



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 87269

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 39/39

A61K 9/133

A61K 39/002

A61K 39/02

A61K 39/12

A61K 39/125

A61P 31/12 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ФУНКЦІОНАЛЬНО ВІДНОВЛЕНІ ВІРУСНІ МЕМБРАНИ, ЩО МІСТЯТЬ АД'ЮВАНТ, СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ВІДНОВЛЕНОЇ ВІРУСНОЇ МЕМБРАНИ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЯКА МІСТИТЬ ВІДНОВЛЕНУ ВІРУСНУ МЕМБРАНУ

1

2

(21) a200512191

(22) 18.06.2004

(24) 10.07.2009

(86) PCT/NL2004/000437, 18.06.2004

(31) PCT/NL03/00450

(32) 19.06.2003

(33) NL

(46) 10.07.2009, Бюл.№ 13, 2009 р.

(72) СТЕГМАНН АНТОНІУС ЙОХАННЕС ХЕНДРІКУС, NL, ВІЛСХУТ ЯН КРІСТІАН, NL, ВАН БЕРКУМ ЙОХАННЕС ХЕНРІКУС ГЕРАРДУС, NL

(73) БЕСТЕВІЛ ХОЛДІНГ Б.В., NL

(56) DIJKSTRA J ET AL: "ACTIVATION OF MURINE LYMPHOCYTES BY LIPOPOLYSACCHARIDE INCORPORATED IN FUSOGENIC, RECONSTITUTED INFLUENZA VIRUS ENVELOPES (VIROSOMES)" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 157, no. 3, 1 August 1996 (1996-08-01), pages 1028-1036.

BRON R ET AL: "PREPARATION, PROPERTIES, AND APPLICATIONS OF RECONSTITUTED INFLUENZA VIRUS ENVELOPES (VIROSOMES)" METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US, vol. 220, 1993, pages 313-331.

COMPAGNON B ET AL: "TARGETING OF POLY(RL)-POLY(RC) BY FUSOGENIC (F PROTEIN) IMMUNOLIPOSOMES" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, SAN DIEGO, CA, US, vol. 200, no. 2, June 1992 (1992-06), pages 333-338.

MENGIARDI B ET AL: "Virosomes as carriers for combined vaccines" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 13, no. 14, 1 October 1995 (1995-10-01), pages 1306-1315.

FERNANDES ISABELLE ET AL: "Synthetic lipopeptides incorporated in liposomes: In vitro stimulation of the proliferation of murine splenocytes

and in vivo induction of an immune response against a peptide antigen" MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 34, no. 8-9, June 1997 (1997-06), pages 569-576.

STEGMANN T ET AL: "FUNCTIONAL RECONSTITUTION OF INFLUENZA VIRUS ENVELOPES" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 6, no. 9, 1987, pages 2651-2660.

WO A 9219267, 12.11.1992.

(57) 1. Відновлена вірусна мембрана, подвійний ліпідний шар якої містить злитий вірусний протеїн, амфифільний ад'ювант і необов'язково додатковий антиген, яка **відрізняється** тим, що (а) подвійний ліпідний шар має композицію ліпідів, сумісну із індукованим злитим протеїном злиттям вірусної мембрани із клітинною мембраною, яка може зливатися з вірусом, з якого отриманий такий злитий протеїн; (b) злитий протеїн і амфифільний ад'ювант взаємодіють із гідрофобною внутрішньою частиною подвійного ліпідного шару, і (c) злитий протеїн, амфифільний ад'ювант і необов'язковий додатковий антиген не є ковалентно зв'язаними.

2. Відновлена вірусна мембрана за п. 1, в якій ліпідний подвійний шар містить природні ліпіди вірусної мембрани.

3. Відновлена вірусна мембрана за пп. 1 або 2, в якій амфифільним ад'ювантом є ліпопептид, гліколіпід або пептид.

4. Відновлена вірусна мембрана за будь-яким з пп. 1-3, в якій амфифільним ад'ювантом є ліганд для Toll-подібного рецептора ссавця.

5. Відновлена вірусна мембрана за п. 3, в якій ліпопептид вибраний з групи, яка включає N-пальмітоїл-S-2,3-(біспальмітоїлокси)-пропілцистеїнілсерилсерин, S-2,3-(біспальмітоїлокси)-пропілцистеїнілсерилсерин, N-пальмітоїл-S-2,3-(біспальмітоїлокси)-пропілцистеїнілсерил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, S-2,3-

(13) C2

(11) 87269

(19) UA

(біспальмітоїлокси)-пропілцистеїнілсерил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, N-пальмітоїл-S-2,3-(бісолеоїлокси)-пропілцистеїнілсерил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, S-2,3-(бісолеоїлокси)-пропілцистеїнілсерилсерин-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, N-пальмітоїл-S-2,3-(бісміристоїлокси)-пропілцистеїнілсерил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, S-2,3-(бісміристоїлокси)-пропілцистеїнілсерил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, N-пальмітоїл-S-3-(пальмітоїлокси)-пропілцистеїнілсерил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин і N-пальмітоїл-S-2,3-гідроксипропілцистеїнілсерил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, N-пальмітоїл-S-2,3-(біспальмітоїлокси)-пропілцистеїнілсерил-(пропіл)<sub>3</sub>-пролін, N-пальмітоїл-S-2,3-(біспальмітоїлокси)-пропілцистеїнілсерил-(глютамініл)<sub>3</sub>-глютамінову кислоту.

6. Відновлена вірусна мембрана за п. 3, в якій гліколіпідом є фосфатидінозитолманнозид, альфа-галактозилкерамід або модифікований ліпополісахарид із зниженою токсичністю.

7. Відновлена вірусна мембрана за будь-яким з пп. 1-6, в якій антиген є внутрішнім мембранним протеїном.

8. Відновлена вірусна мембрана за будь-яким із пп. 1-7, в якій антиген є вірусним антигеном.

9. Відновлена вірусна мембрана за п. 8, в якій антиген є похідним із вірусу грипу.

10. Відновлена вірусна мембрана за п. 9, в якій антиген є гемагглютиніном (НА), нейрамінідазою (НА) або протеїном М2.

11. Відновлена вірусна мембрана за п. 8, в якій антиген одержаний із вірусу, вибраного з групи, яка включає ретровіруси (Retroviridae), краснуха, параміксовіруси, віруси Flaviviridae, віруси герпесу, буньявірусів (Bunyaviridae), Arenaviridae,

Hantaviridae, коронавіруси (Coronaviridae), паповавіруси (Papovaviridae), рабдовіруси (Rhabdoviridae), Coronaviridae, Alphaviridae, Arteriviridae, Filoviridae, Arenaviridae, Poxviridae і вірус африканської чуми свиней.

12. Відновлена вірусна мембрана за будь-яким із пп. 1-7, в якій антиген отриманий від паразита, бактерії, гриба, дріжджів або такий антиген є пухлино-специфічним антигеном.

13. Спосіб одержання відновленої вірусної мембрани, який включає: (а) змішування амфифільного ад'юванта, вірусного злитого протеїну, необов'язкового додаткового антигену і ліпідів у розчині, який містить детергент; (b) зменшення концентрації детергента за умов, які забезпечують відновлення вірусної мембрани, яка містить подвійний ліпідний шар, в якому амфифільний ад'ювант і вірусний злитий протеїн взаємодіють з гідрофобною внутрішньою зоною подвійного ліпідного шару, при цьому амфифільний ад'ювант і вірусний злитий протеїн переважно не є ковалентно зв'язаними, також при цьому переважно амфифільний ад'ювант і необов'язковий додатковий антиген не є ковалентно зв'язаними, і при цьому відновлена вірусна мембрана має здатність до злиття; (с) необов'язкове очищення відновленої вірусної мембрани; і (d) необов'язкове включення відновленої вірусної мембрани до складу фармацевтичної композиції.

14. Фармацевтична композиція, яка містить відновлену вірусну мембрану за будь-яким з пп. 1-12 і фармацевтично прийнятний носій.

15. Фармацевтична композиція за п. 14, яка є придатною для інтраназального, перорального або парентерального призначення.

Винахід стосується вакцин проти антигенів, таких як мембранні протеїни із патогенних організмів або пухлинних клітин. Також винахід стосується способів одержання відновлених вірусних мембран, які мають здатність до злиття, і які представляють собою ліпідні двошарові мембрани, що містять природні вірусні ліпіди, амфифільні антигени, а також амфифільні ад'юванти, та фармацевтичних композицій, які містять такі відновлені вірусні мембрани.

Традиційно вакцини проти оболонкових вірусів містять мертві або живі ослаблені віруси або представляють собою препарати на основі їх складників (наприклад, препарати на основі зруйнованого (розщепленого) вірусу або субодиночній вакцини). При вакцинації такі препарати зазвичай призначаються у вигляді ін'єкцій. Після ін'єкції віруси або протеїни, які містяться у таких вакцинах, захоплюються антиген-презентуючими клітинами імунної системи, такими як деревовидні клітини або макрофаги, після чого антигенні частини вакцин вступають у контакт з клітинами-ефекторами імунної системи. Призначення у вигляді ін'єкції є ефективним завдяки тому, що антиген-презентуючі клітини найбільш чисельні саме під шкірою. Проте, на сьогодні відомо, що подібні клі-

тини також присутні у слизовій оболонці, яка, наприклад, покриває ніс [Ogra et al. 2001]. Для того, щоб стимулювати присутні у слизовій оболонці фагоцити до викликання імунної відповіді, потрібне значно сильніше стимулювання, ніж щодо фагоцитів, які присутні під шкірою [Janeway et al. 2001].

Тоді як ін'єкційне призначення деяких вірусів або протеїнів, що містяться у вакцинах, наприклад вірусу грипу або кіру, викликає імунну відповідь, достатньо сильну для захисту від майбутнього зараження цим самим вірусом, цього не можна сказати про багато інших вірусів, наприклад про респіраторно-синцитіальний вірус (РСВ). Здійснювався ряд спроб посилити імунну відповідь з допомогою фізичних або хімічних засобів. Найважливіші принципи, які проявилися у ході таких експериментів - це: (1) для фізичного стимулювання необхідно об'єднувати множину копій вірусних протеїнів у частинках. Такі частинки можуть складатися з цілих вірусів, відновлених вірусних мембран або протеїнів на мікрочастинкових носіях. Частинки стимулюють імунну систему краще, ніж окремі субодиночці [Ogra et al. 2001; Janeway et al. 2001]. (2) З іншого боку, хімічне стимулювання вимагає, щоб фагоцити або клітини-ефектори імунної системи отримували певні сигнали через ре-

цептори, присутні на поверхні антиген-презентуючих клітин, наприклад завдяки використанню ад'ювантів, хімічних сполук, які розпізнаються цими рецепторами.

При достатньому додатковому фізико-хімічному стимулюванні вірусні протеїни можуть викликати сильну імунну відповідь навіть у випадку їх призначення у мембрани слизової оболонки, наприклад при їх призначення у ніс [Ogra et al. 2001]. Більшість сучасних методів і композицій для стимулювання імунної відповіді у такий спосіб, чи то хімічними, чи то фізичними засобами або їх комбінацією, мають суттєві недоліки, на які буде вказано далі.

Окремий вид вакцинних композицій, який був розроблений у цій галузі, відомий як «віросоми». Вони представляють собою подвійні ліпідні шари, що містять вірусні глікопротеїни. Віросоми можуть містити відновлені вірусні мембрани, які, як правило, отримуються екстракцією мембранних протеїнів і ліпідів з оболонкових вірусів з допомогою детергента з наступним додаванням ліпідів і видаленням такого детергента із екстрагованих вірусних мембранних протеїнів та ліпідів, завдяки чому отримують характерні подвійні шари ліпідів, з яких проступають протеїни [Stegmann et al. 1987]. Віросоми також можуть містити мембрани, отримані з очищених вірусних протеїнів і синтезованих або природних ліпідів, або інших сполук, які утворюють подвійні шари. Характерною ознакою віросом є те, що вони безпосередньо відтворюють склад, структуру поверхні і функціональну активність природної вірусної оболонки. Особливо важливою характеристикою таких віросом є збереження здатності до зв'язування з рецепторами і злиття мембран, яка властива природній вірусній оболонці, що дозволяє віросомам проникати у ті ж самі клітини, в які може проникати вірус та бути представленими імунній системі тими ж самими клітинами. Збереження здатності зв'язування з рецепторами та до злиття мембран є суттєвим для експресування повного спектру імуногенних властивостей таких віросом [Arkema 2000; Bungener 2002].

Щодо деяких вірусних антигенів віросоми викликають захисні імунні відповіді, які можуть бути сильними, навіть якщо вакцина, наприклад, призначається інтраназально [як описано в міжнародних заявках WO 88/08718 і WO 92/19267]. Проте, інші віросомні композиції демонструють лише частково покращену імуногенність порівняно з препаратами на основі мертвих вірусів або субодиниць [як описано у Glück та ін. 1994]. У цьому прикладі віросоми генерували через протокол, який включає додавання екзогенних ліпідів, що, як ми виявили, зумовлює отримання композиції віросом та структуру поверхні, відмінну від властивих для природної вірусної оболонки. Фахівцю у цій галузі відомо, що така відмінна структура поверхні може позначитися на властивостях злиття мембран у одержаних віросом, а отже на їх імуногенності.

Для посилення імунної відповіді, яка б дозволяла інтраназальне призначення такої вакцини, ад'ювантний протеїн із *Escherichia coli* (термолабільний токсин) змішували з ліпід-вмісною віросомною вакциною грипу [EP 0538437]. Клінічні випро-

бування показали, що додавання такого токсину було абсолютно необхідним для індукування титрів сироваткових антитіл, еквівалентних вакцині, призначеній ін'єкційним шляхом [Gluck et al. 1994]. Хоча додавання токсину таким чином посилювало імуногенність вакцини, воно також викликало серйозний побічний ефект, відомий як параліч Белла, тимчасовий периферійний параліч лицьового нерва. Так як ад'ювантний ефект такого токсину є наслідком розпізнавання антиген-презентуючими клітинами, у цьому випадку не можна бути впевненим у тому, що цей токсин і вірусний протеїн вступатимуть у взаємодію з тією ж самою клітиною, а отже, потрібна буде доволі висока концентрація токсину для забезпечення активації кожної клітини, що підвищує шанси розпізнавання антигенів активованою клітиною. Відповідно, цей вид віросомного препарату з доданими до нього ліпідами має цілий ряд недоліків.

Віросоми також одержували з очищених антигенів грипу, які змішували з похідними мураміддипептиду [EP 0205098 і EP 0487909]. У цьому випадку похідна мураміддипептиду утворює мембрану. Хоча мураміддипептид є ад'ювантом, і композиція справді посилювала імунну відповідь на антигени грипу, мураміддипептиди є пірогенними [Kotani та ін., 1976; Dinarello та ін., 1978], швидко виводяться з організму після ін'єкційного призначення і є місцеві токсичними, що викликає гранульоми і запалення [Ribi та ін., 1979; Kohashi et al., 1980]. Більше того, вони мають короткий строк зберігання при нейтральному pH [Powell та ін., 1988], а оптимальний рівень pH для підтримання їх структурної цілісності є надто низьким для того, щоб вони могли включатися до складу вакцини разом із злитими протеїнами вірусів, які проникають у клітини шляхом рецептор-опосередкованого ендоцитозу, такі як гемагглютинін вірусу грипу. Більше того, такі синтетичні мембрани не є достатньо хорошою імітацією природної вірусної мембрани, а отже імунна відповідь на них буде відрізнятися від відповіді, яка викликається вірусом.

В якості альтернативи дослідники у цій галузі також генерували комплексні антигени, відмінні від відновлених вірусних мембран, такі як «Імуностимулюючі Комплекси» [ISCOMs, Morein та ін. 1984], які містять вірусні протеїни, що входять у комплекси з ад'ювантами, такими як сапоніни, подібні до Quil A® [EP 0231039B1; EP 0109942A1; EP0180564A1], більшість з яких виділяється із кори *Quillaia saponaria* Molina. У суміші з антигеном і ліпідами, такими як холестерин, ці ад'юванти утворюють кліткоподібні структури розміром 30-40нм, утворюючи антигенну частинку, при цьому водночас діючи як ад'ювант. Хоча імуностимулюючі комплекси (ISCOMs) застосовувались у ряді ветеринарних вакцин і посилюють імуногенність вірусних мембранних протеїнів, розробці таких вакцин для людей перешкоджали побоювання щодо їх токсичності і складності суміші [Cox та ін. 1998].

У недалекому минулому були розроблені протеосомні вакцини грипу [заявка на патент США 20010053368], які містять нековалентні комплекси очищених протеїнів зовнішніх мембран бактерій, таких як менінгококи, у суміші з антигенними протеїнами, такими як гемагглютинін грипу або глікоп-

ротейн оболонки вірусу імунодефіциту людини. Тоді як такі множинні протеїни бактерій можуть виступати в ролі ад'ювантів, комплексна природа таких сумішей, що містять множинні протеїни, піднімає питання про регулятивні механізми. Більше того, імунна відповідь направлена проти всіх протеїнів та інших антигенів, присутніх у розчині, і менш специфічно проти вірусних протеїнів.

Інша частинкова композиція, розроблена Biovector Therapeutics, містить всередині вуглеводневе ядро, оточене ліпідною оболонкою, що містить антигени. При використанні гемаглютиніну грипу в якості антигену помічалось певне посилення імунної відповіді, але недостатнє для того, щоб гарантувати подальший її розвиток.

Були розроблені інтраназальні вакцини на основі живих ослаблених видів респіраторних вірусів, таких як пристосований до холоду штаму вірусу грипу, з мінімальною реплікацією в дихальних шляхах. Ці вакцини мають виразну перевагу у тому, що вони викликають імунні відповіді, наближені до природного імунітету, який індукується вірусами дикого типу. У випадку з вірусом грипу такі вакцини були відомі з 1980-х, а зараз вони наближаються до їх комерційного впровадження. Затримки були зумовлені притаманною багатьом вірусам здатністю швидко мутувати, внаслідок чого ослаблені віруси частково або повністю повертаються до дикого типу, відтак в дійсності викликаючи захворювання, якому мала запобігти вакцина.

Із вищезазначених причин у цій галузі добре відомо, що, незважаючи на те, що були розроблені такі композиції як імуностимулюючі комплекси і протеосоми, зокрема для індукування імунних відповідей на патогенні організми, які самі по собі не викликають сильну імунну відповідь, а також для інтраназального призначення та призначення в інші слизові оболонки, все ще існує гостра потреба у вакцинних композиціях з позитивними характеристиками, які б індукували сильну імунну відповідь, не містили б живих вірусів і мали низьку токсичність.

Цей винахід стосується нових засобів і способів вирішення ряду проблем і труднощів, які були згадані вище. Винахід стосується відновленої вірусної мембрани, яка містить амфіфільний ад'ювант і антиген, де такий ад'ювант і антиген взаємодіють через механізм гідрофобної взаємодії, обидва присутні разом з мембраною з подвійним ліпідним шаром з відновлених вірусних мембран, і в якій відновлена вірусна мембрана має здатність до злиття, яка перевищує цю здатність у вірусом, одержаних відповідно до EP 0538437. Відновлені вірусні мембрани доволі близько імітують композицію, поверхневу структуру і функціональні властивості вірусної оболонки, з якої отримують відновлену вірусну мембрану. Винахід також стосується способу одержання таких відновлених вірусних мембран, який включає деякі або всі із нижчезазначених стадій: i) розчинення вірусу у придатному детергенті; ii) видалення вірусного генетичного матеріалу і капсидних протеїнів; iii) введення у взаємодію однієї або більше амфіфільних молекул з ад'ювантною активністю і антигеном у розчині, що містить детергент; і iv) видалення детергента

за умов, які забезпечують реформування мембрани.

Крім того, винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить відновлені вірусні мембрани згідно з винаходом, фармацевтично прийнятний носій, а також застосування таких відновлених вірусних мембран або фармацевтичної композиції згідно з винаходом у лікуванні або профілактиці захворювань з використанням інтраназальних, пероральних або парентеральних способів доставки.

Відповідно до першого аспекту цей винахід стосується відновленої вірусної мембрани. Відновлена вірусна мембрана переважно містить: (a) подвійний ліпідний шар; (b) злитий протеїн вірусу; (c) амфіфільний ад'ювант і (d) необов'язково додатковий антиген. У відновленій вірусній мембрані переважно ліпідний подвійний шар має ліпідну композицію, яка сумісна із злиттям вірусної мембрани з клітиною-хазяїном природного хазяїна вірусу, яке індукується злитим протеїном. Переважно ліпідна композиція сумісна із злиттям при оптимальному значенні pH злиття. Переважно злитий білок, амфіфільний ад'ювант і також переважно необов'язковий додатковий антиген взаємодіють з гідрофобною внутрішньою частиною подвійного ліпідного шару, а саме зв'язуються з, інтегруються в і/або включаються в подвійний шар вірусної мембрани через гідрофобну взаємодію з ліпідами у подвійному шарі і/або одного з одним. Також переважно злитий білок і амфіфільний ад'ювант не є ковалентно зв'язаними. Переважно амфіфільний ад'ювант і додатковий антиген також не є ковалентно зв'язаними. Вірусні мембрани згідно з винаходом переважно є функціонально відновленими вірусними мембранами, які містять ліпіди, переважно природні вірусні ліпіди, амфіфільний ад'ювант, вірусний злитий білок і один або більше антигенів, де амфіфільний ад'ювант, вірусні злиті протеїни ліпідів і антигени взаємодіють головним чином через механізм гідрофобної взаємодії, при якому гідрофобна частина амфіфільного ад'юванта переважно утворює невід'ємну частину ліпідної двошарової мембрани, при цьому такий подвійний шар додатково містить злитий протеїн, антиген(и) і ліпіди. Під функціональним відновленням мається на увазі, що відновлена мембрана має здатність до злиття мембран. Переважна відновлена вірусна мембрана має форму везикули.

Під злитим протеїном мається на увазі цілісний мембранний протеїн вірусу, як правило, оболонкового вірусу, який при його експресуванні на поверхні придатної клітини ссавця або птаха може викликати злиття клітини при відповідному pH з клітинами, які є природним хазяїном для вірусу [див., наприклад, Hernandez та ін., 1996]. Приклади вірусних злитих протеїнів для включення у відновлені вірусні мембрани включають протеїн вірусу лісу Семліки E1, гемаглютинін (HA) вірусу грипу, протеїни B1L gp120/gp41, F-протеїни параміксовірусів. Можна виділити два типи злиття, індукованого вірусним злитими протеїнами. Перший тип злиття, такий як, наприклад, індукований протеїнами B1L gp120/gp41, має місце при нейтральному pH на поверхні клітин-хазяїв, які виступають

мішеннями. Другий тип злиття, такий як, наприклад, індукований гемаглютиніном (НА) вірусу грипу, має місце під час інтерналізації при нижчому значенні рН (5.0-6.5) зсередини ендосомного відділення клітини-хазяїна. Обидва типи злиття включені у цей винахід.

Здатність відновлених вірусних мембран згідно з винаходом зливатися з клітинами-хазяїнами, таким чином, залежить від присутності відповідного вірусного злитого протеїну. Проте, ця здатність також залежить від ліпідної композиції подвійного шару відновленої вірусної мембрани, так як описані раніше віросоми, які складаються з синтетичних ліпідів і вірусних злитих протеїнів не мають здатності до злиття. Ліпідна композиція відновлених вірусних мембран, таким чином, переважно вибирається таким чином, щоб мембрани мали здатність до злиття з відповідним клітинами-хазяїнами при відповідному рівні рН. Здатність відновлених вірусних мембран до злиття може бути проаналізована з допомогою аналізу злиття порожніх стром еритроцитів як описано у Прикладі 3. У випадку відновлених вірусних мембран, які містять гемаглютинін грипу, переважна активність злиття у цьому аналізі індукує злиття принаймні 30% везикул відновлених вірусних мембран з порожніми стромами еритроцитів через 1 хвилину, у випадку, якщо 1мкмоль віросом змішують з 50мкмоль мембранних фосфоліпідів еритроцитних при рН, яке є оптимальним для згаданого гемаглютиніну.

Переважна активність злиття для інших відновлених мембран, яка не може бути перевірена з допомогою цього аналізу, є злиттям під час додавання відновлених вірусних мембран до клітин, здатних інфікуватися вірусом, з якого отримуються їх злиті протеїни. Відновлені мембрани мають зливатися принаймні з 10% клітин, з якими б зв'язувався вірус, з якого отримують їх злиті протеїни.

Однією з переважних ліпідних композицій, яка забезпечує відновлені вірусні мембрани, о мають здатність до злиття, є ліпідна композиція, яка містить природні вірусні ліпіди. Термін "природні вірусні ліпіди" у контексті цього винаходу означає ліпіди, які присутні у мембрані вірусу, який виріс на клітині, переважно клітині ссавця, або розвинувся на яйці з ембріоном. Таким чином, природні ліпіди переважно отримують або виділяють з вірусних частинок вирощених таким чином, на відміну від синтетичних ліпідів. Проте, функціонально відновлені вірусні мембрани згідно з винаходом можуть містити очищені ліпіди з інших поверхонь, наприклад синтетичні ліпіди, окрім природних ліпідів. Таким чином, ліпідною композицією для одержання відновлених вірусних мембран із здатністю до злиття переважно є композиція, яку отримують або яка може бути отримана із природних вірусних мембран. Ліпідні композиції для використання у цьому винаході, відповідно, включають композиції, які складаються винятково з природних вірусних ліпідів, композиції, які складаються з природних вірусних ліпідів, доповнені ліпідами, отриманими з інших джерел, а також композиції, які складаються з ліпідів з різних джерел, які імітують ліпідну композицію природної вірусної мембрани.

Ад'юванти включають будь-яку речовину або сполуку, яка при її використанні у поєднанні з антигеном для імунізації людини або тварини стимулює імунну систему, таким чином викликаючи, посилюючи або сприяючи імунній відповіді на антиген, переважно не генеруючи специфічної імунної відповіді на сам ад'ювант. Переважні ад'юванти посилюють імунну відповідь на певний антиген принаймні на фактор 1.5, 2, 2.5, 5, 10 або 20, порівняно з імунною відповіддю на антиген, яка генерується при тих самих умовах, але за відсутності ад'юванта. Тести на визначення статистичного середнього значення посилення імунної відповіді на певний антиген, яка викликається ад'ювантом у групі тварин або людей, порівняно з відповідною контрольною групою, відомі з рівня техніки. Переважно ад'ювант має здатність посилювати імунну відповідь принаймні на два різні антигени. Ад'ювантом згідно з винаходом переважно є сполука, яка є чужерідною для ссавця, що викликає імуностимулюючі сполуки, які є ендегенним для ссавців, такі як, наприклад, інтерлейкіни, інтерферони та інші гормони. Ад'ювантами, які переважно включаються у функціонально відновлені вірусні мембрани згідно з винаходом, переважно є амфіфільні ад'юванти.

Термін "амфіфільний ад'ювант" включає будь-який ад'ювант, включно зі сполуками, такими як ліпопептиди і гліколіпіди, які мають включену гідрофобну мембрану і орієнтовані на середовище полярні (кінцеві групи) частини, і які, переважно самі по собі, можуть зв'язуватися з або, більш переважно, інтегруватися у везикули подвійного ліпідного шару або міцели у воді. Цей термін також включає будь-який амфіфільний ад'ювант, стабільно включений у ліпідний подвійний шар (який складається з природних вірусних ліпідів) з його гідрофобною частиною, що контактує із внутрішньою гідрофобною ділянкою двошарової мембрани, і з його полярною частиною кінцевої групи, орієнтованою на зовнішню полярну поверхню мембрани. Проте, інші гідрофобні ад'юванти, які мають менш виражену амфіфільність, тобто зовсім не мають або мають лише слабо полярні частини кінцевих груп, але можуть зв'язуватися або інтегруватися у везикули подвійного ліпідного шару, не виключаються з об'єму цього винаходу. Термін "амфіфільні ад'юванти" з ад'ювантною активністю в контексті цього винаходу, відповідно, включає природні або (частково) синтетичні ад'юванти, здатні утворювати відновлені вірусні мембрани разом з одним або більшою кількістю антигенів і природних вірусних ліпідів у водному середовищі за умов, які забезпечують утворення відновленої вірусної мембрани.

Відповідно до переважного варіанту амфіфільний ад'ювант, присутній у відновленій вірусній мембрані, є фармацевтично прийнятним для застосування у людей, на відміну від, наприклад, Quil A™ або інших сапонінів, які є амфіфільним речовинами з ад'ювантними властивостями, які випробовувались за певних умов, відомих з рівня техніки. Амфіфільні ад'юванти згідно з винаходом переважно не є ковалентно зв'язаними з антигенами, а присутні разом з подвійними ліпідними шарами відновлених мембран. Той факт, що анти-

ген і ад'ювант не є ковалентно зв'язаними, забезпечує те, що обробка антигену і представлення його епітопів імунній системі по суті ідентична цим процесам у природному протеїні, взятому окремо, що забезпечує задовільне розпізнавання протеїну, присутнього на поверхні природного патогену. З іншого боку, гідрофобна взаємодія антигену і ад'юванта з подвійним ліпідним шаром (та один з одним) забезпечує розподіл ад'юванта і антигену по поверхні відновлених вірусних мембран у вигляді композиції, в якій більшість мембранних везикул містить як антиген, так і ад'ювант в межах одної везикули, більш переважно принаймні 60, 70, 80, 90, 95 або 95% везикул містять як антиген, так і ад'ювант. Комбінація антигену і ад'юванта в одній мембрані або везикулі забезпечує доставку антигену до антиген-презентуючих клітин, які активуються ад'ювантом, завдяки чому посилюється терапевтичний і/або профілактичний ефект, що забезпечується відновленими вірусними мембранами.

Відповідно до переважного варіанту винаходу такий амфіфільний ад'ювант розпізнається Toll-подібним рецептором (Toll-like-receptor (TLR)), присутнім на антиген-презентуючих клітинах. Різні сполуки, які розпізнаються TLR відомі з рівня техніки і включають, наприклад, ліпопептиди, ліпополісахариди, пептидоглікани, ліоптеїхонікські кислоти, ліпопротеїни (з мікоплазми, мікобактерій або спірохет), двохланцюгову РНК (полі І:С), метильовану ДНК, ліпоарабіноманнан, флагелін, CpG-вмісну ДНК і імідазохіноліни. Не всі розпізнавані TLR-рецептором сполуки придатні в якості ад'ювантів, так як, наприклад, токсичність грам-негативних бактеріальних ліпополісахаридів дикого типу є надто високою для того, щоб їх можна було використовувати в якості ад'ювантів, а саме вони не є фармацевтично прийнятними для застосування на людях. Інші розпізнавані TLR-рецептором сполуки, проте, можуть застосовуватись як ад'юванти. Такі розпізнавані TLR-рецептором ад'юванти можуть бути амфіфільними ад'ювантами самі по собі або, як альтернатива, вони можуть бути модифіковані в амфіфільні ад'юванти, наприклад, сполученням гідрофобних сполук (див. далі) з полярним TLR-лігандом. Як альтернатива, амфіфільні ад'юванти можуть бути націлені на інші рецептори. Переважним амфіфільним ад'ювантом є ліпопептид, який може отримуватися синтетичним або напівсинтетичним шляхом. Переважний ліпопептид для застосування в якості амфіфільного ад'юванта має ад'ювантні властивості і є фармацевтично прийнятним для застосування на людях. Ліпопептид згідно з винаходом представляє собою молекулу, яка зазвичай складається з одного або більше (оліго)пептидів, які ковалентно сполучені з однією або більше гідрофобною сполукою, вибраною з жирних кислот, ліпідів, керамідів, плазмалогенів, алкільних або алкенових ланцюгів або стеролів. Як правило, ліпопептиди для застосування згідно з цим винаходом переважно містять 3, 4, 5, 6, 7 або 8 амінокислот, переважно такі пептиди містять 40-70% амінокислот, які мають позитивний заряд, серед яких перевага надається лізіну і аргініну, і переважно такі пептиди включають один або більше

серпнів і/або цистеїнів. Особливо переважні ліпопептиди перелічені у Таблиці.

Відповідно до іншого варіанту винаходу таким амфіфільним ад'ювантом є гліколіпід. Переважний гліколіпід для використання в якості амфіфільного ад'юванта має ад'ювантну активність і є фармацевтично прийнятним для використання на людях. Гліколіпіди - це ліпіди (або інші гідрофобні сполуки), ковалентно сполучені з одним або більше сахарозами. Відповідно до одного з найбільш переважних варіантів винаходу винахід стосується відновлених вірусних мембран згідно з винаходом, в яких гліколіпідом є  $\alpha$ -галактозилкерамід або фосфатидилінозитолманнозид. Терміни " $\alpha$ -галактозилкерамід" і "фосфатидилінозитолманнозид" включають будь-які похідні цих сполук. Похідні цих молекул, які мають ад'ювантну активність, і які є корисними в контексті цього винаходу, описані, наприклад, в патентах США 5,936,076 і 4,542,212. Інші придатні гліколіпідні ад'юванти для застосування в цьому винаході включають, наприклад, модифіковані форми ендотоксичних ліпополісахаридів (ЛПС) від грам-негативних бактерій, які мають знижену токсичність частини Ліпиду А ЛПС, але зберігають (частково) ад'ювантну активність, і які можуть бути отримані з генетично модифікованих грам-негативних патогенів та як описано в міжнародній заявці W002/09746.

Модифікований ЛПС для застосування в якості амфіфільного ад'юванта згідно з винаходом переважно має модифіковану частину Ліпиду А із зниженою токсичністю. Токсичність модифікованого ЛПС переважно нижча, ніж токсичність відповідного ЛПС дикого типу, більш переважно токсичність модифікованого ЛПС менша, ніж 90, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5 або 0.2% токсичності ЛПС дикого типу. Токсичності ЛПС дикого типу і його модифікованих форм із зниженою токсичністю можуть визначатися з допомогою будь-якого придатного аналізу, відомого у цій галузі. Переважним аналізом для визначення токсичності, а саме біологічної активності модифікованих ЛПС є тест WENI на індукування фактора некрозу пухлини (TNF-альфа) макрофаговій клітинній лінії MM6 [Espevik and Niessen, 1986, J. Immunol. Methods 95: 99-105; Ziegler-Heitbrock et al., 1988, Int. J. Cancer 41: 456-461]. З іншого боку, модифікований ЛПС із зниженою токсичністю все ще повинен мати достатню імуностимулюючу активність, а саме ад'ювантну активність. Модифікований ЛПС із зниженою токсичністю переважно має принаймні 10, 20, 40, 80, 90 або 100% імуностимулюючої активності відповідного ЛПС дикого типу. Імуностимулююча активність може визначатися *in vivo* у лабораторних тварин як описано вище або як описано у наведених далі прикладах, або *in vitro*, наприклад, шляхом визначення дозрівання деревовидних клітин, які стимулюються інкубуванням з тестованим ЛПС визначенням продукування принаймні одного цитокіну (наприклад, одного з IL12, IL10, TNP-альфа, IL6 і IL-1-бета) ЛПС-стимульованими деревовидними клітинами, або шляхом визначення експресії принаймні однієї костимулюючої молекули (наприклад, CD40 або CD86) на ЛПС-стимульованих деревовидних клітинах.

Відповідно до ще одного аспекту цього винаходу амфифільний ад'ювант, присутній у віросомі згідно з винаходом, є пептидом, переважно амфифільним пептидом. Переважний пептид для застосування в якості амфифільного ад'юванта має ад'ювантну активність і є фармацевтично прийнятним для застосування на людях. Пептиди, зокрема полярні пептиди з ад'ювантною активністю, можуть бути перетворені у амфифільні ад'юванти їх (ковалентним) зв'язуванням із придатною гідрофобною сполукою (див. вище). Альтернативно амфифільні пептиди можуть включати гідрофобний ряд амінокислот, такий як трансмембранна послідовність, описана далі. Переважний пептид включає послідовність із ліганда Jagged-1 Notch-рецептора [див. Weijzen et al., 2002; Genbank accession no. AAC 52020] або послідовність із протеїну A *Staphylococcus aureus*. Пептиди, які містять послідовності ліганда Jagged-1 або протеїну A переважно ковалентно сполучені із придатною гідрофобною сполукою (див. вище) і/або містять трансмембранну послідовність (див. нижче). (Полярна) частина пептидів, похідних із ліганда Jagged-1 або протеїну A, яка виступає за межі подвійного ліпідного шару, переважно складається не більше, ніж з 3, 4, 5, 6, 7 або 8 амінокислот.

Відновлені вірусні мембрани згідно з винаходом переважно придатні як для парентерального призначення, так і для призначення у слизову оболонку (наприклад, інтраназально або перорально). Проте, важливим аспектом цього винаходу є те, що відновлені вірусні мембрани згідно з винаходом можуть застосовуватись для інтраназальної доставки антигенів, які за звичайних обставин не викликали б достатню імунну відповідь при інтраназальній доставці пацієнту, яка б забезпечила захист від наступного зараження патогенними організмами, які містять такий антиген.

Відновлені вірусні мембрани згідно з винаходом містять вірусний злитий протеїн і необов'язково додатковий антиген. Таким чином, слід мати на увазі, що відновлені вірусні мембрани, які містять лише вірусний злитий протеїн і не містить додаткових антигенів, становлять частину цього винаходу. У цьому випадку вірусний злитий протеїн також виконує функцію антигена на доповнення до своєї функції вірусного злитого протеїну.

Антигени, які є частиною відновленої вірусної мембрани згідно з винаходом переважно мають гідрофобну частину, здатну включатися у мембрану подвійного ліпідного шару у везикулі відновленої вірусної мембрани. Ряд патогенних одиниць, таких як віруси, бактерії, дріжджі і паразити переносять у свої капсиді, клітинній стінці або мембрані протеїни, які викликають імунну відповідь у клітині-хазяїні. Приклади антигенів, які мають гідрофобні елементи, такі як, наприклад, трансмембранні сегменти, і які здатні бути частиною відновленої вірусної мембрани згідно з винаходом, включають протеїни, присутні в мембрані (які у випадку вірусів також називаються оболонкою) патогена. Відповідно, переважно антиген, присутній у відновленій вірусній мембрані згідно з винаходом, є внутрішнім мембранним протеїном. Антигенні протеїни у відновлених вірусних мембранах згідно з винаходом орієнтовані у тому ж самому напрямку, що й на

вірусній або клітинній мембрані, але можуть презентувати епітопи, які за звичайних умов частково або принаймні тимчасово приховані у подвійному ліпідному шарі мембрани. Стимулювання імунної системи такими антиген-презентуючими відновленими вірусними мембранами може бути наслідком поєднання їх специфічного розпізнавання клітинами імунної системи, їх особливих характеристик, презентування протеїну та розкриття прихованих епітопів. Переважно антигенні протеїни, які використовуються у відновлених вірусних мембранах згідно з винаходом, містять один або більше епітопи, здатні викликати імунну відповідь у ссавця, що забезпечує захист від зараження патогеном, з якого отриманий антиген, або який забезпечує захист від пухлини, яка експресує такий антиген.

Відповідно до переважних варіантів винаходу такі антигени отримують з вірусу, паразита, гриба або бактерії. Особливо переважними є відновлені вірусні мембрани, в якій такий антиген отриманий з вірусу грипу. Протеїни з вірусу грипу, які можуть використовуватись у відновлених вірусних мембранах згідно з винаходом, переважно є гемагглютиніном (HA), нейрамінідазою (NA) і/або протеїном M2, окремо або у комбінації.

Антигени, які можуть застосовуватись в утворенні відновлених вірусних мембран згідно з винаходом, можуть бути отримані з усіх різновидів вірусів. Необмежуючий перелік прикладів таких вірусів включає: ретровіруси, такі як вірус імунодефіциту людини (ВІЛ); краснуха; параміксовіруси, такі як віруси парагрипу, кір, інфекційний паротит, респіраторний синцитіальний вірус, людський метатневмовірус; віруси сімейства *flaviviridae*, такі як вірус жовтої лихоманки, вірус денге, вірус гепатиту С (HCV), вірус японського енцефаліту (JEV), вірус клішового енцефаліту, вірус енцефаліту Сент-Луїса або Західного Нілу; віруси герпеса, такі як вірус простого герпеса, цитомегаловірус, вірус Епштейна-Барра; сімейство буньявірусів (*Bunyaviridae*); *Arenaviridae*; *Hantaviridae*, такі як вірус Хантаан; коронавіруси (*Coronaviridae*); папавіруси (*Papovaviridae*), такі як вірус людської папіломи; рабдовіруси (*Rhabdoviridae*), такі як вірус сказу. Коронавіруси, такі як людський коронавірус; *Alphaviridae*, *Arteriviridae*, *filoviridae*, такі як *Ebolavirus*, *Arenaviridae*, *poxviridae*, такий як вірус натуральної віспи, і вірус африканської чуми свиней. Подібним чином такі антигени можуть бути похідними від патогенних бактерій, грибів (включно з дріжджами), або паразитів. Такі антигени включають бактеріальні антигени від бактерій сімейства *Helicobacter*, таких як *H. pylori*, *Neisseria*, таких як *N. meningitidis*, *Haemophilus*, таких як *H. influenza*, *Bordetella*, таких як *B. pertussis*, *Chlamydia*, *Streptococcus*, таких як *Streptococcus* sp. серотип A, *Vibrio*, таких як *V. cholera*, грам-негативні ентеропатогени, включно з, наприклад, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* і *Escherichia*, а також антигени з бактерій, які збуджують сибірську виразку, проказу, туберкульоз, дифтерію, хворобу Ліма, сифіліс, тифоїдну гарячку і гонорею. Антигени від паразитів, наприклад, включають антигени, отримані з найпростіших, таких як *Babesiosis bovis*, *Plasmodium*, *Leishmania* spp. *Toxoplasma gondii*, і *Trypanosoma*, таких як *T. cruzi*. Антигени, похідні від

грибів, можуть включати антигени від таких грибів, як *Aspergillus* sp., *Candida albicans*, *Cryptococcus*, таких як, наприклад, *C. neoformans* і *Histoplasma capsulatum*.

Хоча вакцини традиційно застосовуються для профілактичного захисту від патогенних організмів або для лікування захворювань, що є наслідком заражень патогенами, фахівцю у цій галузі відомо про можливість застосування вакцин для лікування пухлин. Більше того, все більше число пухлино-специфічних протеїнів виявляють належні властивості мішеней для людських або олюджених антитіл. Такі пухлино-специфічні протеїни також становлять частину об'єму правової охорони винаходу. Ряд пухлино-специфічних антигенів відомі з рівня техніки. Відповідно, згідно з одним із переважних варіантів винаходу останній стосується відновлених вірусних мембран, які містять пухлино-специфічний антиген. Придатним пухлино-специфічними антигенами є карциномембранний антиген, простата-специфічний мембранний антиген, простата-специфічний антиген, протеїн MZ2-E, поліморфний епітеліальний муцин (ПЕМ), фолат-зв'язуючий протеїн LK26, усічений епідермальний рецептор фактора росту (EGFR), (T) антиген Томсена-Фріденрайха, GM-2 і GD-2 гангліозиди, Ер-СМ, муцин-1, епітеліальний глікопротеїн-2 і специфічний антиген ободової кишки.

Переважними антигенами для таких патогенів є внутрішні мембранні протеїни. Проте, для застосування у цьому винаході також можуть застосовуватись модифіковані антигени немембранних протеїнів або їх частини, які містять захисні епітопи, які отримуються злиттям з трансмембранною послідовністю. Трансмембранні послідовності або послідовності з мембранними анкерами добре відомі у цій галузі і засновані на генетичній геометрії трансмембранних молекул ссавця. Трансмембранна послідовність, як правило, складається із нитки, що містить приблизно 10-30, зазвичай приблизно 20 амінокислот, більшість з яких має гідрофобні бічні ланцюги. Трансмембранні послідовності відомі своїм широким розмаїттям протеїнів, кожен з яких є придатним до застосування.

Приклади послідовностей з мембранним анкером, які можуть використовуватись згідно з винаходом, включають, наприклад, послідовності, похідні від CD8, ICAM-2, IL-8R, CD4 і LFA-1. Переважно трансмембранну послідовність одержують з вірусного внутрішньомембранного протеїну, який природно існує всередині вірусної мембрани. Приклади включають трансмембранну ділянку глікопротеїну G людського респіраторного синцитіального вірусу (PCV) (наприклад, амінокислоти 38-63) або трансмембранну ділянку нейрамінідази вірусу грипу (наприклад, амінокислоти 7-27).

Відповідно до ще одного аспекту цей винахід стосується способу одержання відновленої вірусної мембрани, яка включає всі або деякі із вказаних етапи: (а) змішування амфіфільного ад'юванта, вірусного злитого протеїну, необов'язкового додаткового антигену і ліпідів у розчині, який містить детергент; (б) зменшення концентрації детергента за умов, які забезпечують відновлення вірусної мембрани, яка містить подвійний ліпідний

шар, в якому амфіфільний ад'ювант і вірусний злитий протеїн взаємодіють з гідрофобною внутрішньою зоною подвійного ліпідного шару, при цьому амфіфільний ад'ювант і вірусний злитий протеїн переважно не є ковалентно зв'язаними, також при цьому переважно амфіфільний ад'ювант і необов'язковий додатковий антиген не є ковалентно зв'язаними, і при цьому відновлена вірусна мембрана має здатність до злиття; (с) необов'язкове очищення відновленої вірусної мембрани; і (d) необов'язкове включення відновленої вірусної мембрани до складу фармацевтичної композиції. З метою включення вірусних ліпідів цей спосіб може додатково включати: i) розчинення вірусу у придатному детергенті, такому як октаетиленгліколь моно-N-додециловий ефір ii) видалення вірусного генетичного матеріалу і капсидних протеїнів, наприклад диференціальним ультрацентрифугуванням. Концентрацію детергента переважно зменшують за рахунок діалізу, діалізування або абсорбції на гідрофобні гранули (і/або на виключення за розміром) при відповідній швидкості видалення детергента, що дозволяє відтворити мембрану, при цьому переважно амфіфільний ад'ювант і вірусний злитий протеїн, а також переважно додатковий антиген, присутній у такій відновленій вірусній мембрані, взаємодіють через механізм гідрофобної взаємодії із внутрішньою гідрофобною ділянкою двошарової мембрани і/або один з одним. Такий вірус переважно є мембрановмісним вірусом, таким як більшість оболонкових вірусів. Переважним вірусом, який використовують як джерело природних вірусних ліпідів, є вірус грипу, вірус лісу Семплі або параміксовіруси.

Переважно спосіб одержання відновленої вірусної мембрани, описаної у цьому винаході, включає очищення такої відновленої вірусної мембрани. Методики очищення відновлених вірусних мембран відомі у цій галузі і включають, наприклад, диференційне центрифугування і центрифугування в градієнті густини і/або хроматографію (гель-проникаюча хроматографія, іонообмінна і/або хроматографію за спорідненістю). Детергентами є амфіфільні молекули з поверхневою активністю. Придатними детергентами є ті детергенти, які легко розчиняють вірусні мембранні компоненти, але які не денатурують злитий протеїн, вірусну капсиду і/або капсидні протеїни, наприклад цвіттер-іонні детергенти, такі як октаетиленгліколь моно-N-додециловий ефір.

Гідрофобні взаємодії є наслідком нековалентних неелектростатичних сил притягання між гідрофобним речовинами, присутніми у водному середовищі. Відповідно до ще одного варіанту винахід стосується фармацевтичної композиції, яка в якості активного інгредієнта містить відновлену вірусну мембрану згідно з винаходом і фармацевтично прийнятний носій. Також до складу фармацевтичної композиції можуть включатись фармацевтично прийнятні стабілізуючі агенти, осмотичні агенти, буферні агенти, диспергуючі агенти і подібні. Переважна форма залежить від вибраного способу призначення і терапевтичного застосування. Фармацевтичним носієм може бути будь-яка сумісна нетоксична речовина, здатна



доставляти відновлені вірусні мембрани в організм пацієнта. Приклади фармацевтично прийнятних носіїв для інтраназальної доставки включають воду, буферні сольові розчини, гліцерин, полісорбат 20, кремофор EL і водні суміші каприлу з каприловим гліцеридом, і можуть бути містити буфери для забезпечення нейтрального рівня pH. Приклади фармацевтично прийнятних носіїв для парентеральної доставки включають стерильний забуферений 0.9% розчин NaCl або 5% розчин глюкози, необов'язково доповненої 20% альбуміном. Препарати для парентерального призначення повинні бути стерильними. Парентеральний спосіб призначення поліпептиду або антитіла відповідає відомими методикам, наприклад, ін'єкції або інфузії внутрішньовенним, інтраперитонеальним, внутрішньом'язовим, внутрішньоартеріальним шляхом або шляхом введення всередину уражених тканин. Відновлені вірусні мембрани переважно призначають у вигляді болісних ін'єкцій. Типова фармацевтична композиція для внутрішньом'язової ін'єкції містить, наприклад, 1-10мл забуференого фосфатом сольового розчину і від 1 до 100мкг, переважно 15-45мкг (протеїну антигену) відновлених вірусних мембран згідно з винаходом. При пероральному призначенні активний інгредієнт може призначатися у вигляді рідких дозованих форм, таких як еліксири, сиропи і суспензії. Рідкі дозовані форми для перорального призначення можуть містити барвник і смакову добавку для підвищення прийнятності для пацієнта. Методики для одержання композицій для парентерального, перорального або інтраназального призначення добре відомі з галузі техніки і детально описані в ряді джерел, включно з, наприклад [Pharmaceutical Science Ремінгстона (15-е вид., Mack Publishing, Easton, PA, 1980) (повністю включений в цей опис в якості посилання)]. Відповідно до ще одного аспекту винахід стосується способу вакцинації або профілактики, або терапії інфекційного захворювання або пухлини призначенням суб'єкту, який потребує такого лікування або профілактики терапевтично або профілактично ефективної кількості (фармацевтичної композиції, яка містить) відновлених вірусних мембран згідно з винаходом. Винахід також стосується відновлених вірусних мембран для застосування в якості лікарського засобу, переважно лікарського засобу для вакцинації або профілактики чи терапії інфекційних захворювань або пухлин. Винахід також стосується застосування відновлених вірусних мембран для одержання лікарського засобу для вакцинації або профілактики чи лікування інфекційних захворювань або пухлин.

Фігура 1: Схематичне зображення градієнту цукрози, який використовували для аналізу фізичного зв'язку між ліпопептидами, протеїном і ліпідами ад'ювант-вмісних відновлених вірусних мембран.

Фігура 2: Двовірна тонкошарова хроматограма ліпідів і ліпопептидів, відновлених з інтерфейсу цукрози 10/40% на градієнтах як показано на Фігурі 1. Блок А: контрольний зразок, відновлені вірусні мембрани без ліпопептиду, на якому показані нінгідрин-реактивні природні вірусні ліпіди. Блок В: відновлені вірусні мембрани, які містять ліпопеп-

тиди, на якому показані природні вірусні ліпіди, які реагують з нінгідрином, а також нінгідрин-реактивні ліпопептиди. Були отримані двовірні хроматограми: система 1 CHCl<sub>3</sub>/метанол/H<sub>2</sub>O 65/25/4, система 2 N-бутанол/оцтова кислота/вода 2/1/1, забарвлені завдяки дериватизації нінгідриновим забарвлювачем. Сайти, які містять зразки, позначались як "точка".

Фігура 3: Електронна мікрофотографія відновлених вірусних мембран, які містять ліпопептиди згідно з цим винаходом негативно заряджений маркер з використанням фосфомолібдату амонію. Мембрани мають 100-200нм в діаметрі.

Фігура 4: IgA титри з носа і легень після двох інтраназальних вакцинацій з використанням A/Panama/2007/99, з інтервалом 14 днів між вакцинаціями; титри визначали через 3 тижні після останньої вакцинації. Пре-іммунні титри віднімали. Застосовували стандартну наявну на ринку субодиночну вакцину, віросоми, одержані відповідно до патенту EP 0538437, або відновлені вірусні мембрани, які містять ліпопептиди згідно з винаходом. Дослід проводили на групі, яка включала 10 мишей.

Фігура 5: IgG титри крові після двох інтраназальних вакцинацій, з інтервалом 14 днів між вакцинаціями; титри визначали через 3 тижні після останньої вакцинації. Пре-іммунні титри віднімали. В якості вакцин застосовували віросоми, одержані відповідно до патенту EP 0538437, або відновлені вірусні мембрани, які містять ліпопептиди згідно з винаходом. Чотири різні вакцинні препарати, кожен з яких містить антиген з одного штаму вірусу, застосовували для вакцинації 4 груп з 10 мишей.

Фігура 6: Активність злиття відновлених вірусних мембран згідно з винаходом. Відновлені вірусні мембрани, які містять піренфосфоліпід, змішували з порожніми стромами еритроцитів, і злиття визначали відповідно до цього опису.

Фігура 7: IgG титри крові після разової внутрішньом'язової вакцинації; титри визначали через 3 тижні після останньої вакцинації. Пре-іммунні титри віднімали. В якості вакцин застосовували віросоми, одержані відповідно до патенту EP 0538437, або відновлені вірусні мембрани, які містять ліпопептиди згідно з винаходом. Дослід проводили на групі, яка включала 10 мишей.

Фігура 8: Аналіз градієнта цукрози при густині рівноваги у відновлених вірусних мембранах із штаму вірусу A/Wyoming, який показує один пік густини у відновленому матеріалі; ліпопептиди відновлювали із фракцій 4, 5 і 6.

Фігура 9: IgG титри крові після інтраназальної вакцинації на 0 і 14-й день у групі з 10 мишей. Антиген отримували із штаму вірусу A/Panama/2007/99, мембрани містили N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(пролін)<sub>3</sub>-пролін.

Фігура 10: IgA титри з носа і легень у групі з 10 мишей після двох інтраназальних вакцинацій відновленими мембранами штаму A/Panama/2007/99, які містять ліпопептид N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(пролін)<sub>3</sub>-пролін. з інтервалом у 14 днів; титри визначали через 3 тижні після останньої вакцинації. Пре-іммунні титри віднімали.

### Приклади

Приклад 1: Відновлення відновленої вірусної мембрани, яка містить ліпопептид N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, природні ліпіди вірусу грипу і протеїни мембрани вірусу грипу.

Вірус грипу отримували вирощуванням вірусу, отриманого у Всесвітньому центрі грипу або Американській колекції культур типових тканин (ATCC), з використанням методик, відомих фахівцям у цій галузі техніки, наприклад вирощуванням вірусу на яйцях з ембріоном або на культивованих клітинах. Після цього вірус очищували, переважно диференційним центрифугуванням або центрифугуванням градієнту густини обома способами, і після цього може деактивуватися бета-пропіолактоном або формальдегідом відповідно до традиційних методик.

Очищений і концентрований вірус грипу штаму A/Panama/2007/9 (1500нмоль фосфоліпід) інкубували з 1мл детергенту окта(тиленгліколь)-п-додециловий моноефір (C12E8) (Boehringer, Mannheim, Німеччина) при концентрації 100ммоль (потрібна концентрація, яка перевищує критичну концентрацію міцел) протягом 10 хвилин при температурі 4°C, в ізотонічному буфері при нейтральному pH: 145ммоль NaCl, 2.5ммоль HEPES (N-2-гідроксиетилпіперазин-N-2-етаносульфонової кислоти), 1ммоль етилендіамінтетраоцтової кислоти EDTA, pH 7.4 (Буфер А). Після цього вірусну нуклеокапсиду і матричні протеїни видаляли центрифугуванням при 100,000×g протягом 30 хвилин при температурі 4°C. Гранули видаляли, а надосадову рідину змішували з сухим ліпопептидом у співвідношенні 0.5мг ліпопептиду на 750нмоль вірусного ліпиду, і перемішували, доки ліпопептид не розчиниться. Після цього додавали 128мг BioBeads SM-2 (Bio-Rad) до кожних 350 мікролітрів суміші, і детергент видаляли інтенсивним струшуванням суміші і гранул протягом однієї години. Після цього рідину перенесли до інших 64 мг таких гранул і продовжували струшувати протягом 10 хвилин. Одержана мутна поверхнева рідина містить вірусні мембрани і може застосовуватись для вакцинації з наступним очищенням або без нього.

Для аналізу фізичного зв'язку між ліпідами, ліпопептидами і вірусними протеїнами мутну суміш, яка містила відновлені вірусні мембрани, звантажували поверх дискретного градієнта цукрози, який містить 1мл «підкладинкового» шару, що складається з 40% розчину цукрози (мас./об.) в буфері А, і 4мл верхнього шару, що складається з 10% розчину цукрози (мас./об.) у буфері А (як показано на Фігурі 1). Обидва градієнти центрифугували протягом 90 хвилин при 100.000 g<sub>max</sub>, і збирали зразки із 40%-ої підкладинки та проміжного шару між 40% підкладинкою і 10% верхнім шаром, а також з верхнього шару. У цих градієнтах неінкорпоровані вірусні протеїни переміщуються у підкладинку під час центрифугування, а ліпіди і ліпопептиди, не присутні у відновлених мембранах, переміщуються у верхню частину градієнта, і відновлені вірусні мембрани можуть бути знайдені у проміжному шарі (Фігура 1). 15% вірусного ліпиду було виявлено біля поверхні градієнту, так само як

було виявлено 6% ліпопептиду. 85% вірусного ліпиду, 94% ліпопептиду і 60% протеїну вірусної мембрани, якими навантажений такий градієнт, як виявилось, були зв'язані з тонким шаром відновленої вірусної мембрани.

Для аналізу ліпідної композиції такого тонкого шару відновлювали два зразки відновлених вірусних мембран, одержаних відповідно до вищеписаного протоколу або за відсутності доданого ліпопептиду, із суміші 40/10% проміжного шару градієнту цукрози як описано вище, і екстрагували сумішшю CHCl<sub>3</sub>/MeOH відповідно до [Folch et al. (1957)]. Екстраговані ліпіди і ліпопептиди аналізували з допомогою двомірної тонкошарової хроматографії з CHCl<sub>3</sub>/метанол/H<sub>2</sub>O 65/25/4 в якості першого елюента, з наступним використанням суміші N-бутанол/оцтова кислота/вода 2/1/1, і забарвлювали шляхом дериватизації нінгідриним забарвлювачем (планшет сприскували 2% нінгідрином в N-бутанолі і інкубували при 80°C протягом 10 хвилин). Результати були наведені на Фігурі 2 і чітко вказують на фізичний зв'язок природних ліпідів вірусу з ліпопептидами.

Електронні мікрофотографії віросом, зібрані із тонкого шару градієнта, показані на Фігурі 3 і чітко вказують на частинки, розмір яких відповідає вірусу, а також на антигенні піки, які є характерними для вірусів грипу.

Приклад 2: Експерименти з інтраназальною імунізацією з використанням відновлених вірусних мембран, які містять ліпопептид N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, природні ліпіди вірусу грипу і протеїни мембран вірусу грипу.

Інтраназальну вакцинацію відновленими вірусними мембранами, які містять гемагглютинін вірусу грипу і N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, порівнювали з інтраназальним призначенням стандартної субодиночної вакцини або віросомної вакцини, одержаної відповідно до EP0538437. Мишей Balb/C імунізували інтраназальним закапуванням 10 мікролітрів антигену, який містить 5мкг протеїнів вірусу грипу, на 0-й і 14-й день. Зразки крові брали на 0-й, 14-й і 35-й день, назальні і легеневі рідини збирали на 35-й день. Порівнювали декілька різних штамів вірусу грипу. Кожну мишу імунізували одним видом штаму. Легеневі рідини збирали завдяки ін'єкції 1.5мл фосфатно-буферного сольового розчину в легені через шприц, з'єднаний із трахеєю, після чого здійснювали відсмоктування 1мл рідини. Рідини з носа отримували шляхом ін'єкції 0.5мл фосфатного буферного сольового розчину у зворотному напрямку через трахею у носоглотку, при цьому промивні рідини збирають біля ніздрів. Дебрис і клітинні компоненти негайно видаляли із змивної рідини центрифугуванням, і додавали суміш інгібітора протеази (хемстатин, антipeйн, леупептин, пепстатин, кінцева концентрація 1мікрограм/мл, із 1000 x концентрованого маткового розчину у сухому ДМСО), після чого зразки заморожували у рідкому азоті і зберігали при -20 градусах Цельсія до проведення аналізу. Зразки аналізували з допомогою IgA в носі і легенях і IgG твердофазним імуноферментним аналізом (ELISA)

щодо протеїнів грипу. Результати наведені на Фігурі 4 і Фігурі 5.

Приклад 3: Активність злиття мембран у відновленої вірусної мембрани, яка містить ліпопептид N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, природні ліпіди вірусу грипу, мічені піреном фосфатидилхоліні і протеїни мембран вірусу грипу.

Очищений і концентрований вірус грипу штаму A/Panama/2007/9 (1500нмоль фосфоліпиду) інкубували з 1мл окта (етилєнглїколь)-п-додециловим моноєфіром (C12E8) при концентрації 100ммоль протягом 10 хвилин при температурі 4°C, в ізотонічному буфері при нейтральному pH: 145ммоль NaCl, 2.5ммоль HEPES, 1ммоль EDTA, pH 7.4 (Буфер А). Після цього вірусну нуклеокапсиду і матричні протеїни видаляли центрифугуванням при 100,000×g протягом 30 хвилин при температурі 4°C. Гранули видаляли, а надосадову рідину змішували з сухим ліпопептидом і пірен-міченим фосфоліпідом у співвідношенні 0.5мг ліпопептиду на 150нмоль 1-гексадеканоїл-2-(1-пірендеканоїл)-sn-гліцеро-S-фосфатиділхоліну на 750нмоль вірусного ліпиду, і перемішували, доки ліпопептид пірен-мічений фосфоліпід не розчиняється. Після цього додавали 128мг BioBeads SM-2 (Bio-Rad) до кожних 350 мікролітрів суміші, і детергент видаляли інтенсивним струшуванням суміші і гранул протягом однієї години. Після цього рідину переносили до інших 64мг таких гранул і продовжували струшувати протягом 10 хвилин.

Для аналізу злиття мембран мембрани-мішені порожніх стром еритроцитів одержували із концентратів червоних клітин (кров групи В, резус фактор негативний) за методом Стека і Канта [Steck and Kant (1974)]. Злиття визначали при концентрації 0.06ммоль фосфоліпідів із стром еритроцитів і 1ммоль вірусної фосфоліпиди у буфері, що містить 140ммоль NaCl, 15ммоль цитрату натрію при pH 5.1. Змішування ліпідів контролювали за рахунок розведення ругРС. З цією метою визначали флуоресцентність піренового ексимера при збудженні і випромінєнні хвиль довжиною 345нм (смуга пропускання 2нм) і, відповідно, 490нм (смуга пропускання 16нм) у присутності відбиваючого фільтра 475нм у вихідному промені. Фонову флуоресцентність визначали при нескінченному розведенні зонда, яке досягалось додаванням 35мкл 0.2ммоль C12E8. Зміни у флуоресценції співвідносили зі ступенями злиття (f) обчисленням  $f = 100 \times (E_0 - E) / (E_0 - E_y)$ , де E відповідає флуоресценції ексимера у будь-який момент часу, а E<sub>0</sub> та E<sub>y</sub>, відповідно, представляють інтенсивності флуоресценції при довжині хвиль 490нм в нульовий момент часу і після додавання C12E8, при цьому обидва значення мають поправку на ефект розве-

дення. Результати, показані на Фігурі 6, чітко вказують на сильно виражену активність зв'язування у відновленої вірусної мембрани.

Приклад 4: Експерименти із внутрішньом'язовою імунізацією з використанням відновлених вірусних мембран, які містять ліпопептид N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, природні ліпіди вірусу грипу і протеїни мембран вірусу грипу, порівняно з імунізацією з використанням віросом, одержаних відповідно до EP 0538437.

25мкл антигену вірусу грипу (5мкг протеїну) призначали ін'єкцією у м'язи однієї із задніх ніг миші Balb/C на 0-й день. Зразки крові брали на 0-й і на 14-й день. Для одержання вакцини використовували вірус штаму A/Panama/2007/99. Зразки аналізували IgG ELISA щодо гемагглютиніну вірусу грипу. Результати показані на Фігурі 7.

Приклад 5: Фізичні характеристики функціонально відновлених вірусних мембран, які містять мембранні протеїни вірусу A/Wyoming, на основі рівноважного центрифугування градієнту густини.

Відновлені мембрани вірусних мембран, які містять ліпопептид N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(лізил)<sub>3</sub>-лізин, отримані як описано у прикладі 1, завантажували поверх 10-60% мас./об. градієнту цукрози і центрифугували при 50000об./хв. у роторі Бекмана SW55 протягом 16 годин. У цьому різновиді градієнта ліпіди і ліпопептиди залишається зверху, тоді як протеїни переміщуються до найнижчої фракції. Зразки градієнта аналізували рефрактометрією для визначення протеїну і фосфоліпиду. Результати, показані на Фігурі 8, свідчать, що, по суті, весь вірусний протеїн і більшість вірусного ліпиду одночасно очищуються на єдиному піку. Також ліпопептиди відновлювались лише із фракцій 4, 5 і 6. Ці дані вказують на те, що відновлені мембрани представляють собою частинки густиною приблизно 1.12г/мл.

Приклад 6: Експерименти із інтраназальною імунізацією з використанням відновлених вірусних мембран, які містять ліпопептид N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(пропіл)<sub>3</sub>-пролін, природні ліпіди вірусу грипу і протеїни мембран вірусу грипу.

Мембрани одержували з A/Panama/2007/99 як описано у прикладі 1 вище і використовували для імунізації мишей як описано у прикладі 2. ELISA IgG титри у сироватці, а також титри IgA з носу і легень показані на Фігурах 9 і 10. Ці дані вказують на те, що лізинові і пролінові похідні N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серилу викликають приблизно однакове посилення імунної відповіді.

Ліпопептиди, особливо придатні для одержання відновлених вірусних мембран згідно з винаходом

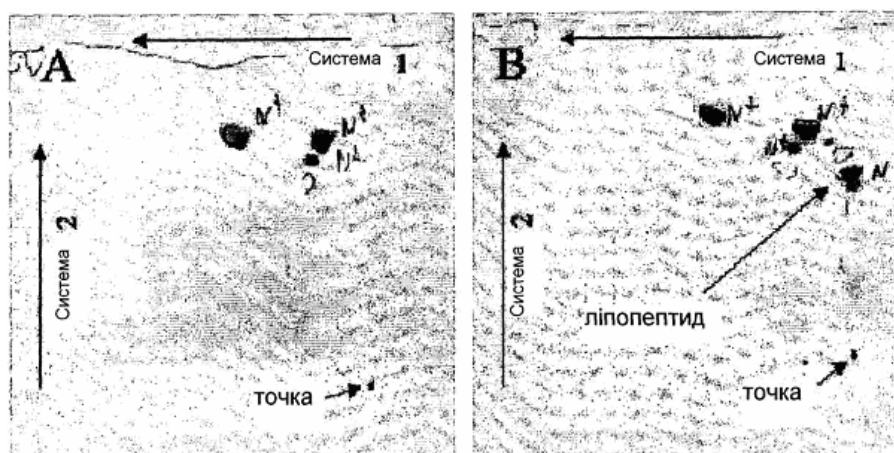
N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-серин
S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-серин
N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(лізил) <sub>3</sub> -лізин
S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(лізил) <sub>3</sub> -лізин
N-пальмітоїл-S-2,3(бісолеоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил(лізил) <sub>3</sub> -лізин
S-2,3(бісолеоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(лізил) <sub>3</sub> -лізин
N-пальмітоїл-S-2,3(бісміристоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(лізил) <sub>3</sub> -лізин
S-2,3(бісміристоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(лізил) <sub>3</sub> -лізин
N-пальмітоїл-S-3(пальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(лізил) <sub>3</sub> -лізин
N-пальмітоїл-S-2,3 гідроксипропіл-цистеїніл-серил-(лізил) <sub>3</sub> -лізин
N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(пропіл) <sub>3</sub> -пролін
N-пальмітоїл-S-2,3(біспальмітоїлокси)-пропіл-цистеїніл-серил-(глютамініл) <sub>3</sub> -глютамінова кислота

#### Література

1. Arkema, A. (2000) Vaccine 18: 1327-1333
2. Böttcher C.J.F, Van Gent C M., Fries C. J. (1961) Anal Chim Acta 24: 203-204
3. Bungener, L (2002) Vaccine 20: 323-338
4. Cox J.C. , Sjolander A. , Barr I.G. (1998) Adv Drug Delivery 32: 247-271
4. Dinarello, C. A. (1978) J. Infect. Dis. 138: 760-767
5. Folch, H. et al. (1957) J. Bid. Chem 226,497-509
6. Glück, R. et al., (1994) J Infect Dis 181: 1129-1132
7. Hernandez, L. D: et al., (1996) Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 12: 627-661
8. Janeway, C. et al. (2001) Immunobiology, 5th edition, Garland Publishing, New York

9. Kohashi, O. et al. (1980) Infect. Immun. 20: 70-75
10. Kotani, S. et al., (1976), Biken J. 19: 9-13
11. Morein et al. (1984) Nature 308: 457-460
12. Ogra PL, Faden H, Welliver RC (2001) Clin Microbiol Rev 14: 430-445
13. Powell, M. F. et al., (1988) 5: 528-532
14. Ribi, E. E. (1979) Cancer Res. 39: 4756-4759
15. Steck, T. L. and Kant, J. A. (1974) Meth. Enzym. 31: 172-180
16. Stegmann T., Morselt H.W.M., Booy F.P., Van Breemen J.F.L.Scherphof G., Wilschut J.(1987) EMBO J 6: 2651-2659
17. Weijzen S, et al., (2002) J. Immunol 169: 4237-4238

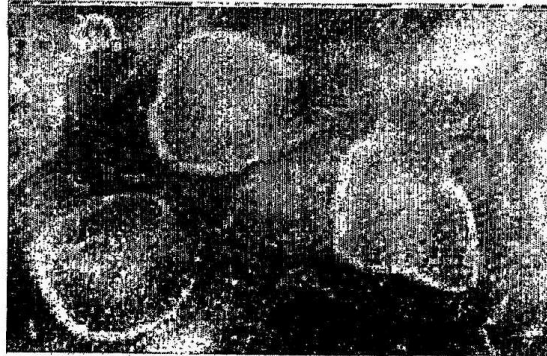
ФІГ. 1



ФІГ. 2



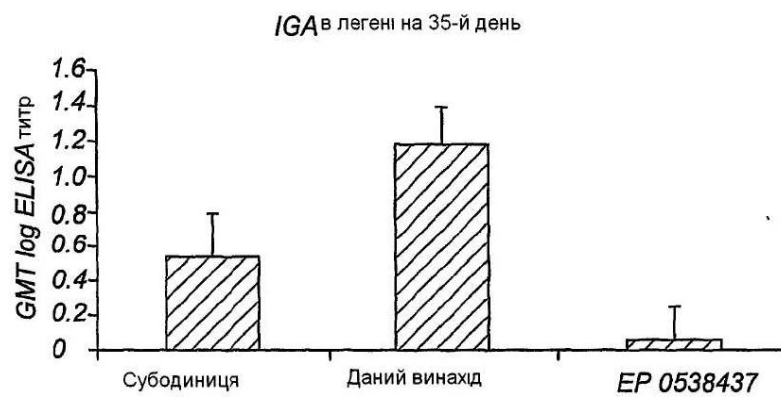
ФІГ. 3



ФІГ. 4a

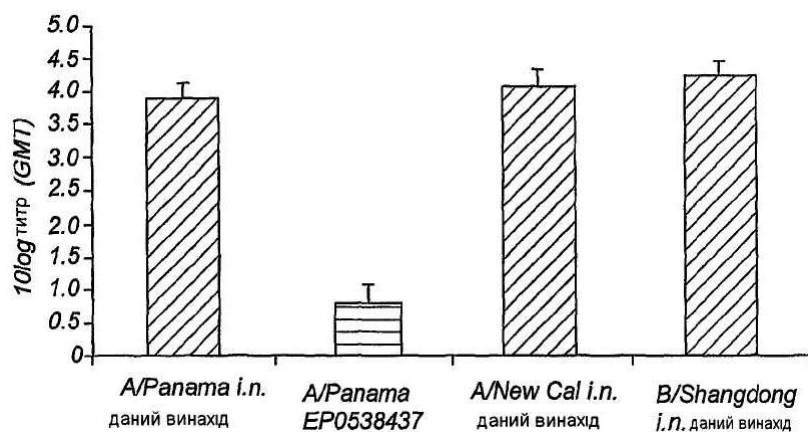


ФІГ. 4b

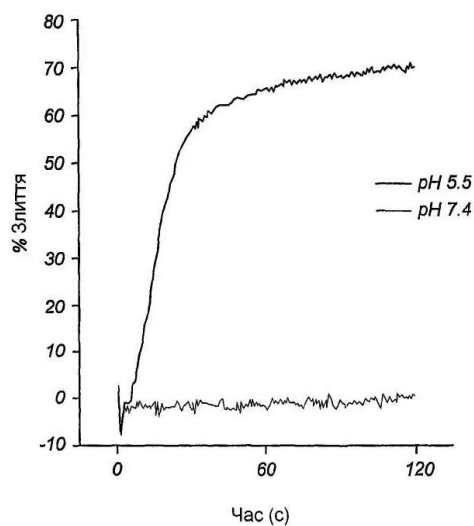


# ФІГ. 5

IgG ELISA титри в сироватці на 35-й день



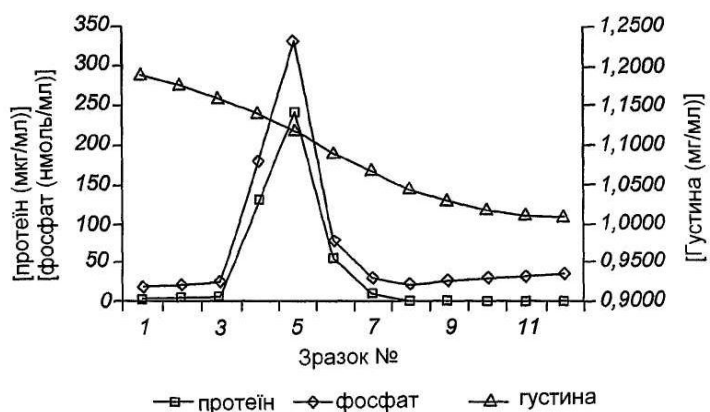
ФІГ. 6



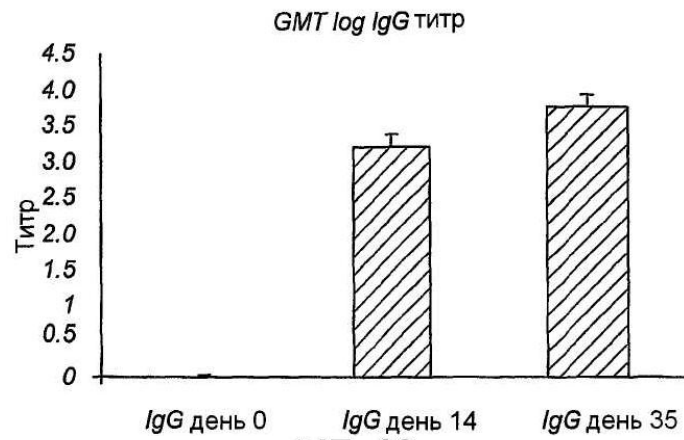
ФІГ. 7



ФІГ. 8



# **ФІГ. 9**



# **ФІГ. 10**

