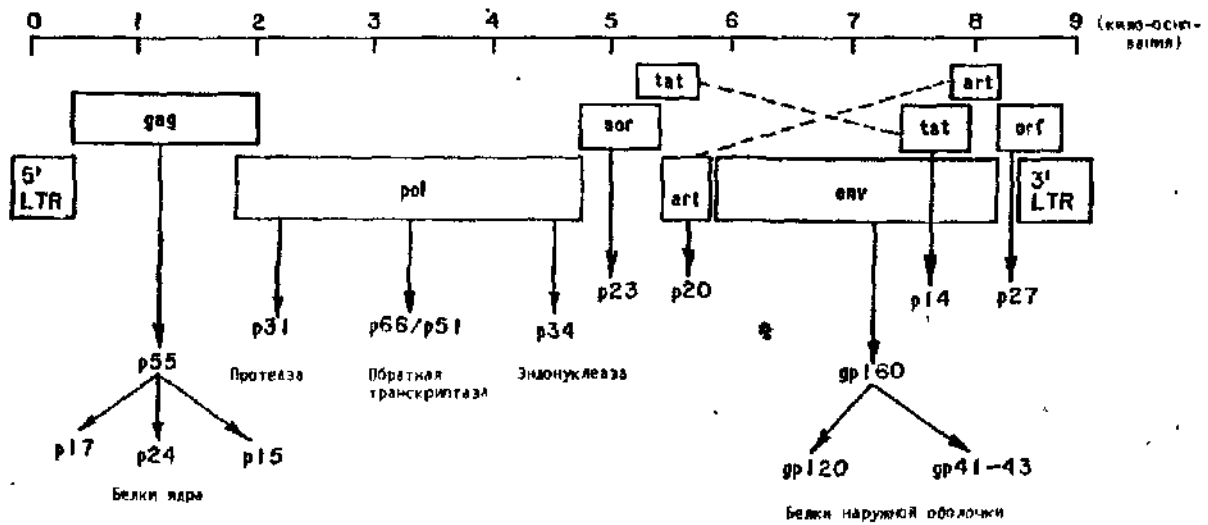
¹⁾ Антитело против обратной транскриптазы

²⁾ Нейтрализующее антитело.

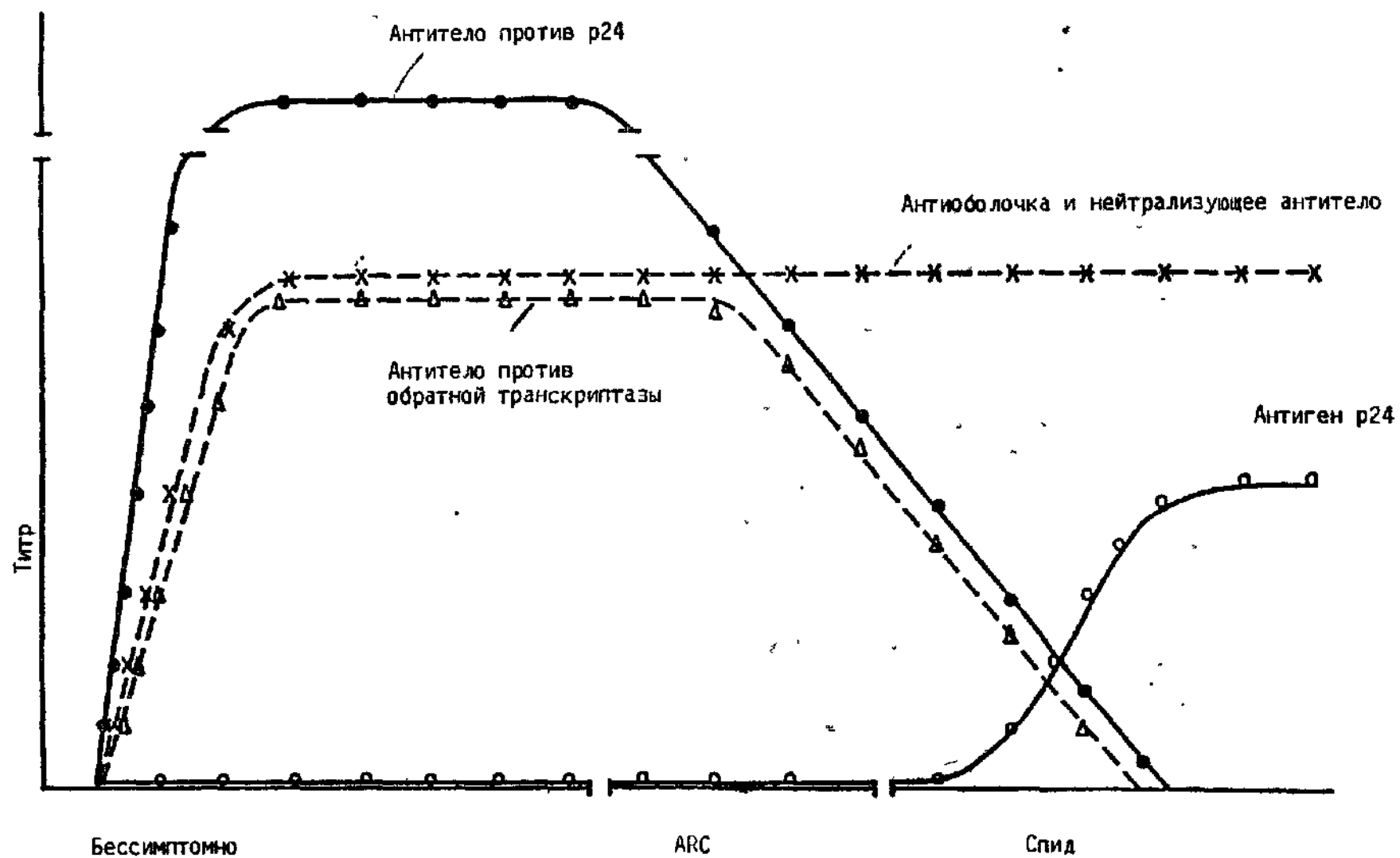


Фиг. 1

Геном HIV



Фиг. 2



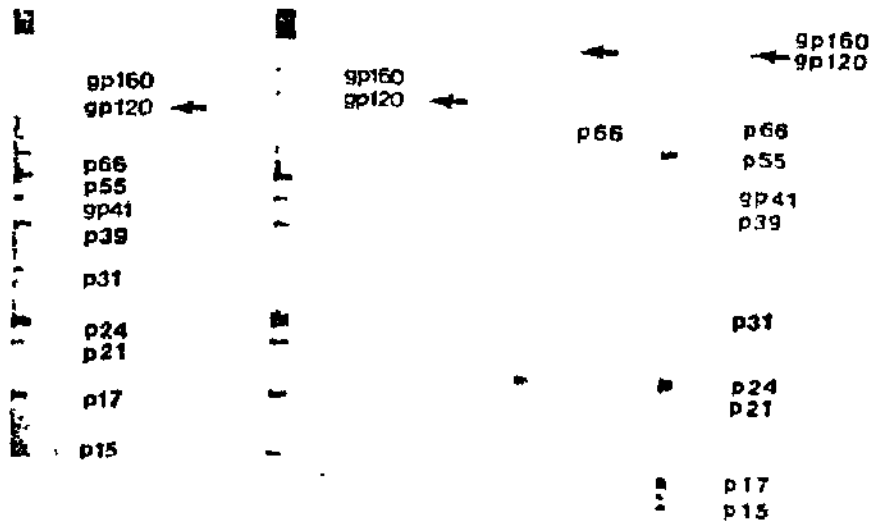
13734

Фиг. 3

A
A86-CB
A-3

B

Г

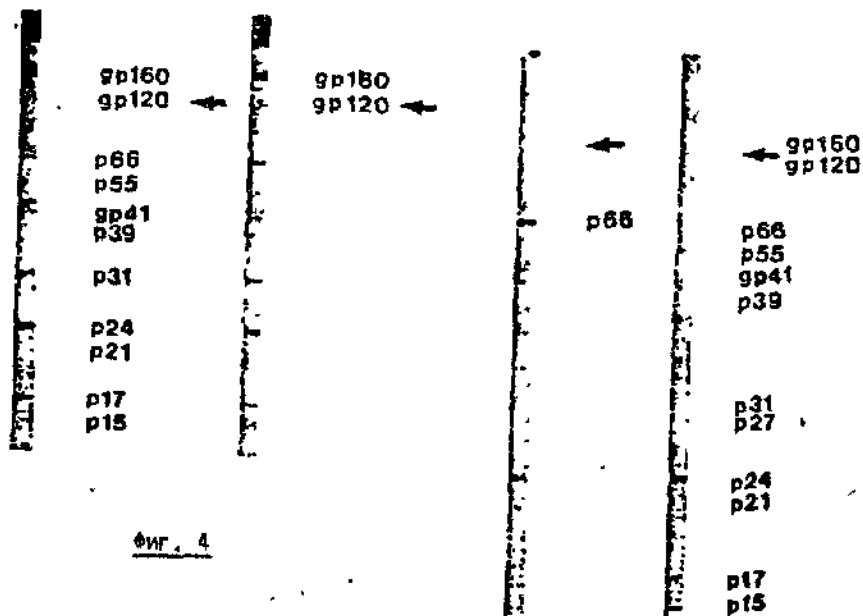


003

010

003

010



Фиг. 4

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор М. Керецман

Замовлення 4121

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна 101

