



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128952** (13) **C2**
(51) МПК
A61K 39/29 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

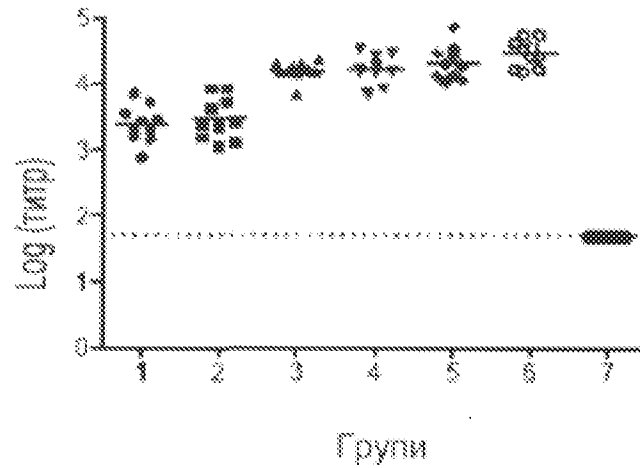
(21) Номер заявки: а 2018 10715	(72) Винахідник(и): Агілар Рубідо Хуліо Сесар (CU), Лобайна Мато Ядіра (CU), Іглесіас Перес Енріке (CU), Пентон Аріас Едуардо (CU), Гільєн Ньєсто Херардо Енріке (CU), Агіар Сантіаго Хорхе Агустін (CU), Гонсалес Бланко Сонья (CU), Вальдес Ернандес Хорхе (CU), Васкес Кастільо Маріела (CU)
(22) Дата подання заявки: 14.03.2017	(73) Володілець (володільці): СЕНТРО ДЕ ІНХЕНЬЕРІЯ ХЕНЕТИКА І БІОТЕКНОЛОХІЯ, Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa La Habana 11600, Cuba (CU)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 12.12.2024	(74) Представник: Бреус Наталія Володимирівна, реєстр. №167
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 2016-0038	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: BENG TI TEY et al Optimal conditions for hepatitis B core antigen production in shaken flask fermentation, BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING, KR, 01.10.2004, vol. 9, no. 5, ISSN 1226-8372, pages 374 - 378 DANIEL O PALENZUELA et al Purification of the Recombinant Hepatitis B Core Antigen, and Its Potential Use for the Diagnosis of Hepatitis B Virus Infection, BIOTECNOLOGÍA APLICADA, CU, 01.01.2002, vol. 19, no. 3-4, ISSN 0864-4551, pages 138 - 142 Y LOBAINA et al Comparison of the immune response induced in mice by five commercial vaccines based on recombinant HBsAg from different sources, implications on their therapeutic use, BIOTECNOLOGÍA APLICADA, CU, 01.01.2008, vol. 25, no. 4, ISSN 0864-4551, pages 325 - 331 AGUILAR J C et al Development of a nasal vaccine for chronic hepatitis B infection that uses the ability of hepatitis B core antigen to stimulate a strong Th1 response against hepatitis B surface antigen, IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY, CARLTON, AU, 01.10.2004, vol. 82, no. 5, ISSN 0818-9641, pages 539 - 546 BETANCOURT et al Phase I clinical trial in healthy adults of a nasal vaccine candidate containing recombinant hepatitis B surface and core antigens, INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES, HAMILTON, CA, 14.08.2007, vol. 11, no. 5, ISSN 1201-9712, pages 394 - 401 RIEDL P et al Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain, THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, 15.05.2002, vol. 168, no. 10, ISSN 0022-1767, pages 4951 - 4959 SCHEEL BIRGIT et al Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 01.01.2004, vol. 34, no. 2, ISSN 0014-2980, pages 537 - 547 EP 2484343 A1, 08.08.2012
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 31.03.2016	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: CU	
(41) Публікація відомостей про заявку: 11.02.2019, Бюл.№ 3	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 11.12.2024, Бюл.№ 50	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/CU2017/050001, 14.03.2017	

(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЯКА ВКЛЮЧАЄ ПОВЕРХНЕВІ І НУКЛЕОКАПСИДНІ АНТИГЕНИ
ВІРУСУ ГЕПАТИТУ В

(57) Реферат:

UA 128952 C2

Винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить ядерний антиген вірусу гепатиту В (HBcAg) і поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg), причому ядерний антиген вірусу гепатиту В (HBcAg) включає матричну рибонуклеїнову кислоту (мРНК) у відсотковій частці 45,0-67,1 % від загальної кількості рибонуклеїнової кислоти (РНК) цього антигену, і поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) включає фосфатидилсерин у відсотковій частці 5,0-8,2 % від загальної кількості фосфоліпідів цього антигену. Винахід також стосується застосування цієї фармацевтичної композиції в одержанні лікарського засобу для імунoproфілактики або імунотерапії проти інфекції, викликаной вірусом гепатиту В.



Or. 1

Даний винахід належить до галузі медицини, зокрема, до галузі вакцинології, зокрема, до розробки вакцинних композицій з підвищеною ефективністю. Ці композиції включають антигени вірусу гепатиту В (ВГВ), які мають модифікації у своєму хімічному складі, що неочікувано підвищило їх імуногенність. Антигенами ВГВ, які модифікували за їх хімічним складом, були

Рівень техніки

Згідно із даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), близько третини населення світу інфіковано вірусом гепатиту В, що ґрунтується на присутності серологічних маркерів інфекції. За оцінками приблизно в 5-10 % дорослих і до 90 % немовлят, інфікованих ВГВ, розвивається хронічний гепатит В (НВС). На даний час 350 мільйонів людей мають персистентну або хронічну інфекцію. Стійка реплікація вірусу протягом тривалого часу призводить до запального процесу в печінці, що призводить до загибелі 25 % інфікованої популяції внаслідок цирозу, гепатоцелюлярної карциноми або інших ускладнень, таких як асцит, кровотечі зі стравоходу і спленомегалія. Незважаючи на загальну вакцинацію немовлят і дітей в останні роки і на наступне зниження числа нових випадків зараження НВС, НВС, як і раніше, є серйозною проблемою охорони здоров'я в усьому світі [Hilleman, M. R. Вакцина (2001), 19, 1837-48].

Лікування інтерфероном-альфа (IFN- α), його пегільованим варіантом (ПЕГ-IFN), а також нуклеотидними і нуклеозидними аналогами, такими як тенофовір, ентекавір, ламівудин, адефовір дипівоксил і тельбівудин, являє собою сучасний стандарт лікування ХГВ. У цілому ці лікарські засоби мають низьку ефективність щодо стійкої елімінації ВГВ після лікування, при цьому їх застосування пов'язане із серйозними несприятливими явищами (АД), що широко відомо [Nash K. Adv Ther (2009), 26: 155-169; Yang N, Hepatol Int. 2015 Sep 12. [електронна публікація до виходу до друку] PubMed PMID: 26363922].

Використання вакцинних композицій як імунотерапевтичної стратегії при лікуванні ХГВ являє собою цікавий підхід. Вірусну персистенцію пов'язували з порушенням розвитку клітинного імунітету проти ВГВ. З початку 1980-х років стратегії вакцинації були спрямовані на збільшення і посилення слабкої відповіді Т-клітин у хворих ХГВ. У таких імунотерапевтичних стратегіях спочатку застосовували комерційні вакцини проти ВГВ із метою індукції специфічних CD4+ і CD8+ відповідей проти ВГВ, а також прозапальних цитокінів для контролю реплікації вірусу. Таким чином, майже всі комерційні профілактичні вакцини досліджували окремо або в комбінації із традиційними противірусними терапіями. У попередніх дослідженнях терапевтичної вакцинації вакцини застосовували з іншими противірусними терапіями або без них. Крім того, імуноterapia із застосуванням комерційних вакцин також надала схеми з великими кількостями щеплень, при цьому досліджували альтернативні парентеральні шляхи. Основні дослідження коротко описані нижче.

Експериментальне дослідження вакцинації у хворих ХГВ із застосуванням Genhevac B® (Aventis Pasteur, France, отримана в клітинах ссавців -CHO) продемонструвало зниження реплікації ВГВ у приблизно 50 % хронічних носіїв [Pol S, et al. C R Acad Sci III (1993), 316: 688-91]. В іншому багато центровому плацебоконтрольованому дослідженні також проводили оцінку вакцини Genhevac B®, вакцини Recombivax® (Merck Sharp Dohme-Chibret, France, отриманої в дріжджах). При цьому значиму відмінність спостерігали в шостий місяць (3 %, 20 % і 22 %) між групами, що одержували Genhevac® і Recombivax®, відповідно. Однак до 12 місяця відмінність зникла [Pol S, J Hepatol (2001); 34: 917-21]. У результаті дійшли висновку, що явна позитивна дія була відсутня, і антиген pre-S2, присутній у вакцині Genhevac®, очевидно, не виявляв якого-небудь додаткового ефекту.

Інші дослідження, у яких оцінювали терапевтичну вакцину Genhevac®, [YALCIN K, et al. Infection (2003), 31: 221-225; Dikici B, et al. J Gastroenterol Hepatol (2003), 18 (2): 218-22] показав лише невелику ефективність, пов'язану з лікуванням.

Нерагене® (Medeva Ltd., UK), отримана в CHO вакцина, включає три варіанти HBsAg (L, S і M), і їх результати на здорових добровольцях і нереспондерах продемонстрували високий рівень імуногенності [Page M, et al. Intervirology (2001), 44: 88-97; Yap I, et al. Ann Acad Med Singapore (1996), 25: 120-122; Zuckerman JN, et al. BMJ (1997), 314: 329; Jones CD, et al. Vaccine (1999), 17(20-21): 2528-37]. Беручи це до уваги, проводили дослідження для оцінки його терапевтичного потенціалу. Вісім доз по 20 мкг вакцини вводили у двох курсах з 4 щеплень, з 5-місячним інтервалом між ними [Carman WF, et al. J Hepatol (2001); 34: 917-921]. Наприкінці схеми, 8 з 22 пацієнтів, які пройшли схему, мали тривалу відсутність вірусу гепатиту В, а в 7 пацієнтів був усунутий HBeAg. Це неконтрольоване обмежене дослідження супроводжувалося контрольованим дослідженням з більшою кількістю пацієнтів. У цьому другому клінічному дослідженні, що включало 103 хронічних хворих, які були HBeAg позитивними, чотири дози

вакцини або плацебо вводили з інтервалами в один і 8 місяців, а потім усі пацієнти одержували 8 додаткових доз із одномісячними інтервалами. Наприкінці лікування не було отримано ніяких значимих позитивних клінічних результатів [Medeva PLC <http://www.investegate.co.uk/article.aspx?id=200001171532169093D> (консультації 20 жовтня 2015 року)].

Щоб сприяти розвитку протівірусної імунної відповіді, використовували методи лікування, що поєднують у собі терапевтичну вакцинацію зі стандартними протівірусними терапіями. Така стратегія враховує результат, пов'язаний з дією ламівудину, який збільшує вміст специфічних ВГВ Т-клітин у периферичній крові в результаті інгібування реплікації вірусу [Bertoletti A et al. Expert Rev Gastroenterol Hepatol (2009), 3 (5): 561-9]

Комбінована стратегія протівірусної вакцинації повинна сприяти більшій реактивності Т-клітинної відповіді проти ВГВ, але повинна вважатися більш безпечною, оскільки вона повинна виключати ураження печінки внаслідок активації імунної системи. Однак немає ніяких підтверджень того, що активація специфічної імунної відповіді вакциною у хворих ХГВ може викликати фульмінантний гепатит.

У дослідженні, опублікованому в 2002 році, оцінювали внутрішньошкірне введення (в/ш) вакцини Енджерікс В® (GlaxoSmithKine) з ламівудином [Dahmen A, et al. J Med Virol 2002; 66: 452-60] у хворих ХГВ. Шість доз Енджерікс В® вводили один раз на місяць у комбінації із щоденним введенням ламівудину. Додаткова група одержувала таке ж лікування в комбінації із щоденним підшкірним (п/ш) введенням інтерлейкіна-2 (IL-2). Після завершення терапії, в 7 з 9 пацієнтів у першій групі та в 2 з 5 пацієнтів у другій групі вірусне навантаження зменшилося до рівнів, що не піддаються визначенню. У чотирьох респондерів вірус був усунутий, і нормалізувалися рівні трансаміназ. В іншому клінічному дослідженні комбінацію терапевтичної вакцинації в/ш шляхом оцінювали при використанні вакцини, що містить HBsAg в алюмокалієвих галунах, із щоденним введенням ламівудину протягом одного року [Horiike N, et al. J Clin Virol (2005), 32: 156-161]. Ці дослідження показали, що комбінована терапія ефективна і має мало ускладнень у хворих ХГВ. Однак в обох випадках використовували в/ш шлях, який може сприяти імуногенності вакцини.

Той же поверхневий антиген, включений в активний ад'ювант, неефективний при комбінованій терапії ламівудином, що вказує на те, що вплив шляху імунізації не слід ігнорувати, і що це, можливо, вирішальний фактор, що визначає майбутнє вакцинації.

Дослідження, яке завершило тривалий період клінічної оцінки кандидатних вакцин для придушення вірусного навантаження, презентовано у звіті Vanderapelіere із співавт. [Vanderapelіere P, et al. Vaccine (2007) Dec 12; 25(51): 8585-97]. У цьому дослідженні проводили клінічну оцінку кандидатної вакцини на основі композиції адсорбованого HBsAg, що вводиться внутрішньом'язовим (в/м) шляхом у дозі 100 г HBsAg, у комбінації з олійним ад'ювантом і потужними імуномодуляторами, такими як монофосфори́лліпід А і сапонін QS21. Десять введень в умовах зниженого вірусного навантаження не продемонстрували ніяких переваг щодо вірусологічної відповіді, у порівнянні з контрольною групою, яка одержувала тільки протівірусний препарат.

Накопичені знання про характеристики імунної відповіді хазяїна і про терапевтичне застосування звичайних вакцин показують, що стратегії, спрямовані на індукцію сильної і довгочасної реактивності Т-клітин проти антигенів ВГВ, можливі і дають надію на успішне лікування хворих ХГВ.

Відсутність імунної стимуляції проти нуклеокапсидних антигенів, імовірно, є основним імунологічним маркером неефективності терапевтичної вакцинації на основі HBsAg. Фактично, мета терапевтичної вакцинації при ХГВ полягає в активації тих же природних імунних механізмів, які переважають під час гострого гепатиту В і які є самоконтрольованими, або при ХГВ, який піддається сероконверсії. Якщо імуноterapia не стимулює такі імунні відповіді, вона, імовірно, не зможе викликати сероконверсію.

Поліпшення композицій з погляду стратегії антигенної селекції і вакцинації може стати способом подолання таких труднощів. Характеристики білків оболонки виправдовують їх включення в терапевтичну вакцину. Фактично, білки оболонки містять численні епітопи В і Т-клітин [Penna A, et al. J Virol (1992), 66(2): 1193-6; Nayersina R, et al. J Immunol (1993), 150: 4659-71], і передбачається, що антитіла проти білків оболонки відіграють важливу роль у придушенні вірусу, усуваючи вільні вірусні частинки із кровотоку і запобігаючи повторному інфікуванню сприйнятливих клітин. З іншого боку, високі рівні HBsAg циркулюють у сироватці хворих ХГВ, цей факт може відігравати головну роль у підтримці імунної толерантності, у результаті виснаження Т-клітин і придушення продукування антитіл проти HBs [Nagaraju K, et al. J Viral Hepat (1997), 4: 221-30].

У цьому напрямку HBcAg був запропонований як основний кандидатний антиген для включення в терапевтичну вакцину для ХГВ. Під час гострого самозавершеного гепатиту епітопна відповідь Т-клітин переважна і переважає в ході сероконверсії при спонтанному або викликаному лікуванні ХГВ [Ferrari C, et al. J Clin Invest (1991), 88: 214-22; Marinos G, et al. Hepatology (1995), 22: 1040-9; Tsai SL, et al. Clin Invest (1992), 89: 87-96].

Дотепер жодна з комерційних вакцин проти гепатиту В не продемонструвала достатні клінічні результати, які дозволять їм конкурувати з існуючими методами лікування або просто викличуть схвалення їх впровадження в медичну практику. Проте, ці вакцини дали великі надії у галузі лікування, не тільки щодо імунотерапії проти гепатиту В, але також і для інших патологій, таких як інфекція, викликана вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ), і рак, серед інших хронічних захворювань, що передаються або не передаються. Таким чином, ця стратегія вимагає клінічної оцінки нових концепцій вакцин і оптимізації всіх пов'язаних факторів. У зв'язку з цим кандидатна терапевтична вакцина, що включає HBcAg, крім HBsAg, є результатом розробки таких стратегій імунотерапії.

Центр генної інженерії і біотехнології Куби (CIGB) робить HBsAg у вигляді рекомбінантного білка, одержуваного в дріжджах *Pichia pastoris* як хазяїна. Цей антиген був включений у профілактичну вакцину Heberbiovac HB® з початку 1990-х років [Muzio V, et al. Biotecnologia Aplicada (2001) 18; 103-104; ul-Haq N, et al. Vaccine (2003) 21: 3179-85].

Крім того, в CIGB розробили композицію, яка забезпечує тривалу імунну відповідь проти гепатиту В, зазначена композиція включає як основні компоненти HBsAg і HBcAg, антигени вводять через слизову оболонку з розвитком системної і мукозальної відповіді [Європейський патент EP 1136077]. В іншому патентному документі центру CIGB описана генерація агрегованих антигенних структур, що утворюють частинки. У цьому документі показано, що агрегація, деліпідизація або окиснення, а також відбір частинок 30-500 нм і включення таких агрегатів у підходящий а'ювант, сприяє імуногенності отриманого антигенного препарату [Європейський патент EP 1346727]. Об'єднавши стратегії, запропоновані в обох патентних документах, в CIGB розробили кандидатну терапевтичну вакцину за назвою NASVAC [Lobaina Y, et al. Mol Immunol (2015), 63: 320-327], яку вводять із застосуванням комбінації шляхів імунізації. Клінічні результати вакцинації вкрай перспективні, однак ефективність продукту необхідно підвищити із застосуванням більш сильних імуногенів.

Стратегії вакцинації, які включають основні антигени ВГВ, такі як HBsAg і HBcAg, призвели до появи композицій, що володіють деякою противірусною ефективністю. Однак їх поліпшення необхідне для збільшення числа пацієнтів із тривалою противірусною відповіддю, а також числа пацієнтів, у яких спостерігається сероконверсія HBsAg в анти - HBsAg.

Опис винаходу

Винахід допомагає розв'язати вищевказану проблему шляхом розробки фармацевтичної композиції, яка характеризується: 1) антигеном HBcAg, який включає матричну рибонуклеїнову кислоту (мРНК) у процентній частці більше 45 % від загальної кількості рибонуклеїнової кислоти (РНК) зазначеного антигену, і 2) антигеном HBsAg HBV. У варіанті здійснення винаходу фармацевтична композиція містить HBsAg, що містить фосфатидилсерин у процентній частці більше 5 % від загальної кількості фосфоліпідів, що формують зазначений антиген.

Включення антигенів HBsAg і HBcAg, які були модифіковані за своїм хімічним складом таким визначеним способом, сприяє імунологічним і противірусним властивостям цієї композиції для імунотерапії. Однак вищевказані модифікації не впливають на білковий склад антигенів HBsAg і HBcAg винаходу, тому що їх первинна, вторинна і третинна структури залишаються ідентичними в порівнянні з їх не модифікованими варіантами. Проте, такі модифікації призводять до несподіваних властивостей цих антигенів, що дає більш сильні імуногени. Крім того, комбінація таких модифікованих антигенів призводить до одержання композиції з більш високою терапевтичною противірусною ефективністю для лікування ХГВ.

У винаході HBcAg був отриманий із мРНК на рівні більше 45 %. У конкретному випадку цей модифікований антиген був отриманий завдяки комбінації змін параметрів його процесу ферментації. У цьому випадку застосування хімічно визначеного середовища і низької питомої швидкості росту забезпечує одержання варіанта HBcAg, де частка мРНК збільшена в порівнянні з іншою РНК, що є присутньою у ньому.

Хоча була описана висока імуногенність HBcAg, отриманого в *Escherichia coli*, як і участь компонента нуклеїнових кислот в імуногенності повнорозмірних антигенів (183 амінокислот) у формі частинок, до даного винаходу відносний ефект кожного варіанта РНК був невідомий щодо їх певного внеску в кінцеву імуногенність HBcAg. Неочікувано було виявлено, що HBcAg з рівнем мРНК вище 45 % був більш імуногенним і викликав розвиток більш сильної відповіді Th1 у порівнянні з не модифікованим HBcAg.

Зміни процентної частки виявленої мРНК не впливали на вміст сумарної РНК, що є присутньою у частинці, щодо вмісту білка. Неочікувано було виявлено, що HBsAg, що містить більше 45 % мРНК у сумарній РНК, мав більш високу імуногенність в порівнянні з HBcAg, отриманим без якої-небудь зміни вмісту мРНК. Таке збільшення імуногенності включало значне збільшення цитокінів Th1 і підвищену здатність до усунення циркулюючого HBsAg після імунізації трансгенних мишей і пацієнтів із ХГВ.

З іншого боку, у даному винаході оцінювали HBsAg, який містить фосфатидилсерин на рівні більше 5 % від загальної кількості фосфоліпідів, що є присутніми у цьому ліпопротеїновому антигені. Зокрема, збільшення процентної частки фосфатидилсерину більш ніж до 5 % від загальної кількості фосфоліпідів було продемонстровано щодо зміни таких параметрів, як збільшення концентрацій кальцію і магнію в середовищі ферментації, низькою питомою швидкості росту і низького рН. Однак винахід не був обмежений HBsAg, отриманим за таких умов. Збільшення процентної частки фосфатидилсерину більш ніж до 5 % зв'язували зі збільшенням імуногенності отриманого в результаті антигену при порівнянні його з HBsAg з більш низьким вмістом цього фосфоліпиду. Спостерігали значне підвищення цитокінів Th1, а також більш високу здатність усунення циркулюючого HBsAg після імунізації HBsAg трансгенних мишей і хворих ХГВ при використанні HBsAg, що містить більше 5 % фосфатидилсерину щодо загального % фосфоліпідів.

У даному винаході особливим чином модифіковані антигени HBsAg і HBcAg були вибрані на основі більш високої інтенсивності імунної і противірусної відповіді в порівнянні з композиціями, у яких використовувалися не модифіковані антигени. Крім того, композиція, що містить обидва антигени, могла викликати сероконверсію HBsAg в анти - HBsAg у більшого числа пацієнтів у порівнянні з антигенами, які вводили окремо, що демонструє важливість і функціональність модифікацій, виявлених в антигенах, що є частиною композиції даного винаходу, а також перевагу комбінованих композицій у порівнянні з окремими антигенами.

У даному винаході запропоноване нове рішення проблеми, що існує в рівні техніки, пов'язаної з необхідністю нових композицій, які дозволяють підсилити імунну відповідь проти HBsAg і проти HBcAg, для створення більш ефективних способів лікування для контролю хронічної інфекції, викликаної ВГВ. Об'єкт даного винаходу не може вважатися очевидним або отриманим з рівня техніки фахівцями, оскільки він є результатом ідентифікації нових характеристик описаних антигенів. Хоча такі модифіковані антигени зберігають свій білковий склад, вони різняться за хімічним складом молекул, пов'язаних з ними.

Таким чином, у рамках винаходу модифікований HBcAg є препаратом з HBcAg, який включає мРНК у процентній частці більше 45 % від сумарної РНК даного антигену. У той же час, модифікований HBsAg є препаратом HBsAg, який містить фосфатидилсерин у процентній частці більше 5 % від загальної кількості фосфоліпідів даного антигену.

В одному варіанті здійснення винаходу композиція, що містить антиген HBcAg із мРНК у процентній частці більше 45 % від сумарної РНК даного антигену і антиген HBsAg ВГВ, відрізняється тим, що вона виготовлена для введення парентеральним і мукозальним шляхами. Для введення композиції згідно з винаходом мукозальним шляхом, і зокрема, назальним шляхом можуть застосовуватися пристрої, які були розроблені і/або випущені в продаж для введення фармацевтичних композицій таким шляхом.

У конкретному варіанті здійснення зазначена композиція додатково відрізняється тим, що вона містить вакцинний ад'ювант. Серед вакцинних ад'ювантів, які можуть бути присутніми у композиції згідно із винаходом, були виявлені, наприклад, такі, які добре відомі фахівцям у цій галузі, такі як солі алюмінію, емульсії "вода в олії", розроблені для медичного застосування, стимулятори імунної системи тощо.

Крім того, винахід належить до застосування антигену HBcAg, який включає мРНК у процентній частці більше 45 % від сумарної РНК даного антигену, і антигену HBsAg для виробництва лікарського засобу для імунопрофілактики або імунотерапії проти інфекції, викликаної ВГВ. В одному варіанті здійснення винаходу HBsAg, що входить до складу зазначеного лікарського засобу, містить фосфатидилсерин у процентній частці більше 5 % від загальної кількості фосфоліпідів даного антигену. У конкретному варіанті здійснення зазначений лікарський засіб виготовлений для введення парентеральним і мукозальним шляхом. У переважному варіанті здійснення лікарський засіб, з HBcAg, що містить мРНК у процентній частці більше 45 % від сумарної РНК даного антигену, і антигеном HBsAg, застосовують для лікування хворих ХГВ або хворих з коінфекціями, де одним з вірусів, що інфікують, є ВГВ. Крім того, при лікуванні хворих ХГВ зазначеним лікарським засобом застосування спрямоване на запобігання гепатоцелюлярного раку, що виник у результаті інфекції, викликаної ВГВ.

У випадку, коли лікарський засіб, що містить HBcAg із процентною часткою мРНК більше 45 % від сумарної РНК даного антигену і антиген HBsAg, застосовується для лікування хворих ХГВ шляхом імунотерапії, її можна проводити активним способом (шляхом імунізації пацієнтів цим лікарським засобом) або в пасивній формі, шляхом клітинної стимуляції. Завдяки своїм компонентам фармацевтична композиція за винаходом може застосовуватися для стимуляції аутологічних або гетерологічних клітин. Таким чином, у винаході запропонований спосіб клітинної стимуляції із застосуванням зазначеної композиції і наступної пасивної імунізації хворих ХГВ на основі максимальної стимуляції, *in vivo* або *in vitro*, аутологічних або гетерологічних клітин, які включають дендритні клітини, В-клітини і макрофаги.

Крім того, у даному винаході розкритий спосіб імунопрофілактики або імунотерапії проти ВГВ - інфекції, який відрізняється введенням пацієнтові, що потребує цього, ефективної кількості фармацевтичної композиції, що включає антиген HBcAg, який містить мРНК у процентній частці більше 45 % від сумарної РНК даного антигену, і HBsAg антиген ВГВ. В одному варіанті здійснення винаходу HBsAg включає фосфатидилсерин у процентній частці більше 5 % від загальної кількості фосфоліпідів даного антигену. У варіанті здійснення винаходу зазначену фармацевтичну композицію вводять парентеральним і мукозальним шляхами. У переважному варіанті здійснення пацієнт, що одержує імунотерапію, є хворим ХГВ. У цьому випадку застосування способу згідно з винаходом для імунотерапії у хворих ХГВ забезпечує запобігання гепатоцелюлярного раку, що виник у результаті інфекції, викликаній ВГВ.

Мета даного винаходу також полягає в застосуванні HBcAg антигену, який містить мРНК у процентній частці більше 45 % від сумарної РНК даного антигену, і антигену HBsAg для посилення імунної відповіді проти додаткового антигену, який спільно вводять із сумішшю цих антигенів. У варіанті здійснення винаходу HBsAg, що входить до складу суміші антигенів, містить фосфатидилсерин у процентній частці більше 5 % від загальної кількості фосфоліпідів даного антигену.

Суміш антигенів, зазначених вище, може застосовуватися в потенціюванні імунної відповіді проти ХГВ (у терапевтичній схемі) або відповідно до стратегій профілактичної вакцинації, де вакцина є полівалентною. Це обумовлене тим, що на додаток до підвищення імуногенності антигенів HBsAg і HBcAg, змінених визначеним способом, можна було перевірити, що вони здатні викликати ефект потенціювання імуногенності гетерологічних антигенів. Результати експериментальних оцінок демонструють, що ці антигени, що є присутніми в полівалентних композиціях, можуть використовуватися в профілактичному або терапевтичному застосуванні.

Хоча відносно композицій у даному винаході можна виключити застосування ад'ювантів, стабілізаторів, консервантів або інших добавок, це не обмежує введення добавок, допоміжних речовин, розріджувачів, які не знижують імуногенність композиції або одержуваного кінцевого продукту, або противірусну ефективність композиції, що вводиться.

З використанням фармацевтичної композиції і способу імунопрофілактики або імунотерапії згідно із винаходом, досягається тривала противірусна відповідь, при цьому число пацієнтів із сероконверсією HBsAg в анти - HBsAg збільшується в порівнянні із застосуванням композицій і способів, відомих у даній галузі техніки.

Короткий опис фігур

Фігура 1. Продуктування антитіл IgG проти HBcAg після введення двох доз.

Фігура 2. Антитіла IgG проти CR3.

Фігура 3. Проліферативна відповідь CD8+CR3 (ВІЛ-1) - специфічних Т-клітин.

Докладний опис варіантів здійснення/прикладів здійснення

Приклад 1. Одержання білка HBcAg з різними процентними частками варіантів РНК

HBcAg одержували зі штаму *E. coli*, який генетично трансформували плазмідною, яка несли ген, що кодує цей антиген [Aguilar JC, et al. *Immunol Cell Biol* (2004) 82: 539-46].

При дослідженні частинок HBcAg, отриманих у результаті ферментативного процесу, проведеного в різні періоди часу, спостерігали збільшення частки мРНК, що включається в препарати HBcAg, отримані при більш тривалих періодах ферментації. Після 20 годин ферментації рівні мРНК в антигені зросли більш ніж на 20 % у порівнянні з HBcAg, отриманим у процесах тривалістю до 14 годин, як показано в Таблиці 1. Ніяких істотних змін у вмісті сумарної РНК у частинці не виявили, оскільки не було виявлено значимих відмінностей у рівнях сумарної РНК або відносно вмісту РНК/вмісту білка. Однак спостерігали значне збільшення рівня мРНК у порівнянні з іншими варіантами, зокрема рибосомною РНК (рРНК), яка показала зниження свого вмісту з підвищенням мРНК. Ніяких інших значимих змін не було виявлено щодо пов'язаних з HBcAg міnorних компонентів або характерних контамінуючих домішок при дослідженні за допомогою мас-спектрометрії або інших хімічних і фізичних аналізів.

Таблиця 1

Зміна процентного вмісту щодо основних типів РНК
в НВсAg залежно від тривалості процесу ферментації

Варіант	тРНК (%)	рРНК (%)	мРНК (%)
1 (10 год.)	0,1	76,3	23,6
2 (12 год.)	0,1	60,0	39,9
3 (14 год.)	0,09	54,9	45,0
4 (16 год.)	0,09	40,0	59,1(*)
5 (18 год.)	0,1	34,5	65,5(*)
6 (20 год.)	0,1	32,8	67,1(*)

Результати являють собою середні значення з п'яти вимірів. У стовпці з назвою "Варіант" тривалість ферментації зазначена в круглих скобках. тРНК: транспортна РНК, рРНК: рибосомна РНК і мРНК: матрична РНК. (*): Значима відмінність ($p < 0,05$).

Оцінка на мишах Balb/c імуногенності варіантів НВсAg з різним процентним вмістом мРНК

Після одержання різних варіантів НВсAg з різним процентним вмістом мРНК у частинці (Таблиця 1), імунологічні оцінки цих препаратів виконували на мишах Balb/c. Для цього дослідження використовували самок мишей віком 8-12 тижнів, зробивши дві імунізації в дні 0 і 15, п/ш шляхом, з дозою 1 мкг НВсAg у фосфатно-сольовому буфері (PBS), що вводиться в кінцевому об'ємі 100 мкл. Докладний опис схеми показано в Таблиці 2.

10

Таблиця 2

Схема імунізації для оцінки впливу
процентного вмісту мРНК у частинці НВсAg на імуногенність цього антигену

Група	Лікування	Кількість тварин
1	1 мкг НВсAg (23 % мРНК)	10
2	1 мкг НВсAg (39 % мРНК)	10
3	1 мкг НВсAg (45 % мРНК)	10
4	1 мкг НВсAg (60 % мРНК)	10
5	1 мкг НВсAg (65 % мРНК)	10
6	1 мкг НВсAg (67 % мРНК)	10
7	PBS 1×	10

Забір крові для оцінки продукування специфічних антитіл у результаті імунізації проводили через 10 днів після введення другої дози. Вимір продукування антитіл проти НВсAg проводили за допомогою методики ІФА.

Як показано на Фігурі 1, на якій представлені титри антитіл IgG проти НВсAg, отримані в кожній досліджуваній групі, продукування IgG проти НВсAg була значно вище в групах, що одержували НВсAg із вмістом мРНК вище 45 % (групи 3-6 у Таблиці 2). Між групами 3, 4, 5 і 6 не було виявлено значимих відмінностей, хоча спостерігали деяку тенденцію до збільшення відповіді IgG, пов'язаному зі збільшенням відсотка вмісту мРНК. Результати показують, що збільшення процентної частки мРНК, що міститься в частинці НВсAg на рівнях вище 45 % щодо сумарного вмісту РНК, надає цьому білку більш високу гуморальну імуногенність. Попередні аналізи структури субкласів IgG вказують на аналогічну активність на рівні імунної відповіді клітинного типу.

Приклад 2. Одержання вірусоподібних частинок (VLP) НВсAg з різними процентними частками фосфатидилсерину

Рекомбінантний НВсAg одержували зі штаму генетично трансформованих *P. pastoris* при використанні гена, який кодує цей антиген [європейський патент EP 480525]. Як відомо, НВсAg, що експресується у дріжджах цього виду, містить фосфатидилсерин у своїх структурних ліпідах [Lobaina Y, et al. Biotecnologia Aplicada (2008), 25: 325-331]. Однак, до даного винаходу вплив присутності даного ліпиду на імуногенність цього антигену не було вивчено.

3 метою дослідження того, як процентна частка фосфатидилсерину впливає на імуногенність HBsAg, одержували препарати зазначених VLP при різних умовах ферментації. Під час культивування у ферментерах для рекомбінантних дріжджів підвищували концентрацію $Mg^{(2+)}$ у середовищі культивування до процентного вмісту 1,0-2,0 %, що призводило до збільшення зазначеного фосфоліпиду, пов'язаного з VLP HBsAg. Це було виявлено за допомогою тонкошарової хроматографії в ході дослідження HBsAg, отриманого при різних умовах росту.

Фосфатидилсерин пов'язаний з VLP HBsAg, що характерно для ліпиду. Результати, показані в Таблиці 3, являють собою середні значення з п'яти різних повторюваностей. Очищення було аналогічним для всіх препаратів HBsAg, отриманих при різних експериментальних умовах. Як можна бачити з таблиці, фосфатидилсерин не був виявлений у зразках, отриманих при ферментації з культуральним середовищем, що містить концентрацію $Mg^{(2+)}$ нижче 1,2 %. Рівні фосфатидилсерину, виявлені в препараті, отриманому з культуральним середовищем, що містить 2,0 % $Mg^{(2+)}$, були значно вище рівнів, виявлених у препараті, отриманому з культуральним середовищем, що містить 1,4 % $Mg^{(2+)}$ (Варіант С).

Таблиця 3

Одержання варіантів HBsAg з кількістю, що підвищується, фосфатидилсерину

Варіант	Концентрація $Mg^{(2+)}$ (%)	ФС (%)
A	1,0	ND
B	1,2	ND
C	1,4	2,5±0,3
D	1,6	5,0±0,4 (*)
E	1,8	6,1±0,4 (*)
F	2,0	7,7±0,5 (**)

ND: Не виявлений. $Mg^{(2+)}$ (%): концентрація іона Mg (у відсотках), виявлена в сольових добавках середовища культивування. ФС (%): відсоток фосфатидилсерину від загального вмісту фосфоліпідів, визначений після виділення очищеного HBsAg. (*): Значимі відмінності ($p<0,05$),

(**) Високі значимі відмінності ($p<0,01$).

Препарати HBsAg, представлені в Таблиці 3, були ідентичні за білковим складом згідно з дослідженням, проведеним з метою вивчення їх первинної, вторинної і третинної структури, порівнюваної з вихідним варіантом. Важливо відзначити, що відношення концентрації ліпідів/концентрації білків не змінилося ні для одного з досліджуваних варіантів. Той же результат був отриманий із процентною часткою загального вмісту фосфоліпідів щодо загального вмісту білка. Ніякі інші істотні зміни не були зареєстровані в ході аналізу домішок HBsAg або інших міnorних сполук у результаті аналізу їх складу за допомогою мас-спектрометрії.

Приклад 3. Імунологічна оцінка препаратів HBsAg, що містять різні процентні частки фосфатидилсерину

3 метою оцінки, чи впливає присутність фосфатидилсерину на імунну відповідь проти HBsAg, проводили дослідження імуногенності на трансгенних мишах, які експресували HBsAg у сироватці [Castro FO, et al. Interferon у Biotecnologia (1989) 6: 251-257; Perez A, et al. Acta Biotechnol (1993) 13: 373-383]. Використовували сім груп по шість мишей у кожній. Самок мишей віком 8-12 тижнів імунізували інтраназальним шляхом (i/n). Перші шість досліджуваних груп одержували по 5 мкг різних варіантів HBsAg, описаних у Таблиці 3, з ад'ювантом Фрейнда. Сьома група використовувалася як контрольна група і одержувала PBS 1×. Усі групи лікування одержували 10 доз імуногену, який вводили раз на 14 днів. Забір крові проводили перед первинною імунізацією і через 10 днів після кожної дози, починаючи із третьої дози. У Таблиці 4 показані рівні HBsAg у крові трансгенних мишей, а також рівні цитокінів (IFN гама (IFN-γ), фактора некрозу пухлини (ФНП-α) і IL-2, індукованих у супернатантах культур спленоцитів, виділених після введення 10 доз. Аналіз проводили при використанні методики ІФА.

Після введення 5 мкг HBsAg i/n шляхом в 10 послідовних імунізаціях, концентрація HBsAg у крові трансгенних мишей за HBsAg була значно знижена, коли рівень фосфатидилсерину в зазначеному HBsAg становив 5 % або більше (варіанти D, E і F у Таблиці 3, Приклад 2). Аналогічним чином, варіанти HBsAg, що містять 5 % або більше фосфатидилсерину, індукували значно більш високі рівні IFN-γ, TNF-α і IL-2 у порівнянні з варіантами з низькими (варіант I3)

або такими, що не піддаються виявленню, рівнями фосфатидилсерину, що вказує на дозозалежний ефект. Це можна бачити в Таблиці 4.

При порівнянні з HBsAg, який не містить фосфатидилсерин, спостерігали значиме збільшення цитокінів Th1, при цьому більш висока здатність до елімінації циркулюючого HBsAg була виявлена після імунізації трансгенних мишей HBsAg варіантами HBsAg, що містять рівні фосфатидилсерину більше 5 % (Таблиця 4, варіанти D-F). Рівні цитокінів, які були виявлені для варіантів D-F, були значно вище, ніж при умовах A-C. Варіанти D-F індукували найбільше зниження концентрації HBsAg, а також найбільш активну секрецію цитокінів після *in vitro* стимуляції клітин селезінки в імунізованих трансгенних тварин.

Таблиця 4

Оцінка циркулюючого HBsAg і рівнів цитокінів після імунізації трансгенних мишей варіантами HBsAg з різним процентним вмістом фосфатидилсерину.

Варіант HBsAg	% зниження концентрації HBsAg	Секреція IFN- γ (пг/мл)	Секреція ФНО- α (пг/мл)	Секреція IL-2 (пг/мл)
A	20 $\pm$ 3	50 $\pm$ 7	37 $\pm$ 6	14 $\pm$ 6
B	23 $\pm$ 4	65 $\pm$ 12	45 $\pm$ 18	22 $\pm$ 4
C	26 $\pm$ 5	149 $\pm$ 15	200 $\pm$ 26	36 $\pm$ 7
D	66 $\pm$ 5 (*)	250 $\pm$ 20 (*)	570 $\pm$ 30 (*)	50 $\pm$ 5 (*)
E	70 $\pm$ 6 (*)	300 $\pm$ 27 (*)	660 $\pm$ 27 (*)	77 $\pm$ 8 (*)
F	90 $\pm$ 5 (**)	359 $\pm$ 31 (**)	750 $\pm$ 37 (**)	90 $\pm$ 10 (**)

A-F: Варіанти HBsAg, отримані з рівнями, що підвищуються, фосфатидилсерину у своєму складі, показані в Таблиці 3. (*): Значимі відмінності ($p < 0,05$), ** Високочислим відмінності ($p < 0,01$).

Спостерігали значиме збільшення цитокінів Th1 і більш високу здатність до елімінації циркулюючого HBsAg при імунізації мишей, які були трансгенними за HBsAg, варіантами HBsAg, що

мають більш високий вміст фосфатидилсерину, що продемонструє збільшення імуногенності антигену при збільшенні процентної частки даного ліпідного компонента в ліпідах, зв'язаних з VLP, формованих цим антигеном.

Про введення фосфатидилсерину в частинки HBsAg раніше повідомлялося в рівні техніки. Однак не було досліджено, яким чином процентна частка цього компонента впливає на імуногенність зазначених частинок. Хоча в 2008 році Лобаїна із співавт. обговорювали роль фосфатидилсерину в більш високій імуногенності HBsAg, що продукується в *P. pastoris* [Lobaina Y, et al. Applied Biotechnology (2008), 25: 325-331], у тому ж повідомленні було продемонстровано, що дві вакцини на основі HBsAg, отримані в тому ж хазяїні, відрізнялися за імуногенністю, хоча рівні фосфатидилсерину приблизно були однаковими, через вид дріжджів, у яких вони були отримані.

Приклад 4. Демонстрація підвищення імуногенності у хворих ХГВ варіантів HBsAg, що містять більш високу процентну частку інкапсульованої мРНК

У Прикладі 1 було показано на мишах, що було присутнє збільшення імуногенності HBsAg при збільшенні процентної частки мРНК у загальній кількості інкапсульованої РНК. З врахуванням таких результатів, досліджували імунологічні властивості і протівірусну відповідь *in vivo* композицій, що включають HBsAg і HBsAg, з модифікаціями щодо їх мРНК і фосфатидилсерину, відповідно.

Із цією метою проводили рандомізоване подвійне сліпе клінічне дослідження фази II в хронічних хворих на гепатит В. На початку дослідження відбирали пацієнтів з вірусним навантаженням вище 10000 копій/мл і позитивним HBsAg. Пацієнтів розподіляли в 6 груп по 15 пацієнтів, яким призначали лікування, описане в Таблиці 5. У цілому вводили 10 доз, які були розділені на два курси по 5 доз кожний, з інтервалом один місяць між ними. Перші 5 доз вводили тільки *i/n* шляхом, а інші 5 доз вводили одночасно *i/n* і *p/sh*. В обох курсах введення дози вводили з інтервалом 14 днів.

Таблиця 5

Групи лікування в клінічному дослідженні фази II, у якому проводили оцінку антигенів HBcAg і HBsAg з модифікаціями за вмістом мРНК і фосфатидилсерину, відповідно

Групи	Лікування
1	50 мкг мHBsAg+50 мкг мHBcAg
2	100 мкг мHBsAg+100 мкг мHBcAg
3	1000 мкг мHBsAg+1000 мкг мHBcAg
4	50 мкг HBsAg+50 мкг HBcAg
5	100 мкг HBsAg+100 мкг HBcAg
6	1000 мкг HBsAg+1000 мкг HBcAg

мHBcAg: HBcAg, що містить мРНК із процентною часткою 50 % від сумарної РНК цього антигену; мHBsAg: HBsAg, що містить 7 % фосфатидилсерину від ліпідних компонентів VLP.

Неочікувано, значно більш високі рівні сероконверсії в HBcAg і HBsAg були виявлені в групі пацієнтів, що одержували препарат, що містить обидва модифікованих антигени (тобто препарат, який містив HBsAg з рівнями фосфатидилсерину більше 5 % і HBcAg із мРНК більше 45 %), у порівнянні із групами пацієнтів, що одержували препарати без цих характеристик (див. Таблицю 6). Це демонструє значимість таких змін для поліпшення якості протівірусної відповіді, яка була викликана у пацієнтів.

У людей антигени оцінювали в діапазоні концентрацій від 50 мкг кожного антигену на дозу до 1000 мкг кожного антигену на дозу, з підтвердженням протівірусної відповіді, щодо сероконверсії в HBsAg і HBeAg, вірусологічного контролю і довгочасної вірусологічної відповіді до 10000 копій ДНК ВГВ у мл протягом більше 1 року після завершення лікування.

Таблиця 6

Частка пацієнтів із сероконверсією в HBeAg і HBsAg через рік після завершення лікування в клінічному дослідженні фази II з HBcAg і HBsAg, що мають модифікації за вмістом мРНК і фосфатидилсерину, відповідно.

Групи лікування	Сероконверсія в HBeAg	Сероконверсія в HBsAg
1	6/15	2/15
2	7/15	3/15
3	12/15	6/15
4	3/15	0/15
5	3/15	0/15
6	4/15	0/15

Подібні результати також були отримані в моделі на мишах, які були трансгенними за HBsAg, де дослідження проводили для оцінки таких же груп лікування, як описані в Таблиці 5, при цьому було отримано більше зменшення циркулюючого HBsAg, а також більш високі титри антитіл проти HBsAg і з більш ранньою появою, для груп, що одержують композиції, які містили антигени з модифікаціями, описаними вище.

Примітно, що композиції, які містять варіанти модифікованих HBcAg і HBsAg, розвивали більш високу Th1 імуногенність у мишей, трансгенних за ВГВ, і в пацієнтів у порівнянні з реакцією, отриманою з композиціями, що містять не модифіковані антигени, або композиціями, які містили тільки один із цих модифікованих антигенів.

Приклад 5. Ад'ювантний ефект антигенів HBcAg і HBsAg, що мають модифікації за вмістом мРНК і фосфатидилсерину, відповідно, у полівалентних композиціях

У цьому дослідженні порівнювали ад'ювантну здатність, тобто посилення імунної відповіді проти антигенів, які вводили спільно, у суміші рекомбінантних білків HBcAg і HBsAg з модифікаціями за вмістом мРНК і фосфатидилсерину, відповідно, із сумішшю немодифікованих HBcAg і HBsAg, парентеральним і мукозальним шляхами. Для цієї мети був вибраний рекомбінантний химерний білок CR3, який є мультиепітопним антигеном ВІЛ-1 [Iglesias E et al. J Biochem Mol Biol & Biophys (2001) 1: 109-122]. У восьми групах по вісім самок мишей Balb/c (H-2d) віком 6-8 тижнів вводили: 1) PBS (плацебо) шляхом п/ш імунізації (далі іменованій Плацебо

(п/ш)); 2) натрій-ацетатний буфер (NaAc), pH = 5,2, шляхом і/н імунізації (плацебо (і/н)); 3) суміш HBcAg (C) і HBsAg (S) п/ш (C+S (п/ш)); 4) суміш HBcAg, що містить мРНК у процентній частці 50 % від сумарної РНК даного антигену (mC), і HBsAg, що містить 7 % фосфатидилсерину від ліпідних компонентів (mS) п/ш (mC+mS (п/ш)); 5) C+S і/н (C+S (і/н)); 6) mC+mS і/н (mC+mS і/н); 7) суміш CR3 з HBcAg (C) і HBsAg (S) п/ш (CR3+C+S (п/ш)); 8) CR3+mC+mS (п/ш); 9) CR3+C+S (і/н) і 10) CR3+mC+mS (і/н). Використовувана доза становила 5 мкг кожного антигену на кожний шлях введення, при цьому імуногени вводили в дні 0, 7 і 21 схеми імунізації. Для п/ш імунізації білки розчиняли в PBS і адсорбували в 1,4 мг/мл гідроксиду алюмінію (Superfos Biosector A/S, Vedbaek, Denmark). Для і/н шляху білки розчиняли в NaAc, pH = 5,2. Тваринам, поміщеним у положення лежачи на спині, робили анестезію шляхом внутрішньоочеревинного (в/ч) введення 30 мкг кетаміну (10 мг/мл) і повільно вводили імуногени в 50 мкл (25 мкл/у ніздрю) через наконечник піпетки. Через десять днів після імунізації сироватку всіх тварин збирали і п'ять тварин умертвляли (випадковим чином) наприкінці дослідження для одержання їх селезінки для досліджень клітинної імунної відповіді.

Продуктування IgG у сироватці оцінювали за допомогою непрямого ІФА, у якому планшети були покриті білком CR3.

Методика кількісного аналізу секреції IFN- γ у супернатантах культур, стимульованих з CR3, була описана раніше [Garcia Diaz D et al. Immunol Lett (2013) 149: 77-84].

Розподіл Гаусса оцінювали для статистичного аналізу даних з використанням критерію Колмогорова-Смирнова і рівності дисперсій із критерієм Бартлетта. Зразки з нормальним розподілом (або такі, у яких визначали розподіл Гаусса) і з однаковою дисперсією порівнювали з параметричними критеріями; в іншому випадку використовували альтернативний непараметричний критерій. Усі титри IgG були перетворені в $\log_{10}$ для одержання нормального розподілу значень. Сироваткам тварин, які не досягали сероконверсії, присвоювали довільний титр 1:10 для статистичної обробки. Значення $p < 0,05$ вважали статистично значимим.

Результати визначення IgG антитіла проти CR3 (ВІЛ-1), спостережуваного на Фігурі 2, показали більш високу відповідь ($p < 0,05$) після введення п/ш і і/н шляхами в групах тварин, імунізованих сумішшю CR3+mC+mS (групи 8 і 10) у порівнянні з CR3+C+S (групи 7 і 9), відповідно. Відповідно до попередніх результатів більш високу секрецію IFN- γ також спостерігали в супернатантах культур мишей у тих же групах, які представлені в Таблиці 7. Для цього аналізу через десять днів після останньої імунізації (день 31) культивували спленоцити п'яти мишей з кожної групи. Суспензії спленоцитів окремих тварин підготовляли для групи плацебо. Їх стимулювали *ex vivo* 2,5 мкг/мл білка CR3 протягом п'яти днів. У супернатантних рідинах CR3-специфічний IFN- γ визначали кількісно за допомогою ІФА сандвіч -типу. Границя виявлення становила 0,8 0 нг/мл.

Таблиця 7

Секреція IFN- γ , виміряна в супернатантних рідинах культур.

Група	Інокулят	Повторюваність (миша)	IFN- γ (нг/мл)
1	Плацебо (п/ш)	Пул	<0,80
2	Плацебо (і/н)	Пул	<0,80
3	C+S (п/ш)	1	<0,80
		2	<0,80
		3	<0,80
		4	<0,80
		5	<0,80
4	mC+mS (п/ш)	1	<0,80
		2	<0,80
		3	<0,80
		4	<0,80
		5	<0,80
5	C+S (і/н)	1	<0,80
		2	<0,80
		3	<0,80
		4	<0,80
		5	<0,80
6	mC+mS (і/н)	1	<0,80
		2	<0,80

		3	<0,80
		4	<0,80
		5	<0,80
7	CR3+C+S(п/ш)	1	6,35
		2	7,86
		3	3,32
		4	4,45
		5	3,54
8	CR3+mC+mS (п/ш)	1	10,35
		2	9,86
		3	8,62
		4	9,05
		5	11,24
9	CR3+C+S(i/н)	1	<0,80
		2	2,03
		3	1,68
		4	0,97
		5	2,25
10	CR3+mC+mS (i/н)	1	4,55
		2	5,36
		3	3,87
		4	2,54
		5	3,98

Нарешті, відсоток CD8+ клітин, які є специфічними до CR3 (ВІЛ-1), порівнювали після ex vivo стимуляції в групах, імунізованих п/ш шляхом. Більш високий відсоток CD8+ клітин був отриманий у групі, стимульованій CR3+mC+mS (п/ш) у порівнянні з CR3+C+S (п/ш) ($p < 0,05$), що можна спостерігати на Фігурі 3.

Ці результати в цілому показують, що суміш HBsAg, що містить мРНК вище 45 % (mC), і HBsAg з рівнями фосфатидилсерину вище 5 % (mS) проявляє більш сильний Th1 ад'ювантний ефект при введенні парентеральним і мукозальним шляхами. Зокрема, у випадку вакцинації проти ВІЛ, цей результат вкрай важливий, оскільки протівірусну Th1 відповідь пов'язували із захистом від інфекції і прогресування в СНІД.

Хоча метою цього експерименту не був вимір гуморальної відповіді проти антигенів HBsAg і HBcAg (скорочено позначених у даному прикладі як C і S), спостерігали відповіді IgG проти HBcAg і проти HBsAg, які були більш високими і статистично значимими, у групах мишей, імунізованих сумішшю модифікованих антигенів HBsAg і HBcAg (mC+mS), у порівнянні із сумішшю немодифікованих HBsAg і HBcAg (C+S, дані не показані). Це підтверджувало наведені вище результати.

Приклад 6. Пасивна імунізація за допомогою адоптивного переносу клітин від мишей Balb/c, імунізованих композиціями HBsAg і HBcAg з модифікаціями за вмістом мРНК і фосфатидилсерину, відповідно, трансгенним мишам Balb/c, що експресують HBsAg.

У цьому винаході автори постаралися підсилити імунну відповідь проти HBsAg і проти HBcAg у донорів за допомогою активної імунізації пацієнтів композицією, що містить антигени HBsAg і HBcAg, які включають модифікації за вмістом фосфатидилсерину і мРНК, відповідно, і, крім того, клітини, що підлягають переносу, будуть активувати in vitro до переносу, тому відповідь на ці антигени буде максимальною, коли клітини будуть інокулювати в організм реципієнта. Таким чином, тип відповіді, яка не існує в пацієнтів, одержують штучно, що дозволяє розширити групу донорів до осіб з подібними гаплотипами, незалежно від того, чи були вони інфіковані ВГВ, чи ні.

У поточному прикладі за допомогою адоптивного переносу клітин оцінювали вплив імунної відповіді, викликаній в результаті вакцинації з використанням композиції, що складається з антигенів HBsAg і HBcAg з модифікаціями за вмістом фосфатидилсерину і мРНК, відповідно, яку застосовували i/н/парентеральним шляхами, щодо трансгенної миші, яка експресує HBsAg, моделі персистентної інфекції ВГВ. Однією із цілей дослідження була оцінка впливу перенесеної імунної відповіді на концентрацію HBsAg (антигенемія) у сироватці трансгенної миші. Крім того, порівнювали вплив відповіді, викликаній комбінацією i/н/парентерального шляхів при введенні композиції антигенів HBsAg і HBcAg у порівнянні із впливом, викликаним переносом клітин, що стимулюються тільки HBsAg in vivo і in vitro. Крім того, вивчали кінетику

перенесеного продукування антитіл проти HBsAg щодо трансгенної миші для цього антигену. Використовували мишей Balb/c і мишей, які були HBsAg (+) трансгенними (з генетичним фоном Balb/c, отриманих в CIGB).

- Одержання мишей Balb/c з імунітетом проти HBsAg Курс імунізації проводили на самках мишей Balb/c віком 8-12 тижнів. Мишей імунізували препаратом вакцини, що містить модифіковані антигени HBsAg (з вмістом фосфатидилсерину більше 5 %) і HBcAg (з вмістом мРНК більше 45 %), одночасно і/н і парентеральним шляхами. У випадку парентерального введення тестували в/м, п/ш і в/ш шляхи. Дозу (в об'ємі 100 мкл) вводили в дні 0 і 14 і повторну імунізацію робили в день 100 перед переносом. Забір крові робили з ретроорбітального сплетіння в дні 2, 10 і 25. У Таблиці 8 показана схема імунізації, що включає лікування, отримане кожною групою.

Таблиця 8

Схема імунізації у нетрансгенних мишей Balb/c

Група	Лікування	Шлях введення	Кількість тварин
1	mHBsAg+mHBcAg+галуни/mHBsAg+mHBcAg	в/м/і/н	13
2	mHBsAg+mHBcAg+галуни/mHBsAg+mHBcAg	п/ш/і/н	13
3	mHBsAg+mHBsAg+галуни/mHBsAg+mHBcAg	в/к/и/н	13
4	mHBsAg+mHBcAg/mHBsAg+mHBcAg	в/м/і/н	13
5	mHBsAg+mHBcAg/mHBsAg+mHBcAg	п/ш/і/н	13
6	mHBsAg+mHBcAg/mHBsAg+mHBcAg	в/к/и/н	13
7	галуни/PBS	в/м/і/н	9

mHBcAg: HBcAg, що містить мРНК у процентній частці 50 % від сумарної РНК даного антигену; mHBsAg: HBsAg, що містить 7 % фосфатидилсерину від загального вмісту ліпідних компонентів VLP.

- Оцінку імунної гуморальної відповіді, отриманої в результаті лікування, проводили шляхом виміру продукування IgG і субкласів IgG проти HBsAg, після кожного щеплення, за допомогою методики ІФА. Для оцінки клітинної імунної відповіді, через 10 днів після першого введення, проводили дослідження за типом ELISPOT, для виміру секреції специфічного IFN- γ проти HBsAg CD8⁺ лімфоцитами селезінки. Результати цих оцінок вказують, що Група 5 робить найбільш сильну клітинну відповідь і гуморальну відповідь, яка не відрізняється від іншої частини досліджуваних груп. На основі цього відібрали двох тварин із цієї групи як донорів спленоцитів для адоптивного переносу. Вибір імунотену проводили при співвідношенні 1:1 (HBsAg:HBcAg)

Одержання імунних спленоцитів

- Через п'ятнадцять днів після одержання бустерної імунізації, двох мишей із Групи 5 і трьох мишей із Групи 7 (плацебо) умертвляли і забирали їх селезінку. Селезінки із Групи 5 і із Групи 7, відповідно, групували. Селезінки обробляли для одержання спленоцитів. Їх ділили на аліквоти по 30×10^6 клітин в 100 мкл PBS 1 $\times$ для переносу реципієнтним мишам.

Адоптивний перенос імунітету

- Трансгенні миші, що експресують HBsAg, яких використовували як реципієнти, мали вік 16-20 тижнів і були представлені обома статтями. Їх розподіляли в різні групи лікування, як показано в Таблиці 9. Перед переносом спленоцитів проводили частковий забір крові для перевірки рівнів HBsAg у сироватці. Потім вводили (в/ч шляхом) 30×10^6 спленоцитів в об'ємі 100 мкл PBS 1 $\times$. Забір крові для оцінки ефекту адоптивного переносу імунітету робили з ретроорбітального сплетіння раз на тиждень протягом 5 тижнів. У тиждень 8 після переносу, у тварин забирали кров і умертвляли.

Схема експерименту із адоптивного переносу імунітету

Група	Лікування	Кількість тварин
1	Перенос спленоцитів мишей Balb/c з відповіддю проти HBsAg і HBcAg	3
2	Перенос спленоцитів мишей Balb/c з групи плацебо	3
3	PBS 1×	3

Кількісний аналіз HBsAg у сироватці мишей, трансгенних за HBsAg

Рівні HBsAg у сироватці визначали за допомогою ІФА.

- 5 Планшети покривали моноклональним антитілом проти HBsAg, названим Нер4 (виробництва CIGB). Усі миші, що одержували клітини з попереднім імунітетом до HBsAg, показали при оцінці через тиждень після переносу помітне зменшення HBsAg у сироватці, зі значимими відмінностями між нульовим моментом і 2-м і 3-м тижнями ($p < 0,05$). На четвертий тиждень (день 35) помітили, що концентрації HBsAg у сироватці почали збільшуватися, що
- 10 вказувало на те, що контроль антигенемії за допомогою перенесеного імунітету знижується. Із цього моменту і до тижня 8 (день 63) не спостерігали ніяких відмінностей в антигенемії, спостережуваних в нульовий момент дослідження.

- У випадку мишей, підданих переносу спленоцитів зі специфічним імунітетом проти HBsAg, виявили помітні зниження HBsAg у сироватці, які були найбільш помітними в дні 7-28. Однак
- 15 миші, які одержували плацебо перенос спленоцитів або PBS, хоча і мали зміни концентрації HBsAg у сироватці, але вони не досягали значимої відмінності з нульовим моментом, і значення нижче 5 мкг/мл ніколи не реєстрували.

- Ці результати вказують, що за допомогою адоптивного переносу імунітету, опосередкованого клітинами, можна ефективно знизити рівні HBsAg, що циркулює в сироватці
- 20 цих тварин, трансгенних за цим білком. Контроль, встановлений щодо антигенемії імунною відповіддю, перенесеним у цьому випадку, був ефективним і тривав протягом приблизно 3 тижнів після однократного переносу клітин.

Продуктування IgG проти HBsAg у сироватці

- Специфічна гуморальна імунна відповідь IgG проти HBsAg була виявлена у всіх мишей, підданих переносу спленоцитів з попереднім імунітетом до цього антигену. Це узгоджується з
- 25 отриманими результатами за антигенемією. У тварин з відповіддю проти HBsAg виявлені титри були високими (титр $> 10^4$) і починали знижуватися в третій тиждень, що може бути пов'язане з підвищенням антигенемії, яке спостерігали в цих тварин приблизно в 4-й тиждень (день 35). Групи, піддані переносу плацебо клітин або PBS, не показали наявності специфічних антитіл.

30

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Фармацевтична композиція, яка містить ядерний антиген вірусу гепатиту В (HBcAg) і
- 35 поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg), яка **відрізняється** тим, що ядерний антиген вірусу гепатиту В (HBcAg) включає матричну рибонуклеїнову кислоту (мРНК) у відсотковій частці 45,0-67,1 % від загальної кількості рибонуклеїнової кислоти (РНК) цього антигену, і поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) включає фосфатидилсерин у відсотковій частці 5,0-8,2 % від загальної кількості фосфоліпідів цього антигену.
2. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вона містить співвідношення
- 40 антигенів 1:1 концентрації білка.
3. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вона складена для введення парентеральним і мукозальним шляхами.
4. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вона додатково включає ад'ювант вакцини.
- 45 5. Застосування фармацевтичної композиції, яка містить ядерний антиген вірусу гепатиту В (HBcAg), який включає матричну рибонуклеїнову кислоту (мРНК) у відсотковій частці, яка становить 45,0-67,1 % від загальної кількості рибонуклеїнової кислоти (РНК) цього антигену, і поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg), який включає фосфатидилсерин у відсотковій частці 5,0-8,2 % від загальної кількості фосфоліпідів цього антигену, в одержанні лікарського

засобу, призначеного для застосування в імунній профілактиці або імунотерапії проти інфекції, викликаній вірусом гепатиту В (ВГВ).

6. Застосування за п. 5, де лікарський засіб призначений для введення парентеральним і мукозальним шляхами.

5 7. Застосування за п. 5, де лікарський засіб використовують у лікуванні пацієнтів із хронічним гепатитом В (ХГВ) або пацієнтів з коінфекціями, де одним з вірусів, що інфікує, є вірус гепатиту В.

8. Застосування за п. 7, де лікування пацієнтів із ХГВ використовують у запобіганні гепатоцелюлярному раку, що виник у результаті інфекції, викликаній ВГВ.

10 9. Застосування за п. 5, де імунотерапію проводять в активній або пасивній формі шляхом клітинної стимуляції.

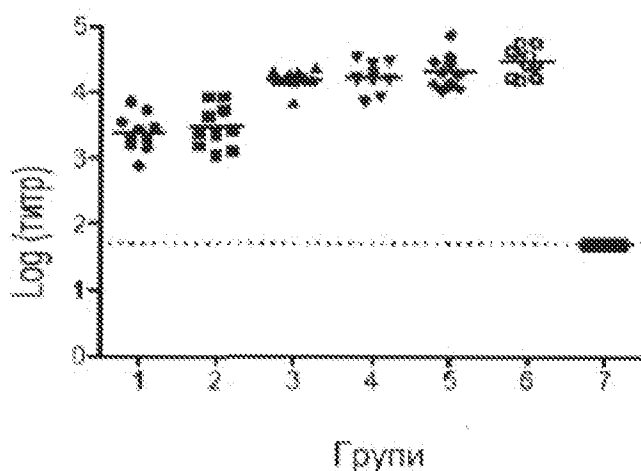


Fig. 1

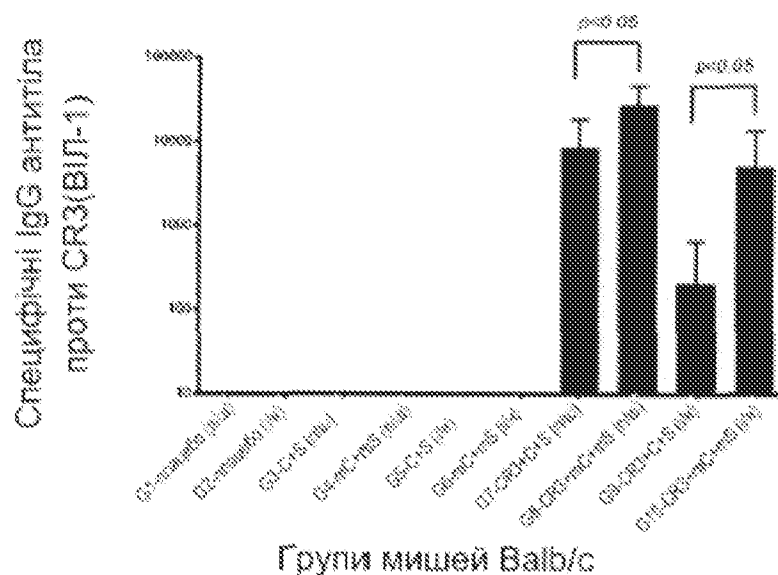


Fig. 2

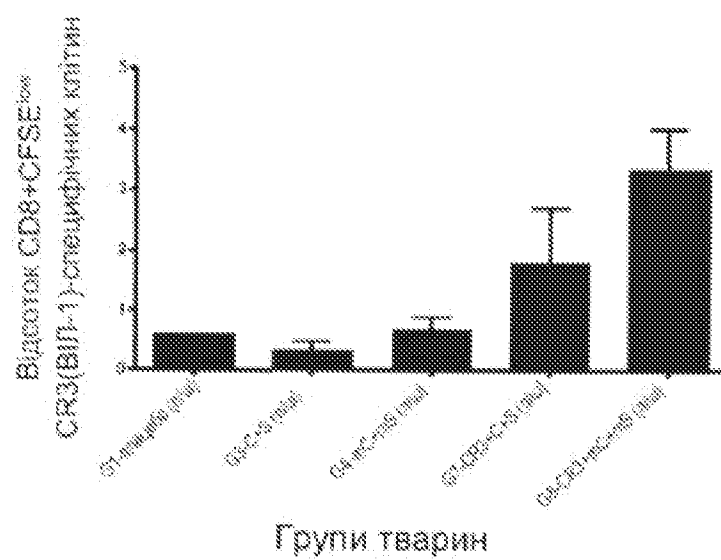


Fig. 3