



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/12 (2018.08); A61P 31/12 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2015136683, 31.01.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.01.2014

Дата регистрации:
26.12.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
31.01.2013 US 61/759,131

(43) Дата публикации заявки: 06.03.2017 Бюл. № 7

(45) Опубликовано: 26.12.2018 Бюл. № 36

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 31.08.2015

(86) Заявка РСТ:
US 2014/014284 (31.01.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/121132 (07.08.2014)

Адрес для переписки:
123242, Москва, пл. Кудринская, д. 1, а/я 35,
"Михайлюк, Сороколат и партнеры -
патентные поверенные"

(72) Автор(ы):

СТЕДМАН Кеннет М. (US),
ЛЕЙДЛЕР Джеймс Р. (US),
БАХДЖАТ Кит (US)

(73) Патентообладатель(и):

ПОРТЛАНД СТЕЙТ ЮНИВЕРСИТИ (US),
ПРОВИДЕНС ХЕЛС ЭНД СЕРВИСЕЗ -
ОРЕГОН (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2440098 C2, 20.01.2012. US
2011123620 A1, 26.05.2011. LAIDLER et al.
Virus Silicification under Simulated Hot Spring
Conditions, ASTROBIOLOGY, vol. 10, no. 6,
24.08.2008, pages 569-576.

(54) ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ СИЛИКАТИРОВАННЫЙ ВИРУС, И
СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится медицине, в частности к способу индуцирования у субъекта вирус-специфического иммунного ответа, а также к иммуногенной композиции. Раскрывается способ индуцирования у субъекта вирус-специфического иммунного ответа, предусматривающий введение субъекту эффективного количества силикатированного вируса или силикатированных вирусных частиц. Также раскрыта иммуногенная композиция,

содержащая силикатированный вирус или силикатированную вирусную частицу и фармацевтически приемлемый носитель или адъювант, где вирус представляет собой вирус осповакцины, ротавирус, аденовирус, вирус гриппа, лентивирус, флавивирус, вирус гепатита, пикорнавирус или коронавирусы. Группа изобретений обеспечивает сохранность инфекционности вируса и способность индуцировать иммунный ответ у

инфицированного хозяина. Кроме того, силикатированный вирус является устойчивым к

обезвоживанию. 2 н. и 19 з.п. ф-лы, 7 ил., 2 табл., 3 пр.

R U 2 6 7 6 0 8 3 C 2

R U 2 6 7 6 0 8 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 39/12 (2018.08); A61P 31/12 (2018.08)(21)(22) Application: **2015136683, 31.01.2014**(24) Effective date for property rights:
31.01.2014Registration date:
26.12.2018

Priority:

(30) Convention priority:
31.01.2013 US 61/759,131(43) Application published: **06.03.2017 Bull. № 7**(45) Date of publication: **26.12.2018 Bull. № 36**(85) Commencement of national phase: **31.08.2015**(86) PCT application:
US 2014/014284 (31.01.2014)(87) PCT publication:
WO 2014/121132 (07.08.2014)

Mail address:

**123242, Moskva, pl. Kudrinskaya, d. 1, a/ya 35,
"Mikhajlyuk, Sorokolat i partnery - patentnye
poverennye"**

(72) Inventor(s):

**STEDMAN, Kenneth, M. (US),
LAIDLER, James, R. (US),
BAHJAT, Keith (US)**

(73) Proprietor(s):

**PROVIDENCE HEALTH & SERVICES -
OREGON (US),
PORTLAND STATE UNIVERSITY (US)**(54) **IMMUNOGENIC COMPOSITIONS COMPRISING SILICIFIED VIRUS AND METHODS OF USE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine, in particular, to a method for inducing a virus-specific immune response in a subject, as well as to an immunogenic composition. Disclosed is a method for inducing a virus-specific immune response in a subject, comprising administering an effective amount of a silicified virus or silicified viral particles to the subject. Also disclosed is an immunogenic composition comprising a silicified virus or a silicified viral particle

and a pharmaceutically acceptable carrier or adjuvant, where the virus is a vaccinia virus, rotavirus, adenovirus, influenza virus, lentivirus, flavivirus, hepatitis virus, picornavirus or coronavirus.

EFFECT: group of inventions enables to maintain infectiousness of the virus and the ability to induce an immune response in an infected host, and in addition, the silicified virus is resistant to dehydration.

21 cl, 7 dwg, 2 tbl, 3 ex

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки США №61/759131, поданной 31 января 2013 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное раскрытие относится к консервации вирусов и ассоциированных с ними частиц путем нанесения на них покрытия диоксида кремния. Данное раскрытие дополнительно относится к иммуногенным композициям, содержащим силикатированный вирус или вирусные частицы, и их применению для индуцирования или изменения у субъекта иммунного ответа.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ПОДДЕРЖКИ

Настоящее изобретение было создано при поддержке правительственного гранта под номером NNA11AC01G, выданного Национальным управлением по аэронавтике и освоению космического пространства, и гранта под номером DGE:0114427, выданного Национальным научным фондом. Правительство обладает определенными правами в отношении настоящего изобретения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Механизмы рассеивания вирусов, в особенности вирусов организмов, являющихся эндемичными для обособленных “островных” экосистем (например, термальных источников), плохо изучены и остаются темой частых дискуссий. Существуют разногласия в отношении того, являются ли вирусы космополитными видами (Breitbart and Rohwer, Trends Microbiol 13:278, 2005) или демонстрируют региональную эндемичность. В то время, как в ряде исследований продемонстрированы четкие региональные отличия в геномах вирусов (Whitaker et al., Science 301:976, 2003), указывая на ограниченное рассеивание, в нескольких других выявили глобальное распространение определенных вирусов с практически идентичными геномами (Breitbart et al., FEMS Microbiol Lett 236:249, 2004; Short and Suttle, Appl Environ Microbiol 71:480, 2005). С учетом большого значения вирусов в поддержании многообразия микроорганизмов и в переработке биогенных питательных веществ (Suttle, Nat Rev Microbiol 5:801, 2007), все, что воздействует на рассеивание вирусов, будет оказывать существенное воздействие на окружающую среду.

В одном исследовании было показано, что локальное рассеивание вирусов может являться результатом распыления вируса в виде аэрозолей термальными источниками фумаролами (Snyder et al., Proc Natl Acad Sci USA 104:19102, 2007), подтверждая, что распространение на более дальние расстояния возможно тогда, когда частицы могут достигать потоков воздуха в средних слоях атмосферы (Smith et al., Aerobiologia 26:35, 2010). Ограничивающим фактором распространения вирусов, переносимых ветром, является способность вируса проявлять устойчивость к высушиванию, поскольку большинство вирусов являются очень чувствительными к обезвоживанию (Ding et al., Gynecol Oncol 121:148, 2011; Fogarty et al., Virus Res 132:140, 2008; Nakano et al., Fish Pathol 33:65, 1998) и в аэрозольной форме будут быстро утрачивать инфекционность.

Предшествующие исследования показали, что на вирусы можно наносить покрытие диоксида кремния в условиях имитации термальных источников (Laidler and Stedman, Astrobiology 10:569, 2010; Orange et al., Biogeosciences 8:1465, 2011). В то же время, до настоящего раскрытия было неизвестно, сохраняют ли вирусы, покрытые диоксидом кремния, инфекционность или способность индуцировать иммунный ответ у инфицированного хозяина.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

В данном документе раскрываются силикатированные вирусные частицы, которые сохраняют способность к инфицированию клеток-хозяев и индуцированию вирус-специфического иммунного ответа *in vivo*.

Предлагается способ индуцирования у субъекта специфического иммунного ответа (например, вирус-специфического иммунного ответа) в отношении выбранного антигена (ов) (например, вирусных антигенов) путем введения субъекту эффективного количества силикатированных вирусов/вирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ включает активацию вирус-специфических Т-клеток, выработку вирус-специфических антител, выработку цитокинов или их любую комбинацию.

Также предлагаются иммуногенные композиции, содержащие силикатированную частицу (например, силикатированную вирусную частицу) и фармацевтически приемлемый носитель и/или адъювант.

Кроме того, предлагается способ усиления у субъекта антиген- (например, вирусного антиген-) специфического, клеточно-опосредованного иммунного ответа путем введения субъекту силикатированного вируса или силикатированных вирусных частиц, где антиген-специфический клеточно-опосредованный иммунный ответ повышается по сравнению с клеточно-опосредованным иммунным ответом после введения несиликатированных вирусов или вирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления повышение вирус-специфического клеточно-опосредованного иммунного ответа определяют по повышению количества вирус-специфических Т-клеток, повышению активации вирус-специфических Т-клеток, повышению выработки цитокинов или их любой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления раскрытых способов и композиций вирус инфицирует эукариотические клетки, такие как клетки животных. В конкретных примерах вирус представляет собой вирус млекопитающего.

Приведенные выше и другие объекты, признаки и преимущества настоящего изобретения станут более очевидными из следующего подробного описания, которое выполнено со ссылкой на прилагаемые графические материалы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1А представлен график, показывающий обратимую инактивацию вирусов при обработке диоксидом кремния. Показано воздействие силикатирования на инфекционность бактериофага Т4 (ромбы), SSV-K (квадраты), PRD1 (треугольники) и VACV (звездочки), нормированное по отношению к исходной инфекционности. Черными символами обозначен раствор с 600 ppm (частями на миллион) (10 mM) диоксида кремния, серыми символами с 300 ppm (5 mM) и белыми символами контроль (0 ppm диоксида кремния). Вертикальная черная стрела указывает на переход к низкому содержанию диоксида кремния. Все анализы бляшкообразования проводили в трех повторах с тремя биологическими повторами за исключением VACV, который имел лишь один биологический повтор. "Усы" прикрыты точками данных на графике.

На фиг. 1В представлен график, показывающий, что силикатированные вирусы являются устойчивыми к обезвоживанию. Показано воздействие силикатирования на инфекционность силикатированных вирусов (Т4 и SSV-K) после обезвоживания, нормированное по отношению к исходной инфекционности. Белые столбцы показывают инфекционность после десяти дней силикатирования; заштрихованные после десяти дней обезвоживания и после десяти дней регидратации; черные столбцы после тридцати дней обезвоживания и десяти дней регидратации.

На фиг. 2 представлена схема эксперимента для оценки иммунных ответов у мышей после введения силикатированного и несиликатированного VACV.

На фиг. 3 представлен ряд графиков, показывающих частоту обнаружения и количество CD8⁺T-клеток, специфичных к антигену B8R VACV, и IFN- γ /B8R-специфичных T-клеток после введения силикатированного и несиликатированного VACV.

На фиг. 4 представлен ряд графиков, показывающих количество в процентах эффектора, специфичного к антигену B8R VACV, и T-клеток памяти после введения силикатированного и несиликатированного VACV.

На фиг. 5 представлен ряд графиков, показывающих частоту появления и количество CD8⁺T-клеток, специфичных к антигену B8R VACV, и IFN- γ /B8R-специфичных T-клеток после бустерного введения силикатированного и несиликатированного VACV.

На фиг. 6 представлен ряд графиков, показывающих количество в процентах эффектора, специфичного к антигену B8R VACV, и T-клеток памяти после бустерного введения силикатированного и несиликатированного VACV.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

I. Сокращения

ELISA иммуноферментный твердофазный анализ

HIV вирус иммунодефицита человека

IFN интерферон

IL интерлейкин

MHC главный комплекс гистосовместимости

MWCO отсечение по молекулярной массе

PFU бляшкообразующая единица

SSV-K веретеновидный вирус-Камчатка 1, инфицирующий *Sulfolobus*

TGF трансформирующий фактор роста

TNF фактор некроза опухолей

VACV вирус осповакцины

II. Терминология и способы

Если не указано иное, технические термины используют согласно традиционному употреблению. Определения общепринятых в молекулярной биологии терминов можно найти в Benjamin Lewin, *Genes V*, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: Comprehensive Desk Reference*, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) и "Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses," published by Elsevier Academic Press, 2005 (ISBN 0-12-249951-4, Claude M. Fauquet et al., Eds).

Для упрощения ознакомления с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия приведены следующие пояснения конкретных терминов.

Аденовирус: безоболочечный вирус икосаэдрической формы с геномом, который представлен молекулой двухцепочечной линейной ДНК. Известно примерно 57 серотипов аденовирусов, инфицирующих людей, которые являются причиной 5-10% инфекций верхних дыхательных путей у детей.

Адьювант: вещество или среда, которая неспецифически повышает иммунный ответ на антиген. Адьювант может включать суспензию минеральных веществ (квасцы, гидроксид или фосфат алюминия), на которых адсорбирован антиген, или эмульсию вода в масле, в которой раствор антигена эмульгирован в минеральном масле (например, неполный адьювант Фрейнда), иногда с добавлением убитых микобактерий (полный адьювант Фрейнда) для дополнительного повышения антигенности. Олигонуклеотиды

с иммуностимулирующими свойствами (такие как содержащие мотив CpG) можно также использовать в качестве адъювантов (например, см. патенты США №№6194388; 6207646; 6214806; 6218371; 6239116; 6339068; 6406705 и 6429199). Адъюванты также включают биомолекулы, такие как ко-стимулирующие молекулы и агонисты образраспознающих рецепторов (такие как агонисты толл-подобных рецепторов). Агонисты толл-подобных рецепторов (TLR) включают, например, агонистов TLR3 (например, синтетическая двухцепочечная РНК, такая как поли I:C), агонистов TLR4 (например, монофосфорил липид А), агонистов TLR7/8 (например, соединения имидазохинолина, такие как имиквимод и резиквимод, одноцепочечный полиуридин (polyU)), агонистов TLR9 (например, олигодезоксинуклеотиды CpG). Другие иллюстративные биологические адъюванты включают IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L и 41 BBL.

Введение: используемое в данном документе введение субъекту композиции (например, иммуногенной композиции) означает давать композицию субъекту, применять композицию по отношению к субъекту или приводить композицию в контакт с субъектом. Введение можно осуществлять посредством какого-либо из путей, таких как, например, местный, пероральный, подкожный, ингаляционный, интраперитонеальный, внутривенный, интратекальный и внутримышечный.

Антитело: молекула иммуноглобулина со специфичной аминокислотной последовательностью, вырабатываемая В-лимфоидными клетками. Выработка антител у людей и других животных индуцируется специфическим антигеном (иммуногеном). Антитела характеризуются тем, что они специфически вступают в реакцию с антигеном некоторым очевидным путем, при этом антитело и антиген каждый определяются в контексте по отношению друг к другу. “Вызывать гуморальный иммунный ответ” относится к способности антигена или другой молекулы индуцировать выработку антител.

Антиген: соединение, композиция или вещество, которые могут стимулировать у животного выработку антител или Т-клеточного ответа, в том числе композиции, которые вводятся животному или всасываются у животного. Антиген вступает в реакцию с продуктами специфичного гуморального или клеточного иммунитета, в том числе с теми, которые индуцированы гетерологичными иммуногенами. В контексте настоящего раскрытия термин “антиген” включает, например, нативные антигены (такие как антигены, присутствующие на частицах вируса дикого типа) или антигены, представляющие собой рекомбинантную или полученную посредством генной инженерии вирусную частицу.

Клеточно-опосредованный иммунитет: иммунный ответ, в который не вовлечены антитела, но в который вовлечена активация фагоцитов, природных клеток-киллеров (NK), антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов и высвобождение ряда цитокинов в ответ на антиген. Исторически так сложилось, что иммунную систему разделяли на две части - гуморальный иммунитет, защитную функцию которого при иммунизации можно выявлять в жидкости организма (бесклеточной физиологической жидкости или сыворотке), и клеточный иммунитет, защитная функция которого ассоциируется с клетками. CD4⁺Т-клетки или хелперные Т-клетки обеспечивают защиту от различных патогенов. Цитотоксические Т-клетки вызывают гибель посредством апоптоза без использования цитокинов, поэтому цитокины не всегда вовлечены в клеточно-опосредованный иммунитет. Клеточный иммунитет защищает организм путем активации антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов, которые способны индуцировать в организме апоптоз клеток, демонстрирующих присутствие эпитопов

чужеродного антигена на своей поверхности, таких как инфицированные вирусами клетки, инфицированные внутриклеточными бактериями клетки и раковые клетки, демонстрирующие присутствие опухолевых антигенов; активации макрофагов и естественных клеток-киллеров, предоставляя им возможность разрушать патогены; и стимуляции клеток для секретирования различных цитокинов, которые воздействуют на функцию других клеток, вовлеченных в адаптивные иммунные ответы и врожденные иммунные ответы. Клеточно-опосредованный иммунитет прежде всего направлен на микроорганизмы, которые выживают в фагоцитах, и на микроорганизмы, которые инфицируют клетки, не являющиеся фагоцитами. Он наиболее эффективен в удалении инфицированных вирусом клеток, но также и принимает участие в защите против грибов, простейших, злокачественных новообразований и внутриклеточных бактерий. Используемый в данном документе “Т-клеточно-опосредованный иммунный ответ” представляет собой иммунный ответ, характеризующийся выработкой и/или активацией антиген-специфических (как, например, вирус-специфических) Т-клеток. Т-клеточно-опосредованный иммунный ответ может включать цитотоксический Т-клеточный ответ и/или хелперный Т-клеточный ответ.

Цитокины: белковые молекулы, которые секретируются клетками и выполняют функцию сигнальных молекул. В целом цитокины относятся к иммуномодулирующим белкам, включающим, например, интерлейкины (например, от IL-1 до IL-20), интерфероны (например, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , белки, представляющие собой трансформирующий фактор роста (TGF) (например, TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3), представителей семейства фактора некроза опухолей (TNF) (например, TNF- α , TNF- β , LT- β , CD154, TRAIL), а также другие молекулы, вовлеченные в регуляцию иммунитета (например, эритропоэтин, фактор стволовых клеток, M-CSF).

Флавивирус: флавивирусы являются представителями семейства Flaviviridae и включают следующие хорошо изученные вирусы: вирус Западного Нила, вирус денге (вирус денге 1-4 типов), вирус клещевого энцефалита, вирус желтой лихорадки, вирус японского энцефалита, вирус Повассан и вирус энцефалита Сент-Луис. Флавивирусы представляют собой оболочечные вирусы с икосаэдрическим типом симметрии и геномом, который представлен молекулой смысловой одноцепочечной РНК положительной полярности.

Иммунный ответ: ответ клетки иммунной системы, такой как В-клетка, Т-клетка, макрофаг или гранулоцит, на стимул, такой как антиген. Иммунный ответ может включать любую клетку организма, вовлеченную в ответ иммунной защиты организма, включая, например, эпителиальную клетку, которая секретирует интерферон или цитокин. Иммунный ответ включает без ограничения врожденный иммунный ответ или воспаление. Используемый в данном документе защитный иммунный ответ относится к иммунному ответу, который защищает субъекта от инфицирования (предупреждает инфицирование или развитие заболевания, ассоциированного с инфицированием). Используемый в данном документе терапевтический иммунный ответ относится к иммунному ответу, который воздействует на вирусную инфекцию, способствуя таким образом элиминации вируса. Способы оценки иммунных ответов хорошо известны из уровня техники и включают, например, оценку пролиферации и/или активности лимфоцитов (таких как В- или Т-клетки), секреции цитокинов или хемокинов, воспаления, выработки антител и т.д.

Иммунизация: предоставление субъекту защиты от заболевания (например, инфекционного заболевания), например, путем вакцинации.

Иммуногенная композиция: используемый в данном документе термин означает

композицию, применимую для стимулирования или вызова специфического иммунного ответа (или иммуногенного ответа). Иммуногенная композиция включает силикатированный вирус. В некоторых вариантах осуществления иммуногенный ответ является защитным или обеспечивает защитный иммунитет в том смысле, что он

5 наделяет субъекта лучшей устойчивостью к инфицированию вирусом или к прогрессированию заболевания, вызванного вирусом, против которого направлена иммуногенная композиция.

Не вдаваясь в конкретную теорию, полагают, что иммуногенный ответ, индуцированный иммуногенной композицией, может быть обусловлен образованием

10 антитела, специфичного к одному или нескольким эпитопам, обеспечиваемым иммуногенной композицией. В качестве альтернативы, ответ может включать ответ, обусловленный Т-хелпером или цитотоксической Т-клеткой на один или несколько эпитопов, обеспечиваемых иммуногенной композицией. Все из трех данных ответов могут инициироваться наивными клетками или клетками памяти. Одним конкретным

15 примером типа иммуногенной композиции является вакцина.

В некоторых вариантах осуществления “эффективное количество” или “иммуностимулирующее количество” иммуногенной композиции представляет собой количество, которое при введении субъекту является достаточным для возникновения выявляемого иммунного ответа. Такой ответ может включать, к примеру, образование

20 антител, специфичных к одному или нескольким эпитопам, обеспечиваемым иммуногенной композицией. В качестве альтернативы, ответ может включать ответ, обусловленный Т-хелпером или CTL (цитотоксическим Т-лимфоцитом) на один или несколько эпитопов, обеспечиваемых иммуногенной композицией. Все из трех данных ответов могут инициироваться наивными клетками или клетками памяти. В других

25 вариантах осуществления “защитное эффективное количество” иммуногенной композиции представляет собой количество, которое при введении субъекту является достаточным для обеспечения защитного иммунитета у субъекта. В других вариантах осуществления “терапевтически эффективное количество” иммуногенной композиции представляет собой количество, которое при введении субъекту является достаточным

30 для лечения вирусной инфекции, например, ускорения элиминации вируса.

Вирус гриппа: вирус с геномом, который представлен молекулой фрагментированной одноцепочечной РНК отрицательной полярности, принадлежит к семейству Orthomyxoviridae. Известно три преобладающих типа вирусов гриппа, А, В и С. Вирусы гриппа А инфицируют множество птиц и млекопитающих, в том числе людей, лошадей,

35 морских млекопитающих, свиней, хорьков и курей. Большинство вирусов гриппа А вызывает у животных легкие местные инфекции респираторного тракта и кишечника. Тем не менее, высоковирулентные штаммы гриппа А, такие как H5N1, вызывают у птиц системные инфекции, при которых смертность может достигать 100%. H5N1 также имеет название “птичий грипп”. В 2009 грипп H1N1 являлся наиболее частой причиной

40 гриппа у людей. В 2009 году возник новый штамм рекомбинантного H1N1 свиного происхождения, и Всемирной организацией здравоохранения он был объявлен пандемическим. Данный грипп также имеет название “свиной грипп”. H3N2, H2N2 и вирусы гриппа В также инфицируют людей и также являются возбудителями сезонного гриппа.

Выделенный: “выделенный” или “очищенный” биологический компонент (такой как нуклеиновая кислота, пептид, белок, белковый комплекс, вирус или частица), который фактически был отделен от, получен независимо от или очищен от других биологических компонентов, таких как иная хромосомная и внехромосомная ДНК и РНК, а также

белки. Нуклеиновые кислоты, пептиды, белки и вирусы, которые были “выделены” или “очищены” таким образом, содержат нуклеиновые кислоты, белки и вирусы, очищенные с помощью стандартных способов очистки. Данный термин также охватывает нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные с помощью рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также полученные химическим синтезом нуклеиновые кислоты или белки. Термин “выделенный” или “очищенный” не подразумевает абсолютной чистоты, скорее, он считается относительным понятием. Так, например, выделенный биологический компонент представляет собой такой, в котором биологический компонент является более насыщенным, чем биологический компонент в природной среде (как, например, в клетке, или другой системе производства). Предпочтительно, препарат очищают таким образом, что содержание биологического компонента составляет по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более от общего содержания биологических компонентов в препарате.

Лентивирус: род вирусов, принадлежащий к семейству Retroviridae, характеризующийся продолжительным инкубационным периодом. Лентивирусы способны к инфицированию непролиферирующих клеток, что отличает данных вирусов от других типов ретровирусов. Лентивирусы представляют собой оболочечные вирусы с геномом, состоящим из двух идентичных сегментов одноцепочечной РНК, которые подвергаются обратной транскрипции в ДНК при инфицировании клеток-хозяев. Лентивирусы включают, например, вирус иммунодефицита человека (HIV; в том числе HIV-1 и HIV-2), вирус иммунодефицита обезьян (SIV) и вирус иммунодефицита кошек (FIV). Лентивирусы широко используются как основа для геннотерапевтических векторов.

Фармацевтически приемлемые носители: фармацевтически приемлемые носители, используемые в данном раскрытии, являются стандартными. В Remington's Pharmaceutical Sciences, by E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975) описаны композиции и составы, подходящие для лекарственной доставки иммуногенных композиций.

В целом, тип носителя будет зависеть от конкретного используемого режима введения. Например, составы для парентерального введения обычно содержат инъекционные жидкости, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический солевой раствор, сбалансированные солевые растворы, водный раствор декстрозы, глицерин или подобные им в качестве носителя. Для твердых композиций (например, формы в виде порошка, пилюли, таблетки или капсулы) стандартные нетоксические твердые носители могут включать, например, маннит, лактозу, крахмал или стеарат магния со степенями чистоты для фармации. Помимо биологически нейтральных носителей подлежащих введению фармацевтические композиции могут содержать незначительные количества нетоксических вспомогательных веществ, таких как увлажняющие или эмульгирующие средства, консерванты и буферизующие средства для установления pH и им подобные, например ацетат натрия или сорбитанмолаурат.

Парвовирус: любой вирус, принадлежащий к семейству Parvoviridae. Парвовирусы представляют собой мелкие (диаметром приблизительно 18-26 нанометров) безоболочечные вирусы с геномом, представленным молекулой одноцепочечной ДНК, и икосаэдрическим капсидом. Парвовирусы включают, например, мелкий вирус мышей, парвовирус собак, парвовирус B19 человека и аденоассоциированные вирусы (AAV). Парвовирусы также широко используются в качестве геннотерапевтических средств.

PhiX174: хорошо изученный бактериофаг семейства Microviridae с геномом, представленным молекулой кольцевой одноцепочечной ДНК, кодирующей 11 белков. PhiX174 представляет собой мелкий (диаметром приблизительно 30 нм) безоболочечный вирус.

5 Пикорнавирус: любой вирус, принадлежащий к семейству Picornaviridae. Пикорнавирусы представляют собой безоболочечные вирусы, геном которых представлен молекулой одноцепочечной РНК положительной полярности, с мелким (диаметром приблизительно 30 нм) икосаэдрическим капсидом. Пикорнавирусы разделены на ряд родов и включают множество важных патогенных микроорганизмов
10 людей и животных. Они вызывают разнообразные заболевания, варьирующие от острых вирусных заболеваний дыхательных путей до полиомиелита, хронических инфекций у сельскохозяйственных животных. Пикорнавирусы включают, например, энтеровирусы (такие как полиовирус и вирус Коксаки), риновирусы, вирус ящура, вирусы энцефаломиокардита и вирус гепатита А.

15 Предупреждение, лечение или уменьшение интенсивности заболевания: “предупреждение” заболевания означает подавление полного развития заболевания. “Лечение” относится к терапевтическому вмешательству, которое уменьшает интенсивность течения или симптома заболевания или патологического состояния после того, как оно начало развиваться. “Уменьшение интенсивности” относится к
20 снижению числа или тяжести одного или нескольких признаков или симптомов заболевания.

Рекомбинантные: рекомбинантная нуклеиновая кислота, белок или вирус представляет собой такой, который характеризуется не встречающейся в природе последовательностью или характеризуется последовательностью, полученной путем
25 искусственного объединения двух разделенных иным способом сегментов последовательности. Такое искусственное объединение зачастую осуществляют путем химического синтеза или путем искусственной манипуляции выделенных сегментов нуклеиновых кислот, например, с помощью методик генной инженерии.

Ротавирус: безоболочечный вирус с геномом, представленным двухцепочечной РНК, с икосаэдрической симметрией. Ротавирус является наиболее частой причиной тяжелой
30 диареи у младенцев и детей младшего возраста. Известно семь видов ротавируса, обозначенных как А, В, С, D, Е, F и G.

Диоксид кремния: диоксид кремния (SiO_2) встречается в кристаллической, аморфной формах и в форме с примесями (а именно кварц, опал и песок, соответственно). Диоксид
35 кремния представляет собой тугоплавкий нерастворимый материал, используемый в производстве стекла, изделий из керамики и абразивных материалов.

Силикатирование: процесс нанесения покрытия из диоксида кремния или пропитывание им.

40 Силикатированный вирус или вирусная частица: вирус или вирусная частица, на которую наносили покрытие из диоксида кремния. В некоторых вариантах осуществления вирус или вирусная частица считается силикатированной после выдерживания в растворе диоксида кремния при концентрации от приблизительно 100 ppm до приблизительно 1000 ppm диоксида кремния, например, приблизительно 150 ppm, приблизительно 300 ppm, приблизительно 450 ppm, приблизительно 600 ppm,
45 приблизительно 750 ppm или приблизительно 900 ppm диоксида кремния, на протяжении от приблизительно 1 до приблизительно 10 дней, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней. В ряде примеров вирус или вирусная частица считается силикатированной после выдерживания в растворе диоксида кремния, концентрация которого составляет от

приблизительно 300 ppm до приблизительно 600 ppm (от приблизительно 5 mM до приблизительно 10 mM) диоксида кремния на протяжении от 1 до 10 дней. В других вариантах осуществления вирус силикатируется после выдерживания в растворе диоксида кремния, концентрация которого составляет от приблизительно 100 ppm до 5 приблизительно 1000 ppm на протяжении по меньшей мере 10 дней, например, (без ограничения) 10 дней, 12 дней, 14 дней, 16 дней, 18 дней или 20 дней. В некоторых вариантах осуществления вирус или вирусная частица считается силикатированной, если по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% площади поверхности вируса или вирусной 10 частицы покрыто диоксидом кремния.

Субъект: живые многоклеточные позвоночные организмы, категория, включающая как человека, так и не относящихся к людям млекопитающих.

Терапевтически эффективное количество: количество определенного средства (такого как иммуногенная композиция), достаточное для достижения желаемого эффекта у 15 субъекта, подвергающегося лечению таким средством. Например, это может представлять собой количество противовирусной вакцины (такой как вакцина на основе силикатированного вируса), используемой для вызова у субъекта иммунного ответа и/или для предупреждения инфицирования вирусом. В контексте настоящего раскрытия терапевтически эффективное количество противовирусной вакцины представляет собой, 20 например, количество, достаточное для повышения устойчивости, предупреждения, уменьшения интенсивности и/или лечения инфекции у субъекта, вызванной вирусом, не вызывая у субъекта значительного цитотоксического эффекта. Эффективное количество иммуностимулирующей композиции на основе вируса, используемой для повышения устойчивости, предупреждения, уменьшения интенсивности и/или лечения 25 инфекции у субъекта будет зависеть от, например, получающего лечение субъекта, способа введения терапевтической композиции и других факторов.

Вакцина: препарат на основе иммуногенного материала, способный стимулировать иммунный ответ, который вводят для предупреждения, уменьшения интенсивности или лечения заболевания инфекционной природы или других типов. Иммуногенный материал 30 может включать аттенуированные или убитые микроорганизмы (такие как бактерии или вирусы) или полученные из них белки с антигенными свойствами (включая вирус-подобные частицы), пептиды или ДНК. Аттенуированная вакцина представляет собой вирулентный организм, который модифицировали для получения формы с меньшей вирулентностью, но при этом сохраняющей способность вызывать выработку антител 35 и индуцировать клеточно-опосредованный иммунитет в отношении вирулентной формы. Убитая вакцина представляет собой ранее вирулентный микроорганизм, который необратимо инактивировали химическими веществами или нагреванием, но который вызывает выработку антител к вирулентному организму. Вакцины могут вызывать как профилактический (предупреждающий), так и терапевтический ответы. Способы 40 введения варьируют в зависимости от вакцины, но могут включать инокуляцию, прием внутрь, ингаляцию или другие формы введения. Вакцины можно вводить с адъювантом для усиления иммунного ответа.

Вирус осповакцины (VACV): большого размера, сложный оболочечный вирус, который принадлежит к семейству поксвирусов. VACV имеют геном, представленный 45 молекулой линейной двухцепочечной ДНК длиной приблизительно 190 т.п.о, которая кодирует примерно 250 генов. Вирус осповакцины хорошо известен из-за своей роли в качестве вакцины для эрадикации натуральной оспы.

Вирусная частица: компонент капсидного белка вируса дикого типа, полученного

генноинженерными методиками или рекомбинантного вируса. Вирусная частица включает по меньшей мере один структурный белок вируса, но может содержать множество структурных белков в зависимости от вируса. В ряде примеров вирусная частица дополнительно включает липидную оболочку. Вирусная частица может
 5 содержать или не содержит нуклеиновую кислоту (т.е. вирусный геном). Таким образом, в контексте настоящего раскрытия термин “вирусная частица” охватывает вирус-подобные частицы (VLP).

Вирус: микроорганизм, который не способен размножаться вне живой клетки. Вирусы характеризуются нуклеопротеиновой структурой, состоящей из ДНК или РНК (или
 10 как из ДНК, так и из РНК), окруженной капсидным белком или нуклеокапсидом. Ряд вирусов дополнительно обладает липидной оболочкой. В контексте настоящего раскрытия “вирус” включает любое семейство, род, виды, штамм или подтип вируса. Термин “вирус” также включает вирусы дикого типа, рекомбинантные, химерные и полученные генноинженерными методиками вирусы. В некоторых вариантах
 15 осуществления вирус инфицирует эукариотические клетки, такие как клетки животных. В конкретных вариантах осуществления вирус представляет собой вирус млекопитающего (инфицирует клетки млекопитающих). В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой патогенный вирус (т.е. вызывает заболевание у хозяина). В конкретных вариантах осуществления вирус представляет собой
 20 оболочечный вирус. В других вариантах осуществления вирус представляет собой безоболочечный вирус.

Примеры вирусов без ограничения включают вирусы из следующих семейств: Retroviridae (например, вирус иммунодефицита человека 1 (HIV-1), HIV-2, вирусы Т-клеточного лейкоза; Picornaviridae (например, полиовирус, вирус гепатита А,
 25 энтеровирусы, вирусы Коксаки человека, риновирусы, эховирусы, вирус ящура); Caliciviridae (такие как штаммы, вызывающие гастроэнтерит, в том числе норовирус); Togaviridae (например, альфавирусы, в том числе вирус Чикунгунья, вирусы энцефалита лошадей, вирус леса Семлики, вирус Синдбис, вирус лихорадки Росс Ривер, вирусы краснухи); Flaviridae (например, вирус гепатита С, вирус денге, вирус желтой лихорадки,
 30 вирус Западного Нила, вирус энцефалита Сент-Луис, вирус японского энцефалита, вирус Повассан и вирусы других энцефалитов); Coronaviridae (например, коронавирусы, вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS)); Rhabdoviridae (например, вирус везикулярного стоматита, вирус бешенства); Filoviridae (например, вирус Эбола, вирус
 35 Марбург); Paramyxoviridae (например, вирусы парагриппа, вирус эпидемического паротита, вирус кори, респираторный синцитиальный вирус); Orthomyxoviridae (например, вирусы гриппа); Bunyaviridae (например, хантавирусы, вирус Син Номбре, вирус лихорадки долины Рифт, буньявирусы, флебовирусы и найровирусы); Arenaviridae (такие как вирус лихорадки Ласса и вирусы других геморрагических лихорадок, вирус Мачупо,
 40 вирус Джунин); Reoviridae (например, реовирусы, орбивирусы, ротавирусы); Birnaviridae; Herpesviridae (вирус гепатита В); Parvoviridae (парвовирусы, например, мелкий вирус мышей, парвовирус собак, парвовирус B19 человека и AAV); Papovaviridae (вирусы папилломы, полиомавирусы, ВК-вирус); Adenoviridae (аденовирусы); Herpesviridae (вирус простого герпеса (HSV)-1 и HSV-2; цитомегаловирус; вирус Эпштейна-Барра; вирус ветряной оспы и другие герпесвирусы, в том числе HSV-6); Poxviridae (вирусы
 45 натуральной оспы, вирусы осповакцины, поксвирусы) и Iridoviridae (такие как вирус африканской чумы свиней); Astroviridae и неклассифицированные вирусы (например, возбудитель гепатита дельта, как полагают, является дефектным сателлитом вируса

гепатита В).

Вирус-подобная частица (VLP): Вирусные частицы образуются из одного или нескольких вирусных структурных белков, но у них отсутствует вирусный геном.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту в данной области, к которой относится настоящее раскрытие. Термины в единственном числе

включают ссылки на множественное число, если контекстом четко не указано иное. “Содержащий А или В” означает включающий А или В, или А и В. Также следует понимать, что все размеры оснований или размеры аминокислот, а также все молекулярные массы или значения молекулярных масс, приведенные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются примерными и приведены с целью описания. Хотя в осуществлении или тестировании настоящего раскрытия могут быть использованы способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, подходящими способами и материалами являются описанные ниже. Все упомянутые в данном документе публикации, патентные заявки, патенты и другие упомянутые

III. Введение

Рассеивание вирусов является решающим как в распространении заболеваний, так и в различных функциях, которые выполняют вирусы в окружающей среде Земли (Peterson, *Naturwissenschaften* 95:483, 2008). Однако механизмы независимого от хозяина рассеивания вирусов, в особенности вирусов в обособленных экосистемах, плохо изучены и являются темой частых дискуссий (Breitbart et al., *FEMS Microbiol Lett* 236:249, 2004; Short and Suttle, *Appl Environ Microbiol* 71:480, 2005). С учетом большого значения вирусов в заболеваниях животных и растений и поддержании многообразия микроорганизмов, а также в переработке биогенных питательных веществ на мировом уровне (Suttle, *Nat Rev Microbiol* 5:801, 2007), все, что воздействует на рассеивание вирусов, будет оказывать существенное воздействие на окружающую среду.

В данном документе раскрывается, что в очень мягких условиях различные вирусы можно покрывать диоксидом кремния. Данное покрытие диоксидом кремния инактивирует вирус. Однако, в отличие от большинства режимов инактивации вирусов, инактивация путем покрытия диоксидом кремния практически полностью обратима (в том числе *in vivo*). Более того, в данном документе демонстрируется, что такое покрытие диоксидом кремния наделяет вирусы значительной стойкостью к обезвоживанию. Таким образом, силикатирование вирусов обеспечивает механизм консервации вирусов, например, для применения в получении и составлении вакцин.

IV. Обзор нескольких вариантов осуществления

Предшествующие исследования показали, что вирусы можно покрывать диоксидом кремния в условиях имитации термальных источников (Laidler and Stedman, *Astrobiology* 10:569, 2010; Orange et al., *Biogeosciences* 8:1465, 2011). В то же время, до настоящего раскрытия было неизвестно, сохраняют ли вирусы или вирусные частицы, покрытые диоксидом кремния, инфекционность и способность индуцировать иммунный ответ у инфицированного хозяина. В данном документе раскрыты данные, которые демонстрируют, что вирусы могут быть обратимо инаktivированы путем силикатирования, и данные, которые демонстрируют, что ранее подвергнутые силикатированию вирусы сохраняют способность инфицировать хозяина и индуцировать

у него иммунный ответ. В данном документе также раскрыто, что силикатированные вирусы проявляют значительную стойкость к обезвоживанию.

В данном документе предлагается способ индуцирования у субъекта вирус-специфичного иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления данный способ включает введение субъекту эффективного количества силикатированного вируса или силикатированных вирусных частиц. Например, эффективное количество может быть количеством, которое требуется для индуцирования у хозяина выявляемого иммунного ответа на вирус.

В некоторых вариантах осуществления вирус (или его частица), который является силикатированным, представляет собой вирус, который инфицирует эукариотические клетки, например, клетки животных. В конкретных вариантах осуществления вирус представляет собой вирус млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой вирус осповакцины, ротавирус, аденовирус, вирус гриппа, лентивирус, флавивирус, вирус гепатита, парвовирус или пикорнавирус. В некоторых примерах лентивирус представляет собой вирус иммунодефицита, такой как вирус иммунодефицита человека, вирус иммунодефицита обезьян или вирус иммунодефицита кошек. В некоторых примерах флавивирус представляет собой вирус Западного Нила, вирус японского энцефалита, вирус денге, вирус клещевого энцефалита, вирус желтой лихорадки или вирус энцефалита Сент-Луис. В некоторых примерах вирус гепатита представляет собой вирус гепатита А, вирус гепатита В или вирус гепатита С. В некоторых примерах пикорнавирус представляет собой полиовирус, вирус гепатита А, риновирус или вирус ящура. В некоторых примерах вирус представляет собой парвовирус, такой как аденоассоциированный вирус (AAV), мелкий вирус мышей или парвовирус собак. В других примерах вирус представляет собой респираторный синцитиальный вирус.

Вирус-специфический иммунный ответ может быть гуморальным иммунным ответом или клеточно-опосредованным иммунным ответом. В некоторых вариантах осуществления вирус-специфический иммунный ответ включает активацию вирус-специфических Т-клеток (таких как $CD4^+$ Т-хелперные клетки или $CD8^+$ цитотоксичные Т-клетки), выработку вирус-специфических антител, выработку цитокинов или их любую комбинацию. Способы оценки у хозяина вирус-специфического иммунного ответа хорошо известны из уровня техники. Например, количество вирус-специфических Т-клеток можно определить с помощью проточной цитометрии с использованием специфичных к Т-клеточным маркерам антител (например, CD8) и антиген-специфичных тетрамеров главного комплекса гистосовместимости (МНС). Вирус-специфические антитела можно выявлять с помощью, например, иммунологического анализа, такого как иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA). Выработку цитокинов также можно определять с помощью ELISA или проточной цитометрии, используя специфичные к цитокинам антитела.

Путь введения силикатированного вируса или силикатированной вирусной частицы может представлять собой любой путь, подходящий для индуцирования иммунного ответа против конкретного вируса. Подходящие пути иммунизации хорошо известны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления введение является местным, пероральным, подкожным, ингаляционным, интраперитонеальным, внутривенным, интратекальным или внутримышечным. В конкретных примерах введение является внутримышечным, подкожным, пероральным или ингаляционным.

Также в данном документе предложены иммуногенные композиции, содержащие силикатированный вирус или силикатированные вирусные частицы. В некоторых

вариантах осуществления вирус инфицирует эукариотические клетки, например, клетки животных. В конкретных вариантах осуществления вирус представляет собой вирус млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой вирус осповакцины, ротавирус, аденовирус, вирус гриппа, лентивирус, флавивирус, вирус гепатита или пикорнавирус. В некоторых вариантах осуществления лентивирус представляет собой вирус иммунодефицита, такой как вирус иммунодефицита человека, вирус иммунодефицита обезьян или вирус иммунодефицита кошек. В некоторых примерах флавивирус представляет собой вирус Западного Нила, вирус японского энцефалита, вирус денге, вирус клещевого энцефалита, вирус желтой лихорадки или вирус энцефалита Сент-Луис. В некоторых примерах вирус гепатита представляет собой вирус гепатита А, вирус гепатита В или вирус гепатита С. В некоторых примерах пикорнавирус представляет собой полиовирус.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или адъювант. В некоторых примерах адъювант включает эмульсию вода в масле, неполный адъювант Фрейнда, квасцы, гидроксид алюминия, агонист толл-подобных рецепторов, иммуностимулирующий олигонуклеотид или биологический адъювант. В некоторых примерах фармацевтически приемлемый носитель включает физиологический солевой раствор, сбалансированный солевой раствор, буферизующее средство, суспендирующее средство, загуститель, неводный растворитель, водный носитель, консервант, антиоксидант, бактериостатическое средство или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция входит в состав единичной дозированной формы. В других вариантах осуществления иммуногенная композиция входит в состав многодозовой формы.

Дополнительно предлагается способ усиления у субъекта вирус-специфичного клеточно-опосредованного иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту силикатированного вируса или силикатированных вирусных частиц, где вирус-специфический клеточно-опосредованный иммунный ответ повышается по сравнению с клеточно-опосредованным иммунным ответом после введения несиликатированных вирусов или несиликатированных вирусных частиц.

В некоторых вариантах осуществления данного способа вирус инфицирует эукариотические клетки, например, клетки животных. В конкретных вариантах осуществления вирус представляет собой вирус млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой вирус осповакцины, ротавирус, аденовирус, вирус гриппа, лентивирус, флавивирус, вирус гепатита, парвовирус или пикорнавирус. В некоторых примерах лентивирус представляет собой вирус иммунодефицита, такой как вирус иммунодефицита человека, вирус иммунодефицита обезьян или вирус иммунодефицита кошек. В некоторых примерах флавивирус представляет собой вирус Западного Нила, вирус японского энцефалита, вирус денге, вирус клещевого энцефалита, вирус желтой лихорадки или вирус энцефалита Сент-Луис. В некоторых примерах вирус гепатита представляет собой вирус гепатита А, вирус гепатита В или вирус гепатита С. В некоторых примерах пикорнавирус представляет собой полиовирус, вирус гепатита А, риновирус или вирус ящура. В некоторых примерах парвовирус представляет собой AAV, мелкий вирус мышей или парвовирус собак. В других примерах вирус представляет собой респираторный синцитиальный вирус.

В некоторых вариантах осуществления вирус-специфический клеточно-опосредованный иммунный ответ повышается на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по

меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45% или по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% по сравнению с клеточно-опосредованным иммунным ответом после введения несиликатированного вируса.

- 5 В некоторых вариантах осуществления повышение вирус-специфического, клеточно-опосредованного иммунного ответа определяют по повышению числа вирус-специфических Т-клеток, повышению активации вирус-специфических Т-клеток, повышению выработки цитокинов или их любой комбинации. Соответственно, в некоторых примерах количество вирус-специфических Т-клеток после введения
- 10 силикатированного вируса или силикатированных вирусных частиц повышается на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% по сравнению с количеством вирус-специфических Т-клеток после введения
- 15 несиликатированного вируса или несиликатированных вирусных частиц; активация вирус-специфических Т-клеток после введения силикатированного вируса или силикатированных вирусных частиц повышается на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по
- 20 меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% по сравнению с активацией вирус-специфических Т-клеток после введения несиликатированного вируса или несиликатированных вирусных частиц; и/или выработка цитокинов после введения
- 25 силикатированного вируса повышается на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% по сравнению с выработкой цитокинов
- 30 после введения несиликатированного вируса или несиликатированных вирусных частиц.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой CD8⁺Т-клетки.

В других вариантах осуществления Т-клетки представляют собой CD4⁺Т-клетки.

- В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой интерлейкин
- 35 (IL), такой как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15; IL-16; IL-17; IL-18, IL-19 или IL-20. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой интерферон, такой как IFN- α , IFN- β , IFN- γ . В некоторых вариантах осуществления цитокин является белком, представляющим собой
- 40 трансформирующий фактор роста (TGF), таким как TGF- β 1, TGF- β 2 или TGF- β 3. В некоторых вариантах осуществления цитокин является представителем семейства факторов некроза опухолей (TNF), таким как TNF- α , TNF- β , LT- β , CD154 или TRAIL. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой какую-либо другую молекулу, вовлеченную в иммунную регуляцию, такую как эритропоэтин, фактор
- стволовых клеток или M-CSF. В одном неограничивающем примере цитокин
- 45 представляет собой IFN- γ .

V. Силикатирование вируса или вирусных частиц

Способы силикатирования вирусов описаны в уровне техники (см., например, Laidler and Stedman, *Astrobiology* 10:569, 2010; Orange et al., *Biogeosciences* 8:1465, 2011, и Laidler et al., *J Virol* 87(24):13927-13929, 2013). Кроме того, иллюстративные способы

силикатирования вируса или вирусных частиц описаны в данном документе в примере 1 и примере 3.

В целом, силикатирование осуществляют путем смешивания выбранного вирусного материала с раствором диоксида кремния, таким как раствор диоксида кремния, полученный из метасиликата натрия пентагидрата. Концентрация раствора диоксида кремния может варьировать, например, от приблизительно 100 ppm до 1000 ppm. В конкретных способах содержание диоксида кремния в растворе диоксида кремния составляет от приблизительно 300 ppm до приблизительно 600 ppm (от приблизительно 5 mM до приблизительно 10 mM). Раствор диоксида кремния может также содержать буфер, например, буфер, который повышает устойчивость вируса. Растворы диоксида кремния могут также содержать соли, такие как соли, повышающие устойчивость вируса, как, например, хлорид магния, хлорид кальция и сульфат магния.

В иллюстративных способах небольшое количество вируса (например, приблизительно 1-5 мл или приблизительно 2-2,5 мл) в растворе диоксида кремния вводят в диализную трубку, которую затем помещают в больший объем раствора (такой как приблизительно 30-50 мл, например, 40 мл) с такой же концентрацией диоксида кремния. Раствор диоксида кремния можно периодически заменять, например, раз в сутки. Продолжительность выдерживания вируса в растворе диоксида кремния может варьировать, но обычно составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10 дней. В некоторых примерах используют доступную на рынке систему для диализа, такую как SLIDE-A-LYZER™ MINI Dialysis Device (Thermo-Fisher).

Настоящее раскрытие предусматривает силикатирование любого вируса или любой вирусной частицы, включая любые вирусы дикого типа (т.е. встречающиеся в природе) или их частицы, или какие-либо полученные генноинженерными методиками, рекомбинантные или химерные вирусы или их частицы. Обычно вирусные частицы содержат по меньшей мере один вирусный капсидный белок и могут также включать липидную оболочку. Вирусные частицы могут включать или не включать вирусный геном дикого типа или вирусный геном, полученный генноинженерными методиками. Например, вирус-подобные частицы, которые имеют сходство с вирусом, но не содержат вирусный геном, можно силикатировать согласно раскрытым в данном документе способам.

Таким образом, в контексте настоящего раскрытия “вирус” включает любое семейство, род, виды, штамм или подтип вируса. Термин “вирус” также включает дикого типа, рекомбинантные, химерные или полученные генноинженерными методиками вирусы или их частицы. В некоторых вариантах осуществления вирус инфицирует эукариотические клетки, такие как клетки животных. В конкретных вариантах осуществления вирус представляет собой вирус млекопитающего (инфицирует клетки млекопитающих). В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой патогенный вирус (т.е. вызывает заболевание у хозяина). В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой оболочечный вирус. В других вариантах осуществления вирус представляет собой безоболочечный вирус.

Примеры вирусов (или их частиц), которые могут подвергаться силикатированию, без ограничения включают вирусы из следующих семейств: Retroviridae (например, вирус иммунодефицита человека 1 (HIV-1), HIV-2, вирусы Т-клеточного лейкоза; Picornaviridae (например, полиовирус, вирус гепатита А, энтеровирусы, вирусы Коксаки человека, риновирусы, эховирусы, вирус ящура); Caliciviridae (такие как штаммы, вызывающие гастроэнтерит, в том числе норовирус); Togaviridae (например, альфавирусы, в том числе вирус Чикунгунья, вирусы энцефалита лошадей, вирус леса Семлики, вирус

Синдбис, вирус лихорадки Росс Ривер, вирусы краснухи); Flaviridae (например, вирус гепатита С, вирус денге, вирус желтой лихорадки, вирус Западного Нила, вирус энцефалита Сент-Луис, вирус японского энцефалита, вирус Повассан и вирусы других энцефалитов); Coronaviridae (например, коронавирусы, вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS)); Rhabdoviridae (например, вирус везикулярного стоматита, вирус бешенства); Filoviridae (например, вирус Эбола, вирус Марбург); Paramyxoviridae (например, вирусы парагриппа, вирус эпидемического паротита, вирус кори, респираторный синцитиальный вирус); Orthomyxoviridae (например, вирусы гриппа); Bunyaviridae (например, хантавирусы, вирус Син Номбре, вирус лихорадки долины Рифт, буньявирусы, флебовирусы и найровирусы); Arenaviridae (такие как вирус лихорадки Ласса и вирусы других геморрагических лихорадок, вирус Мачупо, вирус Джунин); Reoviridae (например, реовирусы, орбивирусы, ротавирусы); Birnaviridae; Herpadnaviridae (вирус гепатита В); Parvoviridae (парвовирусы, например, мелкий вирус мышей, парвовирус собак, парвовирус B19 человека и AAV); Papovaviridae (вирусы папилломы, полиомавирусы, ВК-вирус); Adenoviridae (аденовирусы); Herpesviridae (вирус простого герпеса (HSV)-1 и HSV-2; цитомегаловирус; вирус Эпштейна-Барра; вирус ветряной оспы и другие герпесвирусы, в том числе HSV-6); Poxviridae (вирусы натуральной оспы, вирусы осповакцины, поксвирусы) и Iridoviridae (такие как вирус африканской чумы свиней); Astroviridae и неклассифицированные вирусы (например, возбудитель гепатита дельта, как полагают, является дефектным сателлитом вируса гепатита В).

VI. Иммуногенная композиция и ее введение

Предложенные в данном документе иммуногенные композиции включают силикатированный вирус (или его частицы), такой как силикатированный вирус, который способен инфицировать клетки млекопитающих. В ряде случаев иммуногенные композиции дополнительно включают фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или и то, и другое. Раскрытую в данном документе иммуногенную композицию можно использовать в качестве вакцин, чтобы вызвать иммунный ответ, такой как защитный или терапевтический иммунный ответ, против вируса.

Предложенные иммуногенные композиции, как правило, объединяют с фармацевтически приемлемым носителем или средой для введения людям-субъектам или животным-субъектам в качестве иммуностимулирующей композиции.

В целях удобства иммуногенные составы могут быть представлены в форме единичной дозированной формы и получены с использованием общепринятых фармацевтических методик. Такие методики включают этап совмещения активного ингредиента (т.е. силикатированного вируса или силикатированных вирусных частиц) и фармацевтического носителя(носителей) или вспомогательного вещества(веществ). Обычно данные составы получают путем однородного и равномерного объединения активного ингредиента с жидкими носителями. Подходящие составы могут включать водные и неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства и растворенные компоненты, которые придают составу изотоничность, подобную изотоничности крови предполагаемого получателя, и водные, и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие средства и загустители. Составы могут быть представлены в однократном или многократном контейнерах, например, запаиваемые ампулы и флаконы, и могут храниться в сублимированном (лиофилизированном) состоянии, требующем лишь добавления стерильного жидкого носителя, например,

воды для инъекций, непосредственно перед применением. Экстемпоральные инъекционные растворы и суспензии могут быть получены из стерильных порошков, гранул и таблеток, которые стандартно использует специалист в данной области.

5 Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, как, например, оливковое масло, инъекционные органические сложные эфиры, как, например, этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевые и буферные среды. Среда для парентерального применения
10 включает раствор хлорида натрия, раствор декстрозы в растворе Рингера, раствор декстрозы и хлорида натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла. Среда для внутривенного введения включает добавки для восполнения жидкостей и питательных веществ, добавки для восполнения электролитов (такие на основе раствора декстрозы в растворе Рингера) и им подобные. Могут также присутствовать
15 консерванты и другие добавки, такие как, например, антимикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы и тому подобное.

Возможно введение некоторых композиций в виде фармацевтически приемлемой соли присоединения кислоты или основания, образующихся путем реакции с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота,
20 бромистоводородная кислота, перхлорная кислота, азотная кислота, тиоциановая кислота, серная кислота и фосфорная кислота, а также с органическими кислотами, такими как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, гликолевая кислота, молочная кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, малеиновая кислота и фумаровая кислота, или путем реакции
25 с неорганическим основанием, таким как гидроксид натрия, гидроксид аммония, гидроксид калия, и с органическими основаниями, такими как моно-, ди-, триалкил и ариламины, а также замещенными этаноламинами.

В определенных вариантах осуществления составы в виде единичной лекарственной формы представляют собой такие, которые содержат дозу или единицу вводимого
30 ингредиента, или ее соответствующую часть. Следует понимать что помимо, в частности, ингредиентов, упомянутых выше, охваченные в данном документе составы могут включать другие средства, которые обычно использует специалист в данной области.

Предложенные в данном документе иммуногенные композиции можно вводить различными путями, такими как пероральный, в том числе трансбуккальный и
35 сублингвальный, ректальный, парентеральный, аэрозольный, назальный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный и местный. Их можно вводить в виде различных форм, включая, без ограничения, растворы, эмульсии и суспензии, микроферы, частицы, микрочастицы, наночастицы и липосомы.

Объем введения будет варьировать в зависимости от, например, пути введения и
40 типа вируса. К примеру, объем при внутримышечных инъекциях может варьировать от приблизительно 0,1 до приблизительно 1,0 мл. Специалисту в данной области известны соответствующие объемы для различных путей введения.

Количество силикатированного вируса или силикатированных вирусных частиц в каждой дозе иммуногенной композиции устанавливают по количеству, которое
45 индуцирует иммуностимулирующий и иммунопротективный эффект без существенных нежелательных побочных эффектов. Такое количество будет варьировать в зависимости от того, какой конкретный иммуноген используют, и в какой форме он представлен. Дозы в первичных инъекциях могут варьировать в диапазоне от приблизительно 1 мкг

до приблизительно 1 мг, в некоторых вариантах осуществления в диапазоне от приблизительно 10 мкг до приблизительно 800 мкг, а в других вариантах осуществления в диапазоне от приблизительно 25 мкг до приблизительно 500 мкг. После первичного введения иммуногенной композиции субъекты могут получать одно или несколько бустерных введений с установленными определенными промежутками. Дозы в бустерных введениях могут варьировать в диапазоне от приблизительно 1 мкг до приблизительно 1 мг, в других вариантах осуществления в диапазоне от приблизительно 10 мкг до приблизительно 750 мкг, а еще в других в диапазоне от 50 мкг до приблизительно 500 мкг. Периодические бустерные введения с интервалами 1-5 лет, например три года, могут быть желательными для поддержания защитного иммунитета на требуемых уровнях.

Введение можно осуществлять путем использования однократной дозы или множественных доз. В контексте данного документа вводимая субъекту доза должна быть достаточной для индуцирования благоприятного терапевтического эффекта у субъекта в течение некоторого времени или для подавления, или для предупреждения вирусной инфекции. Требуемая доза будет варьировать от субъекта к субъекту в зависимости от вида, возраста, массы и общего состояния субъекта, тяжести подлежащей лечению инфекции, конкретной используемой композиции и способа ее введения. Соответствующую дозу специалист в данной области может определить путем проведения лишь стандартных экспериментов.

Фармацевтические или иммуногенные композиции или способы лечения можно вводить в сочетании с другими средствами терапевтического воздействия. Например, предложенные в данном документе композиции можно вводить с адъювантом, таким как неполный адъювант Фрейнда или полный адъювант Фрейнда.

Необязательно один или несколько цитокинов, таких как IL-2, IL-6, IL-12, RANTES, GM-CSF, TNF- α или IFN- γ , один или несколько факторов роста, таких как GM-CSF или G-CSF, одну или несколько молекул, таких как OX-40L или 41 BBL, или комбинации данных молекул можно использовать в качестве биологических адъювантов (см., например, Salgaller et al., 1998, J. Surg. Oncol. 68(2):122-38; Lotze et al., 2000, Cancer J. Sci. Am. 6(Suppl 1):S61-6; Cao et al., 1998, Stem Cells 16(Suppl 1):251-60; Kuiper et al., 2000, Adv. Exp. Med. Biol. 465:381-90). Данные молекулы можно вводить хозяину системно (или местно).

Следующие примеры приведены для иллюстрации определенных конкретных характеристик и/или вариантов осуществления. Данные примеры не следует рассматривать как ограничивающие настоящее раскрытие по описанным конкретным характеристикам или вариантам осуществления.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Инактивация, реактивация и устойчивость к обезвоживанию силикатированных вирусов

В данном примере описаны данные о том, что разнообразную группу вирусов можно обратимо инаktivировать путем силикатирования и в ряде случаев повысить устойчивость вирусов к обезвоживанию. В описанных ниже исследованиях воздействия силикатирования на инфекционность вируса и стойкость к обезвоживанию определяли у четырех иллюстративных вирусов: двух бактериофагов (T4 и PRD1), одного оболочечного вируса животного (осповакцины) и одного вируса гипертермофильных архей (SSV-K) (Wiedenheft et al., J Virol 78:1954, 2004).

Введение

Одно из основных разногласий в экологии вирусов состоит в том, являются ли вирусы

космополитными видами (Breitbart and Rohwer, Trends Microbiol 13:278, 2005) или проявляют региональную эндемичность. Исследования вирусов в разнообразных окружающих средах, таких как термальные источники вулканического происхождения, арктические ледяные озера и открытый океан, породили противоречивые результаты (Angly et al., PLOS Biology 4:2121, 2006). Некоторые исследования показали четкие региональные отличия в геномах вирусов (Held and Whitaker, Environ Microbiol 11:457, 2009), указывая на ограниченное рассеивание. Однако, в нескольких других исследованиях было установлено глобальное распространение вирусов с практически идентичными геномами во многих различных окружающих средах (Breitbart et al., FEMS Microbiol Lett 236:249, 2004; Short and Suttle, Appl Environ Microbiol 71:480, 2005).

В одном исследовании указывается, что локальное рассеивание вирусов может быть результатом выброса вируса в виде аэрозолей термальными источниками fumarолами (Snyder et al., Proc Natl Acad Sci USA 104:19102, 2007), свидетельствуя, по крайней мере, об одном возможном независимом от хозяина механизме рассеивания. Этот результат подтверждает, что распространение на более дальние расстояния возможно лишь тогда, когда вирусные частицы могут достигать потоков воздуха в стратосфере и верхних слоях тропосферы (Smith et al., Aerobiologia 26:35, 2010). В нескольких исследованиях показано, что эти потоки воздуха в верхних слоях способны переносить бактерии и грибы из пустыни Сахара до ледников Монблана (Chuvochina et al., Microbiology 80:125, 2011; Chuvochina et al., Microbes Environ 26:237, 2011; Hervas et al., Environ Microbiol 11:1612, 2009; Laghdass et al., Aquat Microb Ecol 62:201, 2011; Perfumo and Marchant, Environ Microbiol Rep 2:333, 2010; Prospero et al., Aerobiologia 21:1, 2005; Schlesinger et al., Aerobiologia 22:259, 2006; Toepfer et al., Aerobiologia 28:221, 2012).

Немаловажным ограничивающим фактором распространения вирусов, переносимых ветром, является способность вируса проявлять стойкость к высушиванию, поскольку большинство вирусов являются очень чувствительными к обезвоживанию (Ding et al., Gynecol Oncol 121:148, 2011; Fogarty et al., Virus Res 132:140, 2008; Nakano et al., Fish Pathol 33:65, 1998) и в аэрозольной форме будут быстро утрачивать инфекционность. Однако, если в дополнение к их капсиду вирусы можно обратимо покрывать защитным слоем, то потенциально они могут распространяться очень широко. Покрытие диоксидом кремния представляет собой особенно привлекательную возможность, поскольку предшествующие исследования показали, что вирусы можно покрывать диоксидом кремния в условиях имитации природных термальных источников (Laidler and Stedman, Astrobiology 10:569, 2010; Orange et al., Biogeosciences 8:1465, 2011).

Способы

Культуры бактериофагов T4, PRD1 и вируса SSV-K получали из лабораторных культур. Все культуры получали свежими либо из замороженной культуры (SSV-K), либо поддерживали в их природном хозяине (T4 и PRD1). Для каждого из данных вирусов 100 мл культуры хозяина в лог-фазе (*Escherichia coli* B для T4, *Salmonella typhimurium* LT2 для PRD1 и *Sulfolobus solfataricus* GΘ для SSV-K) инокулировали аликвотой 1 мл лабораторной культуры вируса и инкубировали при соответствующей температуре (37°C для *E. coli* и *S. typhimurium*; 80°C для *S. solfataricus* GΘ). После инкубации в течение ночи инфицированные культуры центрифугировали при 3000 g в течение 30 минут для осаждения клеток и клеточного дебриса. Перед центрифугированием pH культуры SSV-K доводили до 7,0 с помощью 1 M NaHCO₃, поскольку вирусные частицы SSV более устойчивы при нейтральном pH, чем при оптимальном для их хозяина pH (pH 2-3). После центрифугирования супернатант сливали и фильтровали в стерильный полипропиленовый контейнер через целлюлозно-ацетатный

свободный от поверхностно-активных веществ фильтр с размером пор 0,2 мкм. Культуры вирусов получали за день до начала экспериментов и хранили до использования при 4°C.

В начале эксперимента культуры вирусов смешивали с растворами диоксида кремния, свежеприготовленными из пентагидрата метасиликата натрия, с конечными концентрациями диоксида кремния 0, 300 и 600 ppm (0, 5 и 10 mM, соответственно). Растворы также содержали 10 mM NaHCO_3 (буфер) и 5 mM MgCl_2 (повышает устойчивость вируса), и с помощью 1 н. HCl их pH доводили до 7,0-7,1. Начальные испытания с использованием диоксида кремния в концентрациях 150 ppm и 200 ppm не показали выявляемого различия между теми растворами и контрольным раствором 0 ppm по отношению к инфекционности вируса.

Конечные титры вируса составляли примерно 10^9 БОЕ/мл для T4, PRD1 и VACV и 10^5 БОЕ/мл для SSV-K. От 2,0 до 2,5 мл каждого раствора затем вводили в отдельные участки диализной трубки (10 мм, с MWCO (показателем пористости ультрамембран) 12000 дальтон), которую герметизировали на одном конце с помощью мембраны для ввода образца. Затем данную диализную трубку погружали в 40 мл раствора в ванной с теми же диоксидом кремния, NaHCO_3 , MgCl_2 и pH, что и в растворе для вируса.

Раствор в ванной заменяли ежедневно на свежеприготовленный раствор с тем же составом, а образцы извлекали через мембрану для ввода образца в дни 0 (в течение десяти минут от начала эксперимента), 1, 3, 8 и 10. Титр вируса в каждом образце определяли в трех повторах с помощью анализа бляшкообразования.

В день 10 отбирали аликвоты по 100 мкл в трех повторах для тестов на обезвоживание. Также в день 10 отбирали аликвоты образца по 100 мкл и разбавляли их до 1 мл раствором с содержанием диоксида кремния 0 ppm, уменьшающего концентрацию диоксида кремния ниже насыщенной. Анализы бляшкообразования проводили с данными разведенными образцами в дни 12, 14, 16 и 20 для того, чтобы определить, была ли обратимой какая-либо потеря инфекционности.

Аликвоты образца для теста на обезвоживание помещали в полипропиленовые микроцентрифужные пробирки и первичное высушивание осуществляли в вакуум-концентраторе при 4°C и 13 мбар в течение 4 часов перед помещением образцов в вакуумный эксикатор с новым поглотителем влаги и при давлении 240-270 мбар до наступления времени анализа, который осуществляли через 10, 30 и 90 дней обезвоживания. При анализе образец обезвоженного вируса регидратировали при помощи 1 мл раствора диоксида кремния с 0 ppm. Через один час после регидратации и через десять дней после регидратации отбирали образцы по 100 мкл и титр вируса определяли с помощью анализа бляшкообразования. Для образцов SSV-K весь объем 1 мл раствора регидратированного вируса использовали в анализах на день 10 и день 30 для повышения чувствительности анализа бляшкообразования.

Для вируса осповакцины (VACV) требовалась незначительно отличающаяся процедура эксперимента. Культуры вируса получали перед инфицированием свободно плавающих клеток HeLa и инкубировали культуру при 37°C в течение 48 часов. Весь культуральный раствор затем замораживали и хранили при -80°C до использования. В начале каждого эксперимента производили оттаивание аликвоты VACV при 37°C, интенсивно встряхивали на вихревой мешалке, а затем смешивали со свежеприготовленным раствором метасиликата натрия с конечной концентрацией либо 0 ppm, либо 600 ppm.

В исследованиях силикатирования VACV, десилятирования и обезвоживания

основным раствором являлся фосфатно-буферный солевой раствор Дульбекко (DPBS), pH которого доводили с помощью 1 н. HCl до 7,0-7,1. DPBS выбрали по той причине, что в исследованиях была показана устойчивость VACV в DPBS при комнатной температуре (Kline et al., Vaccine 23:4944, 2005; Newman et al., J Infect Dis 187:1319, 2003).

5 Кроме того, воздействие раствора диоксида кремния осуществляли в полипропиленовых микроцентрифужных пробирках вместо диализных трубок, и при этом воздействие продолжалось только два дня без замены раствора. Через два дня аликвоту 100 мкл удаляли и разбавляли 900 мкл DPBS, получая конечную концентрацию диоксида кремния 60 ppm (1 mM), которая ниже концентрации насыщения диоксида кремния при комнатной
10 температуре (Conrad et al., Geochim Cosmochim Acta 71:531, 2007; Gunnarsson and Arnorsson, Geothermics 34:320, 2005). В итоге, эксперименты по обезвоживанию проводили при атмосферном давлении окружающей среды в ламинарном шкафу BSL3, чтобы избежать риска контаминации оборудования VACV.

Результаты

15 Ранее не было известно о влиянии покрытия на основе диоксида кремния на инфекционность вируса. Таким образом, определили воздействие силикатирования на инфекционность четырех разных вирусов. Используемые в данном исследовании вирусы включали два бактериофага (T4 и PRD1) (Bamford et al., Adv Virus Res 45:281, 1995; J.D. Karam, Ed., Bacteriophage T4, ASM Press, Washington, D.C., ed. 2nd, 1994), один оболочечный
20 вирус животного (осповакцина) (Smith et al., J Gen Virol 83:2915, 2002) и один вирус гипертермофильных архей (SSV-K) (Wiedenheft et al., J Virol 78:1954, 2004). Данные вирусы инкубировали в растворах с исходно растворенным диоксидом кремния, концентрации которого варьировали в диапазоне от 0 ppm (контроль) до 600 ppm при pH 7,0-7,1, в течение десяти дней. Результаты повторных экспериментов с
25 концентрациями диоксида кремния 150 ppm и 200 ppm отличались от таковых при 0 ppm. Во время первичного инкубирования периодически отбирали образцы и инфекционность вируса определяли с помощью анализов бляшкообразования. Обработка диоксидом кремния бактериофага PRD1 при любой из экспериментальных концентраций практически не оказывала воздействие на инфекционность. В
30 противоположность этому, обработка бактериофага T4 диоксидом кремния либо в концентрации 300 ppm (5 mM), либо 600 ppm (10 mM) оказывала сильное воздействие на инфекционность с потерей инфекционности практически на три порядка при воздействии 600 ppm диоксида кремния в течение десяти дней (Фиг. 1А). Воздействие раствором с 600 ppm диоксида кремния оказывало большее влияние, чем воздействие
35 раствором с 300 ppm диоксида кремния. Данные результаты были неожиданны с учетом тех предыдущих результатов, что бактериофаги T4, подвергнутые воздействию раствора с 300 ppm диоксида кремния, равномерно покрывались аморфным диоксидом кремния (Laidler and Stedman, Astrobiology 10:569, 2010). Интересно, что архейный фузелловиреус SSV-K, который является эндогенным вирусом в средах термальных источников с
40 высоким содержанием диоксида кремния, характеризовался промежуточной степенью инактивации (Фиг. 1А). Бактериофаг T4, PRD1 и архейный вирус SSV-K имеют белковые оболочки (Bamford et al., Adv Virus Res 45:281, 1995; J.D. Karam, Ed., Bacteriophage T4, ASM Press, Washington, D.C., ed. 2nd, 1994; Wiedenheft et al., J Virol 78:1954, 2004).

Другой основной морфологической особенностью вируса и многих из патогенных
45 для животных вирусов является оболочка или наружная липидная мембрана. Поэтому тестировали реакцию хорошо изученного оболочечного вируса животных, вируса осповакцины (VACV), на обработку диоксидом кремния. Лишь после двух дней воздействия раствором с 600 ppm диоксида кремния инфекционность VACV снижалась

более чем на три порядка (Фиг. 1А), тогда как наиболее чувствительный из трех безоболочечных вирусов - бактериофаг Т4 - за то же время терял инфекционность на менее, чем два порядка (Фиг. 1А). По техническим причинам условия анализа для VACV являлись несколько иными, чем для бактериофага Т4, поэтому их нельзя сравнивать непосредственно. Концентрации диоксида кремния, необходимые для влияния на инфекционность, являются значительно более высокими, чем концентрации, которые необходимы для гомогенной нуклеации.

С учетом предыдущих исследования силикатирования бактерий и архей (Laidler and Stedman, *Astrobiology* 10:569, 2010; Orange et al., *Biogeosciences* 8:1465, 2011; Asada and Tazaki, *Can Mineral* 39:1, 2001; Benning et al., *Geochim Cosmochim Acta* 68:743, 2004; Kyle et al., *Geomicrobiol J* 24:627, 2007; Orange et al., *Geobiology* 7:403, 2009; Peng et al., *Chin Sci Bull* 52:367, 2007; Phoenix et al., *Chem Geol* 169:329, 2000; Renaut et al., *Sedimentology* 45:1083, 1998; SchultzeLam et al., *Can J Earth Sci* 32:2021, 1995; Toporski et al., *Astrobiology* 2:1, 2002; Westall et al., *Palaeontology* 38:495, 1995) потеря инфекционности вируса при силикатировании не является неожиданной. Более неожиданным является то, что даже в сверхнасыщенных растворах диоксида кремния разные вирусы поддавались воздействию в неравной степени. Бактериофаг Т4 практически полностью инактивируется, PRD1 характеризуется не выявляемой потерей инфекционности, а SSV-K характеризуется промежуточной реакцией. Несмотря на то, что экспериментальные методики, используемые для VACV, отличались, данные указывают на то, что VACV может быть даже более чувствительным к силикатированию, чем бактериофаг Т4, возможно, из-за его слоя липидной мембраны. Полученные данные дают веские основания предположить, что характеристики поверхности разных вирусов оказывают значительное влияние на скорость осаждения диоксида кремния и, тем самым, на их чувствительность к инаktivации силикатированием.

Для того, чтобы определить, являлась ли потеря инфекционности при силикатировании обратимой, аликвоту каждого из вирусов после десяти дней обработки раствором с 600 ppm диоксида кремния помещали в раствор с 0 ppm диоксида кремния. Аликвоты вирусов, которые не силикатировали, использовали в качестве контролей. Образцы отбирали в течение до 10 дополнительных дней и определяли инфекционность вируса. Как у бактериофага Т4, так и у SSV-K инфекционность восстанавливалась на по меньшей мере 10% от их первичного титра в течение десяти дней воздействия раствором с низкой концентрацией диоксида кремния (Фиг. 1А). Подобным образом, силикатированные VACV возобновляли приблизительно 90% своей инфекционности при помещении в ненасыщенный раствор диоксида кремния (Фиг. 1А). Помимо демонстрации обратимости влияния силикатирования в данных условиях на инфекционность эти результаты подтверждают гипотезу о том, что влияние на инфекционность было результатом нанесения покрытия диоксида кремния, а не физического или химического повреждения, которое было бы необратимым.

И наконец, данные результаты показывают, что силикатированный бактериофаг Т4 и архейный вирус SSV-K характеризуются повышенной устойчивостью к обезвоживанию в сравнении с несиликатированным вирусом. После десяти дней силикатирования аликвоту каждого комплекса вирус-диоксид кремния помещали в вакуумный эксикатор. Обезвоженные образцы анализировали через 10, 30 и 90 дней. Обработанные вирусы разбавляли 1:10 раствором с 0 ppm диоксида кремния для того, чтобы определить, являлась ли потеря инфекционности обратимой. Необработанный вирус служил в качестве контроля. Инфекционность вируса определяли непосредственно после обезвоживания. Силикатированный бактериофаг Т4 являлся устойчивым в течение по

меньшей мере 30 дней обезвоживания, тогда как несиликатированный вирус необратимо инактивировался. Силикатирование аналогичным образом предохраняло SSV-K (Фиг. 1В), но в меньшей степени, чем бактериофаг Т4. Поскольку SSV-K нельзя вырастить до высоких значений титра бактериофага Т4, предел выявления данного вируса является более низким, что ограничивает возможность сравнения их устойчивости при обезвоживании при длительных воздействиях. Тем не менее, защита не являлась полной, поскольку через 90 дней обезвоживания инфекционность бактериофага Т4 снижалась на более, чем семь порядков ниже предела обнаружения для анализа.

Среди несиликатированных вирусов только VACV еще обладал инфекционностью после обезвоживания. Устойчивость VACV к обезвоживанию снижалась после двух дней силикатирования. Инфекционность несиликатированного VACV снижалась на три порядка после обезвоживания (от $1,4 \times 10^8$ БОЕ/мл до $2,1 \times 10^5$ БОЕ/мл), тогда как у силикатированного VACV снижалась на четыре порядка (от $1,4 \times 10^8$ БОЕ/мл до $1,6 \times 10^4$ БОЕ/мл). Данная потеря инфекционности VACV соответствует присущей вирусу устойчивости к обезвоживанию в экспериментальных условиях (Collier, *Bacteriol Rev* 18:74, 1954).

Данные результаты обезвоживания указывают на то, что, по меньшей мере для некоторых вирусов, силикатирование может защитить от влияний высушивания. Это может давать возможность вирусу персистировать по меньшей мере несколько недель при давлении и влажности в условиях стратосферы. Если вирусы термальных источников были силикатированы и переведены в аэрозольное состояние выбросом газов или фумарольной активностью, тогда силикатирование дает вирусам возможность персистировать на протяжении от дней до недель при давлении и влажности в условиях стратосферы и, вероятно, обеспечивает возможность глобального рассеивания (Smith et al., *Aerobiologia* 26:35, 2010), в результате чего объясняются некоторые из противоречивых результатов, рассмотренных выше (Breitbart et al., *FEMS Microbiol Lett* 236:249, 2004; Short and Suttle, *Appl Environ Microbiol* 71:480, 2005; Breitbart and Rohwer, *Trends Microbiol* 13:278, 2005; Angly et al., *PLOS Biology* 4:2121, 2006; Held and Whitaker, *Environ Microbiol* 11:457, 2009).

Помимо участия в рассеивании вируса, силикатирование вирусов может служить в качестве способа консервации вакцин. Вакцины против инфекционных заболеваний представляют собой наиболее экономически эффективные средства лечения заболевания (Anonymous, *Bulletin of the World Health Organization* 78:274, 2000; Jefferson, *Vaccine* 17: S69, 1999). Однако некоторые вакцины являются весьма неустойчивыми, что негативно влияет на доставку, в особенности в развивающихся странах (Levine and Robins-Browne, *Immunol Cell Biol* 87:274, 2009). Покрытие диоксидом кремния данных вакцин, наделяет их возможностью доставки и обработки с намного меньшими затратами, чем это было возможно ранее.

Пример 2. Иммунный ответ после введения силикатированного и несиликатированного VACV

В данном примере описываются данные в отношении того, что силикатированный вирус способен индуцировать вирус-специфический иммунный ответ после введения *in vivo*.

Для того, чтобы определить способность силикатированного вируса к инфицированию животного-хозяина и индуцированию у него иммунного ответа, мышей C57BL/6 инокулировали в режиме прайм-буст 1×10^6 БОЕ либо силикатированного, либо несиликатированного VV-OVA (рекомбинантный вирус осповакцины,

экспрессирующий овальбумин). Антиген-специфические Т-клетки определяли по внутриклеточному окрашиванию цитокинов (ICS) и окрашиванию тетрамеров МНС через семь дней после прайм-инокуляции и через пять дней после бустерной инокуляции (Фиг. 2).

Окрашивание тетрамеров и ICS проводили для определения частоты появления и количества в ответ на введение вируса антиген-специфических Т-клеток, полученных из селезенки инокулированных животных. Тетрамеры МНС, специфичные к пептидному эпитопу B8R VACV, использовали для количественного определения антиген-специфических CD8⁺Т-клеток. ICS проводили для определения IFN- γ /B8R-специфических Т-клеток. Как показано на фиг. 3 (прайм) и фиг. 5 (буст), силикатированный и несиликатированный VACV индуцировал появление аналогичных количеств вирус-специфических CD8⁺Т-клеток и экспрессирующих IFN- γ вирус-специфических CD8⁺Т-клеток.

Дополнительные исследования проводили для оценки у мышей, инокулированных силикатированным и несиликатированным VV-OVA, субпопуляций Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток. Как показано на фиг. 4 (прайм) и фиг. 6 (буст), после введения силикатированного и несиликатированного VV-OVA существенного отличия в процентном количестве вирус-специфических эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти не выявляли.

Эти данные демонстрируют, что силикатированный VACV может сбрасывать свою оболочку из диоксида кремния и проявлять инфекционность у мышей. Данные результаты дополнительно демонстрируют, что силикатированный вирус способен индуцировать вирус-специфический иммунный ответ у вакцинированных животных.

Пример 3. Силикатирование бактериофага PhiX174 в качестве модели для мелких вирусов

В этом примере описываются данные в отношении того, что силикатирование может значительно уменьшить инфекционность очень мелких вирусов.

В данном исследовании сравнивали две сходные процедуры силикатирования - силикатирование с использованием SLIDE-A-LYZER™ MINI Dialysis Device (10K MWCO, блоки по 0,5 мл; Thermo-Fisher, номер в каталоге 88401) и стандартную процедуру силикатирования, описанную в примере 1. Данные процедуры являются идентичными за исключением используемого для диализа устройства. Для обоих протоколов получали очень схожие результаты.

Бактериофаг PhiX174 представляет собой очень мелкий (диаметром приблизительно 30 нм) безоболочечный вирус, служащий в качестве модели для пикорнавирусов, таких как полиовирус, вирус гепатита А, риновирусы и вирус ящура, а также парвовирусы, такие как аденоассоциированный вирус (AAV), мелкий вирус мышей и парвовирусы собак.

Бляшкообразующие единицы (PFU) определяли при использовании в качестве хозяина E.coli C в разведенных препаратах вируса PhiX174, которые не подвергали воздействию SiO₂ (Без SiO₂) или подвергали воздействию условий силикатирования в течение 4 дней (таблица 1) или семи дней (таблица 2). Использовали два разных протокола силикатирования, где в одном использовали коммерческий блок SLIDE-A-LYZER™, а в другом использовали протокол силикатирования, описанный в примере 1 и у Laidler et al. (J Virol 87(24):13927-13929, 2013). В каждой таблице “А” и “В” означают повторы анализов.

Таблица 1. БОЕ после воздействия на PhiX174 условий силикатирования в течение

четырёх дней

Повтор	A	B
Разведение	10^{-7}	10^{-7}
C SiO ₂ , SLIDE-A-LYZER™	14	37
C SiO ₂ , стандартное силикатирование	7	13
Без SiO ₂	107	103

Таблица 2. БОЕ после воздействия на PhiX174 условий силикатирования в течение семи дней

Повтор	A	B	A	B
Разведение	10^{-7}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-6}
C SiO ₂ , SLIDE-A-LYZER™	1	0	4	19
Без SiO ₂	прибл.100	n.d.	n.d.	n.d.

“n.d.”=не определено

Как показано в таблицах 1 и 2, использование одной из двух процедур силикатирования приводило в результате к существенному снижению вирусной инфекционности по сравнению с диализом в отсутствие SiO₂. Данные результаты указывают, что силикатирование осуществимо даже для очень мелких вирусов, в том числе для вирусов человека, таких как AAV, полиовирус и вирус гепатита А.

Принимая во внимание множество возможных вариантов осуществления, в отношении которых можно применить принципы раскрытого изобретения, следует понимать, что проиллюстрированные варианты осуществления являются только предпочтительными примерами настоящего изобретения, и их не следует понимать, как ограничивающие объем настоящего изобретения. Напротив, объем настоящего изобретения определен нижеследующей формулой изобретения. Таким образом, в настоящем изобретении заявляется все, что входит в объем и суть формулы настоящего изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Способ индуцирования у субъекта вирус-специфического иммунного ответа, предусматривающий введение субъекту эффективного количества силикатированного вируса или силикатированных вирусных частиц.

2. Способ по п. 1, где вирус представляет собой вирус осповакцины, ротавирус, аденовирус, вирус гриппа, лентивирус, флавивирус, вирус гепатита, пикорнавирус или коронавирусы.

3. Способ по п. 2, где лентивирус представляет собой вирус иммунодефицита.

4. Способ по п. 3, где вирус иммунодефицита представляет собой вирус иммунодефицита человека.

5. Способ по п. 2, где флавивирус представляет собой вирус Западного Нила, вирус японского энцефалита, вирус денге, вирус клещевого энцефалита, вирус желтой лихорадки или вирус энцефалита Сент-Луис.

6. Способ по п. 2, где вирус гепатита представляет собой вирус гепатита А, вирус гепатита В или вирус гепатита С.

7. Способ по п. 2, где пикорнавирус представляет собой полиовирус.

8. Способ по п. 2, где коронавирус представляет собой вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) или коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS).

9. Способ по любому из пп. 1-8, где вирус-специфический иммунный ответ предусматривает активацию вирус-специфических Т-клеток, выработку вирус-специфических антител, выработку цитокинов или любую их комбинацию.

10. Способ по любому из пп. 1-8, где вирус-специфический иммунный ответ представляет собой гуморальный иммунный ответ.

11. Способ по любому из пп. 1-8, где вирус-специфический иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ.

12. Способ по п. 11, где клеточно-опосредованный иммунный ответ предусматривает активацию вирус-специфических Т-клеток, выработку цитокинов или и то, и другое.

13. Способ по п. 12, где Т-клетки представляют собой CD8⁺ Т-клетки.

14. Способ по п. 12 или 13, где цитокин представляет собой интерферон-γ (IFN-γ).

15. Способ по любому из пп. 1-14, где введение представляет собой путь, выбранный из внутримышечного, подкожного, перорального и ингаляционного.

16. Иммуногенная композиция, содержащая (i) силикатированный вирус или силикатированную вирусную частицу и (ii) фармацевтически приемлемый носитель или адъювант, где вирус представляет собой вирус осповакцины, ротавирус, аденовирус, вирус гриппа, лентивирус, флавивирус, вирус гепатита, пикорнавирус или коронавирус.

17. Иммуногенная композиция по п. 16, где

лентивирус представляет собой вирус иммунодефицита;

флавивирус представляет собой вирус Западного Нила, вирус японского энцефалита, вирус денге, вирус клещевого энцефалита, вирус желтой лихорадки или вирус энцефалита Сент-Луис;

вирус гепатита представляет собой вирус гепатита А, вирус гепатита В или вирус гепатита С;

пикорнавирус представляет собой полиовирус; или

коронавирус представляет собой вирус SARS или вирус MERS.

18. Иммуногенная композиция по п. 17, где вирус иммунодефицита представляет собой вирус иммунодефицита человека.

19. Иммуногенная композиция по любому из пп. 16-18, где адъювант включает эмульсию вода в масле, неполный адъювант Фрейнда, квасцы, гидроксид алюминия, агонист толл-подобных рецепторов, иммуностимулирующий олигонуклеотид или биологический адъювант.

20. Иммуногенная композиция по любому из пп. 16-19, где фармацевтически приемлемый носитель включает физиологический солевой раствор, сбалансированный солевой раствор, буферизующее средство, суспендирующее средство, загуститель, неводный растворитель, водный носитель, консервант, антиоксидант, бактериостатическое средство или любую их комбинацию.

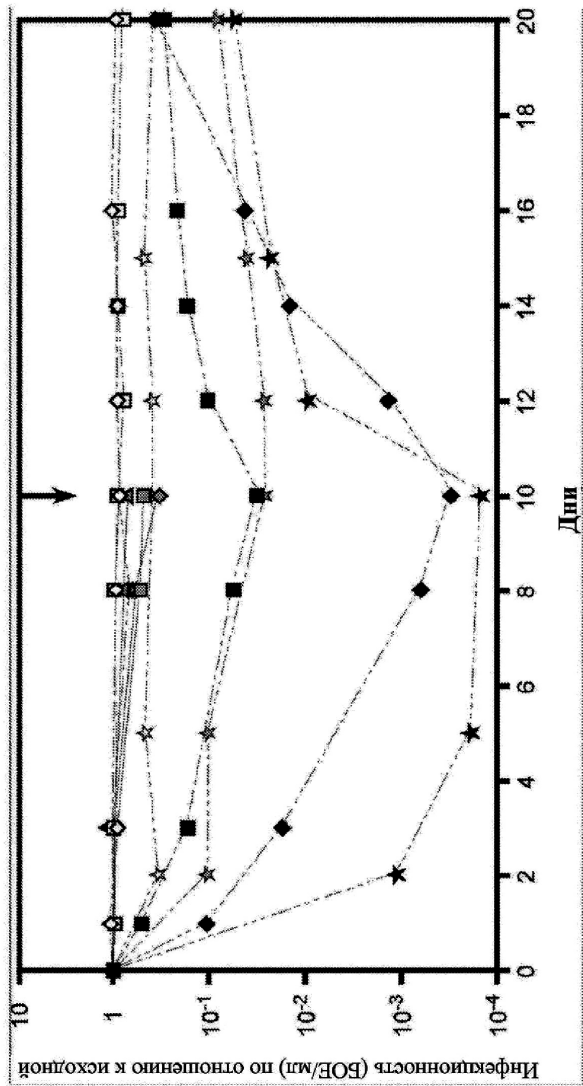
21. Иммуногенная композиция по любому из пп. 16-20, которая входит в состав единичной дозированной формы.

1

WO 2014/121132

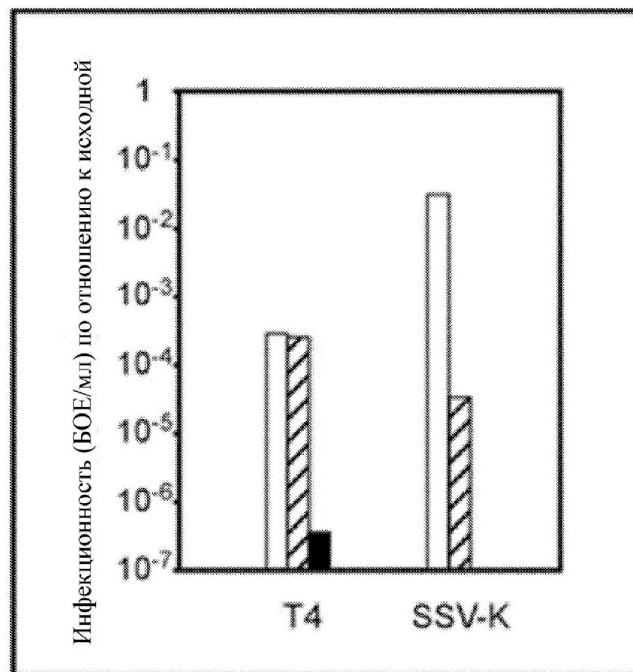
1/7

PCT/US2014/014284



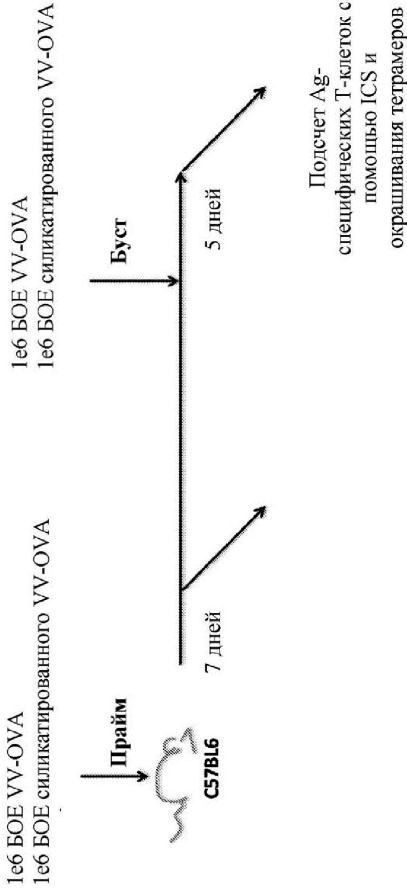
Фиг. 1А

2

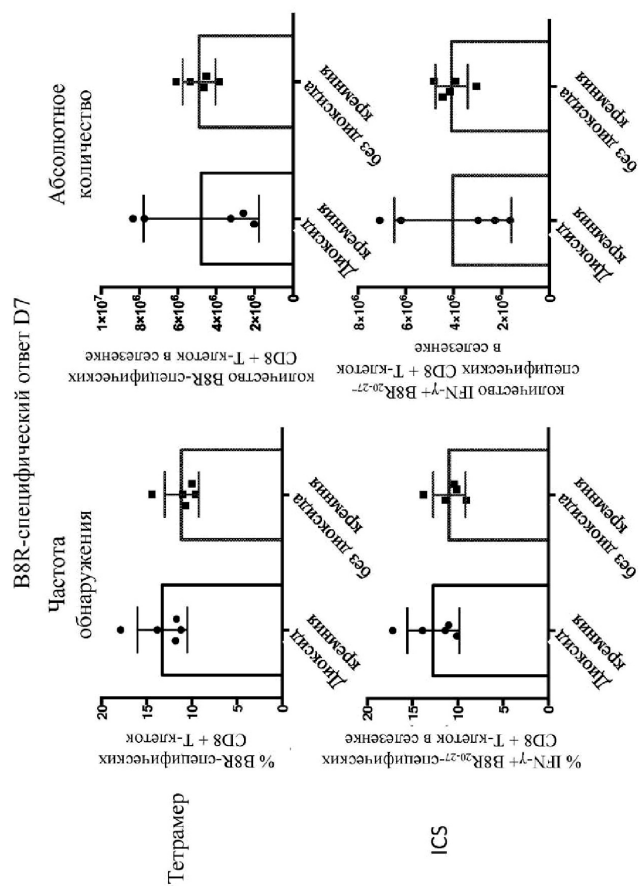


Фиг. 1В

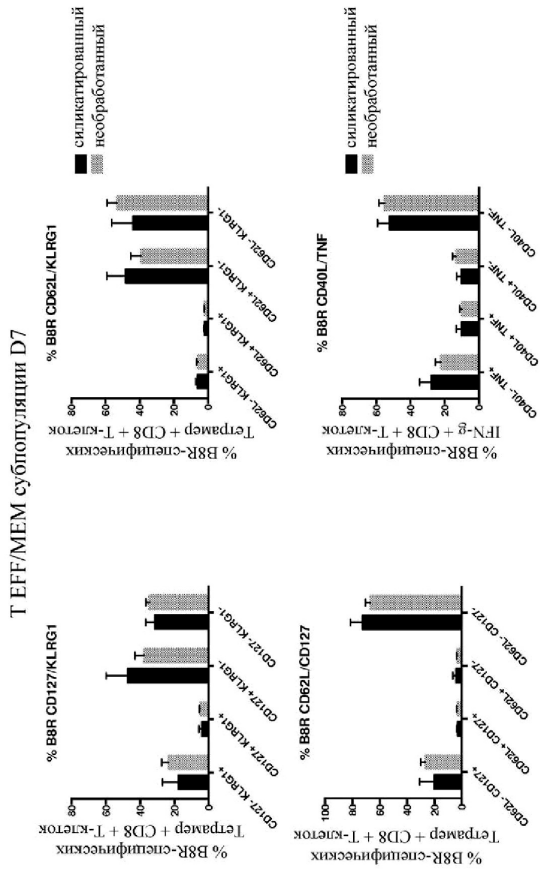
Схема эксперимента



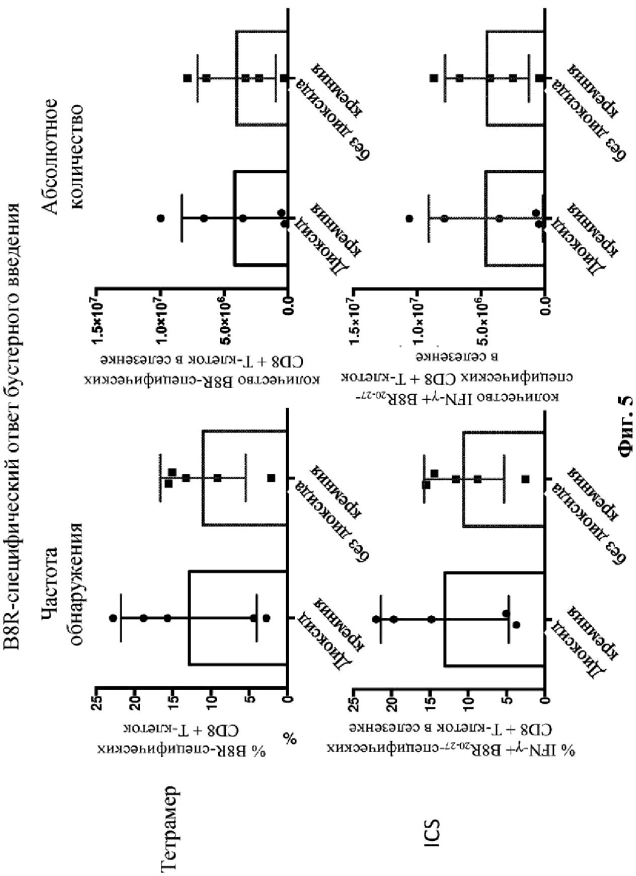
Фиг. 2

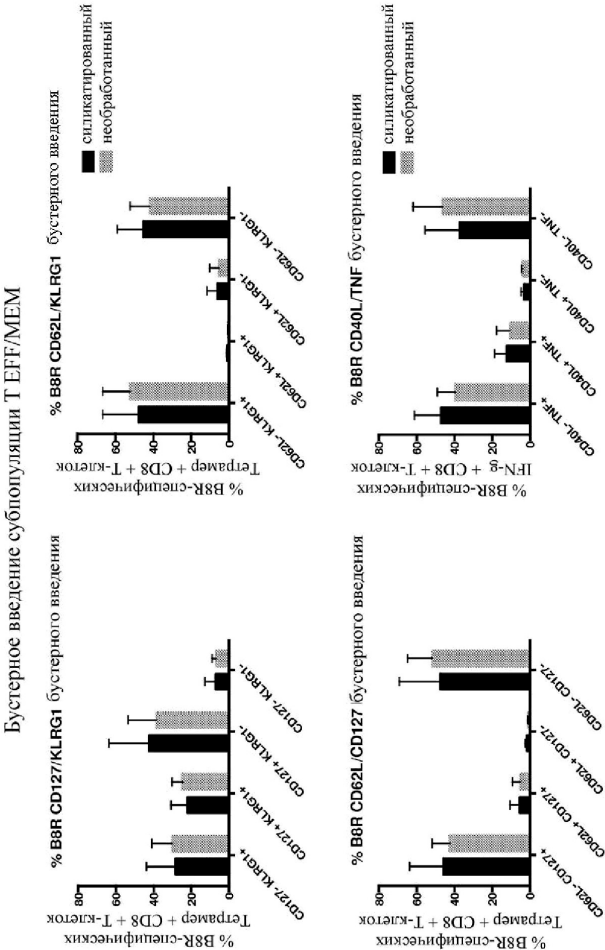


Фиг. 3



Фиг. 4





Фиг. 6